

2m11.3017.10

Université de Montréal

***Étude de l'adhésion du collagène sur des surfaces chimiquement modifiées
par SPR, AFM et PM-IRRAS***

par

Audrée Andersen

Département de Chimie
Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M. Sc.)
en Chimie

Août, 2002

©, Audrée Andersen, 2002



QD

3

U54

2002

N.032

1000

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

*Étude de l'adhésion du collagène sur des surfaces chimiquement modifiées
par SPR, AFM et PM-IRRAS*

présenté par

Audrée Andersen

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Pr. Gilles Durocher
Président-rapporteur

Pr. Antonella Badia
Directrice de recherche

Pr. Thomas H. Ellis
Codirecteur de recherche

Pr. Françoise Winnik
Membre du jury

RÉSUMÉ

Le collagène est un composant clé de plusieurs matériaux biologiques, tels les os, les tendons, le cartilage, la peau et les dents. L'organisation moléculaire du collagène en fibrilles est largement responsable du rôle structural que joue cette protéine dans ce type de matériel. Le principal but de ce projet est de caractériser l'adhésion du collagène sur différentes surfaces chimiquement modifiées pouvant être utilisées en vue de contrôler et de diriger l'assemblage du collagène en structures bien définies. Ces structures revêtent un rôle important pour les implants de cartilage ou de peau, et peuvent aussi être utilisées comme substrats pour la culture cellulaire.

L'adhésion de différents thiols formant des monocouches auto-assemblées (SAMs) sur l'or a tout d'abord été vérifiée par la spectroscopie de résonance de plasmons de surfaces (SPR). Les épaisseurs obtenues ont été comparées à des valeurs de la littérature. Par la suite, l'adhésion du collagène de type 1 sur différentes SAMs a été étudiée par microscopie à force atomique (AFM) et par spectroscopie infrarouge de réflexion-adsorption en polarisation-modulation (PM-IRRAS). De plus, la cinétique d'adhésion de cette protéine sur ces surfaces a été investiguée par SPR. Nous avons comparé l'adhésion et la croissance du collagène sur différentes surfaces hydrophiles (terminaisons hydroxyles et carboxylate) et hydrophobe (terminaison méthyle). De plus, nous avons exploré l'influence de la longueur de la chaîne des SAMs sur l'adhésion du collagène pour la terminaison méthyle (C₈, C₁₁, C₁₆, C₁₈). Des mesures d'épaisseurs de fibrilles ont été calculées à la fois à partir de la SPR et des images AFM. Enfin, l'utilisation de la technique de micro-contact printing (μ CP) a permis d'observer la sélectivité de l'adhésion du collagène en présence de deux différentes surfaces.

Mots Clés : Collagène, Fibrilles, Spectroscopie de résonance de plasmons de surface, Microscopie à force atomique, Spectroscopie infrarouge de réflexion adsorption en modulation de polarisation, micro-contact printing

ABSTRACT

Collagen is a key component in biological materials such as bone, cartilage, teeth, tendons and skin. The organisation of collagen molecules into fibrils is largely responsible for the structural role that collagen plays in these materials. The goal of this work was to characterize the adhesion of this protein on different chemically modified surfaces so that in the future, these can be used to control and direct the assembly of collagen into well-defined structures. Such structures are important for bone cartilage or skin grafts, and can also used as substrates for cell cultures.

The formation of the self-assembled monolayers (SAMs) used for collagen adsorption was first followed by surface plasmon resonance spectroscopy (SPR). The film thicknesses are comparable with literature values. The adhesion of type I collagen from calf skin on SAMs under physiological conditions was studied by Atomic Force Microscopy (AFM) and by Polarization-Modulation Reflection-Absorption Infrared Spectroscopy (PM-IRRAS). Moreover, the kinetics of the adhesion of collagen on the SAMs was investigated by SPR. We compared the adhesion and growth of collagen on different hydrophilic (hydroxyl and carboxyl end groups) and hydrophobic surfaces (methyl end group). Furthermore, we explored the influence of the alkyl chain length (C_8 , C_{11} , C_{16} , C_{18}) for the methyl terminated SAMs. Collagen fibrils thicknesses measurements were measured by SPR and AFM. Finally, the use of micro-contact printing (μ CP) allowed the observation of the selectivity of the collagen adhesion on chemically patterned surfaces.

Key words : Collagen, Fibrils, Surface Plasmon Resonance Spectroscopy, Atomic Force Microscopy, Polarization-Modulation Reflection-Absorption Infrared Spectroscopy, Micro-Contact Printing.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des Tableaux	vii
Liste des Figures	ix
Liste des abréviations	xvi
Remerciements	xvii

CHAPITRE 1

INTRODUCTION	1
1.1 Collagène	2
1.2 Monocouches auto-assemblées	7
1.3 Spectroscopie de résonance des plasmons de surface	9
1.4 Microscopie à force atomique	14
1.5 Spectroscopie infrarouge de réflexion absorption par polarisation de modulation	20
1.6 Survol du mémoire	24
Références	25

CHAPITRE 2

PARTIE EXPÉRIMENTALE	30
2.1 Préparation des couches d'or	30
2.2 Formation des SAMs	31
2.3 Adhésion du collagène	32
2.4 Micro-contact Printing	33
2.5 Manipulations SPR	35
2.5.1 Préparation de la cellule	36
2.5.2 Expériences SPR	37
2.5.3 Modélisation de Fresnel	38
2.6 Analyses AFM	38
2.7 Analyses PM-IRRAS	39
Références	41

CHAPITRE 3

ÉTUDE DE L'ADHÉSION DE THIOLS SUR L'OR PAR SPR ET PM-IRRAS	42
3.1 Caractérisation des SAMs par SPR	42
3.1.1 Cinétique de l'adhésion des thiols	42
3.1.2 Épaisseur des thiols	46
3.2 Caractérisation des SAMs par PM-IRRAS	52
3.3 Conclusions	57
Références	58

CHAPITRE 4

ÉTUDE DE L'ADHÉSION DU COLLAGÈNE PAR SPR, AFM & PM-IRRAS .	60
4.1 Étude de l'adhésion du collagène sur l'hexadécane-thiol	60
4.1.1 Cinétique de l'adhésion du collagène par SPR et AFM	62
4.1.2 Épaisseur du collagène par SPR et AFM	66
4.2 Étude de l'adhésion du collagène en fonction de la longueur de la chaîne	71
4.2.1 Cinétique de l'adhésion du collagène par SPR et AFM	71
4.2.2 Épaisseur du collagène par SPR et AFM	75
4.3 Étude de l'adhésion du collagène en fonction de la terminaison de la chaîne	81
4.3.1 Cinétique de l'adhésion du collagène par SPR et AFM	81
4.3.2 Épaisseur du collagène par SPR	85
4.4 Étude de l'adhésion du collagène par PM-IRRAS	89
4.4.1 Analyse de l'adhésion du collagène sur un C16	90
4.4.2 Analyse de l'adhésion du collagène sur le C8, le C11 et le C18	95
4.4.3 Analyse de l'adhésion du collagène sur les terminaisons hydrophiles	96
4.5 Étude de l'adhésion du collagène sur des surfaces μCP	100
4.5.1 Surfaces μ CP C8-C16	101
4.5.2 Surfaces μ CP (C15-COOH)-(C15-CH ₃)	103
4.6 Conclusion	107
Références	109

CHAPITRE 5**CONCLUSIONS & PERSPECTIVES 112****5.1 Implications des résultats obtenus pour l'adhésion du collagène . 112****5.2 Perspectives 114**

Références 116

ANNEXE 1

Données sur les plasmons de volume et les plasmons de surface . . 118

Références 126

ANNEXE 2

Exemple de modélisation sur les courbes SPR pour les mesures d'épaisseur du collagène 127

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1	Composition chimique du collagène de type I : principaux acides aminés.	3
Tableau 3.1	Paramètres utilisés pour la modélisation de l'épaisseur des thiols	46
Tableau 3.2	Valeurs obtenues pour les épaisseurs et la pente de différentes courbes de l'épaisseur en fonction du nombre de carbones	48
Tableau 3.3	Valeurs expérimentales d'épaisseurs mesurées pour le C11-OH, le C10-COOH et le C15-COOH	50
Tableau 3.4	Attribution des pics aux différents modes d'élongation pour les alkanethiols étudiés	53
Tableau 3.5	Attribution des pics aux différents modes d'élongation (ν) pour la région des basses fréquences pour le C11-OH, le C10-COOH et le C15-COOH	54
Tableau 3.6	Attribution des pics aux différents modes d'élongation pour la région des hautes fréquences pour le C11-OH, le C10-COOH et le C15- COOH.	56
Tableau 4.1	Attribution des bandes de différents modes d'élongation pour l'adhésion du collagène sur un C16	90
Tableau 4.2	Fréquences observées relatives aux bandes Amides I et II pour différentes conformations structurales des protéines.	93
Tableau 4.3	Attribution des bandes de la région des basses fréquences pour l'adhésion du collagène sur un C16	93

Tableau 4.4	Attribution des bandes pour l'adhésion du collagène sur un C8, un C11 et un C18 à divers temps d'incubation	96
Tableau 4.5	Attribution des bandes pour l'adhésion du collagène sur un C11-OH à divers temps d'incubation	98
Tableau 4.6	Attribution des bandes pour l'adhésion du collagène sur un C15-COOH à divers temps d'incubation	98
Tableau 4.7	Attribution des bandes pour l'adhésion du collagène sur un C10-COOH à divers temps d'incubation	98

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Molécule de collagène de type I	4
Figure 1.2	A. Processus de formation de fibrilles matures du collagène de type I, B. Image obtenue par microscopie à force atomique (topographie, 2,28 μm x 2,28 μm) de fibrilles de collagène de type I. L'analyse de ligne d'une fibrille permet d'apprécier la périodicité de 67 nm	5
Figure 1.3	Phénomène d'adsorption des thiols sur une surface d'or	8
Figure 1.4	Schéma d'une courbe SPR (i.e. réflectivité en fonction de l'angle d'incidence)	12
Figure 1.5	Cinétique d'adsorption A. en fonction de l'angle de couplage et B. en fonction de la réflectivité	13
Figure 1.6	Schéma d'un système AFM	15
Figure 1.7	Fonctionnement général d'un photodétecteur	15
Figure 1.8	Courbe de Van der Waals	17
Figure 1.9	Mesure sur le photodétecteur prise en A. Mode AFM et B. Mode LFM.	18
Figure 1.10	Changement de friction A. en fonction de la composition chimique et B. en fonction de la pente de l'échantillon	19
Figure 1.11	Vecteurs électriques incidents et réfléchis pour une radiation polarisée-p et polarisée-s sur une surface métallique	20

Figure 1.12	Schéma du système optique d'un PM-IRRAS tiré de la littérature	23
Figure 2.1	Étapes nécessaires à l'obtention d'une surface μ CP .	34
Figure 2.2	Schéma du spectromètre SPR de Resonant Probes GmbH .	35
Figure 2.3	Schéma de la cellule SPR	36
Figure 2.4	Schéma du système PM-IRRAS utilisé	40
Figure 3.1	Cinétique de l'auto-assemblage de monocouches d'alcanethiol sur l'or selon les discussions présentées dans la littérature ..	43
Figure 3.2	Courbes de la variation de l'angle de couplage (degrés) en fonction du temps (1000 minutes) pour (A) différents thiols hydrophobes et (B) pour différents thiols hydrophiles	44
Figure 3.3	Courbes de la variation de l'angle de couplage (degrés) en fonction du temps (200 minutes) pour (A) tous les thiols hydrophobes utilisés et (B) pour tous les thiols hydrophiles utilisés	45
Figure 3.4	Exemple de courbes expérimentales (points rouges, Au-EtOH, points bleus, Au-C16-EtOH) et modélisées (ligne rouge Au-EtOH, ligne bleue, Au-C16-EtOH) prises en spectroscopie SPR	47
Figure 3.5	Épaisseur des thiols en fonction du nombre de CH_2 . — droite calculée (chaînes ayant un angle de 25° avec la normale); ▲ valeurs expérimentales (EtOH anhydre) et régression linéaire; ◆ valeurs expérimentales (solution tampon) et régression linéaire	48

- Figure 3.6** Schématisation des ponts-hydrogène possibles entre deux molécules du thiol C15-COOH 51
- Figure 3.7** Spectres PM-IRRAS (région hautes fréquences) et rapports d'intensités entre les bandes d⁺ et r⁺ des thiols avec terminaison -CH₃ 53
- Figure 3.8** Spectres PM-IRRAS (région basses fréquences et hautes fréquences) des thiols C11-OH, C10-COOH et C15-COOH 54
- Figure 4.1** Images AFM (topographie), collagène adsorbé sur une SAM de C16. (Incubation 90 minutes) Adsorption effectuée à : **A.** 37°C et **B.** 23,5°C. **C.** Image AFM (topographie), SAM de C16 sur l'or 61
- Figure 4.2.** **A.** Cinétique de l'adhésion du collagène sur une SAM de C16 par spectroscopie SPR. **B.** Images AFM (topographie) de l'adhésion du collagène sur la SAM de C16 à **a.** 5 minutes, **b.** 10 minutes, **c.** 15 minutes, **d.** 35 minutes, **e.** 75 minutes, **f.** 120 minutes et **g.** 15 heures 63
- Figure 4.3** Image AFM du collagène adsorbé sur une SAM de C16. Période d'incubation de 120 minutes 65
- Figure 4.4** Exemple de mesure de l'épaisseur d'un film uniforme de collagène pour une incubation de 120 minutes (2 µm x 2 µm) à partir d'une image AFM (topographie) 65
- Figure 4.5** Épaisseur du collagène adhérent sur un C-16, mesuré par SPR, à divers temps d'incubation 66

- Figure 4.6** Épaisseur des fibrilles de collagène adhérees sur un C-16, mesurée par AFM, à divers temps d'incubation 67
- Figure 4.7** Distribution de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) d'une certaine épaisseur. (SAM de C16) 69-70
- Figure 4.8** Cinétique de l'adhésion du collagène sur un C8 (noir), un C11 (rouge), un C16 (vert) et un C18 (orange) par spectroscopie SPR 72
- Figure 4.9** Images AFM (A, B, C : 75 μm x 75 μm ; D à I : 100 μm x 100 μm , I détail 10 μm x 10 μm) de l'adhésion du collagène sur **A.** C8 (15 minutes), **B.** C8 (34 minutes), **C.** C8 (15 heures), **D.** C11 (15 minutes), **E.** C11 (35 minutes), **F.** C11 (15 heures), **G.** C18 (15 minutes), **H.** C18 (35 minutes), **I.** C18 (15 heures) 73
- Figure 4.10** Taux de recouvrement du collagène (en pourcentage) en fonction du temps pour tous les thiols à terminaison méthyle étudiés 74
- Figure 4.11** Épaisseur du collagène adhéree sur un C8 (rouge), un C11 (orange), un C16 (jaune) et un C18 (vert) mesuré par SPR, à divers temps d'incubation 76
- Figure 4.12** Épaisseur des fibrilles de collagène adhérees sur un C8 (rouge), un C11 (orange), un C16 (jaune) et un C18 (vert) mesurée par AFM, à divers temps d'incubation. L'épaisseur rapportée est la moyenne de 50 fibrilles différentes 76
- Figure 4.13** Distribution par tranche de 10 nm de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) adhérees sur un C8 77

- Figure 4.14** Distribution par tranche de 10 nm de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) adhérees sur un C11 78
- Figure 4.15** Distribution par tranche de 10 nm de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) adhérees sur un C18 78
- Figure 4.16** Épaisseur moyenne des fibrilles en fonction du temps d'incubation pour le C8 (noir), le C11 (rouge) et le C18 (orange). 80
- Figure 4.17** Cinétique de l'adhésion du collagène sur un C11-OH, un C10-COOH et un C15-COOH par spectroscopie SPR 82
- Figure 4.18** Images AFM (A à F : 50 μm x 50 μm ; G et H : 100 μm x 100 μm , I : 75 μm x 75 μm) de l'adhésion du collagène sur **A.** C11-OH (15 minutes), **B.** C11-OH (35 minutes), **C.** C11-OH (15 heures), **D.** C10-COOH (15 minutes), **E.** C10-COOH (35 minutes), **F.** C10-COOH (15 heures), **G.** C15-COOH (15 minutes), **H.** C15-COOH (35 minutes), **I.** C15-COOH (15 heures) 83
- Figure 4.19** Épaisseur du collagène adhéree sur un C11-OH, un C10-COOH et un C15-COOH mesuré par SPR, à divers temps d'incubation 85
- Figure 4.20** Exemple de spectre infrarouge du collagène de type I provenant de la littérature 89
- Figure 4.21** Spectres PM-IRRAS de la région des hautes fréquences du collagène sur le C16. **A.** C16 seul, **B.** 2 heures d'incubation, **C.** 4 heures d'incubation, **D.** 24 heures d'incubation 91

- Figure 4.22** Spectres PM-IRRAS de la région des basses fréquences du collagène sur le C16. **A.** 2 heures d'incubation, **B.** 4 heures d'incubation, **C.** 24 heures d'incubation 94
- Figure 4.23** Image AFM obtenue en mode friction d'une surface C15-COOH (cercles) et de C15-CH₃ (fond) 101
- Figure 4.24** Image AFM (mode friction) d'une surface μ cp C15-CH₃ (fond)-C7-CH₃ (cercles) recouverte de collagène (incubation 48 heures) 102
- Figure 4.25** Images AFM (2 exemples différents en mode friction) d'une surface μ cp C15-CH₃ (fond)-C7-CH₃ (cercles) recouverte de collagène (incubation 1 heure) 102
- Figure 4.26** Images AFM obtenues en mode friction d'une surface μ cp C15-CH₃(fond)-C15-COOH(cercles) recouverte de collagène **A.** 1D et **B.** 3D. (incubation 1 heure) 103
- Figure 4.27** Images AFM obtenues en mode topographie de surfaces μ cp C15-CH₃(fond)-C15-COOH(cercles) recouverte de collagène (incubation 24 heures) 104
- Figure 4.28** Spectres PM-IRRAS de la région des basses fréquences du collagène sur le (C15-CH₃) –(C15-COOH). (1 heure d'incubation) 104
- Figure 4.29** Relief observé une surface μ CP C15-CH₃(fond)-C15-COOH(cercles) recouverte de collagène (24 heures d'incubation) 105

- Figure A.1** Fonction diélectrique du gaz d'électrons libres en fonction de la fréquence angulaire de l'onde incidente exprimée par rapport à la fréquence de plasma ω_p 109
- Figure A.2** Représentation schématique de l'évolution d'un plasmon de volume dans le temps. 111
- Figure A.3** Pertes d'énergie d'un électron lors de l'excitation des plasmons de volume et de surface 113
- Figure A.4** Couplage d'une onde électromagnétique incidente polarisée-p (plan xz) avec un plasmon de surface 114
- Figure A.5** Courbes de modélisation de Fresnel de **A.** C16 dans la solution tampon et **B.** C16 avec collagène dans la solution tampon (rouge : expérimental, noir : modélisation) 116

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> - Microscopie à force atomique
C8	octanethiol
C11	undecanethiol
C16	hexadecanethiol
C18	octadecanethiol
C10-COOH	1-mercapto-acide undécanoïque
C11-OH	1-mercapto-undecanol
C15-COOH	1-mercapto-acide hexadecanoïque
EtOH	Éthanol
IR	Infrarouge
IRRAS	Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption
LFM	<i>Lateral Force Microscopy</i> – Microscopie en mode friction
PEM	<i>photoelastic modulator</i> - modulateur photoélastique
PM-IRRAS	Spectroscopie Infrarouge de réflexion-absorption à modulation de polarisation
RF	Résonance de Fermi
SAM(s)	<i>self-assembled monolayer(s)</i> – Monocouche(s) auto-assemblée(s)
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> - Résonance de plasmons de surface
THF	Tétrahydrofuranne

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, le professeur Antonella Badia, pour avoir bien voulu m'accepter dans son groupe. Ses conseils judicieux, sa rigueur scientifique et sa disponibilité m'ont grandement aidée, surtout dans les derniers milles de cette aventure.

Je voudrais aussi remercier mon co-directeur de recherche, le professeur Thomas H. Ellis. Ses discussions fructueuses en idées nouvelles, ainsi que ses encouragements constants ont grandement été appréciés.

En faisant la navette entre mes deux groupes, j'ai eu grand plaisir à côtoyer plusieurs personnes. Il m'a été possible de profiter de leur expérience variée, de leurs conseils et de leurs encouragements. Merci à Florence et Maritza pour leur amitié, à Jackie pour sa gentillesse et à Patricia pour toutes ces histoires hilarantes sur l'heure du dîner, à Eve pour son aide toujours renouvelée et à Michal pour les minutes conseil SPR. Merci également à Lori pour sa camaraderie et sa grande générosité et à Marc et Craig pour leurs conseils techniques spectroscopiques.

Je voudrais aussi remercier mes parents, mes trois petites sœurs et mon grand-petit frère, qui, même loin de moi, m'ont encouragée du mieux qu'ils ont pu. Merci pour les pots de confiture aux framboises, et pour toutes ces petites attentions lors de mes visites quasi-mensuelles. Merci aussi à mon amie Julie... toutes ces heures de défoulement téléphonique furent bénéfiques!

Enfin, je tiens à remercier du fond du cœur Sébastien qui, quotidiennement, m'a montré qu'il suffit d'un peu de volonté pour arriver au bout de nos peines. Merci pour les multiples encouragements, tant dans les moments difficiles que dans ceux plus faciles. Merci d'être là... sans toi, Montréal aurait certainement été plus difficile à apprivoiser.

« Toutes les sciences ont leur chimère, après laquelle elles courent, sans la pouvoir attraper; mais elles attrapent en chemin d'autres connaissances fort utiles. »

Bernard le Bouyer de Fontenelle (1657-1757)

à mes Parents & à Papé

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

Le collagène est un composant clé de plusieurs matériaux biologiques, tels les os, les tendons, le cartilage, la peau et les dents. En effet, l'organisation moléculaire du collagène en fibrilles est largement responsable du rôle structural que joue cette protéine dans ce type de matériel. Le principal objectif de ce projet était donc de déterminer quelles surfaces, chimiquement modifiées, peuvent être utilisées en vue de contrôler et de diriger l'assemblage du collagène en structures bien définies. On vise donc à caractériser l'adhésion du collagène sur diverses surfaces potentielles. Ce but reste le premier volet d'un projet de longue haleine, qui pourra mener à diverses applications biotechnologiques.

Le contrôle de la croissance de ces structures revêt un rôle important pour les implants dentaires, de cartilage ou de peau. De plus, ces structures peuvent être utilisées comme substrats pour la culture cellulaire. Dans le premier cas, on essaie plus spécifiquement de contrôler l'adhésion du collagène pour ensuite le minéraliser avec de l'hydroxyapatite, afin de créer une dentine artificielle. En disposant cette dentine artificielle de manière contrôlée sur la surface des implants dentaires, on peut ainsi améliorer l'adhésion de l'implant dans la dent et limiter les risques de rejet. D'autre part, en réussissant à contrôler la croissance du collagène sur une surface, on peut cultiver des matrices cellulaires selon des patrons rigoureux et ouvrir ainsi la voie à la compréhension de phénomènes jusqu'ici méconnus^{1,2}.

Ce projet comporte donc plusieurs étapes qui demandent des connaissances en chimie, en physique, en biochimie et en biotechnologie. Une analyse qualitative et quantitative de l'adhésion du collagène sur diverses surfaces modèles est présentée ici. Pour ce faire, on a utilisé les techniques de microscopie à force atomique (AFM), de spectroscopie de résonance de plasmons de surfaces (SPR) et de spectroscopie infrarouge d'absorption-réflexion en modulation de polarisation (PM-IRRAS). De plus, les premiers résultats concernant la croissance contrôlée de cette protéine sont décrits à la fin de ce rapport.

1.1 COLLAGÈNE

Les fibres de collagène apparaissent très tôt dans le développement embryonnaire, au moment où on commence à voir une différenciation entre les parties du corps humain. Ces fibres sont responsables de l'intégrité structurale de chaque partie constitutive du corps, comme les os ou la peau, et jouent aussi un rôle dans la formation des vaisseaux sanguins et de la plupart des organes. Le collagène est donc une protéine très importante pour le corps humain et se décline selon plusieurs types, dépendant de sa provenance. Jusqu'à maintenant, les scientifiques reconnaissent plus de 19 différents types de collagène et dans plusieurs cas, leur structure moléculaire a été élucidée³. Dans le cadre de ce présent projet, nos recherches se concentrent plutôt sur le collagène de type I, un des principaux composants de la dentine humaine⁴⁻⁶.

Le collagène est formé d'une série plus ou moins régulière d'acides aminés, qui diffère légèrement d'un type de collagène à l'autre. Dans le cas du collagène de type I, on remarque que les molécules forment une structure primaire constituée principalement de glycine (Gly), de proline (Pro) et d'hydroxyproline (Hyp). De manière idéale, on retrouve un arrangement (Gly-X-Y)_n répétitif, où X et Y sont généralement soit Pro, soit Hyp. Le tableau 1.1 montre les structures et les pourcentages exacts des principaux acides aminés constituant les molécules de collagène de type I. Ces pourcentages ont été calculés à partir de la quantité de résidus d'acides aminés par 1000 résidus^{4,5,7}.

Acide aminé	Structure chimique	Tête	Charge à pH physiologique	pourcentage
Glycine		polaire	neutre	33.1
Proline		non-polaire	neutre	11.9
Alanine		polaire	neutre	11.0
4-hydroxyproline		polaire	neutre	10.2
Lysine		polaire	positive	2.3

Tableau 1.1 Composition chimique du collagène de type I : principaux acides aminés⁴⁻⁶.

Les molécules de collagène de type I ont une longueur d'environ 300 nm. Elles forment une triple-hélice, tel que présenté à la figure 1.1. De plus, ces hélices possèdent des zones hydrophobes et des zones chargées électrostatiquement qui permettent aux molécules de collagène de s'associer pour former des fibrilles, une conformation jouant un rôle très important dans la formation de structures complexes du corps humain.

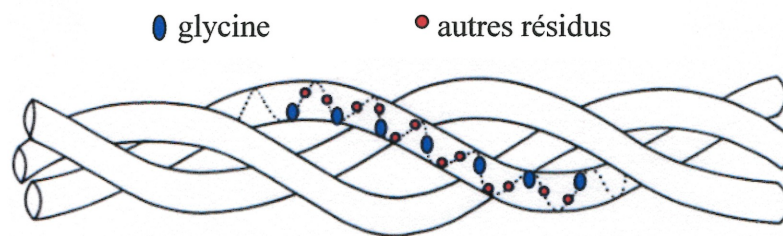
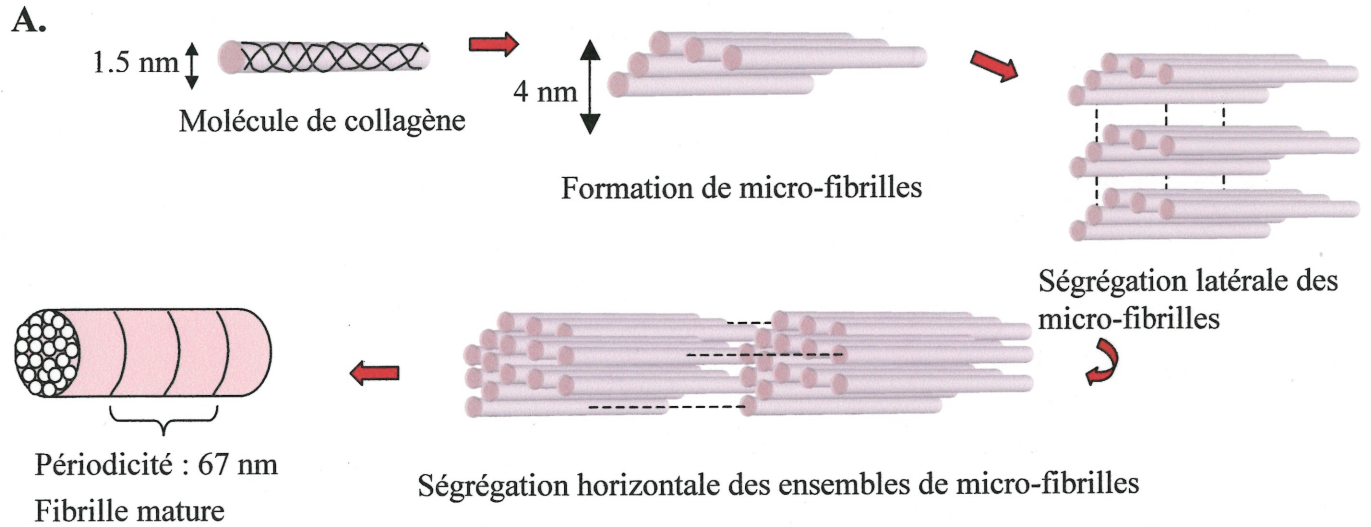


Figure 1.1 Molécule de collagène de type I¹

La formation de fibrilles de collagène⁷ est présentée schématiquement à la figure 2. Lors de la première étape, cinq molécules de collagène s'associent pour former des micro-fibrilles. Ces micro-fibrilles ont une épaisseur d'environ 4 nm. Par la suite, on sait que les ensembles de micro-fibrilles s'associent par ségrégation latérale, pour former des ensembles de micro-fibrilles d'épaisseur plus importante. Finalement, la ségrégation horizontale de ces paquets de micro-fibrilles engendre la formation d'une fibrille dite mature, qui possède une périodicité de 67 nm⁴⁻⁶. Cette périodicité apparaît conséquemment à l'arrangement structural des micro-fibrilles entre elles.

Cette périodicité reste une indication très précieuse quant à la nature d'une fibrille. En effet, une fibrille plus âgée possédera une périodicité différente (variant entre 62 nm et moins de 50 nm) et il en sera de même pour une fibrille dénaturée, que ce soit thermiquement, chimiquement ou de toute autre manière que ce soit^{6,7}. Il va sans dire que cette information est donc très utile pour vérifier l'état des protéines lors de nos expériences. Un exemple d'image obtenue par microscopie à force atomique montrant une périodicité de 67 nm est d'ailleurs présenté à la Figure 1.2.

**B.**

	Line1		
	X (µm)	Z(nm)	
Point1:	0.246	51.4	Zmin: 0.0 nm
Point2:	-0.178	48.9	Zmax: 65.5 nm
Diff:	-0.067	-2.5	Scan Range: 2 µm
Length:	0.067 µm		Resolution: 512 x 512
Pt Angle:	2.15°		

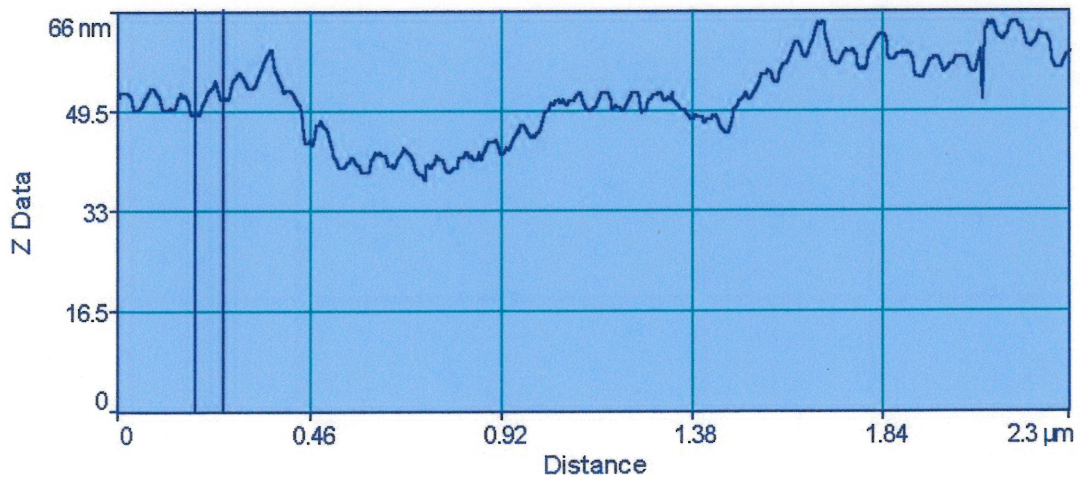
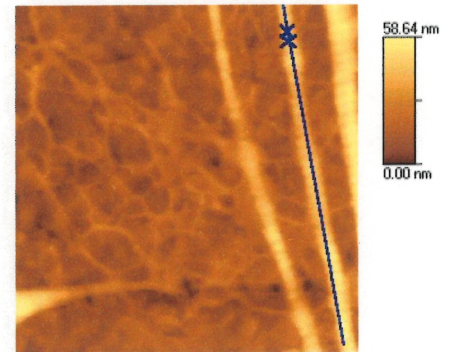


Figure 1.2 A. Processus de formation de fibrilles matures du collagène de type I, B. Image obtenue par microscopie à force atomique (topographie, 2,28 µm x 2,28 µm) de fibrilles de collagène de type I. L'analyse de ligne d'une fibrille permet d'apprécier la périodicité de 67 nm.

Tel que mentionné précédemment, le collagène joue un rôle très important dans le corps humain car il entre dans la composition de la plupart de ses parties constitutives. Le collagène de type I, pour sa part, est associé à la formation des os, du derme, de la membrane placentaire, des tendons et de la dentine⁴. C'est d'ailleurs le seul type de collagène qui s'associe à une composante solide, soit l'hydroxyapatite. En conséquence, le mélange de la protéine avec ces cristaux de phosphate de calcium engendre des propriétés mécaniques inhabituelles pour une protéine. On peut donner ici à titre d'exemple une résistance à la tension élevée (10 kg/mm^2)³.

Le collagène constitue le réseau protéique permettant l'adhésion des cellules sur une surface. Les mécanismes d'adhésion et de communication cellulaire sont complexes, mais il devient nécessaire d'en posséder une meilleure compréhension afin d'améliorer la biocompatibilité. Plusieurs travaux de recherche ont démontré que l'orientation des peptides sur un biomatériau est très importante pour éviter une réponse étrangère de la part des cellules face à un implant⁸. Il est possible de varier l'orientation et la conformation des peptides ou des protéines de manière à favoriser l'adhésion cellulaire.

La création de surfaces possédant des protéines ayant une orientation ou une morphologie contrôlées permettrait donc de diminuer les rejets liés aux implants. L'étude présentée ici s'inscrit dans cet ordre d'idée et vise à fabriquer des surfaces possédant des applications dans le domaine des biomatériaux où l'adhésion et la croissance du collagène sont contrôlées. Cependant, avant d'arriver à cette croissance structurée du collagène, il faut caractériser son adhésion sur des surfaces potentielles aux applications visées.

1.2 MONOCOUCHEs AUTO-ASSEMBLÉES

La structure et le mode de croissance de couches monomoléculaires sont étudiés depuis très longtemps. En effet, pour retrouver la première observation du phénomène dans l'histoire, il faut remonter plus de deux cents ans en arrière, lorsque Benjamin Franklin observa l'effet de l'étalement de l'huile sur l'eau⁹. Au 19^{ème} siècle, Agnès Pockels fut la première à préparer des monocouches à l'interface air-eau¹⁰⁻¹³. Par la suite, le domaine devenant très en vogue, plusieurs scientifiques ont dirigé leurs recherches vers ce sujet¹⁴⁻¹⁶. En 1917, Irving Langmuir s'intéressa aux monocouches de molécules à caractère amphiphile. Enfin, Katherine Blodgett fut la première à étudier la déposition de ces couches sur des substrats solides^{17,18}, d'où le nom Langmuir-Blodgett utilisé aujourd'hui pour ce genre de monocouches^{19,20}. Ce n'est cependant que plus tard que Zisman²¹, Blackman et Dewar²² ont étudié de manière plus systématique les monocouches auto-assemblées (SAMs)^{23,24}. Ce concept permet de fabriquer facilement un système tant hautement orienté que moléculairement spécifique, qui peut être utilisé comme substrat chimiquement spécifique pour des études d'adsorption. Ainsi, cette technologie peut être particulièrement intéressante dans plusieurs domaines, dont les biotechnologies et l'électronique moléculaire.

Le concept d'auto-assemblage peut être défini simplement par la formation spontanée d'une structure complexe et organisée conduite par diverses interactions moléculaires (liaisons hydrogène, interactions Van der Waals, ioniques, hydrophiles, hydrophobes, etc.). C'est aussi un principe qu'on retrouve aisément dans la nature, par exemple, lorsqu'il est question de la formation de membranes lipidiques.

Plusieurs systèmes peuvent être utilisés en vue de l'obtention de SAMs. Cependant, le système le mieux connu, et celui utilisé dans le cadre de ce projet, est constitué de thiols en solution s'adsorbant chimiquement sur l'or^{25,26}. Dans ce cas, les interactions responsables de la stabilité du système sont les interactions or-soufre,

les interactions Van der Waals entre les chaînes alcanes ainsi que les interactions entre les terminaisons chimiques.

Un organothiols possède une liaison S-H (E_1 : 338 kJ/mol)²⁷ chimiquement plus faible que la liaison S-Au (E_1 : 418 ± 25 kJ/mol)²⁸. De plus, l'or est assez réactif pour briser une liaison S-H. D'abord, on observe une physisorption du thiol à la surface de l'or (E_d : 126 kJ/mol)²⁹. Par la suite, il se produit une chimisorption (ΔH : -29 kJ/mol)²⁹ entre l'atome de soufre et celui d'or, alors qu'il se produit une désorption recombinative entre les atomes d'hydrogène. Le phénomène est illustré à la figure 1.3 :

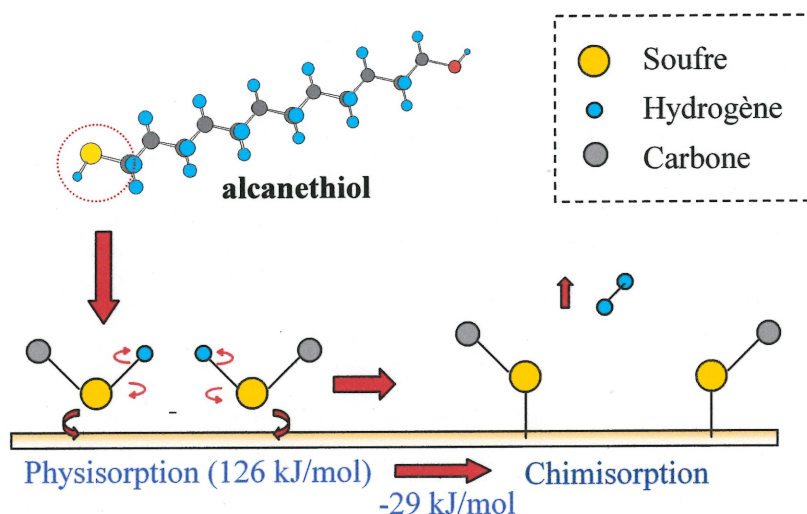


Figure 1.3 Phénomène d'adsorption des thiols sur une surface d'or

La méthode de fabrication des SAMs est relativement simple. On prépare tout d'abord une solution de thiol. Par la suite, on laisse incuber des plaquettes d'or dans cette solution pour une période de temps variant entre 18 et 24 heures, de manière à obtenir une couche la mieux organisée possible²⁴. Au cours de ce projet, on favorisera cette méthode de fabrication de surface par rapport à des surfaces de polymères pour sa rapidité et sa facilité d'exécution et ses résultats spectaculaires au niveau de l'organisation moléculaire. De plus, sa spécificité chimique possible et sa densité moléculaire importante occasionnée lors de la formation de la monocouche sont des avantages à ne pas négliger^{24,29}.

1.3 SPECTROSCOPIE DE RÉSONANCE DES PLASMONS DE SURFACE

Le phénomène des plasmons fut découvert il y a bien longtemps. En effet, Wood³⁰ fut l'un des premiers à observer expérimentalement ce concept au début du XX^{ème} siècle. Ce n'est cependant que cinquante ans plus tard, soit en 1957, que les premiers résultats associés aux plasmons de volume et de surface furent publiés, par Ritchie et al³¹. Les premiers travaux portant sur la résonance des plasmons de surface relatifs aux films minces furent publiés en 1976³². Par la suite, grâce aux recherches associées aux bio-capteurs³³, cette technique s'est répandue rapidement et est devenue disponible commercialement. Dans le cadre de l'étude d'adsorption des protéines, la SPR devient très utile pour observer la cinétique de l'adhésion et par le fait même, les changements de conformations. De plus, elle permet d'obtenir l'épaisseur des protéines adsorbées.

Un plasmon de surface est une onde évanescente dont le champ électrique est maximum à l'interface de deux médias. De plus, le champ électrique de ce dernier diminue exponentiellement avec la distance par rapport à l'interface. On peut donc considérer que le plasmon de surface se propage à une interface selon un mode électromagnétique couplé à une onde de densité de charge de surface. Des explications plus élaborées sur la nature des plasmons ainsi que leur propagation sont présentées à l'annexe 1.

La spectroscopie de résonance des plasmons de surface (SPR) consiste en une excitation des plasmons de surface à une interface métal-diélectrique à l'aide d'une onde électromagnétique (i.e. faisceau laser polarisé-p). Ainsi, la SPR permet de caractériser l'épaisseur, l'indice de réfraction réel et le coefficient d'adsorption du métal (ex. : or, argent ou cuivre) ainsi que de la couche diélectrique adjacente³⁴. Cette dernière peut être une monocouche auto-assemblée, une bicouche lipidique, un film de polymère, etc³⁴.

Lorsque l'angle de la lumière incidente arrive à une valeur précise, on observe une diminution rapide de l'intensité du faisceau laser, jusqu'à l'obtention d'un minimum, qu'on appelle angle de couplage θ_c . Ce minimum correspond à l'excitation des plasmons de surface. On peut caractériser les différents paramètres énumérés ci-haut à partir du déplacement de l'angle de couplage selon l'équation suivante³⁵ :

$$\Delta\theta_c(\lambda) = c_1\Delta n(\lambda) + c_2\Delta d \quad [1]$$

Comme le montre cette équation, l'angle de couplage (θ) varie proportionnellement selon l'indice de réfraction (Δn) et l'épaisseur moyenne de la couche déposée (Δd). De plus, λ est la longueur d'onde utilisée et c_1 et c_2 sont des constantes déterminées à partir de la modulation de Fresnel.

Il existe plusieurs méthodes de couplage, mais deux sont plus populaires. Elles ont été proposées respectivement par Otto³⁶ et par Kretschmann³⁷ et ces méthodes portent aujourd'hui leurs noms. Dans la conformation de Kretschmann, soit celle utilisée au cours de ce projet, les plasmons sont excités par une onde évanescente générée par réflexion totale interne de la lumière incidente dans un prisme de verre. Cette onde évanescente pénètre le film métallique qui est à la surface du prisme. Ce film métallique agit comme un résonateur qui est conduit par le champ électrique des photons incidents. Ce champ induit des plasmons de surface à l'interface métal-diélectrique.

Dans cette conformation, les photons ne sont pas couplés à l'interface métal-diélectrique mais plutôt via une traînée de lumière évanescente qui provient de la lumière ayant subi une réflexion totale interne. Celle-ci possède un vecteur d'onde plus grand que celui de l'onde dans l'air et peut ainsi se coupler aux plasmons de surface. C'est donc en choisissant un angle d'incidence approprié que les plasmons de surface sont obtenus. On peut ajouter que seule une lumière polarisée parallèlement au plan de la surface métallique peut exciter des plasmons de surface.

Il est possible d'obtenir deux formes de spectres SPR, soit celui de la réflectance en fonction de l'angle d'incidence ou alors, en fonction de la longueur d'onde. Pour un spectre à une fréquence d'onde incidente fixe, on a un minimum d'intensité lumineuse à un maximum de couplage entre la lumière incidente et les plasmons de surface. On a donc à ces paramètres précis une absorption maximale de lumière. L'angle d'incidence auquel est associé ce maximum de couplage est donc très important puisqu'il est très dépendant de l'indice de réfraction et de l'épaisseur des médias présents. Par contre, lorsqu'on garde l'angle d'incidence fixe et que la fréquence de l'onde varie, les valeurs des constantes diélectriques et des médias sont modifiées. Cependant, on retrouve à un certain point que la condition de résonance est satisfaite et que la lumière incidente est absorbée.

Tel que mentionné précédemment, les spectres SPR de réflectance en fonction de l'angle de couplage peuvent donner des informations relatives à trois paramètres : la position angulaire, qui donne de l'information sur l'épaisseur du métal (t) et de la couche diélectrique, la largeur angulaire, qui donne plutôt de l'information sur les indices de réfraction réels (n) et finalement, la profondeur de résonance, qui caractérise plutôt le coefficient d'absorption (k).

Lorsqu'on veut étudier les paramètres n , k et t de n'importe quelle couche diélectrique, il faut cependant déterminer auparavant n , k et t pour le métal seul. On peut aujourd'hui le faire par simulation (analyses de Fresnel). Enfin, il faut mentionner que la position angulaire et la forme de la courbe de résonance sont très sensibles aux propriétés optiques du film métallique et du médium adjacent à la surface métallique. En général, plus on augmente l'épaisseur de la couche diélectrique, plus l'angle est déplacé. Ceci permet de suivre en temps réel divers processus d'adsorption de molécules à la surface du métal.

On peut suivre la cinétique des processus d'adsorption de deux manières. Tout d'abord, on peut suivre le déplacement de l'angle de couplage en fonction du temps (Figure 1.5A). Cette méthode est certainement la plus connue et la plus utilisée. On peut aussi prendre un point précis de la courbe SPR et suivre ce point en fonction du temps (Figure 1.5B). On fera alors une cinétique en fonction de la réflectivité à un angle d'incidence fixe. Cette méthode est cependant moins utilisée, due aux fluctuations d'intensité du laser.

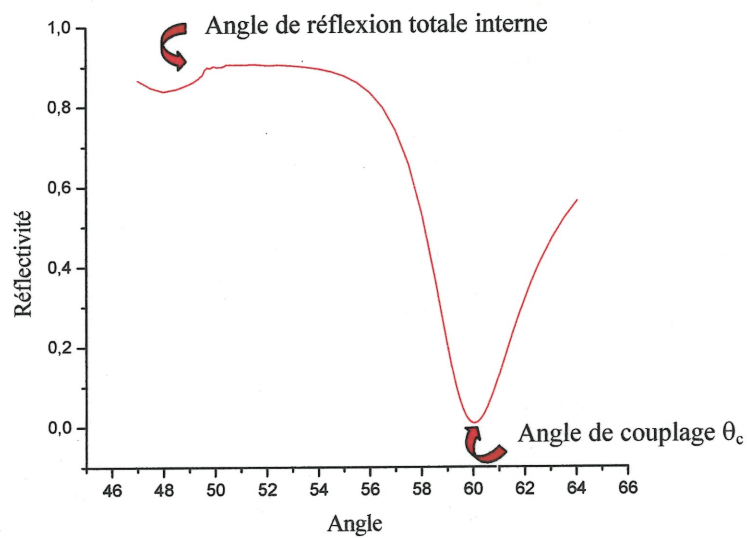


Figure 1.4 Schéma d'une courbe SPR (i.e. réflectivité en fonction de l'angle d'incidence).

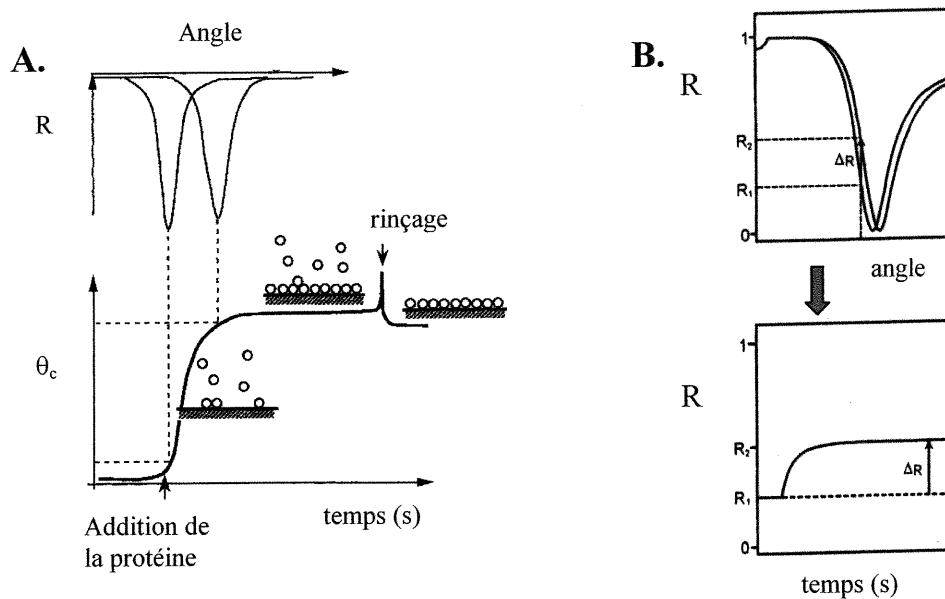


Figure 1.5 Cinétique d'adsorption **A.** en fonction de l'angle de couplage et **B.** en fonction de la réflectivité.

Cette technique spectroscopique en est donc une particulièrement sensible, donc performante. Comme elle est très sensible au changement de l'indice de réfraction des médias présents, l'adsorption de molécules à la surface du mince film métallique ou des changements conformationnels de molécules déjà présentes sur ce même film peuvent être détectés. Donc, on peut utiliser cette technique pour étudier *in situ* des réactions chimiques et physiques qui ont lieu sur diverses interfaces métalliques. De plus, elle permet de mesurer en temps réel, sans aucun marquage chimique, la détection, la dynamique et les changements structuraux se produisant au cours d'interactions biomoléculaires à l'interface métal/solution sans l'influence de la sous-phase. Il s'agit là d'un des principaux avantages de cette technique.

1.4 MICROSCOPIE À FORCE ATOMIQUE

Le domaine de la microscopie s'est surtout développé au cours du siècle dernier grâce à l'essor spectaculaire de la recherche scientifique et du désir de voir toujours plus petit. En effet, la communauté scientifique cherchait un moyen pour dépasser la limite imposée par la diffraction de la lumière ($\sim 2\mu\text{m}$). On a donc assisté à l'apparition des microscopes électroniques à balayage ainsi qu'à celle des microscopes électroniques à transmission dans les années 1930-1940. En 1981, Binnig et Rohrer ont permis d'atteindre une résolution atomique en imagerie grâce à leur microscope à effet tunnel (scanning tunnelling microscopy)³⁸. Cette méthode nécessitant des échantillons conducteurs, ces deux mêmes chercheurs introduisirent sur le marché en 1986 le microscope à force atomique³⁹ qui ne possède pas ce facteur limitant. Cette dernière est couramment utilisée dans le cadre de l'étude de la morphologie des surfaces et permet de déterminer de nombreuses caractéristiques en regard de cette dernière. Plus précisément, dans le cadre de la présente étude, la microscopie AFM permet d'étudier les structures adoptées par le collagène sur différentes surfaces. De plus, elle permet de vérifier si le collagène est dénaturé.

La microscopie à force atomique (AFM) consiste à balayer une surface à l'aide d'une sonde, en l'occurrence une pointe dont le bout possède un diamètre plus petit que 100 Å. Cette pointe est située à l'extrémité d'un microlevier mou qui peut être long de 100-200 μm . Les forces occasionnées par l'interaction entre cette sonde et l'échantillon (ex. : forces de Van der Waals, électrostatiques et capillaires) engendrent une déflexion du microlevier. Ces déflexions sont mesurées par un photodétecteur, au fur et à mesure que la sonde balaye l'échantillon, et permettent à l'ordinateur de générer une carte de la topographie de la surface. Un schéma d'un AFM est présenté à la Figure 1.6⁴⁰.

En regardant de plus près le système de détection de l'appareil, on remarque que la plupart des AFM détectent la position du microlevier grâce à des techniques optiques. Un laser est en effet réfléchi sur le dos du microlevier, pour ensuite

atteindre un photodétecteur sensible à la position. Lorsque le microlevier subit une déflexion, la position du laser sur le détecteur change et on mesure ainsi, par exemple, les changements de topographie. Un schéma explicatif est présenté à la Figure 1.7. Il existe d'autres systèmes de détection, comme l'utilisation d'un matériau piézo-résistif comme composante de microlevier. Cette méthode ne nécessite pas de laser et de photodétecteur mais reste beaucoup plus rare et peu utilisée puisqu'elle est moins sensible.

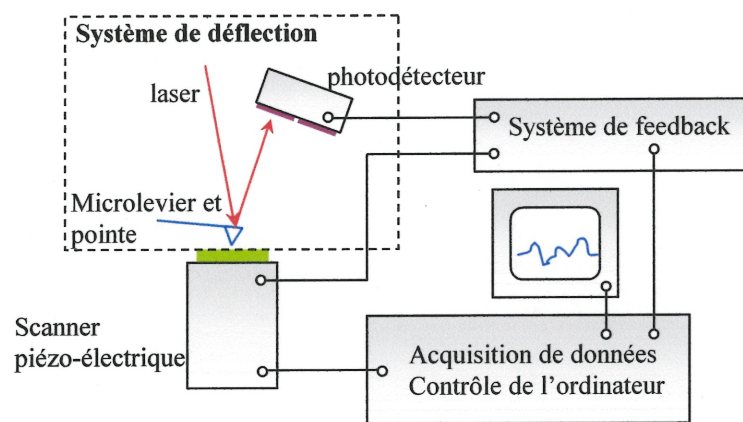


Figure 1.6 Schéma d'un système AFM.

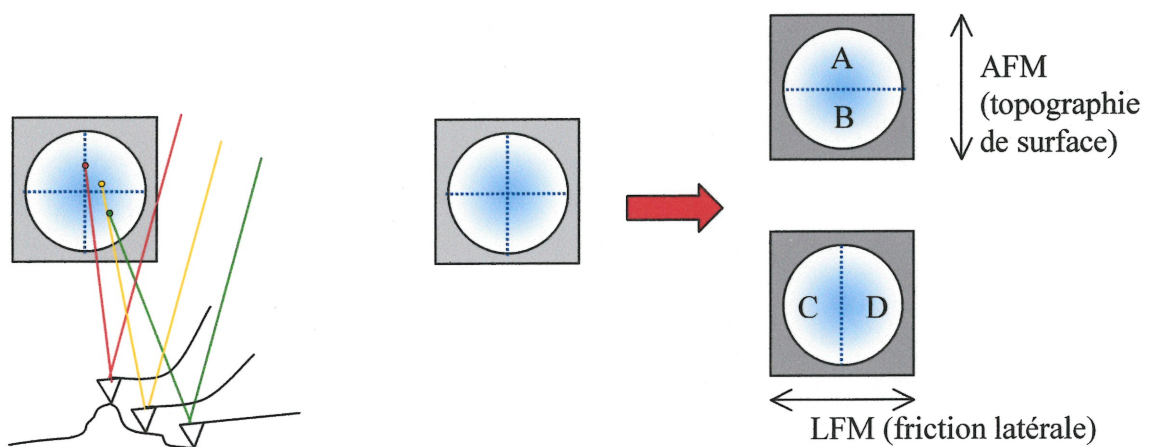


Figure 1.7 Fonctionnement général d'un photodétecteur.

Le scanner permet de déterminer la surface analysée. Il est composé de piézo-électriques (un piézo-électrique pour chacune des trois dimensions X, Y et Z), qui s'allongent ou se contractent proportionnellement au voltage appliqué. Ceux-ci sont indépendants les uns des autres. Dans certains cas, la sonde repose sur le système piézo-électrique, et l'échantillon reste immobile, mais pour l'appareil utilisé dans le cadre de ce projet, c'est plutôt l'échantillon qui repose sur le système piézo-électrique et la sonde qui reste immobile.

On retrouve sur le marché plusieurs types de pointes AFM, chacune ayant des caractéristiques particulières. Certaines possèdent une constante de force petite et d'autres, une constante plus grande, tout dépendant de l'utilisation qu'on en fait. En effet, une pointe utilisée en mode contact (nous y reviendrons ultérieurement) nécessite un microlevier plus "mou" (constante de force 0,06-0,58 N/m), puisqu'il subira des déflexions importantes. Cependant, une pointe utilisée en mode tappingTM demande un microlevier plus rigide (~ 40 N/m) pour pouvoir vibrer à des fréquences de résonance élevées (~ 300 kHz).

Il existe plusieurs modes d'imagerie en AFM. Cependant, nous présenterons seulement les modes qui ont été utilisés au cours des diverses manipulations relatives à ce projet.

MODE CONTACT

Le mode contact en AFM, aussi connu sous le nom de mode répulsif, provient d'un contact physique entre la pointe et l'échantillon. Ainsi, le scanner fait bouger l'échantillon de manière à ce que la pointe touche toute la surface étudiée, le microlevier subissant des changements de déflexion dont on tire une topographie. Pour mieux comprendre le phénomène, on peut regarder la courbe de Van der Waals présentée à la Figure 1.8⁴¹.

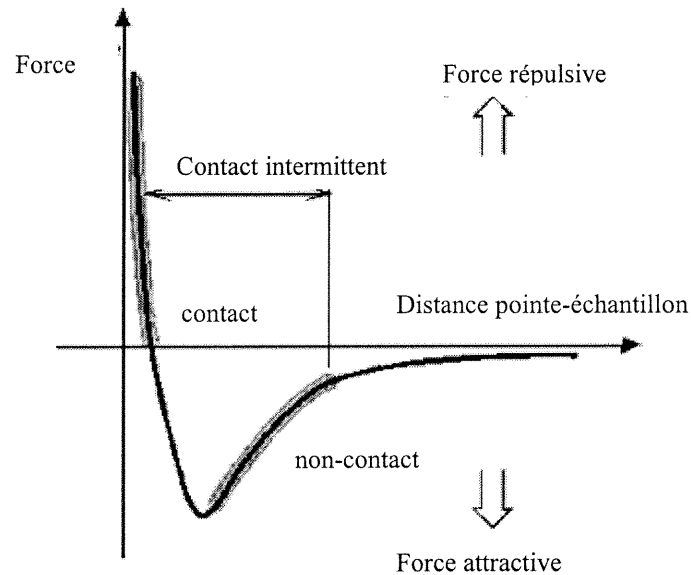


Figure 1.8 Courbe de Van der Waals.

Sur la Figure 1.8, on voit que plus on se situe dans la portion de droite de la courbe, plus on est loin de la surface. On peut dire que l'axe des ordonnées représente la surface, et la courbe, la distance entre la pointe et cette surface. Lorsqu'on s'approche de celle-ci, de faibles forces d'attraction attirent la pointe vers l'échantillon. Plus on approche, plus ces forces deviennent importantes, jusqu'à ce que les atomes de la pointe soient si près de ceux de l'échantillon qu'ils commencent à se repousser électrostatiquement. Plus la distance diminue, plus cette répulsion électrostatique devient importante au détriment des forces attractives. À un point précis, les forces attractives et répulsives deviennent égales et s'annulent donc. Ceci arrive lorsque la pointe est à une distance de quelques angströms de la surface. Enfin, lorsque les forces Van der Waals deviennent seulement positives, la pointe est en contact avec l'échantillon⁴⁰. Ces forces modifient la déflexion du microlevier et permettent d'obtenir une topographie de la surface.

MODE FRICTION

La microscopie en mode friction (LFM, lateral force microscopy) mesure les déflexions latérales d'un microlevier lorsque celui-ci subit des forces qui sont parallèles au plan de la surface. Un schéma est présenté à la Figure 1.9. Ce type de microscopie est utile pour imager des surfaces qui possèdent des inhomogénéités chimiques ou viscoélastiques ou tout simplement pour apporter des informations supplémentaires à une image prise en topographie⁴⁰.

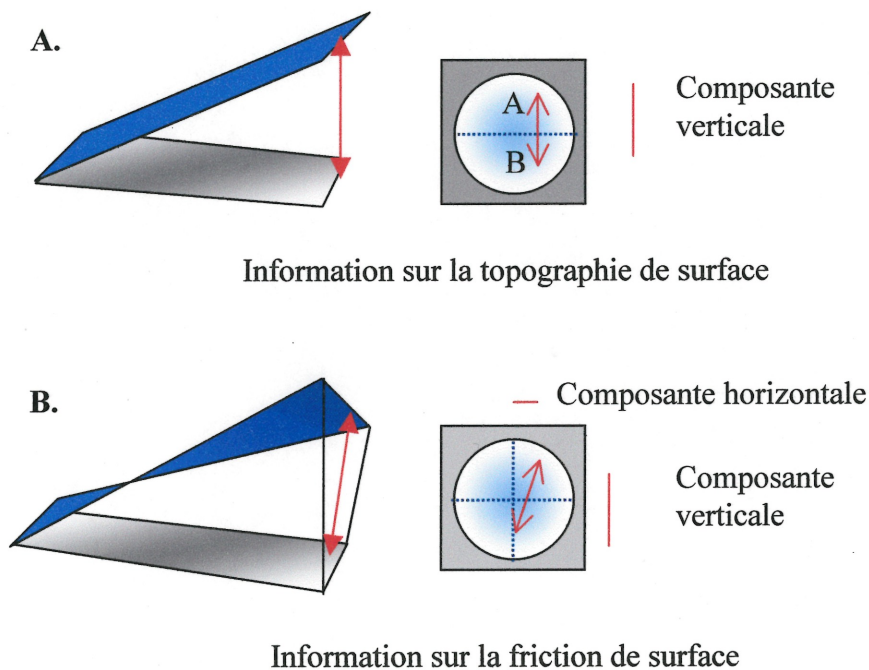


Figure 1.9 Mesure sur le photodétecteur prise en **A.** Mode AFM et **B.** Mode LFM.

Les déflexions latérales du microlevier peuvent provenir de deux causes. Tout d'abord, on observe une déflexion latérale lorsque la surface change de composition chimique ou moléculaire. Ceci amène un changement de friction entre la pointe et l'échantillon et donc une déformation du microlevier. Ensuite, on peut observer le phénomène de déflexion latérale lorsque la pente de l'échantillon

change. Ces deux situations sont présentées à la Figure 1.10. L'enregistrement simultané de la déflexion verticale et latérale du microlevier donne donc un portrait plus complet d'une surface.

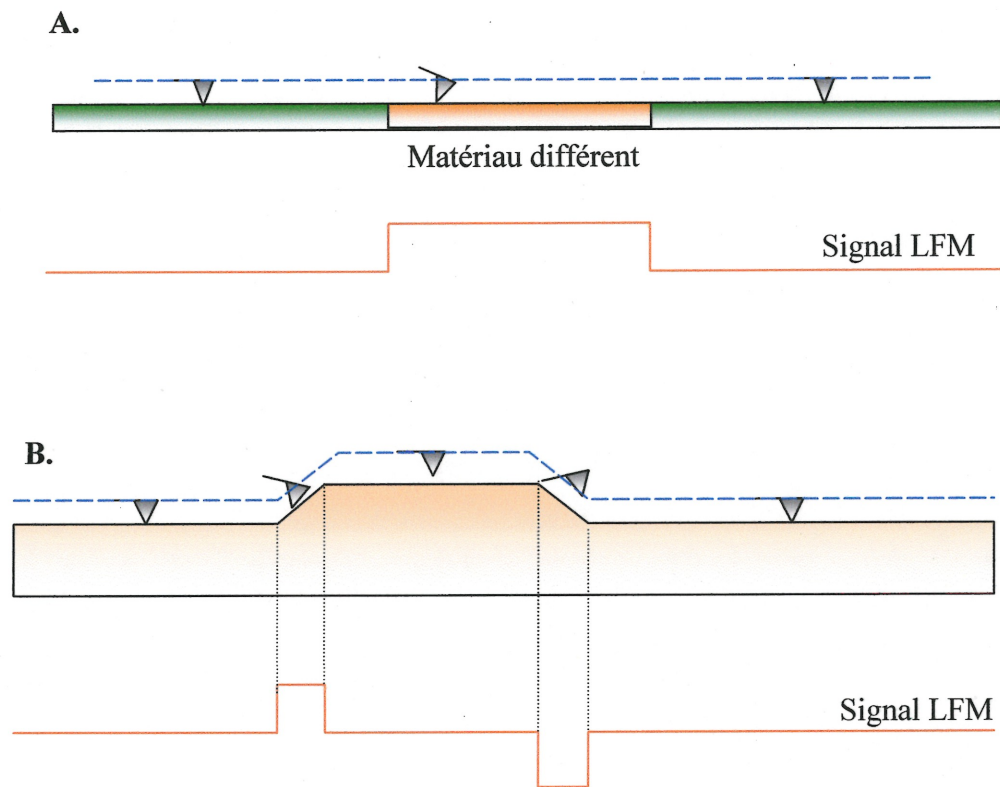


Figure 1.10 Changement de friction **A.** en fonction de la composition chimique et **B.** en fonction de la pente de l'échantillon.

1.5 SPECTROSCOPIE INFRAROUGE DE RÉFLEXION ABSORPTION PAR MODULATION DE POLARISATION

La spectroscopie infrarouge possède de multiples applications visant à identifier des molécules ou caractériser leurs vibrations squelettiques ou moléculaires. Dans le cas des films minces sur l'or ou sur l'eau, on utilise un mode de réflexion absorption par modulation de polarisation (PM-IRRAS). La technique IRRAS a été développée à la fin des années soixante par Greenler⁴². Par la suite, Nafie et al.^{43,44} ont développé la technique de modulation de polarisation qui a été ajoutée par Golden et al.⁴⁵ au système IRRAS déjà existant. Cet ajout permet de dépasser les limites de détection liées à l'IRRAS et donc d'en augmenter la sensibilité. Aujourd'hui, le PM-IRRAS est couramment utilisé dans le cas de couches Langmuir-Blodgett⁴⁶, de films minces⁴⁷ et de molécules adsorbées sur l'or⁴⁵.

En IRRAS, l'absorption de la radiation infrarouge due aux vibrations des molécules à la surface d'un métal est mesurée après une réflexion sur celui-ci. Un spectre de réflexion de la couche adsorbée sur le métal peut donc être obtenu à partir de la mesure directe de la perte de réflexion correspondant aux longueurs d'ondes des bandes d'absorption. L'absorption de la radiation infrarouge dans un tel système est améliorée lorsqu'on travaille à des angles d'incidence élevés. De plus, elle n'est effective que si on utilise une radiation polarisée-p. L'origine de ce phénomène est illustré à la Figure 1.11^{48,49}.

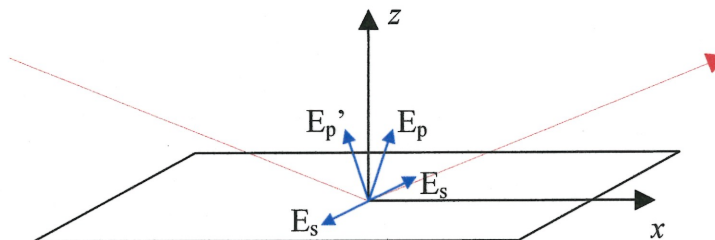


Figure 1.11 Vecteurs électriques incidents et réfléchis pour une radiation polarisée-p et polarisée-s sur une surface métallique.

On remarque sur la Figure 1.11 que la radiation polarisée-s est dans le plan parallèle à la surface métallique. Conséquemment, cette radiation ne peut pas interagir avec les dipôles présents à la surface. D'autre part, on observe que la polarisation-p subit un changement de phase largement influencé par l'angle d'incidence du faisceau radiatif. Ainsi un angle rasant du faisceau incident permet d'augmenter de presque du double la résultante électrique $E_{p\perp}$, perpendiculaire à la surface. De cette manière la composante p peut interagir fortement avec les molécules adsorbées à la surface du métal⁴⁹.

Le principe de base du PM-IRRAS repose sur le couplage d'un système IRRAS avec un modulateur photoélastique (PEM, *photoelastic modulator*)⁴⁸. De cette manière, le PM-IRRAS conserve les caractéristiques de l'IRRAS, mais augmente la sensibilité du système tout en permettant d'effectuer des expériences *in situ*. Cette composante permet la modulation rapide de la polarisation du faisceau incident entre la polarisation-p et la polarisation-s⁴³. Cependant, la règle de sélection associée à ce système dicte que seules les vibrations perpendiculaires à la surface contribuent au signal enregistré. Le principal avantage de ce couplage repose sur le fait que la polarisation-s permet ici d'utiliser l'échantillon comme référence. Ainsi, aucune autre référence n'est nécessaire.

Généralement, un amplificateur lock-in est nécessaire pour extraire les interférogrammes différentiels du signal détecté⁵⁰. Il est utilisé pour le filtrage et la démodulation avant le traitement mathématique de l'intensité détectée, afin d'obtenir les signaux $(R_p - R_s)$ et $(R_p + R_s)$. Le signal de réflectivité différentielle est normalisé selon l'équation suivante :

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{(R_p - R_s)}{(R_p + R_s)} \quad [2]$$

Comme les composantes p et s, modulées à haute fréquence, sont généralement déphasées l'une de l'autre, le lock-in est utilisé pour enregistrer les deux signaux. Cependant, dans le cas présent, on remplace le lock-in par un système

d'acquisition haute vitesse à canaux multiples, qui utilise un logiciel déterminant les deux composantes p et s.

Lorsqu'on effectue une expérience en modulation de polarisation, le faisceau est tout d'abord dévié vers l'extérieur du spectromètre par un miroir, pour converger vers l'échantillon. Le faisceau est ensuite polarisé par un polariseur à grille en ZnSe et passe à travers le PEM en ZnSe. L'application d'une tension sinusoïdale $V_0 \cos(\omega_m t)$ sur ce dispositif, permet de moduler la polarisation du faisceau à une fréquence fixe $2f_m$ (avec $f_m = \omega_m / 2\pi = 37$ kHz) entre un état linéaire-p et un état extrême généralement elliptique qui peut être linéaire-s pour des nombres d'onde particuliers (réglage en ajustant V_0)⁵¹. Ensuite, le faisceau est réfléchi sur l'échantillon selon un angle d'incidence presque rasant ($\sim 85^\circ$). Finalement, le faisceau réfléchi est focalisé par une autre lentille en ZnSe sur la surface active d'un détecteur infrarouge cryogénique MCT (mercure-cadmium-tellure) refroidi à l'azote liquide. La figure 1.12 présente un schéma d'un système PM-IRRAS tiré de la littérature⁵¹.

Lorsqu'on effectue le traitement numérique du signal⁴⁶ provenant du PM-IRRAS, il y a différentes étapes à suivre en vue de l'obtention du spectre final. Tout d'abord, les deux interférogrammes correspondants à $(R_p + R_s)$ et $(R_p - R_s)J_2(\phi_0)$ résultent d'une moyenne effectuée sur le nombre de balayages du miroir mobile. On calcule leurs transformées de Fourier respectives pour obtenir les spectres caractéristiques de $(R_p + R_s)$ et $(R_p - R_s)J_2(\phi_0)$. Ensuite, on procède au calcul de leur rapport pour arriver à un spectre proportionnel à :

$$\frac{(R_p - R_s)}{(R_p + R_s)} J_2(\phi_0) \quad [3]$$

Il faut mentionner que le spectre expérimental obtenu diffère du spectre de réflectivité différentiel recherché (équation [1]) par la fonction de Bessel $J_2(\phi_0)$. Celle-ci dépend du réglage du modulateur photoélastique et peut être éliminée par la modélisation mathématique.

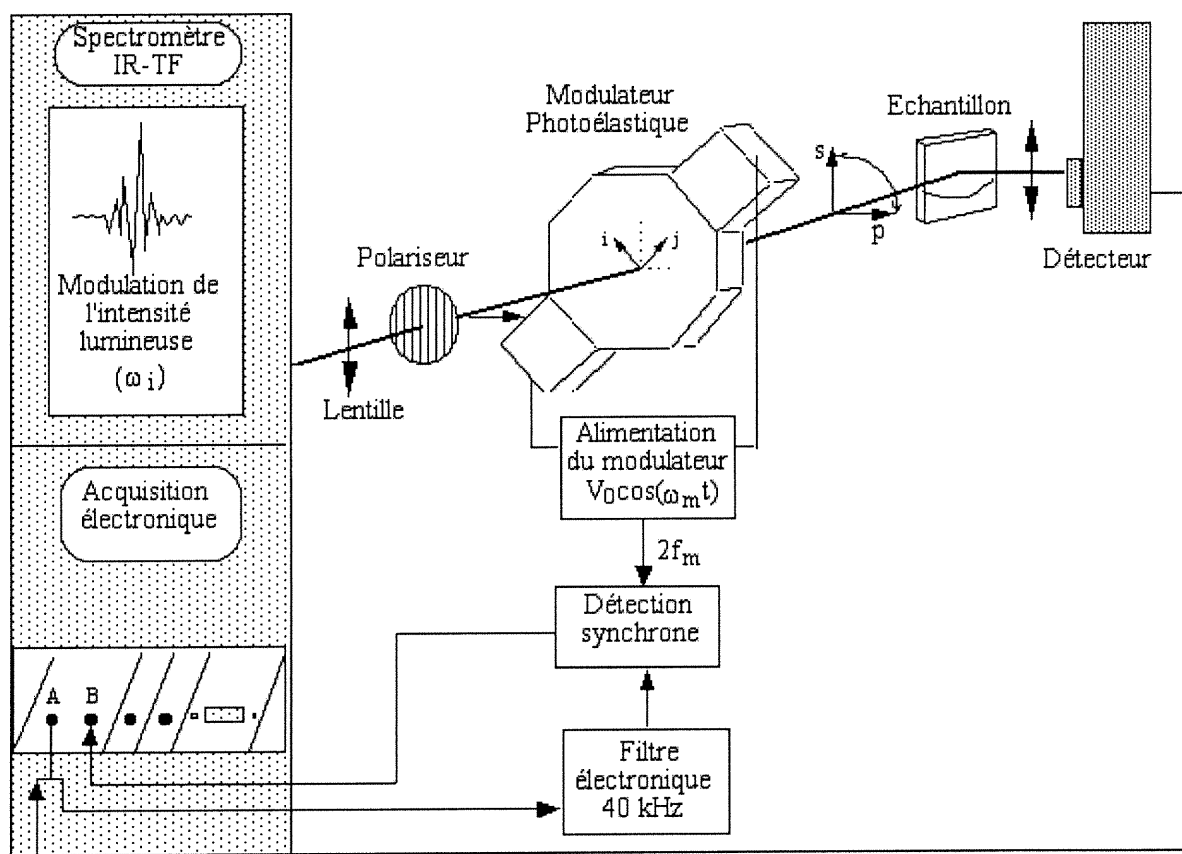


Figure 1.12 Schéma du système optique d'un PM-IRRAS tiré de la littérature⁵¹.

1.6 SURVOL DU MÉMOIRE

Les résultats obtenus ont été divisés en deux parties distinctes. Celles-ci sont cependant précédées d'une courte partie expérimentale, qu'on retrouve au chapitre 2.

Le chapitre 3 présente les résultats associés à la caractérisation des SAMs utilisées au cours de ce projet. On a voulu vérifier la qualité de ces dernières. Les résultats obtenus en SPR et en PM-IRRAS sont développés successivement. La section sur la SPR présente tout d'abord les courbes de cinétique d'absorption des thiols sur l'or, suivie de l'épaisseur mesurée des différentes SAMs. Celle sur le PM-IRRAS présente l'attribution des bandes retrouvées sur les spectres des SAMs.

Le chapitre 4 est divisé en 5 sections. Tout d'abord l'adhésion du collagène sur une SAM de C16 est présentée. La section 2 porte sur l'influence de la longueur de la chaîne de l'alcanethiol sur l'adhésion du collagène alors que la section 3 vérifie plutôt l'influence de la terminaison chimique de la SAM sur l'adhésion de la protéine. Ces trois sections montrent des résultats obtenus en SPR et en AFM. On retrouve à la section 4 une analyse PM-IRRAS de toutes les situations étudiées dans les trois premières sections. Enfin, il est possible d'apprécier à la section 5 certains résultats relatifs à l'adhésion préférentielle du collagène sur une surface micro-structurée obtenue à l'aide d'impressions par micro-contact. (μ CP).

Ces résultats ont permis de déterminer quelles SAMs peuvent être utilisées en vue de contrôler et de diriger l'assemblage du collagène en structures bien définies.

RÉFÉRENCES

- (1) Blawas, A. S., Reichert, W. M. *Biomaterials* **1998**, *19*, 595.
- (2) Ohl, A., Schröder, K. *Surface and Coating Technologie* **1999**, *116-119*, 820.
- (3) Shah, N. K., Ramshaw, J. A. M., Kirkpatrick, A., Shah, C. Brodsky, B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10262.
- (4) Nimni, M. E. *Collagen, Vol. 1, Biochemistry*; CRC Press: Florida, 1988.
- (5) Creighton, T. E. *Proteins, Structures and Molecular Properties*; W. H. Freeman and Compagny: New-York, 1983.
- (6) Ramachandran, R. N. *Treatise on Collagen (Chemistry of Collagen)*; Academic Press: London, 1967.
- (7) Gould, B. S. *Treatise on Collagen (Biology of Collagen, Part A)*; Academic Press: London, 1968.
- (8) Dee, K. C. *Biomaterials* **1999**, *20*, 878.
- (9) Franklin, B. *Trans. R. Soc. London* **1774**, *64*, 445.
- (10) Pockels, A. *Nature* **1891**, *43*, 437.
- (11) Pockels, A. *Nature* **1892**, *46*, 418.

- (12) Pockels, A. *Nature* **1893**, 48, 152.
- (13) Pockels, A. *Nature* **1894**, 50, 223.
- (14) Rayleigh, L. *Philos. Mag.* **1899**, 48, 321.
- (15) Hardy, W. B. *Proc. R. Soc. London A* **1912**, 86, 610.
- (16) Devaux, H. *Smithson. Inst. Ann. Rep* **1913**, 261.
- (17) Blodgett, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 1007.
- (18) Blodgett, K. *Phys. Rev.* **1937**, 51, 964.
- (19) Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 39, 1848.
- (20) Langmuir, I. *Trans. Faraday. Soc.* **1920**, 15.
- (21) Bigelow, W. C., Pickett, D. L., Zisman, W. A. *J. Colloid Interface Sci.* **1946**, 1, 513.
- (22) Blackmann, L. C. F., Dewar, M. J. S. *J. Chem. Soc.* **1957**, 162, p. part I.
- (23) Nuzzo, R. G., Allara, D.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4481.
- (24) Bain, D. B., Throughton B., E. Tao, Y.-T., Evall, J., Whitesides, G.M., Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 321.

- (25) Ulman, A. *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*; Academic Press: Toronto, 1991.
- (26) Ulman, A. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533.
- (27) Atkins, P. *Physical Chemistry, 5th Edition*; W. H. Freeman and Co.: New-York, 1994.
- (28) <http://www.webelements.com/webelements/elements/text/Au/enth.html>, Vol. 2002.
- (29) Schreiber, F. *Prog. in Surf. Sci.* **2000**, *65*, 151.
- (30) Wood, R. W. *Phil. Mag.* **1912**, *23*, 310.
- (31) Ritchie, R. H. *Phys. Rev.* **1957**, *106*, 874.
- (32) Abeles, F., Lopez-Rios, T., Tadieddine, A. *Solid State Commun.* **1976**, *16*, 843.
- (33) Liedberg, B., Nylander, C., Lungstrom, I. *Sens. Actuat.* **1983**, *4*, 299.
- (34) Salamon, Z., Macloed, H. A., Tollin, G. *Biochimica Biophysica Acta* **1997**, *1331*, 117.
- (35) Boussaad, S, P., J., Tao, N.J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 222.

- (36) Otto, A. *Z Phys.* **1968**, *216*, 398.
- (37) Kretchmann, E. *Z. Phys.* **1971**, *241*, 313.
- (38) Binnig, G., Rohrer, H., Gerber, C., Weibel, E. *Phys. Rev. Lett.* **1982**, *49*, 57.
- (39) Binnig, G., Ouate, C.F., Gerber, C. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, *56*, 930.
- (40) Baskin, A., Norde, W., *Physical Chemistry of Biological Interfaces*; Marcel Dekker: New-York, 2000.
- (41) <http://www.tmmicro.com/spmguide/1-2-1.htm>; Vol. 2002.
- (42) Greenler, R. G. *J. Chem. Phys.* **1966**, *44*, 310.
- (43) Nafie, L. A., Vittrine, D. W. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*; Academic Press: New-York, 1982; Vol. 3.
- (44) Nafie, L. A., Diem, M. *Appl. Spectrosc.* **1979**, *33*, 130.
- (45) Golden, W. G., Dunn, D. S., Overend, J. *J. Catal.* **1981**, *71*, 395.
- (46) Buffeteau, T., Desbat, B., Turlet, J. M. *Appl. Spectrosc.* **1991**, *45*, 380.
- (47) Giasson, S., Palermo, T., Buffeteau, T., Desbat, B., Turlet, J. M. *Thin Solid Films* **1994**, *252*, 111.

- (48) Buffeteau, T., Desbat, B., Blaudez, D., Turlet, J. M. *Appl. Spectrosc.* **2000**, *54*, 1646.
- (49) Woodruff, D. P., Delchar, T.A. *Modern Techniques of Surface Science, 2nd Ed.*; Cambridge University Press: Cambridge, 1994.
- (50) Barner, B. J., Green, M. J., Saez, E. I., Corn, R. M. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 55.
- (51) <http://www.biophyresearch.com/ftir.htm>; Vol. 2002.

CHAPITRE 2

PARTIE EXPÉRIMENTALE

2.1 PRÉPARATION DES COUCHES D'OR

Les surfaces d'or ont été préparées selon deux protocoles différents, dépendant de leur application. Elles ont été préparées à l'aide d'un évaporateur thermique (Modèle VE90, Thermionics Laboratory Inc., Hayward, CA) possédant une pompe turbomoléculaire ainsi qu'un système permettant de mesurer l'épaisseur du film déposé (quartz crystal).

Les lames de verre BK₇ (Fisherbrand) préalablement coupées selon les grandeurs désirées ont tout d'abord été lavées à l'éthanol anhydre chaud. La première étape de l'évaporation est la déposition d'une mince couche de titane à une pression de $9,8 \times 10^{-8}$ Torr (5 nm, vitesse : 0,3-0,4 Å/s) (Plasmaterials, 99,995%) pour favoriser l'adhésion de l'or. L'or (Plasmaterials, 99,99%) est ensuite déposé selon une épaisseur de 100 nm à une pression de $1,1 \times 10^{-7}$ Torr (vitesse : 1,1 Å/s).

Si les surfaces d'or fraîchement préparées sur des surfaces de lame de microscope ne sont pas utilisées immédiatement, elles peuvent être gardées dans de l'éthanol anhydre. Cette mesure permet de limiter le contact entre l'or et l'air ambiant, ce qui diminue la contamination de la surface de l'or. Cependant, malgré cette procédure, il est nécessaire, lorsque vient le temps d'utiliser les surfaces d'or, de procéder au traitement «piranha». Ce traitement consiste à tremper les lames recouvertes d'or dans une solution **3 :7** (vol/vol) H₂O₂ 30 %/H₂SO₄ concentré. (*Attention! La solution piranha réagit violemment avec de nombreux produits organiques et doit être utilisée avec précautions.*) On trempe donc les lames dans cette solution durant 30 secondes pour ensuite les rincer généreusement à l'eau de qualité MilliQ (18,2 MΩ.cm). Lorsque ce traitement est effectué, il faut immédiatement passer à l'étape suivante, sans attente supplémentaire.

Avant de procéder à l'évaporation sur les lames de verre LaSFN₉ (Schott Glass, Allemagne), celles-ci doivent être nettoyées selon un protocole précis. Elles sont tout d'abord déposées dans un récipient en verre rempli d'une solution d'Helmanex 2% (Hellma© Canada, savon spécial pour les composantes en quartz), qui est placé dans le bain à ultrasons pour 5 minutes. Elles sont ensuite rincées 12 fois à l'eau MilliQ. Le récipient est rempli une seconde fois, mais avec de l'eau MilliQ. On le replace dans le bain à ultrasons pour 5 minutes. Après, les lames sont rincées encore 6 fois à l'eau MilliQ, puis conditionnées à l'éthanol anhydre. Enfin, elles sont placées une dernière fois pour 5 minutes dans le bain à ultrasons dans l'éthanol anhydre. On garde les lames dans l'éthanol anhydre jusqu'à leur utilisation.

Le protocole d'évaporation sur des lames en LaSFN₉, spécifiques à la technique SPR, diffère de celui pour les lames de verre ordinaires. En effet, étant donné le coût très élevé de ces lames, on préfère évaporer seulement l'or, sans couche intermédiaire de titane, afin de pouvoir facilement enlever la couche d'or pour les réutiliser. La sensibilité de la spectroscopie SPR étant limitée par l'épaisseur de la couche de métal, on préfère ici ne déposer qu'environ 46-50 nm d'or (vitesse : 1,1 Å/s). De plus, ces surfaces doivent être utilisées dès leur préparation, sans quoi, leur réactivité diminue trop pour les expériences effectuées.

2.2 FORMATION DES SAMs

La formation de SAMs nécessite la préparation de solutions de thiols de concentration 1 mM. Le thiol (solide ou liquide, dépendant du type de thiol utilisé) est dissout dans un mélange 1 : 4 (vol/vol) tétrahydrofuranne (THF, BDH, 99%) / éthanol anhydre, pour les lames de microscopes ou seulement dans l'éthanol anhydre chaud pour les lames en LaSFN₉*. Le premier mélange permet d'éliminer les problèmes de dissolution occasionnés par certains thiols. Toutefois, on réussit à bien dissoudre ces mêmes thiols dans l'éthanol anhydre chaud.

* La raison ici étant de faciliter la modélisation en terme de l'indice de réfraction du solvant permettant l'interprétation des résultats obtenus en SPR. En effet, il est plus facile de modéliser un solvant plutôt qu'un mélange de solvants.

Une fois les solutions prêtes, les lames d'or sont placées dans les solutions de thiols, pour une période d'incubation de 18 à 24 heures. Cette longue période d'incubation permet d'obtenir une meilleure organisation des molécules de thiols à la surface d'or. Elles acquièrent une conformation plus compacte et mieux orientée. Lorsque les lames fonctionnalisées sont prêtes, on les rince abondamment à l'éthanol anhydre, puis on les sèche avec un jet d'azote gazeux (Praxair, 4.8 ou 5.0 UHP).

Quelques thiols utilisés dans cette étude ont été synthétisés antérieurement. On parle ici de l'hexadecanethiol (C16) et du 1-mercapto-hexadecanoic acid (C15-COOH). Cependant, l'octanethiol (C8, 98%), le 1-mercapto-undecanoic acid (C10-COOH, 95%), le 1-mercapto-undecane (C11, 98%), le 1-mercapto-undecanol (C11-OH, 97%), et l'octadecanethiol (C18, 98%) ont tous été achetés chez Sigma-Aldrich. Ils ont tous été utilisés tels que reçus.

2.3 ADHÉSION DU COLLAGÈNE

L'adhésion du collagène sur l'or doit se faire selon les conditions physiologiques pour respecter l'esprit de ce projet. Ainsi, on travaille dans une solution légèrement acidifiée, donc à pH 6,81 et à 37 °C. De plus, en attendant de procéder à l'adhésion du collagène sur l'or, les solutions sont gardées à 4 °C.

La première étape consiste à dissoudre le collagène de type I (Collagen Type I from calf skin, acide soluble (monomer), Sigma Aldrich) dans une solution d'acide acétique 0,01 M de manière à obtenir une solution de collagène de 0,4 mg/mL. Pour ce faire, 0,006 g de collagène solide sont dissous dans 15 mL d'acide acétique 0,01M. La dissolution se fait à 4 °C : la solution de collagène, placée dans un bain de glace, est agitée à l'aide d'une plaque agitatrice. Par la suite, la solution est réfrigérée, jusqu'au moment de son utilisation. Les solutions doivent être utilisées la journée même de leur fabrication.

Enfin, une solution-tampon de phosphate Na_2HPO_4 (Fischer) (0,4 M) / KH_2PO_4 (Anachemia) (0,4 M) doit être préparée de manière à obtenir un pH de 6,81. Pour ce faire, la masse nécessaire de sel pour chacune des deux solutions constitutives du tampon est dissoute dans de l'eau milliQ. Par la suite, on ajoute la solution monobasique, le Na_2HPO_4 , à la solution dibasique, le KH_2PO_4 , en suivant le pH à l'aide d'un pH-mètre, ce dernier ayant été calibré au préalable à l'aide de tampons de pH 4 et 7. Cette solution est réfrigérée en attendant son utilisation. Elle doit être utilisée la journée même de sa fabrication.

Lorsqu'on veut procéder à l'incubation des SAMs dans la solution de collagène, les lames sont placées dans un système thermostaté (37°C) et on verse la solution de collagène et la solution-tampon (proportion 1:1 (vol/vol)) dans le système. Dans le cas présent, on a laissé les SAMs dans la solution de collagène pendant différents temps d'incubation. Pour les expériences effectuées en SPR, on utilise les mêmes deux solutions, qu'on mélange ensemble (1 : 1(vol/vol)) immédiatement avant de les injecter dans la cellule expérimentale.

2.4 MICRO-CONTACT PRINTING

La technique de micro-contact printing (μCP) a été développée par Whitesides *et al*¹ au cours de la dernière décennie; elle permet d'obtenir différentes terminaisons chimiques selon des patrons définis sur une même surface. C'est donc une méthode très utile pour étudier la spécificité d'adhésion de molécules en présence de deux différentes surfaces.

Un moule en polydiméthylsiloxane (PDMS, Sylgard, Silicone Elastomer 184 kit) est d'abord préparé en déposant le polymère sur un patron en silicium préparé par microlithographie. On laisse le polymère figer et on obtient ainsi un moule. Le patron utilisé ici a été fourni par le groupe de recherche de Whitesides.

Le moule doit être rincé avant chaque utilisation. Sa surface est aspergée d'éthanol anhydre, puis asséchée à l'aide d'un jet d'azote. La Figure 2.1 présente les étapes nécessaires à l'obtention d'une surface μ CP. Ainsi, une goutte du premier thiol (1mM dans EtOH anhydre) est déposée sur le PDMS et laissée pendant 30 secondes. Cette surface est asséchée immédiatement après à l'aide d'un jet d'azote, pendant 10 secondes. Après, le PDMS possédant les thiols est déposé sur la surface d'or fraîchement préparée pendant 30 secondes. Il est ensuite enlevé rapidement, d'un coup sec. Enfin, la surface d'or possédant ce premier thiol est placée dans la solution contenant le second thiol pour une heure. À la fin de ces manipulations, une surface possédant différentes zones chimiquement spécifiques est prête à être utilisée. Elle peut être utilisée immédiatement après, mais il est aussi possible de s'en servir dans les trois semaines suivant sa fabrication. Il existe différents patrons disponibles commercialement. Cependant, dans le cadre de ce projet, nous avons toujours utilisé le même moule, soit des cercles de 10 μ m de diamètre séparé entre eux par 10 μ m.

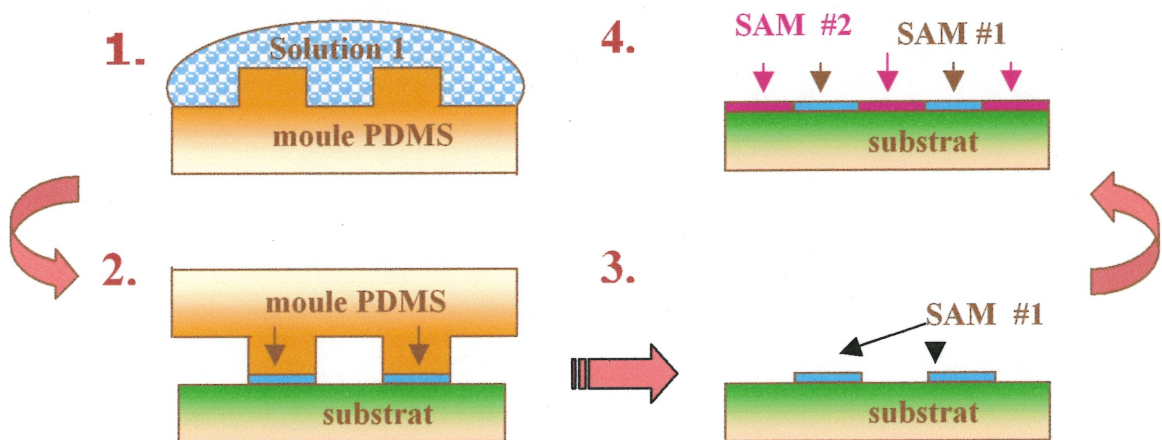


Figure 2.1 Étapes nécessaires à l'obtention d'une surface μ CP

2.5 EXPÉRIENCES SPR

L'appareil utilisé, un spectromètre de résonance des plasmons de surfaces (Resonant Probes GmbH, Allemagne), est schématisé à la Figure 2.2.

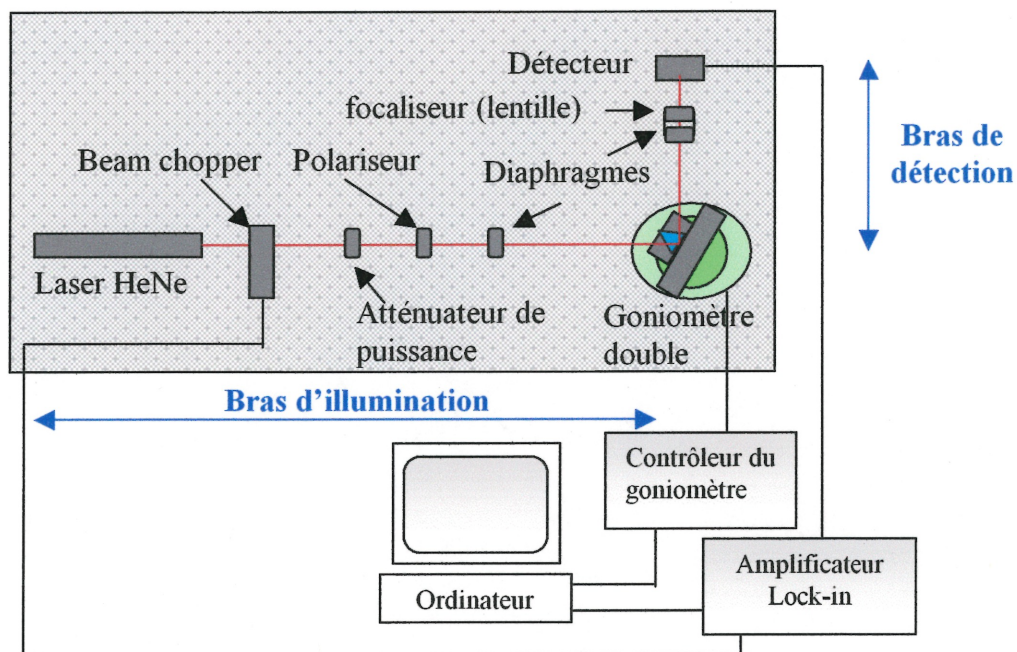


Figure 2.2 Schéma du spectromètre SPR de Resonant Probes GmbH.

Le système est constitué d'un laser HeNe (JDS Uniphase) ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$). Le faisceau incident engendré par cette source monochromatique passe tout d'abord par un interrupteur de faisceau (Perkin Elmer Instruments, Modèle 651.1) fixé à une fréquence de 1007 Hz. Ce dernier est suivi d'un atténuateur de puissance (Owis), d'un polariseur en p (Owis) et d'un diaphragme (Owis). L'interrupteur de faisceau est relié à l'amplificateur lock-in (Modèle 5210, EG&G), lui-même relié à l'ordinateur de contrôle. Par la suite, le faisceau incident frappe le prisme (LaSFN_9 , $n=1,845$), passe dans la cellule d'analyse, (montée sur un goniomètre double qui relié à l'ordinateur par un contrôleur) et est réfléchi vers un second diaphragme (Owis) couplé à un focaliseur (Owis). Enfin, le faisceau réfléchi frappe un photodétecteur. Ce dernier est relié à l'amplificateur lock-in, qui redirige le signal vers l'ordinateur.

2.5.1 Préparation de la cellule

La première étape en spectroscopie SPR consiste à préparer la cellule analytique, illustrée à la Figure 2.3. Tout d'abord, une lame de verre (lame de microscope BK₇, Fisherbrand) est déposée sur le montage. Cette lame aura été nettoyée au préalable avec de l'éthanol ou de l'iso-propanol, puis séchée à l'aide d'un jet d'azote. La cellule expérimentale en téflon est ensuite déposée par-dessus la lame de microscope. Cette dernière aura tout d'abord été nettoyée à l'éthanol anhydre, dans un bain à ultrasons (5 minutes), rincée à l'éthanol anhydre puis séchée avec un jet d'azote. Advenant le cas que de l'or provenant d'une expérience précédente soit collé sur la cellule, il serait possible de l'enlever à l'aide d'un papier à faible peluchage (Kimwipe©) imbibé d'iso-propanol.

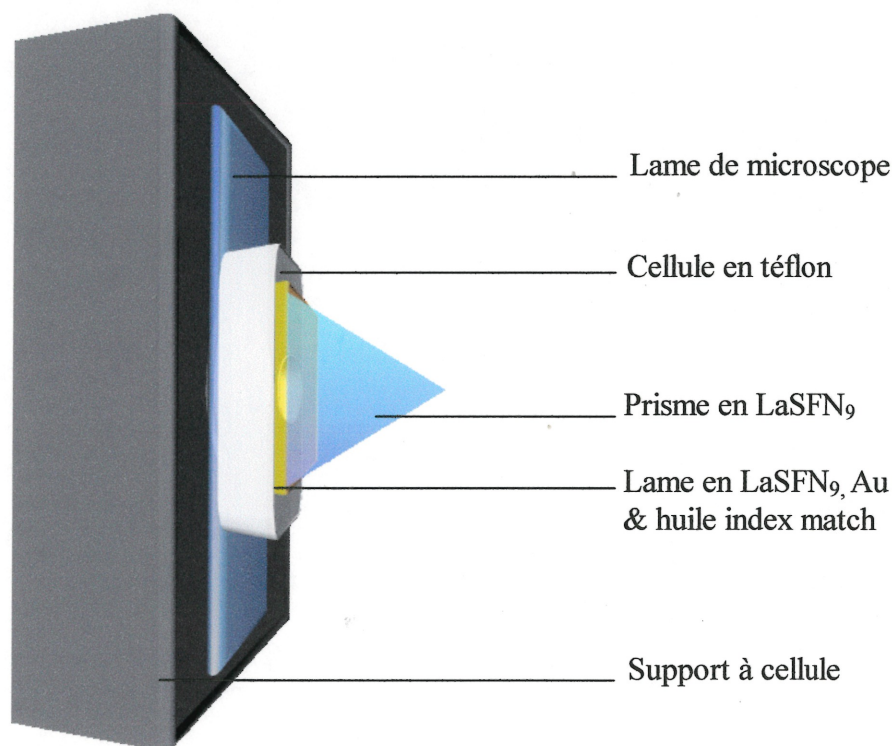


Figure 2.3 Schéma de la cellule SPR

La lame de LaSFN₉ est ensuite déposée sur la cellule en téflon, l'or face à la cellule. De l'autre côté de cette lame, une goutte d'huile index match de 1,7000 d'indice de réfraction est déposée, finalement suivie du prisme en LaSFN₉. Il est important d'éliminer toute bulle d'air possible entre la lame et le prisme. Enfin, les tubes en téflon par lesquels circuleront les solvants dans la cellule (lavés eux aussi à l'éthanol anhydre) sont insérés dans les trous prévus à cet effet sur la cellule en téflon. À ce point, la cellule est prête à être utilisée.

2.5.2 *Expériences SPR*

Avant de commencer les expériences proprement dites, le système doit être minutieusement aligné. Cet alignement se fait en deux étapes : tout d'abord le bras de détection est aligné à 45° et ensuite, le bras d'illumination à 90° (en alignant les réflexions du laser sur le centre du diaphragme situé sur le bras de détection ou sur le bras d'illumination). Cet alignement est nécessaire pour définir l'angle d'incidence de 45° et la position du détecteur à 90° par rapport à l'angle d'incidence de 45°.

Ensuite, il est possible de procéder aux diverses expériences. Elles se font toujours de la même manière, lorsqu'il s'agit d'expériences en cinétique, comme dans le cas présent. Tout d'abord, une courbe SPR de la surface est effectuée, à l'aide de laquelle on détermine l'angle de couplage. L'appareil est ensuite positionné à cet angle de couplage, et la cinétique est débutée. Après quelques minutes de stabilisation, le produit dont on veut suivre la cinétique est injecté et des mesures sont prises durant le temps voulu. Lorsqu'on veut terminer une cinétique, on injecte un solvant dans la cellule, qui arrête la réaction d'adsorption, et on attend encore que le système se stabilise. Enfin, une seconde courbe SPR est prise pour trouver encore une fois l'angle de couplage. Celui-ci aura changé de position si une adsorption a été observée au cours de la réaction de cinétique. Lorsque l'expérience est terminée, la cellule peut être enlevée du système expérimental, démontée et nettoyée. L'échantillon peut être conservé pour des analyses ultérieures telles que l'AFM ou l'infrarouge.

2.5.3 Modélisation de Fresnel

L'épaisseur des couches adsorbées ou encore le changement de l'indice de réfraction (partie réelle) occasionné par le changement de surface peuvent être obtenus par la modélisation de Fresnel.

La modélisation de Fresnel est calculée à partir d'un logiciel associé à l'appareil acheté. C'est un système de modélisation en étapes qui fonctionne par itérations mathématiques. On doit modéliser notre système expérimental de manière à caractériser chacune des couches l'une après l'autre. Ainsi, il est nécessaire de considérer certains paramètres comme étant des constantes, et ne modifier qu'un seul paramètre à la fois. Dans le cas qui nous intéresse, on cherche à obtenir les épaisseurs des différentes couches constituant notre système. On doit donc connaître ou approximer les valeurs relatives aux constantes diélectriques, à savoir ϵ' et ϵ'' (respectivement les parties réelle et imaginaire). Ces données sont présentées dans les résultats relatifs à chaque épaisseur mesurée.

2.6 ANALYSES AFM

Toutes les analyses de ce projet ont été effectuées dans l'air sur un microscope à force atomique AutoProbe Research CP, (ThermoMicroscopes, Sunnyvale, CA), en mode contact ou en mode friction.

D'autre part, deux types de pointes en forme de V ont été utilisées: des pointes UltraleversTM UL06A (Thermomicroscopes), en silicium possédant une constante de force de 0,26 N/m et des pointes Nanoprobes (Digital Instruments, Santa Barbara, CA) en Si_3N_4 ayant une constante de force de 0.32 N/m. Au cours des différentes analyses, les images ont été prises avec des vitesses de balayage variant entre 0,8 Hz et 1,2 Hz, des « set points » entre 10,4 nN et 15 nN, des gains entre 0,1 et 2 et des grosseurs d'image entre $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$ et $100 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$.

Sur chaque échantillon, les analyses ont été effectuées à 5 endroits différents, afin de bien visualiser la similitude des résultats. Enfin, les images ont été traitées avec le système SPM Analysis version X (ThermoMicroscopes). Les mesures d'épaisseurs des fibrilles et des films de collagène ont été effectuées avec le même système. Il s'agit ici de prendre un point de référence associé à la hauteur du substrat, sur une coupe transversale de l'image, et de mesurer la hauteur des fibrilles par rapport à ce point. Les incertitudes sur les statistiques effectuées dans le chapitre 4 ont été calculées à partir de la Loi de Student, selon un intervalle de confiance de 95%.

Par ailleurs, le logiciel Scion Images permet de calculer le pourcentage de recouvrement d'une image AFM. Il s'agit de déterminer ici quelle hauteur Z correspond à la limite entre le substrat et la protéine. Cette limite établie, le logiciel détermine que tout ce qui est sous la limite est noir, et tout ce qui est au-dessus est blanc. Le logiciel calcule par la suite le nombre de pixels blancs par rapport au nombre total de pixels de l'image, ce qui permet de déterminer le pourcentage de recouvrement de celle-ci.

2.7 ANALYSES PM-IRRAS

Toutes les analyses infrarouges ont été effectuées avec le système PM-IRRAS FTS-6000 de Bio-Rad. Les échantillons ne requièrent pas de préparation spécifique : ils sont placés tout simplement dans le porte-échantillon, ce dernier étant inséré dans la chambre d'analyse. L'échantillon doit être positionné selon un angle de 85° par rapport au faisceau incident.

Dans le système PM-IRRAS, le faisceau incident est tout d'abord dirigé vers des miroirs (servant à la focalisation du faisceau), suivis d'un PEM constitué d'une fenêtre en ZnSe (Hirdes) relié à un modulateur de fréquence fixé à 1000 Hz. À la sortie du PEM, le faisceau incident frappe la surface d'or de l'échantillon selon un angle de 85° . Le faisceau réfléchi est dirigé vers une lentille focalisatrice en ZnSe, pour finalement atteindre le détecteur cryogénique MCT (mercure-cadmium-tellure)

(InfraRed Labs Inc.). Un schéma des composantes PM-IRRAS est présenté à la Figure 2.4.

Le FTS-6000 ne possède pas d'amplificateur lock-in associé à son système PM-IRRAS. En effet, comme il possède la technologie de Step-Scan DSP 3, ce logiciel remplace l'amplificateur lock-in. Tous les spectres ont donc été acquis à l'aide du logiciel Bio-Rad fourni avec le spectromètre, pour une fenêtre spectrale s'étendant de 400 à 4000 cm^{-1} , selon une résolution de 8 cm^{-1} , et un UDR (Undersampling Ratio) de 4. Pour chaque échantillon, un balayage a été co-additionné.

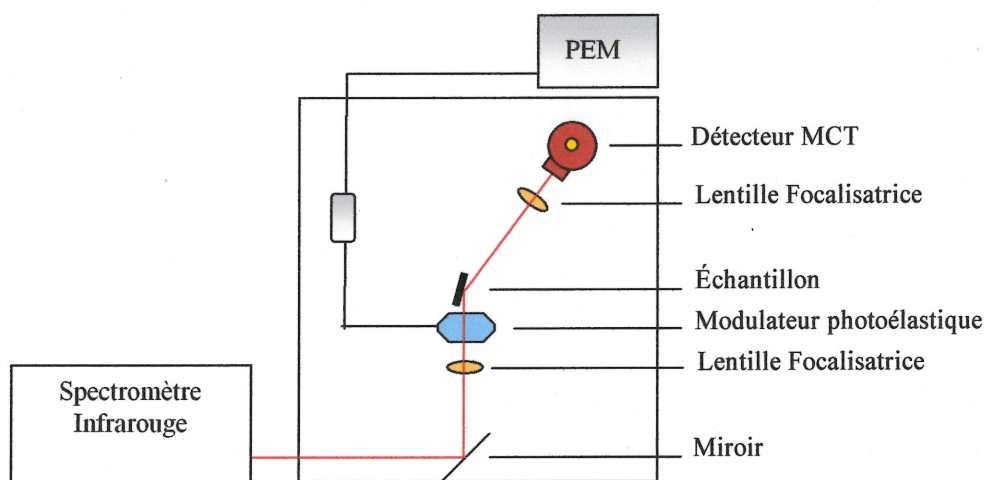


Figure 2.4 Schéma du système PM-IRRAS utilisé.

Le traitement des spectres est effectué à l'aide du programme Grams. Les lignes de bases ont été tracées selon une fonction quadratique pour la région des hautes fréquences alors que celles associées à la région des basses fréquences ont été tracées selon la méthode multi-points. Les spectres ne sont pas traités en entier mais plutôt région par région, afin de faciliter la modélisation de la ligne de base.

RÉFÉRENCE

- (1) Xia, Y. N., Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 551.

CHAPITRE 3

ÉTUDE DE L'ADHÉSION DE THIOLS SUR L'OR PAR SPR ET PM-IRRAS

3.1 CARACTÉRISATION DES SAMs PAR SPR

La qualité des SAMs utilisées au cours de ce projet a tout d'abord été vérifiée à l'aide de la spectroscopie SPR, puis par la spectroscopie PM-IRRAS. Ces deux appareils étant nouveaux au laboratoire, ces analyses ont permis de vérifier les forces et les limites de ces deux techniques. De plus, comme les systèmes de SAMs sont bien compris et ont été étudiés de manière extensive par de nombreux groupes de recherches, les résultats obtenus, comparés à ceux de la littérature, permettent de juger de la qualité du recouvrement des SAMs préparées en terme de l'épaisseur mesurée. On compare donc ici la cinétique d'adsorption et les épaisseurs de couches, pour des systèmes C8, C11, C16, C18, C10-COOH, C11-OH et C15-COOH à d'autres résultats provenant de la littérature¹⁻³.

3.1.1 Cinétique de l'adhésion des thiols

Un bon indice de la qualité des SAMs réside en sa cinétique d'adhésion à l'or. En effet, les étapes de la cinétique d'adhésion d'une SAM sur l'or sont bien comprises et bien décrites dans la littérature^{1,4}. La vitesse de formation peut varier selon certains facteurs, comme la concentration, les solvants utilisés ou la température. Cependant, dans le cadre de ce projet, nous avons utilisé des conditions habituelles pour ce genre de manipulation (conf. p. 31).

La cinétique de réaction se déroule en deux phases¹. Tout d'abord, les thiols adhèrent très rapidement sur l'or et forment ainsi une monocouche : on parle ici d'une réaction de l'ordre de quelques secondes. Après seulement quelques minutes d'incubation, la monocouche a atteint environ 90 % de son épaisseur finale. Ceci est la conclusion des mesures d'angles de contact et d'ellipsométrie retrouvées dans la littérature^{1,5}. Cette première phase rapide est suivie d'une période plus lente, au cours

de laquelle la monocouche atteint ses valeurs finales d'épaisseur et d'angle de contact. Au cours de cette période lente, on observe une réorganisation de la couche; les chaînes carbonées s'ordonnent mieux, les impuretés sont expulsées de la monocouche (celles-ci possédant moins d'affinités avec l'or que les thiols) et les défauts de cette dernière sont réparés. Il faut attendre plus de 10 heures pour obtenir une couche à 100% formée. Ainsi, il est commun de laisser l'incubation se poursuivre durant la nuit, de manière à obtenir des couches les plus parfaites possibles. Un schéma de la cinétique d'adhésion de SAMs sur l'or est présenté à la Figure 3.1^{6,7}.

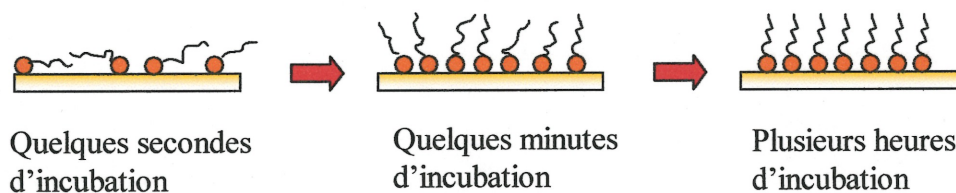


Figure 3.1 Cinétique de l'auto-assemblage de monocouches d'alkanethiol sur l'or selon les discussions présentées dans la littérature^{1,6-8}.

La spectroscopie SPR a permis de suivre *in situ* l'adhésion de différents thiols sur des surfaces d'or fraîchement préparées. On a préféré la technique de cinétique suivant l'angle de couplage pour sa plus grande sensibilité. Les courbes de cinétique obtenues expérimentalement sont présentées à la figure 3.2 et à la figure 3.3. La première figure présente une cinétique sur une durée de plus de 900 minutes, alors que la seconde présente la cinétique des trois premières heures d'incubation de tous les thiols utilisés lors de ce projet.

On remarque tout d'abord que la cinétique de l'adhésion des thiols sur l'or se fait en deux temps, tel que la littérature le présente^{1,9}. Ainsi, dans la première phase, on observe une adhésion rapide du thiol qui se traduit par une augmentation rapide de l'angle de couplage (où l'angle de couplage est relié à l'épaisseur, selon l'équation [1], dans l'introduction). De plus, il n'y a pas de délai entre l'injection et le début de

l'adhésion des thiols, ce qui signifie que la surface d'or est propre. Par la suite, la cinétique devient plus lente. Au cours de cette période, les chaînes carbonées deviennent de plus en plus ordonnées. Une incubation de trois heures (figure 3.3) semble correcte pour obtenir une couche suffisamment ordonnée pour les besoins de ce projet. Cependant, il ne suffit pas de vérifier que la cinétique, il faut aussi regarder les épaisseurs obtenues (après rinçage avec le solvant pur) par modélisation de Fresnel pour pouvoir tirer une conclusion de ces mesures.

Il est important de traiter du cas du C15-COOH. En effet, il arrive que la cinétique se fasse normalement et possède une épaisseur attendue, comme la courbe présentée à la figure 3.2B. Cependant, il arrive aussi que l'épaisseur de la couche (avant rinçage avec le solvant) soit supérieure à l'épaisseur d'une monocouche, comme c'est le cas sur la figure 3.3B. Ce thiol possède en effet une cinétique difficilement reproductible. Il est donc très important de bien rincer la surface plusieurs fois la monocouche formée avant de mesurer son épaisseur finale. Cependant, cette anomalie n'est pas typique à la terminaison COOH, puisque dans le cas du C10-COOH (ou même du C11-OH), on n'observe pas ce genre de problème, du point de vue de la cinétique. (voir section 3.1.2)

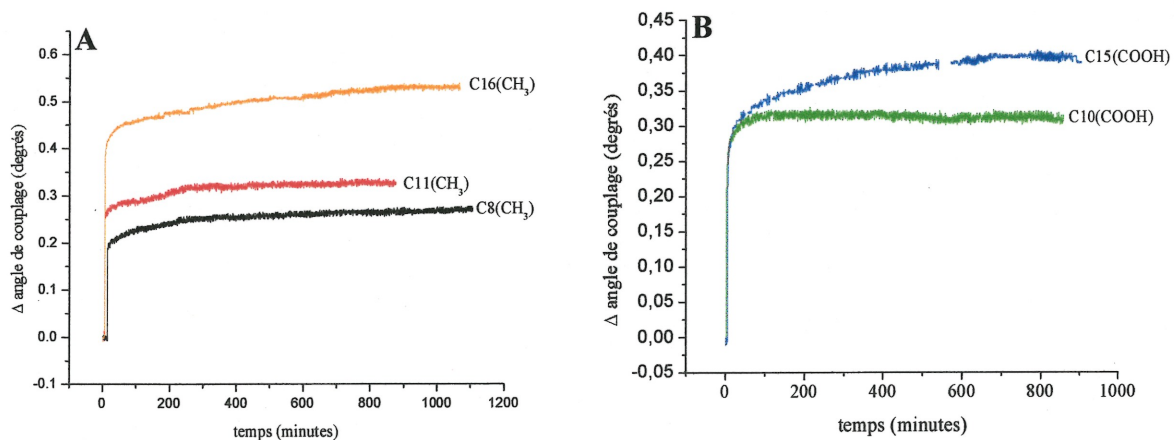


Figure 3.2 Courbes de la variation de l'angle de couplage (degrés) en fonction du temps (1000 minutes) pour (A) différents thiols hydrophobes et (B) pour différents thiols hydrophiles.

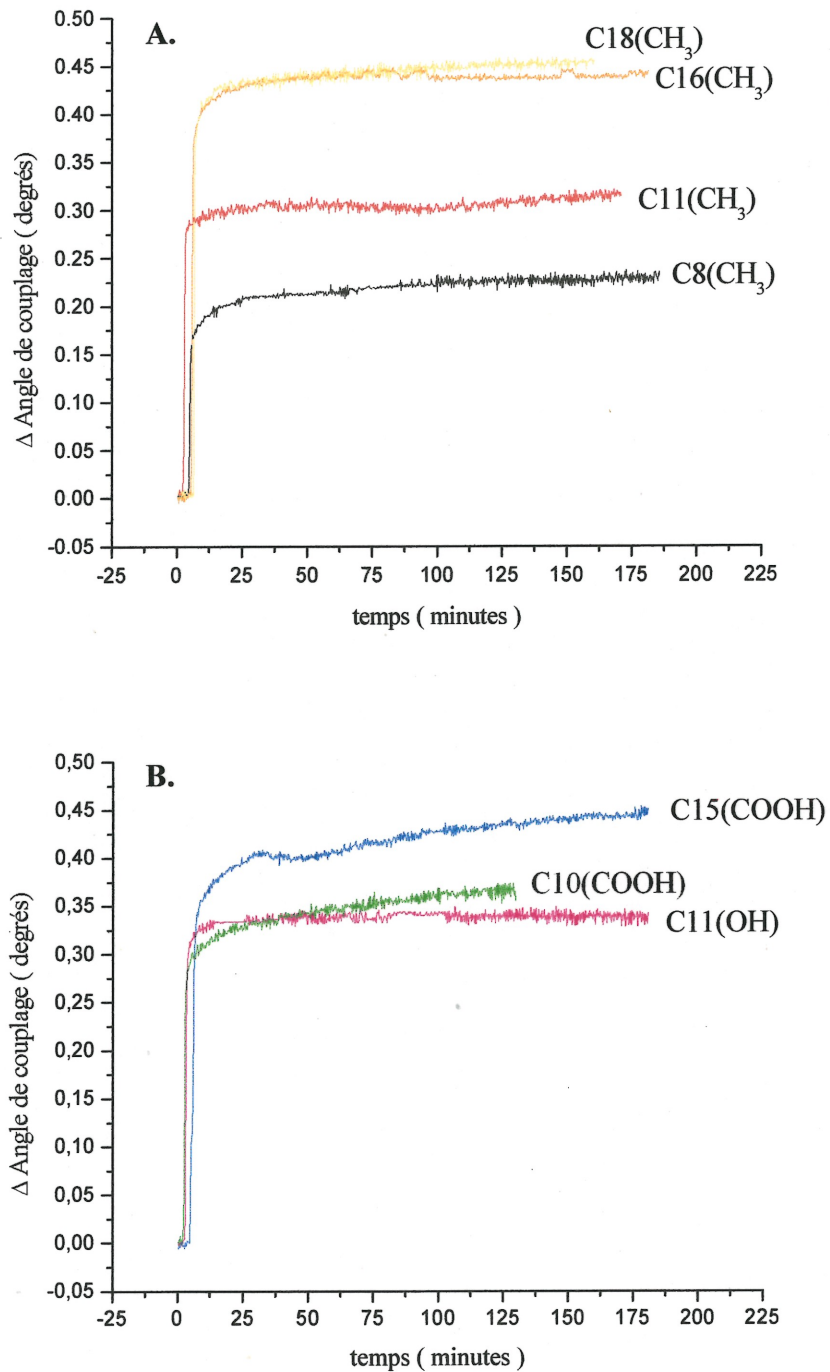


Figure 3.3 Courbes de la variation de l'angle de couplage (degrés) en fonction du temps (200 minutes) pour (A) tous les thiols hydrophobes utilisés et (B) pour tous les thiols hydrophiles utilisés.

3.1.2 Épaisseur des thiols

Après avoir vérifié les cinétiques d'adhésion des thiols sur l'or, il reste toujours important de vérifier en plus l'épaisseur des couches obtenues. Pour ce faire, on prend des courbes SPR avant et après l'adhésion du thiol (Figure 3.4.) et on modélise couche par couche l'épaisseur de chacun des constituants du système. Ainsi, dans le cas des thiols, on commence par modéliser l'épaisseur de l'or puis, ensuite, l'épaisseur du thiol. Les différents paramètres utilisés pour ces modélisations sont présentés dans le Tableau 3.1. Comme le paramètre recherché est l'épaisseur de la SAM, on le laisse variable. Cependant, il est important de mentionner qu'on modélise couche par couche, et que les valeurs obtenues restent constantes pour la couche suivante. Par exemple, si on modélise l'épaisseur de l'or, lorsqu'on voudra modéliser la couche suivante, soit les thiols, on prendra l'épaisseur trouvée pour l'or et on la gardera constante pour le thiol. De plus, lorsqu'une couche possède un ϵ'' de zéro, cela signifie qu'elle est transparente à la longueur d'onde utilisée (dans notre cas, 632,8 nm). La valeur de ϵ' utilisée pour les thiols provient de résultats de Badia¹⁰. Étant donné que l'on considère l'épaisseur du prisme et du solvant comme infinies, on leur attribue une épaisseur de zéro.

Couche	Épaisseur (nm)	ϵ' (partie réelle)	ϵ'' (partie imaginaire)
Prisme	0	3.4040	0
Or	variable	-12,75 à -12,95	1,05 à 1,35
Thiol	variable	2.25	0
Solvant (EtOH)	0	1.85	0

Tableau 3.1 Paramètres utilisés pour la modélisation de l'épaisseur des thiols.

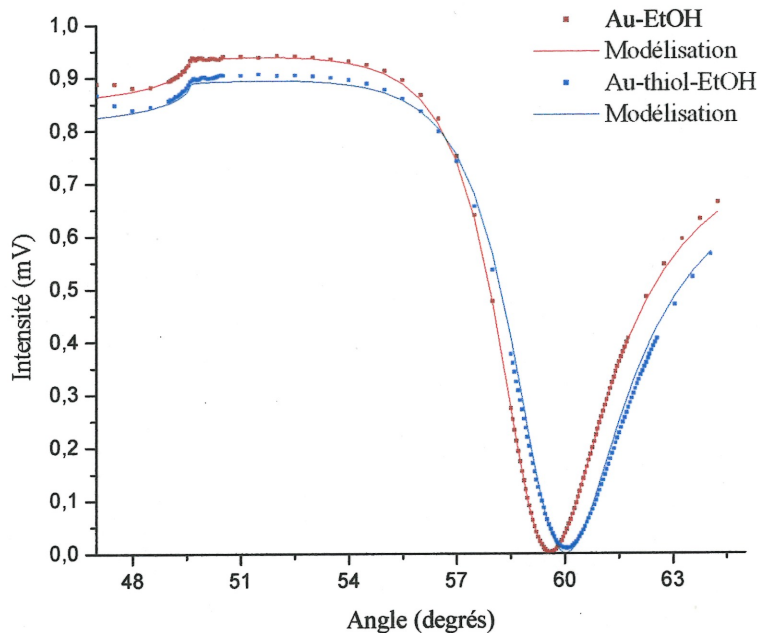


Figure 3.4 Exemple de courbes expérimentales (points rouges, Au-EtOH, points bleus, Au-C16-EtOH) et modélisées (ligne rouge Au-EtOH, ligne bleue, Au-C16-EtOH) prises en spectroscopie SPR.

Suivant cette méthode de modélisation pour les différents thiols utilisés, on a obtenu les résultats présentés à la figure 3.5. On y retrouve tout d'abord deux groupes de données expérimentales, obtenues dans deux solvants différents (éthanol anhydre et solution tampon). Chaque épaisseur est la moyenne de plusieurs modélisations provenant de différentes expériences. Chaque modélisation a été effectuée à partir d'une courbe SPR obtenue après rinçage de la surface et stabilisation du système, à la fin de la cinétique d'adhésion. De plus, on retrouve une droite calculée mathématiquement (où les chaînes forment un angle de 25° avec la normale) qui servira de point de comparaison. Le tableau 3.2 donne les différentes valeurs associées aux droites de la figure 3.5 ainsi que les valeurs expérimentales obtenues par Lingler *et al*² ainsi que par Porter *et al*³. On étudie dans un premier temps l'épaisseur obtenue pour chaque thiol. Par la suite, on investigate la pente de chaque courbe, celle-ci donnant le nombre de nanomètres par groupement CH_2 .

Paramètres	Calc. (25°)	Porter <i>et al</i> ³	Lingler <i>et al</i> ²	Exp. EtOH	Exp. Tampon
		$n_{\text{SAM}}=1,45$	$n_{\text{SAM}}=1,50$	$n_{\text{SAM}}=1,50$	$n_{\text{SAM}}=1,50$
Épaisseur C8 (nm)	1,28	1,43	$1,57 \pm 0,23$	$1,24 \pm 0,25$	$1,34 \pm 0,25$
Épaisseur C11 (nm)	1,61	1,88	-	$1,66 \pm 0,25$	$1,79 \pm 0,25$
Épaisseur C12 (nm)	1,72	2,03	$2,13 \pm 0,23$	-	-
Épaisseur C16 (nm)	2,16	2,63	$2,69 \pm 0,23$	$2,39 \pm 0,25$	$2,60 \pm 0,25$
Épaisseur C18 (nm)	2,38	2,93	$2,97 \pm 0,23$	$2,62 \pm 0,25$	$2,91 \pm 0,25$
Pente (nm/CH ₂)	0,11	0,15	0,14	$0,14 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,08$
Ordonnée à l'origine (nm)	0,51	0,38	0,59	0,24	0,22

Tableau 3.2 Valeurs obtenues pour les épaisseurs et la pente de différentes courbes de l'épaisseur en fonction du nombre de carbones.

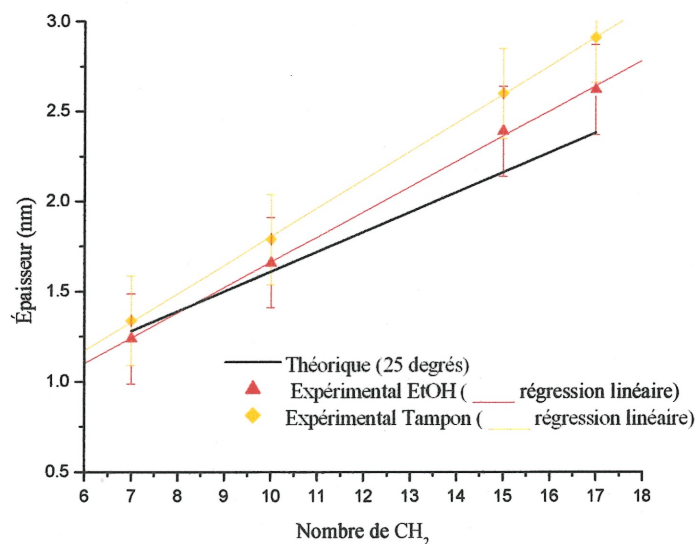


Figure 3.5 Épaisseur des thiols en fonction du nombre de CH_2 . — droite calculée (chaînes ayant un angle de 25° avec la normale); ▲ valeurs expérimentales (EtOH anhydre) et régression linéaire; ◆ valeurs expérimentales (solution tampon) et régression linéaire.

Les valeurs du nombre de nanomètres par groupement CH_2 obtenues expérimentalement pour l'éthanol anhydre ($0,14 \pm 0,08 \text{ nm/CH}_2$) et pour le tampon ($0,16 \pm 0,08 \text{ nm/CH}_2$) sont comparables aux valeurs obtenues expérimentalement par Lingler *et al*² dans l'EtOH en SPR ($0,14 \text{ nm/CH}_2$) et par Porter *et al*³ dans l'air en ellipsométrie ($0,15 \text{ nm/CH}_2$). De plus, les valeurs de pentes obtenues se rapprochent de la situation où on a un angle de 25° par rapport à la normale, ce qui est tout à fait plausible étant donné que le système avec lequel nous travaillons est constitué de surface d'or polycristallin à forte orientation $\langle 111 \rangle$ et de longues chaînes carbonées. En effet, plus la chaîne est longue, plus elle possédera un angle élevé par rapport à la normale⁴. De plus, lorsqu'on travaille avec des surfaces d'or polycristallin, des études IR réalisées par Porter *et al*³ indiquent un angle d'inclinaison des chaînes de $20\text{-}30^\circ$ pour les n-alkanethiols. Il faut cependant mentionner que toutes ces valeurs dépendent de la température (ici, $22,5^\circ\text{C}$ pour nos valeurs expérimentales), de l'indice de réfraction utilisé pour la SAM et de la pénétration du solvant dans la monocouche (interactions SAM-solvant). Enfin, comme la corrélation des droites expérimentales à la figure 3.5 est presque parfaite, on peut conclure que la SPR est une technique très sensible et que la préparation des SAMs est très reproductible.

Les mesures d'épaisseurs pour les systèmes C11-OH, C10-COOH et C15-COOH ont par ailleurs été comparées à des valeurs provenant de Bain *et al*¹. On retrouve dans ces travaux des valeurs calculées pour des pentes (en nm/CH_2) et des ordonnées à l'origine (en nm) pour le système carboxylate. Par contre, on ne comparera que les valeurs individuelles d'épaisseur obtenues pour les trois systèmes avec les valeurs de la littérature étant donné que nous n'avons pas assez de points pour former une courbe de l'épaisseur en fonction du nombre de CH_2 . Les résultats obtenus dans le cadre de ce projet sont donc comparés, dans le tableau 3.3, à des mesures expérimentales de Bain *et al*¹ obtenues par ellipsométrie ainsi qu'à des mesures calculées.

Thiols	Épaisseur Expérimentale (EtOH) $n_{\text{SAM}}=1,50$ $\pm 0,2$ nm	Épaisseur expérimentale (tampon) $n_{\text{SAM}}=1,50$ $\pm 0,1$ nm	Épaisseur calculée (Bain <i>et al</i> ¹) nm	Épaisseur expérimentale (Bain <i>et al</i> ¹) (air) $n_{\text{SAM}}=1,45$ nm
C11-OH	1.7	1.5	1.36*	-
C10-COOH	2.2	1.8	1.77	1.64
C15-COOH	2.7	2.5	2.40	2.22

Tableau 3.3 Valeurs expérimentales d'épaisseurs mesurées pour le C11-OH, le C10-COOH et le C15-COOH. Il est à noter que toutes les valeurs de comparaison proviennent de Bain *et al*¹ à l'exception de C11-OH. *Cette valeur a été calculée avec le logiciel ACD/Chem-Sketch Freeware.

Les résultats expérimentaux obtenus sont relativement près des valeurs de la littérature. On peut toutefois mentionner que les épaisseurs calculées dans la solution tampon sont beaucoup plus près des valeurs expérimentales dans l'air et calculées de Bain *et al*¹ que celles obtenues dans l'éthanol anhydre. On peut expliquer ce phénomène par le fait qu'un nettoyage important de la surface est nécessaire pour éliminer toutes les molécules susceptibles de rester à la surface de la SAM. En nettoyant à l'éthanol une première fois, puis à l'aide de la solution tampon, on augmente la quantité de solvant utilisée au nettoyage.

Le cas du C15-COOH amène cependant une discussion légèrement différente. En effet, lors d'une mesure de l'épaisseur du thiol C15-COOH dans l'EtOH, on a obtenu une valeur de 3,56 nm. Cette valeur, sans être exactement le double, est beaucoup plus élevée que la valeur attendue. On peut donc penser que des thiols ont peut-être formé une bicouche partielle, tel que schématisé à la figure 3.6. La formation de cette seconde monocouche, désorganisée, peut être expliquée par la

présence de ponts-hydrogène entre les deux têtes polaires. Dans ce cas, les propriétés de surfaces de cette monocouche seraient modifiées puisqu'on n'aurait non pas une terminaison hydrophile, mais plutôt hydrophobe qui ferait face au collagène. Nous reviendrons d'ailleurs sur ce problème dans le troisième volet du chapitre 4. Il faut aussi mentionner que ce problème n'a pas été rencontré dans le cas des SAMs de C10-COOH et C11-OH. Dans le cas du C11-OH, la probabilité de formation de ponts-hydrogène est beaucoup plus faible. Pour le C10-COOH, ce thiol possédant une chaîne plus courte, il est plus soluble dans l'éthanol. De plus, comme il forme une monocouche moins ordonnée que le C15-COOH, la probabilité de former des ponts-hydrogènes est moindre.

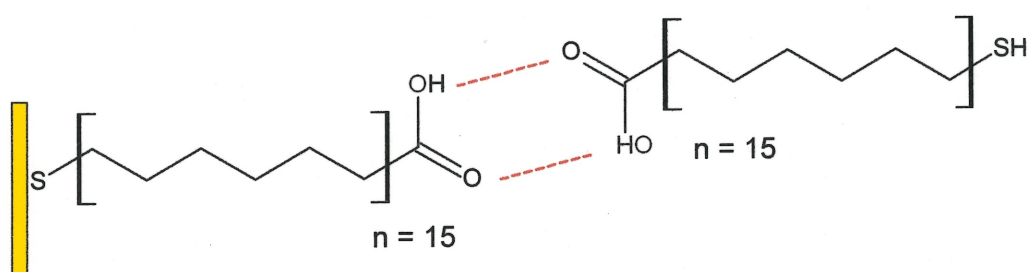


Figure 3.6 Schématisation des ponts-hydrogène possibles entre deux molécules du thiol C15-COOH.

3.2 CARACTÉRISATION DES SAMs PAR PM-IRRAS

La technique PM-IRRAS est utilisée ici à titre indicatif, de manière à observer si les spectres obtenus pour les SAMs préparées se comparent à ceux de la littérature en terme d'ordre de la chaîne et de la présence de fonctionnalités chimiques. Ainsi, dans le cas des thiols possédant une terminaison méthyle, on observe des pics spécifiques que dans la région des hautes fréquences (2800 à 3100 cm^{-1}). Les différents spectres obtenus pour ces SAMs sont présentés à la Figure 3.7 et les attributions des pics sont présentées dans le Tableau 3.4.

On retrouve tout d'abord les pics associés aux elongations asymétriques (d^-) et symétriques (d^+) du groupement $-\text{CH}_2-$, celles-ci étant situées respectivement à environ 2920 cm^{-1} et 2851 cm^{-1} . Ces valeurs concordent bien avec la littérature³. On remarque cependant que le d^+ du C8 possède une intensité très faible.

De plus, on observe r^- (dans le plan) du groupement $-\text{CH}_3$, à environ 2965 cm^{-1} , r^+ à 2878 cm^{-1} et RF provenant de la résonance de Fermi, à 2938 cm^{-1} . Ce dernier pic est causé par les interactions entre la résonance de Fermi et les déformations asymétriques du groupement $-\text{CH}_3$ à basse fréquence¹¹. Aussi, le rapport entre les intensités des pics d^+ et r^+ augmente avec la longueur de la chaîne, ce qui est normal étant donné que le nombre de $-\text{CH}_2$ devient plus élevé.

Tous ces pics caractéristiques permettent de conclure que les systèmes C8, C11, C16 et C18 sont préparés correctement en vue de leur utilisation future. Il est toutefois important de mentionner qu'on ne peut se fier ici à l'intensité relative entre les spectres. En effet, cette intensité dépend de la position de l'échantillon dans le système IRRAS, qui peut changer légèrement d'un échantillon à l'autre. Cependant, le système IRRAS n'est pas utilisé de manière quantitative dans ce projet. Aussi, les informations obtenues sont suffisantes pour répondre à nos interrogations.

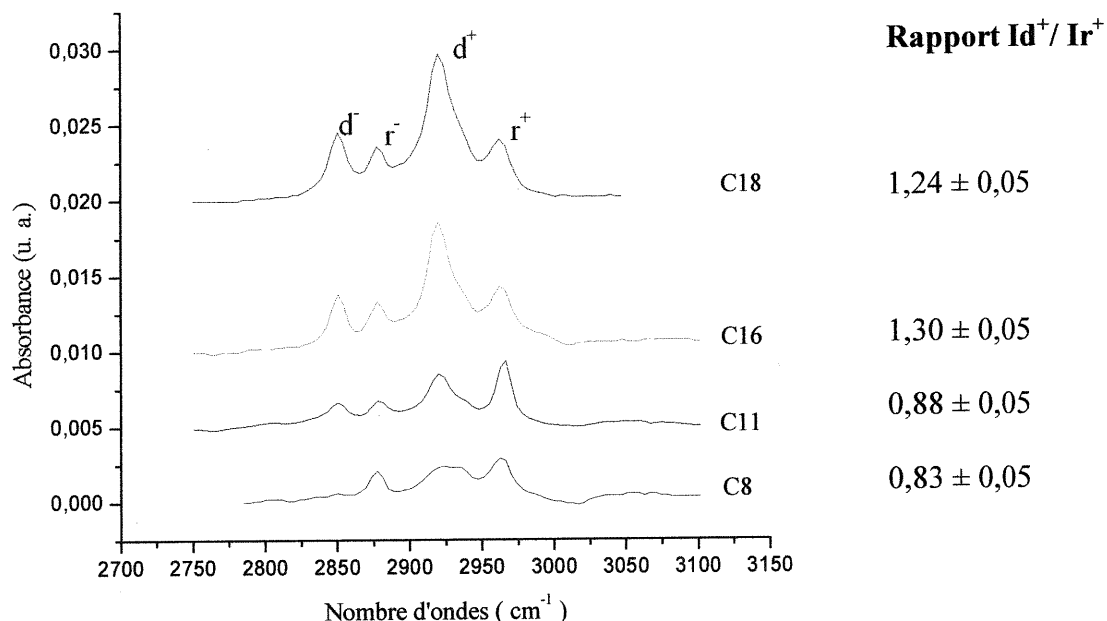


Figure 3.7 Spectres PM-IRRAS (région hautes fréquences) et rapports d'intensités entre les pics d^+ et r^+ des thiols avec terminaison $-CH_3$.

Groupement structural	Mode d'élongation C-H	Position des pics pour $CH_3(CH_2)_nSH$ adsorbé sur l'or cm^{-1}			
		$n = 7$	$n = 10$	$n = 15$	$n = 17$
$-CH_2-$	d^-	2920	2920	2919	2919
	d^+	2851	2851	2851	2850
$-CH_3$	r^-	2966	2966	2965	2964
	RF	2938*	2937*	2936*	2937*
	r^+	2878	2878	2878	2878

* Ces pics sont dissimulés par le pic à 2920 cm^{-1} , il s'agit ici d'un épaulement.

Tableau 3.4 Attribution des pics aux différents modes d'élongation pour les alcanethiols étudiés.

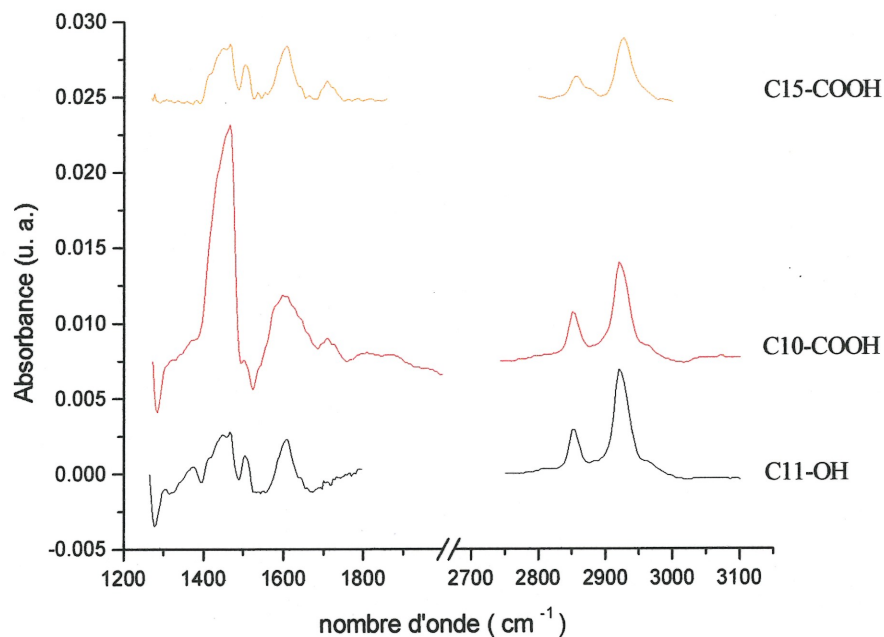


Figure 3.8 Spectres PM-IRRAS (région basses fréquences et hautes fréquences) des thiols C11-OH, C10-COOH et C15-COOH.

Groupement structural	Mode d'élongation	Position des pics pour X-(CH ₂) _n SH adsorbé sur l'or		
		cm ⁻¹		
		<i>n</i> =11 <i>X</i> =OH	<i>n</i> =10 <i>X</i> =COOH	<i>n</i> =15 <i>X</i> =COOH
<i>C = O</i>	<i>v</i>	-	1711	1708

Tableau 3.5 Attribution des pics aux différents modes d'élongation (*v*) pour la région des basses fréquences pour le C11-OH, le C10-COOH et le C15-COOH. .

Groupement structural	Mode d'élongation C-H	Position des pics pour X-(CH ₂) _n SH adsorbé sur l'or		
		cm ⁻¹		
		<i>n=10</i> <i>X=OH</i>	<i>n=10</i> <i>X=COOH</i>	<i>n=15</i> <i>X=COOH</i>
-CH ₂ -	d ⁻	2924	2921	2921
	d ⁺	2854	2851	2852

Tableau 3.6 Attribution des pics aux différents modes d'élongation pour la région des hautes fréquences pour le C11-OH, le C10-COOH et le C15-COOH. .

La Figure 3.8 présente les spectres associés aux SAMs C11-OH, C10-COOH et C15-COOH. On retrouve sur celle-ci la région des basses fréquences et la région des hautes fréquences. Dans le cas des basses fréquences, il faut tout d'abord mentionner que la zone se situant entre 1300 cm⁻¹ et 1650 cm⁻¹ représente un patron souvent rencontré dans les SAMs mais dont on n'a pas d'attribution précise. Cependant, dans le cas du C10-COOH et du C15-COOH, on retrouve un pic à respectivement 1711 cm⁻¹ et 1708 cm⁻¹ qui est associé à l'élongation C=O (ν). Ce pic est caractéristique du groupement carboxylate et permet de conclure que ces deux SAMs possèdent la terminaison attendue¹². De plus, la position de cette bande suggère une présence possible d'un dimère^{12,13}. En effet, un carbonyle, pour ce genre de molécule, possède généralement un pic ν C=O à environ 1760 cm⁻¹. Cependant, dans le cas présent, le pic carbonyle apparaît à une fréquence plus basse. Cet effet peut être causé par une interaction hydrogène intermoléculaire.

De plus, les pics associés aux d⁻ et d⁺ du groupement -CH₂- sont présentes dans la région des hautes fréquences des spectres obtenus (Tableau 3.6). Celles-ci sont situées respectivement à environ 2921 cm⁻¹ (2924 cm⁻¹ dans le cas de C11-OH) et 2851 cm⁻¹ (2854 cm⁻¹ dans le cas de C11-OH). Encore une fois, ces valeurs concordent avec la littérature³. On n'observe cependant pas de pics associés à -CH₃

puisque ce groupement est absent des SAMs étudiées ici. Dans le cas du C11-OH, on peut donc conclure à la bonne terminaison de la couche par l'absence de pic associé au groupement C=O ainsi que de pics associés à $-\text{CH}_3$.

Un point intéressant est le fait qu'on puisse associer la position des pics d^- et d^+ du $-\text{CH}_2-$ au degré de cristallinité d'une SAM, tant pour les SAMs à terminaison méthyles que les autres. En effet, selon la littérature^{1,3}, plus la chaîne carbonée est longue, plus les SAMs s'orienteront de manière ordonnée. Ainsi on considère que les chaînes dites courtes ($n=10$ carbones et moins) formeront une couche plus désordonnée alors que les chaînes dites longues ($n = 12$ carbones et plus), grâce aux interactions chaînes-chaînes plus propices, formeront une couche mieux organisée. Cette propriété se présente dans un spectre IR par un changement dans la position des pics mentionnés précédemment. Plus les chaînes sont ordonnées, plus les pics tendront vers 2918 cm^{-1} et 2850 cm^{-1} .³ Cependant, dans le cas de chaînes plus courtes, on observera plutôt des pics à 2924 cm^{-1} et 2854 cm^{-1} .³ C'est ce qui est observé dans le cas du C11-OH, dont les pics d^- et d^+ apparaissent à des nombres d'ondes plus élevés (2924 cm^{-1} et 2854 cm^{-1}). Cependant, dans le cas de toutes les autres SAMs, tant pour les terminaisons $-\text{CH}_3$ que pour les terminaisons $-\text{COOH}$ on n'observe pas de différence notable dans la position de ces pics; il apparaît que ces derniers revêtent tous une structure ordonnée.

3.3 CONCLUSIONS

Le premier volet de cette recherche a permis de vérifier la qualité des SAMs utilisées dans le cadre de ce projet. La cinétique d'adhésion des SAMs sur l'or a d'abord été caractérisée à l'aide de la spectroscopie SPR et a permis d'observer une adhésion en deux temps, d'abord rapide (quelques minutes), puis lente (plusieurs heures), telle que la littérature le démontre. Par la suite, on a caractérisé les épaisseurs des SAMs formées à l'aide de la spectroscopie SPR et de la modélisation de Fresnel. Dans tous les cas, il est possible d'arriver à des valeurs très près de la littérature, ce qui permet de conclure que les SAMs préparées sont complètes et denses. Cependant, les expériences effectuées démontrent qu'il faut être prudent avec les SAMs constituées de C15-COOH et les rincer abondamment. En effet, celles-ci ont tendance à former plus d'une monocouche.

Par ailleurs, les SAMs ont été caractérisées par PM-IRRAS, et pour chacune d'entre elles, on a retrouvé des pics caractéristiques. Dans le cas des SAMs à terminaison méthyles, les pics δ^- et δ^+ du groupement $-\text{CH}_2-$ et les pics ν^- , ν^+ et RF du groupement $-\text{CH}_3$ ont été observés. Dans le cas des terminaisons autres que méthyles, on a retrouvé aussi les pics δ^- et δ^+ du groupement $-\text{CH}_2-$. De plus, dans le cas des SAMs ayant un groupement carboxylate comme terminaison, le pic ν du groupement $\text{C}=\text{O}$ a été observé. La position de ce pic nous permet de soupçonner une interaction intermoléculaire formant des dimères entre les têtes $-\text{COOH}$ des thiols.

Enfin, la caractérisation des SAMs par SPR et PM-IRRAS a permis de montrer la grande sensibilité de ces deux techniques de caractérisation des surfaces.

Il est donc possible de conclure que les SAMs préparées peuvent être utilisées comme surface de base à l'adhésion du collagène étant donné que leur structure interfaciale a été vérifiée par la spectroscopie SPR et le PM-IRRAS.

RÉFÉRENCES

- (1) Bain, D. B.; Throughton B. E.; Tao Y.-T.; Evall, J.; Whitesides, G.M.; Nuzzo, R. G.; *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321.
- (2) Lingler, S.; Rubinstein, I.; Knoll, W.; Offenhäusser, A.; *Langmuir* **1997**, *13*, 7085.
- (3) Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D.L.; Chidsey, C.E.D.; *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559.
- (4) Schreiber, F; *Prog. in Surf. Sci.* **2000**, *65*, 151.
- (5) Peterlinz, K. A.; Georgiadis, R.; *Langmuir* **1996**, *12*, 4731.
- (6) Buck, M. E. F.; Fischer, J.; Grunze, M.; Trager, F.; *Appl. Phys. A* **1991**, *53*, 552.
- (7) Hahner, G. W., C.; Buck, M.; Grunze, M.; *Langmuir* **1993**, *9*, 4.
- (8) Poirier, G. E.; Pyland, E.D.; *Science* **1996**, *272*, 1145.
- (9) Ulman, A.; *An Introduction to Ultrathin Organic Films from Langmuir-Blodgett to Self-Assembly*; Academic Press: Toronto, 1991.
- (10) Badia, A.; *résultats non-publiés*.
- (11) Hill, I. R.; Levin, I. W.; *J. Chem. Phys.* **1979**, *70*, 842.
- (12) Silverstein, R. M.; Webster, F. X.; *Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6th Ed.*; John Wiley & Sons, Inc.: New-York, 1998.

- (13) Schmitt, H.; Badia, A.; Dickson, L.; Reven, L.; Lennox, B.; *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 475.

CHAPITRE 4

ÉTUDE DE L'ADHÉSION DU COLLAGÈNE PAR SPR, AFM & PM-IRRAS

Ce quatrième chapitre présente les résultats relatifs à l'adhésion du collagène sur des monocouches de différents thiols. On traite ici de l'épaisseur de la couche de collagène adsorbée mesurée par SPR et comparée à celle mesurée à l'aide des images AFM. Ce chapitre a été divisé en cinq volets. Tout d'abord, on traite de la caractérisation de l'adhésion du collagène sur une surface d'hexadécane-thiol. Par la suite, on vérifie si la longueur de la chaîne carbonée du thiol a un effet quelconque sur l'adhésion du collagène. L'adhésion de la protéine sur des surfaces hydrophiles est présentée dans la troisième section de ce chapitre. Ensuite, on présente la caractérisation faite par PM-IRRAS du collagène adsorbé sur les différentes surfaces. Finalement, quelques résultats associés à la technique de μ CP (impression par micro-contact) sont présentés dans la dernière section de ce chapitre.

4.1 ÉTUDE DE L'ADHÉSION DU COLLAGÈNE SUR UNE SAM D'HEXADÉCANETHIOL

Il est connu de la littérature que les protéines adhèrent mieux sur des surfaces hydrophobes¹, étant donnée leur composition chimique. Dans le cas du collagène, la leucine, présente en position X de la structure primaire Gly-X-Y, est un résidu hydrophobe jouant un rôle important dans les interactions hydrophobes de cette protéine. De par sa position dans la molécule de collagène, il ne contribue pas à la stabilité de la triple-hélice du collagène mais est plutôt impliqué dans les interactions hydrophobes avec les molécules environnantes^{2,3}. Cette molécule est en effet exposée au solvant selon un pourcentage d'environ 70%⁴. Cette propriété peut donc être intéressante dans le cas où l'on veut faire adhérer sélectivement le collagène sur une surface. Cependant, il est important de vérifier si cette propriété reste efficace sur des monocouches de thiols, et surtout de voir si cette adhésion varie dans le temps. Dans ce premier volet, on a donc cherché à observer l'adhésion du collagène sur une SAM d'hexadécane-thiol (C16) en variant le temps d'incubation, tout d'abord de manière qualitative, grâce à la technique d'imagerie par AFM, puis de manière quantitative, à l'aide de la SPR et de l'analyse de surface des images AFM.

Avant de traiter des résultats obtenus par la technique SPR, il est important de mentionner que cet appareil n'est pas thermostaté. En conséquence, il a fallu travailler à la température de la pièce, soit 23,5 °C, plutôt qu'à 37 °C pour l'assemblage et l'adsorption du collagène tel qu'indiqué dans le protocole rapporté par Holmes *et al*⁵. Cependant, avant de débiter ces expériences, une vérification a été faite. On a laissé incuber des échantillons de C16 à 37°C ainsi qu'à 23,5 °C dans les solutions de collagène durant différentes périodes de temps et on a observé par AFM si le collagène adhérait de la même manière aux surfaces incubées aux deux températures. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 4.1. Dans les deux cas, le collagène a formé une couche trouée sur la surface, accompagnée de petites fibrilles. De plus, le taux de recouvrement a été calculé sur les deux images à l'aide du logiciel Scion Image. Dans le cas de l'incubation à 37°C, on a obtenu un taux de recouvrement de $55 \pm 5\%$ et pour l'incubation à température de la pièce, un taux de recouvrement de $52 \pm 5\%$. L'épaisseur moyenne du film troué est de $13,9 \pm 0,5$ nm dans le premier cas et de $13,2 \pm 0,5$ nm dans le second. La morphologie et le taux de recouvrement étant semblables, on peut conclure que les deux méthodes donnent des résultats similaires et que la température n'est pas un paramètre important dans le cas de l'adhésion du collagène sur des SAMs.

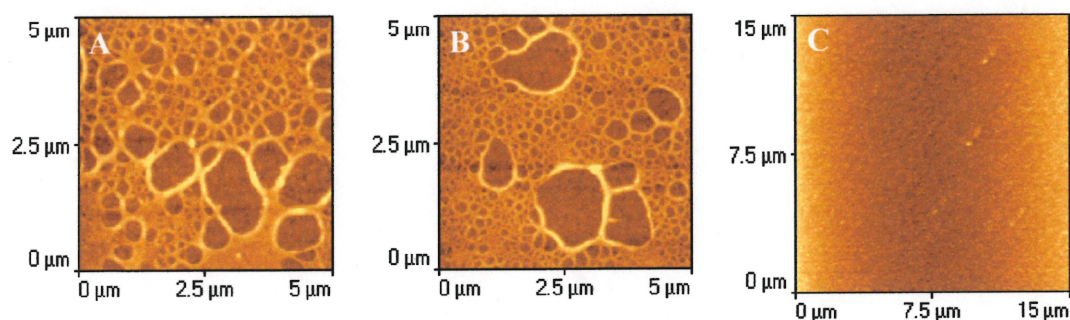


Figure 4.1 Images AFM (topographie), collagène adsorbé sur une SAM de C16. (Incubation 90 minutes) Adsorption effectuée à : **A.** 37°C et **B.** 23,5°C. **C.** Image AFM (topographie), SAM de C16 sur l'or (pour comparaison).

4.1.1. Cinétique de l'adhésion du collagène par SPR et AFM

La cinétique d'adhésion du collagène sur une surface C16 a tout d'abord été effectuée par spectroscopie SPR. Pour ce faire, on a étudié la variation de l'angle de couplage en fonction du temps, sur une période de 950 minutes. La courbe obtenue est présentée à la Figure 4.2A. On remarque tout d'abord une augmentation rapide de l'angle de couplage après l'injection du collagène, qui est associée à une augmentation d'épaisseur et par le fait même à une augmentation de la quantité de collagène sur la surface. Par la suite, un maximum est atteint à environ 40 minutes, et enfin, une diminution de l'angle de couplage, qui devient moins importante après 700 minutes. Cette allure générale de la courbe peut mener à deux hypothèses. Tout d'abord, il est possible que le collagène commence par adhérer à la surface de la SAM pour ensuite se désorber en partie. Cependant, on peut aussi penser qu'il s'agit d'une réorganisation structurale du collagène à la surface de la monocouche. En effet, la spectroscopie SPR est assez sensible pour détecter ce genre de modification sur une surface⁶. Le fait d'utiliser la microscopie AFM en parallèle à la spectroscopie SPR permet d'observer en temps réel ce qui se passe à la surface, et donc, de répondre à l'interrogation. (Les échantillons sont tout d'abord analysés en temps réel à l'aide de la SPR. Cependant, ils sont retirés du système à des temps précis d'incubation pour être étudiés *ex situ* en AFM.) Sur la figure 4.2B, on observe plusieurs images AFM (en topographie), à des temps précis d'incubation. Ces temps sont d'ailleurs notés sur la courbe de cinétique SPR. Il est à noter qu'à partir de ce point, toutes les images AFM (présentées dans les sections 4.1, 4.2 et 4.3) proviennent d'échantillons analysés par SPR. Par le fait même, une comparaison directe peut être faite entre l'épaisseur de la couche de collagène adsorbé mesuré par SPR et AFM

La première observation qu'on peut déduire de ces images AFM est qu'avec le temps, les fibrilles de collagène semblent occuper une aire de surface plus importante, tout en diminuant de hauteur. Cette remarque est d'autant plus importante pour l'image G (Fig. 4.2B). En effet, en regardant les échelles de l'axe

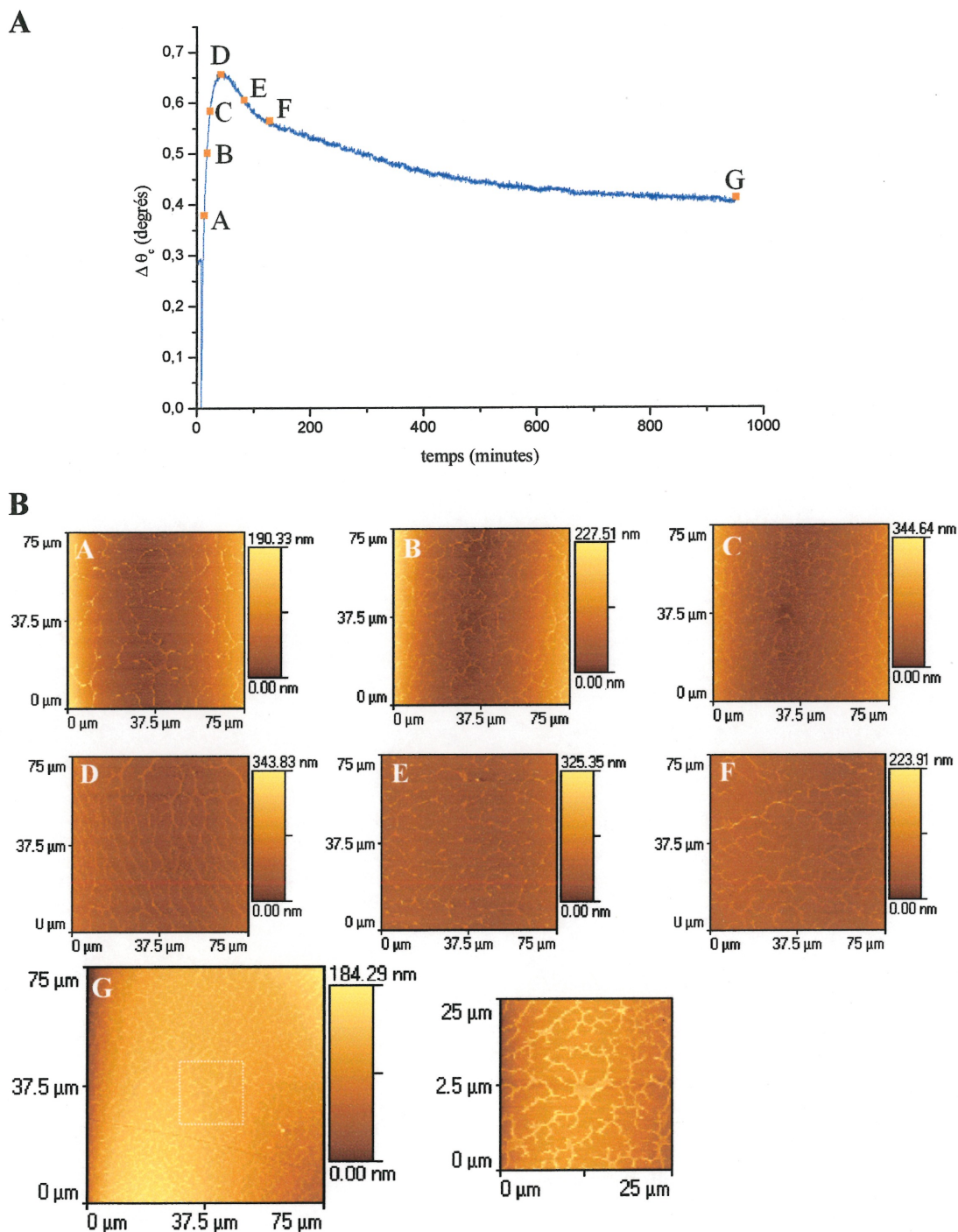


Figure 4.2. A. Cinétique de l'adhésion du collagène sur une SAM de C16 par spectroscopie SPR. B. Images AFM (topographie) de l'adhésion du collagène sur la SAM de C16 à a. 5 minutes, b. 10 minutes, c. 15 minutes, d. 35 minutes, e. 75 minutes, f. 120 minutes et g. 15 heures.

des Z (échelle de hauteur) des images A à G, on remarque que les changements en Z avec le temps d'incubation suivent la variation de l'angle de couplage θ_c sur la courbe de cinétique d'absorption SPR. Tout d'abord, la valeur maximale des Z augmente, atteint ensuite un certain plateau entre 15 et 75 minutes, puis redescend jusqu'à un certain point. De plus, on a calculé le pourcentage de recouvrement du collagène pour chacun des temps d'incubation, et on a remarqué que ce dernier passait de $52 \pm 5\%$ après 5 minutes d'incubation à $63 \pm 5\%$ après 15 heures. On observe donc une légère augmentation, qui pourrait être associée à une réorganisation de surface. Les résultats associés à l'étude systématique de l'épaisseur des fibrilles sont présentés au point suivant de cette section. En somme, étant donné que l'étude des images AFM ne montre pas qu'il y a moins de collagène avant qu'après, on peut croire que nous sommes face à un phénomène de réorganisation à la surface plutôt qu'à un phénomène de désorption.

Il faut de plus mentionner qu'à l'occasion, on observe non pas des fibrilles, comme présentées à la figure 4.2B, mais plutôt un recouvrement plus ou moins uniforme de collagène sur la surface d'or, accompagné de fibrilles. Ce genre de situation n'apparaît jamais dans les 15 premières minutes d'incubation, mais plutôt après. Un exemple de cette situation est présenté à la figure 4.3. L'épaisseur de ce film uniforme a été mesurée à l'aide de l'AFM. Pour ce faire, on a appliqué une force très grande avec la pointe d'AFM de manière à former un trou dans le film de protéine. Par la suite, on a imagé cette zone, et on a trouvé que le film possédait une épaisseur d'environ $7,8 \pm 0,3$ nm. Cette valeur a été calculée sur une moyenne de 10 mesures prises à des endroits différents sur l'échantillon. La figure 4.4 montre la méthode « cross-sectional analysis ». En comparant cette valeur à celles obtenues à partir des images présentées à la figure 4.1, on remarque que cette valeur est plus petite que celles obtenues lors de comparaison entre les deux méthodes d'incubation. Il faut d'ailleurs noter que les images présentées à cette figure sont des détails (5 μm) de films présents sur la surface. On ne peut par contre rien conclure face à cette différence d'épaisseur.

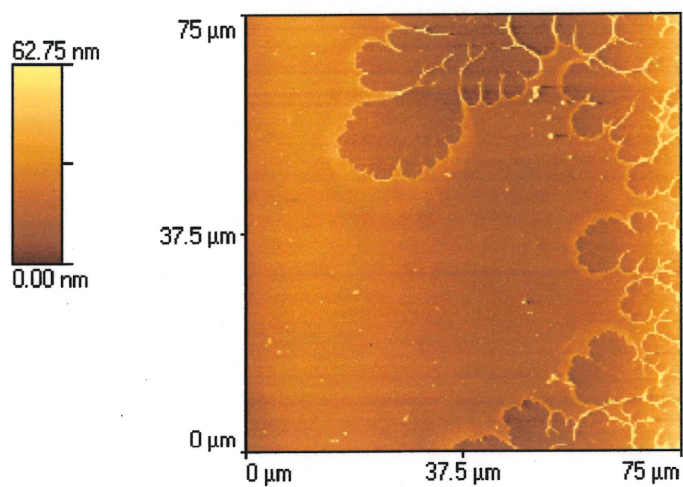


Figure 4.3 Image AFM du collagène adsorbé sur une SAM de C16. Période d'incubation de 120 minutes.

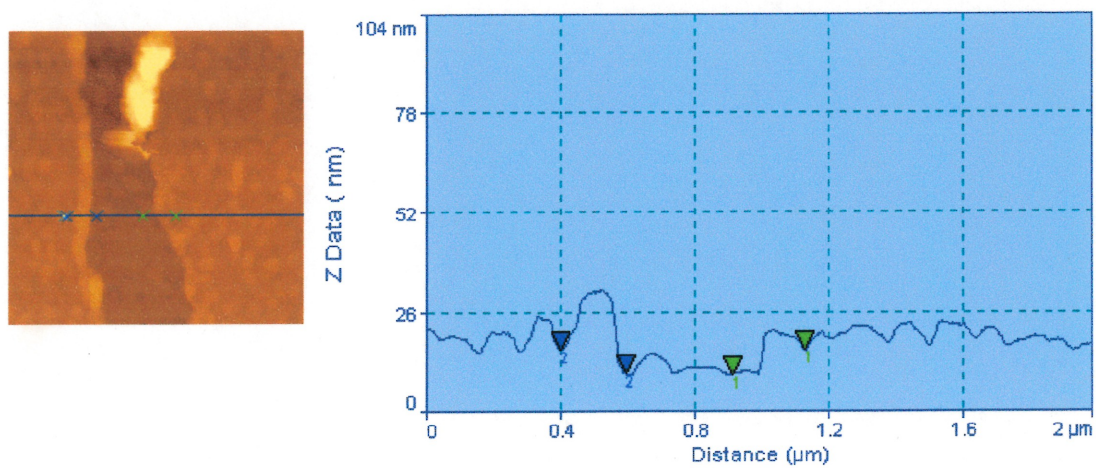


Figure 4.4 Exemple de mesure de l'épaisseur d'un film uniforme de collagène pour une incubation de 120 minutes ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) à partir d'une image AFM (topographie)

4.1.2. Épaisseur du collagène par SPR et AFM

Un des buts important de ce projet est d'apporter une meilleure connaissance sur l'adhésion du collagène dans le temps. Aussi, en étudiant l'épaisseur des fibrilles selon le temps d'incubation, on peut voir ce qui se passe à la surface. On a donc procédé au calcul de l'épaisseur de la couche de collagène tout d'abord par la spectroscopie SPR en utilisant la modélisation de Fresnel. Dans le cas du collagène, tous les paramètres de modélisations sont ceux présentés dans le Tableau 3.1 La méthode utilisée est d'ailleurs la même que pour la section 3.2. La seule différence réside dans le fait que nous avons une couche de plus, soit le collagène. L'épaisseur est ce que nous recherchons, ε' pour le collagène est $2,1025^7$ (où ε' est le carré de n , qui est de 1,45 à 1,5 pour les protéines) et ε'' est de zéro. Cependant, comme l'épaisseur mesurée par la spectroscopie est une moyenne de la surface analysée (aire $\approx 3 \text{ mm}^2$), et comme cette dernière n'est pas uniforme, les valeurs obtenues ne peuvent être étudiées que de manière qualitative. On a donc aussi mesuré de manière systématique l'épaisseur des fibrilles sur les images AFM obtenues à des temps précis, et on a procédé à des calculs de statistique sur chaque échantillon. Les résultats des deux méthodes sont présentés en parallèle dans cette section.

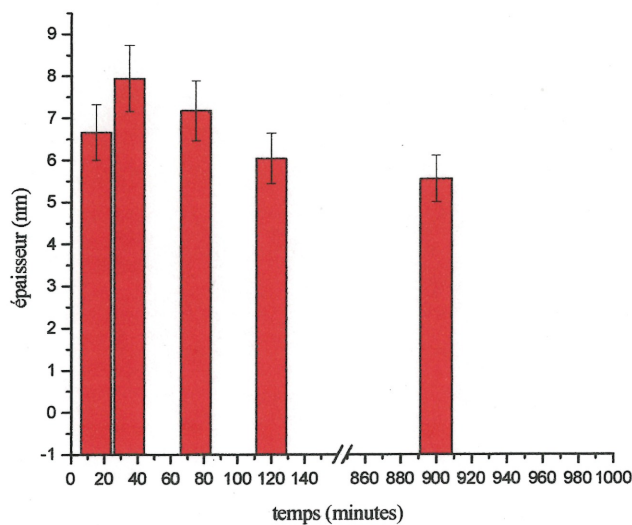


Figure 4.5 Épaisseur du collagène adhérent sur une SAM de C-16, mesuré par SPR, à divers temps d'incubation.

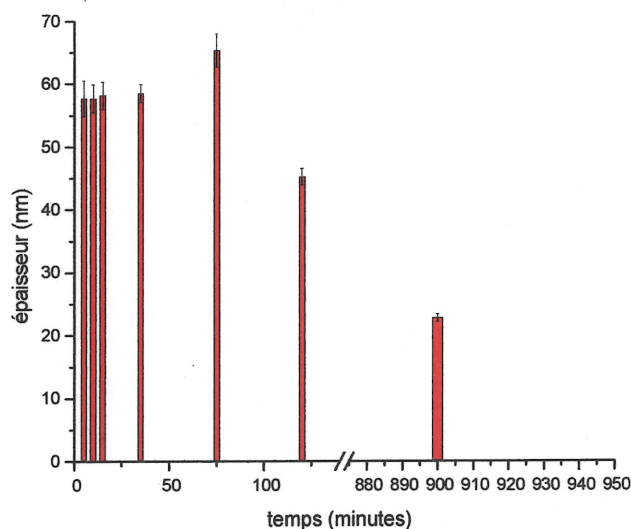


Figure 4.6 Épaisseur des fibrilles de collagène adhérentes sur une SAM de C-16, mesurée par AFM, à divers temps d'incubation.

Dans un premier temps, l'épaisseur de collagène mesurée par la spectroscopie SPR a été modélisée selon l'équation de Fresnel (à l'aide des paramètres décrits précédemment). Les résultats obtenus pour divers temps d'incubation sont présentés à la figure 4.5. L'allure générale de la courbe présente une augmentation au cours des 40 premières minutes d'incubation, puis une diminution de l'épaisseur en fonction du temps. Cependant, les valeurs calculées oscillent entre 6 et 8 nanomètres, ce qui est loin de la réalité. En effet, une fibrille mature possède plutôt un diamètre se situant entre 15 et 500 nm⁸⁻¹⁰.

La figure 4.6 présente l'épaisseur des fibrilles calculée à partir d'images AFM. Pour ce faire, l'épaisseur de 50 fibrilles différentes a été mesurée. De ces mesures, on a calculé l'épaisseur moyenne, présentée ici en fonction du temps d'incubation. On remarque que la valeur moyenne reste assez stable dans les 35 premières minutes d'incubation, à environ 57 nm. Cependant, on voit nettement une augmentation de la taille moyenne des fibrilles à 75 minutes. Enfin, cette taille moyenne diminue par la suite pour se stabiliser aux alentours de 25 nm, après 900 minutes. Cette tendance est donc la même que celle observée en spectroscopie SPR,

à la différence près que les valeurs de diamètre de fibrilles se situent dans les valeurs attendues.

Une distribution de l'épaisseur des fibrilles a été effectuée à partir des 50 mesures prises sur les différentes images AFM, pour chaque temps d'incubation. La figure 4.7 présente le pourcentage de la quantité de fibrilles d'une certaine épaisseur pour chaque dizaine de nanomètres. En prenant les bandes associées à chaque temps d'incubation, on remarque que pour des temps d'incubation long (plus de 35 minutes) le maximum associé à chaque courbe diminue. Ainsi, 34% des fibrilles possèdent un diamètre entre 60 et 70 nm après 35 minutes, alors qu'après 900 minutes, 68% des fibrilles possèdent un diamètre entre 10 et 20 nm. Un autre point important est la distribution en elle-même. Lorsqu'on observe les temps assez courts d'incubation, on remarque que la distribution est très large, et s'étend de 20 nm à 110 nm (5 minutes et 10 minutes). De plus, le maximum de ces distributions n'est pas bien défini. Les distributions associées à 10 et 35 minutes prennent une allure plutôt Gaussienne, avec un maximum mieux défini. La distribution présentée à 75 minutes semble être une situation intermédiaire, où on observe une quantité semblable de fibrilles à diverses épaisseurs. Enfin, les distributions relevant de temps plus longs, soient 120 et 900 minutes, sont beaucoup plus étroites avec un maximum bien défini. On peut donc conclure que plus le temps d'incubation est long, plus les fibrilles adoptent des structures uniformes.

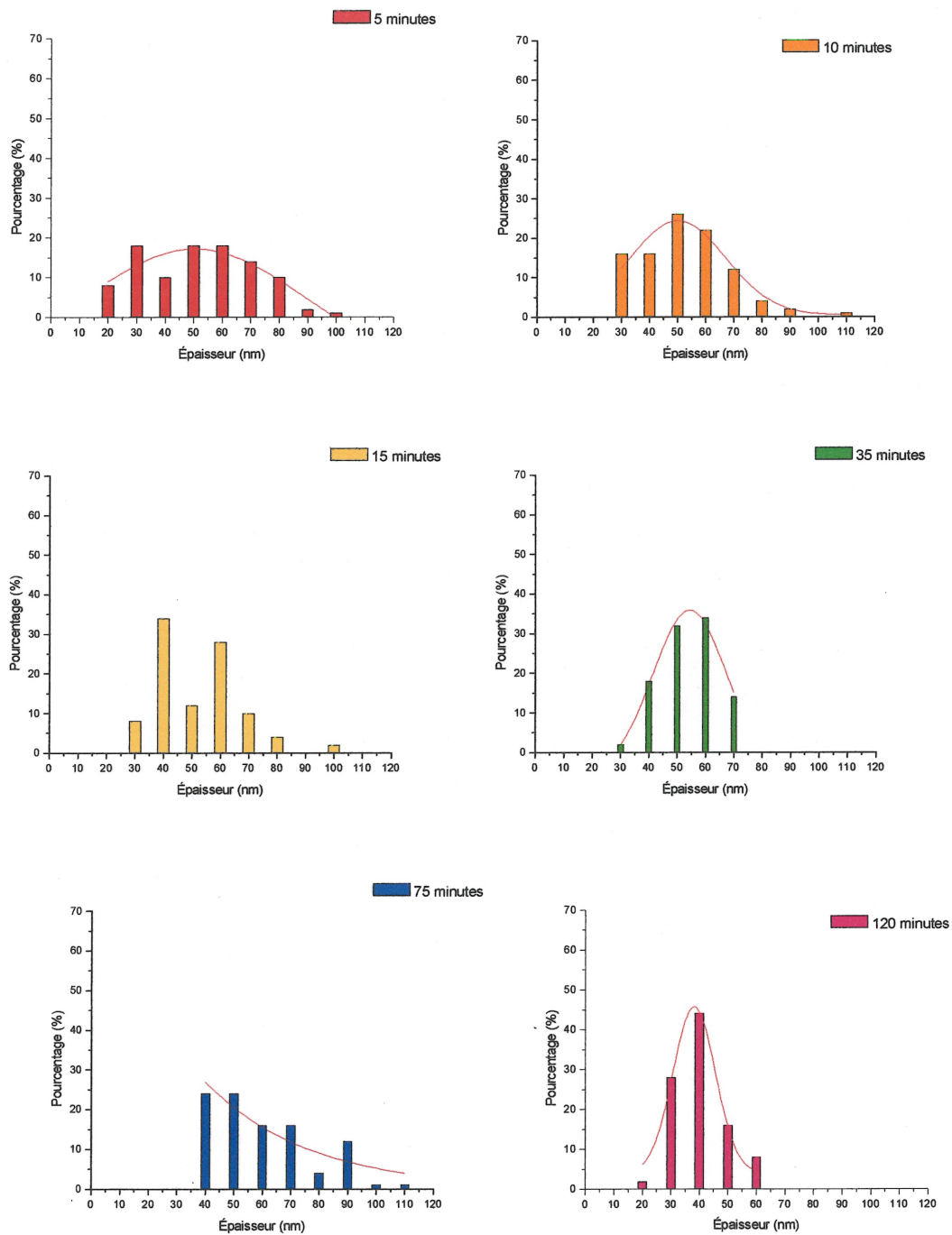


Figure 4.7 Distribution de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) d'une certaine épaisseur. (SAM de C16)

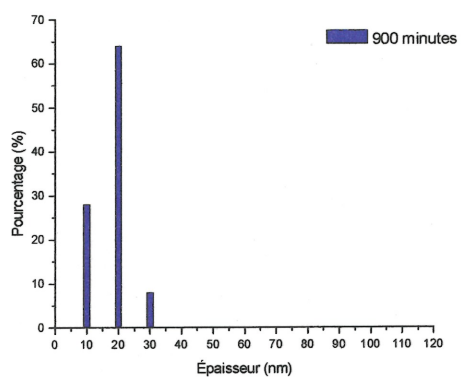


Figure 4.7 suite Distribution de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) d'une certaine épaisseur. (SAM de C16)

4.2 ÉTUDE DE L'ADHÉSION DU COLLAGÈNE EN FONCTION DE LA LONGUEUR DE LA CHAÎNE

Ayant montré précédemment que le collagène adhère bien sur une surface méthyle, on peut se demander si la longueur de la chaîne carbonée peut influencer l'adhésion du collagène sur cette terminaison. Il est connu de la littérature que plus la chaîne carbonée d'un thiol est longue et plus l'ordre des chaînes est important¹¹. Ainsi, avant 10 ou 11 carbones, les chaînes sont dans un état moins ordonné. Lorsque les chaînes possèdent plus de 12 carbones, elles sont alors dans un état plus ordonné. On veut donc observer ici si l'ordre de la monocouche auto-assemblée a une influence sur l'adhésion de la protéine, et ce en fonction du temps d'incubation. On a donc procédé de la même manière que précédemment, soit par une analyse d'abord qualitative (AFM), puis quantitative (SPR et AFM).

4.2.1. Cinétique de l'adhésion du collagène par SPR et AFM.

La figure 4.8 présente les cinétiques d'adhésion du collagène sur différents thiols à terminaison méthyles. On retrouve l'adhésion du collagène sur un C8, un C11 et un C18. Les trois courbes présentent la même tendance que lors de l'adhésion du collagène sur un C16. On remarque tout d'abord une augmentation rapide de l'adhésion, suivie d'un maximum, qui varie entre 40 et 100 minutes d'incubation, puis d'une diminution. Une diminution plus lente apparaît par la suite, après environ 700 minutes d'incubation. Il semble de plus que le C11 et le C18 possèdent un $\Delta\theta_c$ plus élevé que le C8 et le C16. Cependant, comme l'adhésion du collagène n'est pas uniforme sur toute la surface, il est possible que la valeur mesurée varie légèrement.

Les courbes relatives aux terminaisons présentent donc toutes la même allure. Cependant, on ne peut conclure par ces résultats que l'adhésion du collagène varie selon la longueur de la chaîne. En effet, on ne retrouve pas de différence significative dans l'adhésion du collagène sur une terminaison méthyle selon la

longueur de la chaîne. Le phénomène semble plutôt aléatoire, considérant les résultats présentés à la Figure 4.8.

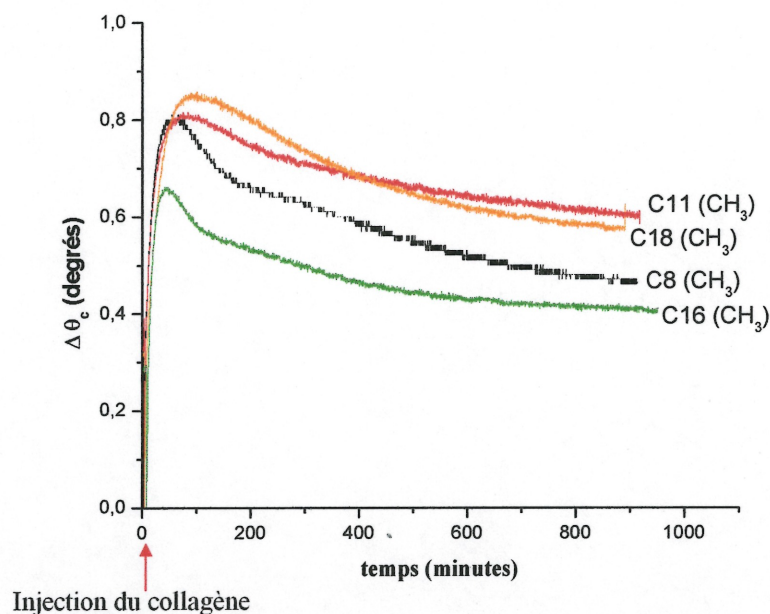


Figure 4.8 Cinétique de l'adhésion du collagène sur un C8 (noir), un C11 (rouge), un C16 (vert) et un C18 (orange) par spectroscopie SPR.

On retrouve à la Figure 4.9 différentes images prises à l'aide de l'AFM. Tout d'abord, les images A, B et C représentent l'adhésion du collagène sur un C8 à respectivement 15 minutes, 34 minutes et 15 heures. Les images D, E et F sont associées à l'adhésion du collagène sur un C11, encore une fois à 15 minutes, 35 minutes et 15 heures d'incubation. Finalement, les images G, H et I représentent les mêmes temps d'incubation, mais pour l'adhésion du collagène sur un C18. Il apparaît que dans le cas du C11 et du C18, une mince couche uniforme de collagène est présente sur une surface importante de l'échantillon. Cependant, les fibrilles restent tout de même présentes. Par contre, on ne peut pas associer la hauteur en Z (Fig. 4.9) avec la variation de θ_c obtenue en fonction du temps en SPR. Ceci est principalement dû au fait que l'axe des Z considère jusqu'au point le plus élevé pour déterminer sa valeur maximale, et dans le cas de plusieurs images, des agglomérats de collagène sont présents et sont plus hauts que les structures étudiées. On ne peut

donc rien conclure de ces valeurs de Z. Cependant, les valeurs obtenues à partir des calculs d'épaisseurs présentés à la section suivante permettent de mieux caractériser les fibrilles de ces différents échantillons.

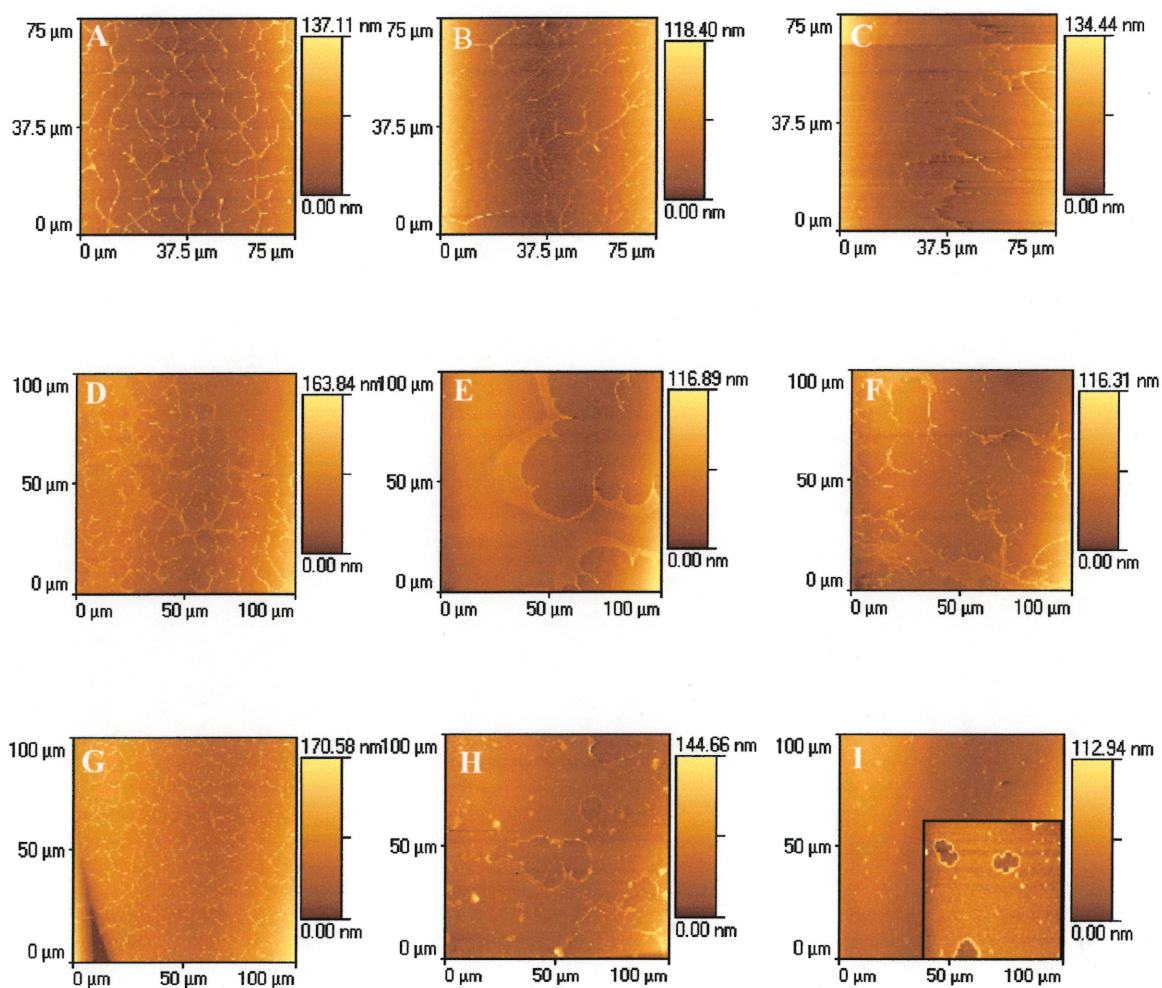


Figure 4.9 Images AFM (A, B, C : 75 μm x 75 μm ; D à I : 100 μm x 100 μm , I détail 10 μm x 10 μm) de l'adhésion du collagène sur A. C8 (15 minutes), B. C8 (34 minutes), C. C8 (15 heures), D. C11 (15 minutes), E. C11 (35 minutes), F. C11 (15 heures), G. C18 (15 minutes), H. C18 (35 minutes), I. C18 (15 heures).

Le pourcentage de recouvrement de chaque surface par le collagène a été calculé pour toutes les images présentées. Les résultats obtenus sont présentés à la Figure 4.10, selon chaque longueur de chaîne carbonée.

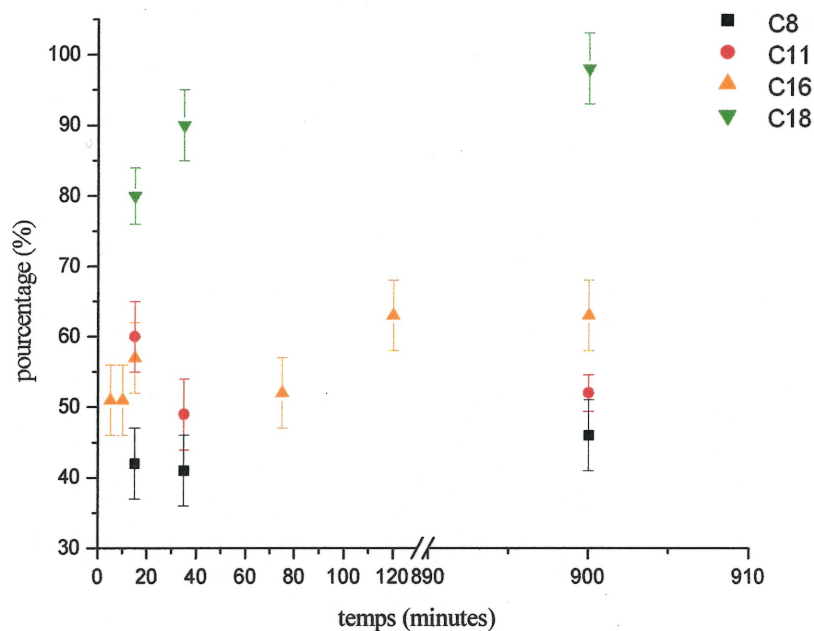


Figure 4.10 Taux de recouvrement du collagène (en pourcentage) en fonction du temps pour tous les thioles à terminaison méthyle étudiés.

Sur la Figure 4.10, le taux de recouvrement augmente avec la longueur de la chaîne. De plus, les taux de recouvrement ne subissent qu'une légère augmentation avec le temps. Pour un C8, les taux de recouvrement varient plutôt autour de 40%, pour le C11, on retrouve plutôt un taux de recouvrement aux alentours de 50%, pour le C16, 60% et pour le C18, 90%. Il faut mentionner que dans le cas du C18, le recouvrement n'est pas constitué de fibrilles, mais bien d'un film uniforme, ce qui fait nécessairement augmenter la valeur. Cependant, dans les autres cas, ce sont les fibrilles qui recouvrent en grande partie la surface de thioles.

4.2.2. Épaisseur du collagène adsorbé par SPR et AFM

L'épaisseur du collagène sur les différents thiols a été mesuré à l'aide de deux méthodes, de la même manière qu'à la section précédente. L'épaisseur a donc été calculée tout d'abord à l'aide des courbes obtenus en spectroscopie SPR et modélisées par les calculs de Fresnel. Par la suite, des statistiques ont été effectuées sur les fibrilles observées par AFM pour différents échantillons, à divers temps d'incubation, pour le C8, le C11 et le C18. Ces valeurs ont été comparées à celles obtenues pour le C16. La seconde méthode a été utilisée pour la même raison que dans la section suivante. En effet, la spectroscopie donne une valeur moyenne de l'épaisseur du collagène sur les surfaces. Les structures n'étant pas uniformes, on ne peut donc se fier qu'à l'allure générale de la courbe.

La Figure 4.11 présente l'épaisseur du collagène adhérente sur le C8, le C11, le C16 et le C18 calculée selon la méthode relative à la SPR. Les tendances pour le C8, le C11 et le C18 sont les mêmes que celles pour le C16. On observe en effet tout d'abord une augmentation, puis une diminution de l'épaisseur en fonction du temps. Cependant, les valeurs calculées oscillent encore une fois entre 6 et 9 nanomètres. Les mesures calculées à partir des images AFM sont donc importantes pour vérifier si les fibrilles observées sont les structures attendues. On peut cependant conclure de cette figure que peu importe la surface méthyle présentée au collagène, ce dernier s'absorbe de manière aléatoire, sans suivre vraiment de tendance d'adhésion en fonction de la longueur de la chaîne carbonée du thiol.

La Figure 4.12 présente quant à elle l'épaisseur des fibrilles calculée à partir d'images AFM. Les valeurs obtenues expérimentalement diffèrent d'une longueur de chaîne alcane à l'autre. On remarque tout d'abord que pour une chaîne C8, les fibrilles possèdent un diamètre très élevé, d'environ 75 nm. Par la suite, cette valeur diminue à environ 38 nm après 35 minutes. La valeur obtenue après 900 minutes est sensiblement la même qu'après 35 minutes. Pour le C11 cependant, le diamètre des fibrilles à 15 minutes et à 35 minutes est sensiblement le même, soit d'environ 58

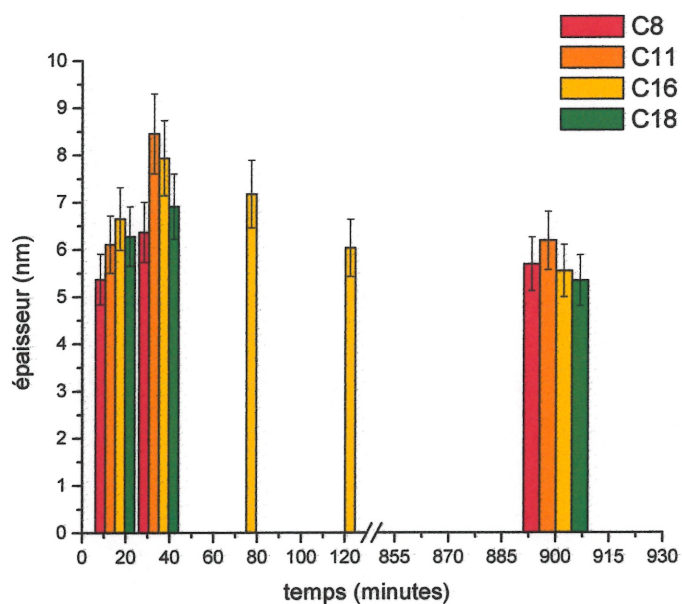


Figure 4.11 Épaisseur du collagène adhérent sur un C8 (rouge), un C11 (orange), un C16 (jaune) et un C18 (vert) mesuré par SPR, à divers temps d'incubation.

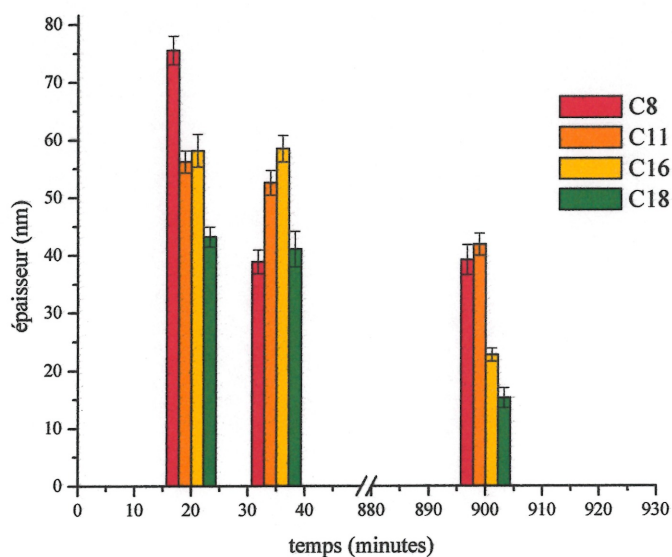


Figure 4.12 Épaisseur des fibrilles de collagène adhérentes sur un C8 (rouge), un C11 (orange), un C16 (jaune) et un C18 (vert) mesurée par AFM, à divers temps d'incubation. L'épaisseur rapportée est la moyenne de 50 fibrilles différentes.

nm. Par la suite, on trouve que le diamètre est plutôt d'environ 43 nm après 900 minutes. Le C18 suit la même tendance que le C11, en ayant toutefois des valeurs de diamètre plus petit que pour ce dernier. En effet, l'épaisseur calculée pour 15 et 35 minutes est plutôt de 42 nm, alors qu'après 900 minutes, on observe une épaisseur de 15 nm. En comparant avec les valeurs obtenues précédemment pour le C16, on remarque que le C11 et le C18 suivent la même tendance que ce dernier. Cependant, ce n'est pas le cas du C8. La conclusion qui peut être cependant tirée réside dans le fait que peu importe la longueur de la chaîne, le diamètre des fibrilles diminue toujours en fonction du temps.

Les Figures 4.13, 4.14 et 4.15 présentent les distributions de l'épaisseur des fibrilles de mesures prises sur les différentes images AFM, pour respectivement le C8, le C11 et le C18. Chacune des figures possède des bandes associées aux temps d'incubation de 15 minutes, 34 minutes et 900 minutes.

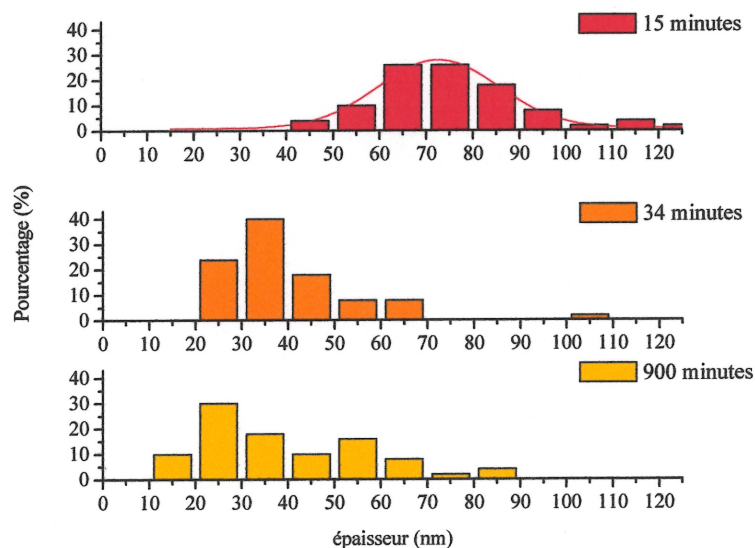


Figure 4.13 Distribution par tranche de 10 nm de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) adhérentes sur un C8.

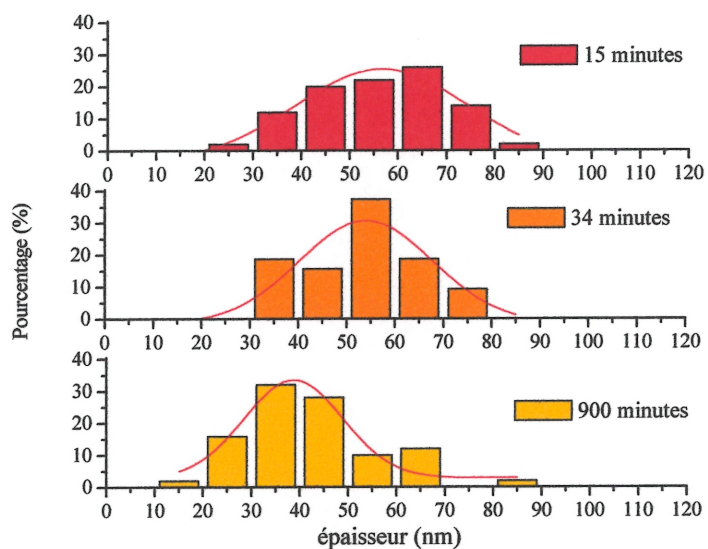


Figure 4.14 Distribution par tranche de 10 nm de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) adhérees sur un C11.

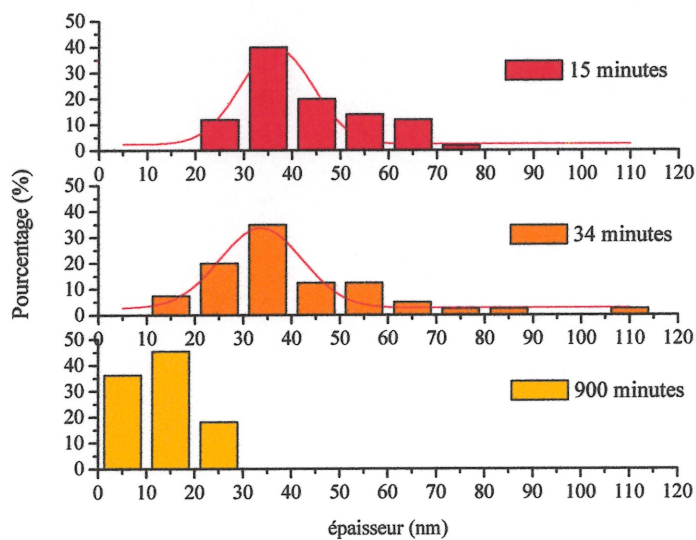


Figure 4.15 Distribution par tranche de 10 nm de la quantité de fibrilles de collagène (en pourcentage) adhérees sur un C18.

Sur la figure 4.13, on remarque que pour une SAM C8, la distribution pour l'épaisseur des fibrilles est assez large peu importe le temps d'incubation. Il est aussi possible d'observer, comme sur la Figure 4.12, que le maximum associé à chaque courbe diminue avec le temps. De cette manière, après 15 minutes, on observe qu'un maximum de 26% des fibrilles ont un diamètre entre 60 et 80 nm. Après 34 minutes, le maximum se situe plutôt entre 30 et 40 nm, avec 40%. Finalement, 30% des fibrilles après 900 minutes possèdent un diamètre qui se situe entre 10 et 20 nm.

Sur la Figure 4.14, on observe une distribution large pour chacun des temps d'incubation sur une SAM C11. Chaque courbe prend l'allure d'une Gaussienne, avec un maximum diminuant en fonction du temps d'incubation. En effet, pour 15 minutes d'incubation, le maximum se situe à un diamètre de 60-70 nm pour 26% des fibrilles, à 35 minutes, le diamètre maximum est plutôt entre 50 et 60 nm (37,5%) alors qu'après 900 minutes, on retrouve préférentiellement 32% des fibrilles possédant un diamètre entre 30 et 40 nm. Il faut noter que dans le cas du C11, le diamètre final des fibrilles est le même que pour le C8. Cependant, on ne peut pas relier cette observation à l'ordre des chaînes carbonées des thiols. En effet, le phénomène semble encore une fois aléatoire.

Enfin, la Figure 4.15 présente la distribution du diamètre des fibrilles pour l'adhésion du collagène sur le C18. Ici, la situation est différente du C11, mais se rapproche du C8. En effet, on remarque une distribution plutôt large pour les temps courts, mais pour 900 minutes, la distribution se fait de manière plutôt étroite. On peut cependant conclure ici aussi que le diamètre des fibrilles diminue en fonction du temps. Par contre, il ne semble pas y avoir de différences entre 15 minutes et 35 minutes d'incubation. Dans les deux cas, les fibrilles possédant un diamètre entre 30 et 40 nm sont celles présentes en plus grande importance, avec cependant un pourcentage légèrement différent (40% pour 15 minutes, et 35% pour 35 minutes). Cependant, le diamètre des fibrilles est plutôt entre 10 et 20 nm pour un temps plus long d'incubation (900 minutes). Il faut cependant mentionner que pour les données associées à 900 minutes d'incubation, l'échantillonnage est moins grand. En effet,

pour cette expérience, on a obtenu plus souvent des films uniformes que des fibrilles. Il n'a donc pas été possible d'effectuer 50 mesures, mais plutôt 11.

La figure 4.16 résume les résultats présentés aux figure 4.13, 4.14 et 4.15. On peut apprécier l'épaisseur moyenne des fibrilles en fonction du temps d'incubation. On conclut clairement que l'épaisseur des fibrilles tend à diminuer en fonction de celui-ci, et ce, pour toutes les longueurs de chaînes étudiées.

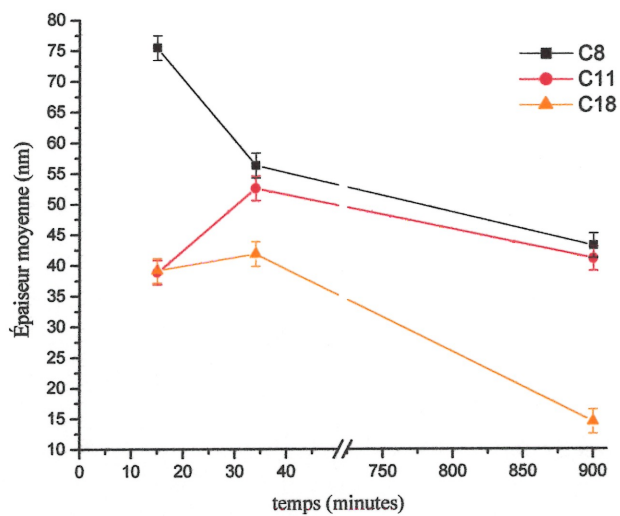


Figure 4.16 Épaisseur moyenne des fibrilles en fonction du temps d'incubation pour le C8 (noir), le C11 (rouge) et le C18 (orange).

Il est possible de conclure face à ces résultats, que de manière générale, le collagène adhère de manière semblable sur toutes les terminaisons méthyles, peu importe la longueur de la chaîne de l'alcanethiol. La principale observation réside dans le fait qu'avec le temps, le diamètre des fibrilles diminue en fonction du temps d'incubation. Il faut toutefois mentionner que dans le cas du C18, on remarque un taux de recouvrement un peu plus élevé et une forme quelque peu différente de la couche de collagène adsorbée. Cependant, on n'a pas observé de variation dans la cinétique d'adhésion du collagène en fonction de la longueur de la chaîne. Il serait donc intéressant d'effectuer ces mêmes mesures pour des longueurs de chaîne plus grande, tel que le C20 et le C22.

4.3 ÉTUDE DE L'ADHÉSION DU COLLAGÈNE EN FONCTION DE LA TERMINAISON DE LA CHAÎNE

La troisième partie de ce chapitre traite de l'adhésion du collagène sur des surfaces hydrophiles, afin de comparer ces résultats avec ceux obtenus dans le premier volet de ce projet avec des surfaces hydrophobes. On espérait ainsi trouver une surface sur laquelle l'adhésion du collagène est quasi-nulle, afin de préparer des surfaces structurées sur lesquelles celui-ci pourrait adhérer de manière spécifique. Pour ce faire, on a étudié l'adhésion du collagène sur des thiols possédant des terminaisons hydroxyles et carboxylates. Les résultats qualitatifs et quantitatifs obtenus sont présentés ici en comparaison avec ceux obtenus précédemment. On a étudié des thiols de longueur C11 et C16, étant donnée la disponibilité réduite de ce genre de terminaison de thiols.

4.3.1. *Cinétique de l'adhésion du collagène par SPR et AFM.*

La figure 4.17 présente les cinétiques d'adhésion du collagène pour une période de 900 minutes sur un C11-OH, un C10-COOH et un C15-COOH. On remarque que dans ce cas particulier, le changement de l'angle de couplage est plus petit que celui observé pour les surfaces hydrophobes (i.e. $\Delta\theta_c \approx 0,05^\circ$ pour C15-COOH, $\approx 0,125^\circ$ pour C10-COOH et $\approx 0,275^\circ$ pour C11-OH contre $\Delta\theta_c \approx 0,45^\circ$ - $0,60^\circ$ pour C₇-CH₃ à C₁₇-CH₃) ce qui signifie que moins de collagène adhère à la surface du thiol, et ce, pour les trois terminaisons différentes. De plus, la courbe possède une allure linéaire : elle ne commence pas par augmenter pour ensuite redescendre, comme pour les terminaisons hydrophobes. On observe de plus que l'adhésion sur une surface hydroxyle est plus importante que sur une surface carboxylate. De plus, l'allure des courbes de cinétique de l'adhésion du collagène sur ces surfaces hydrophiles diffère de l'allure des courbes d'adsorption obtenues pour les surfaces hydrophobes. Tout d'abord, il n'y a pas de diminution de l'angle de couplage avec le temps. De plus, on observe simplement un plafonnement. L'observation des images AFM prises à divers temps d'incubation permet d'appuyer ces conclusions.

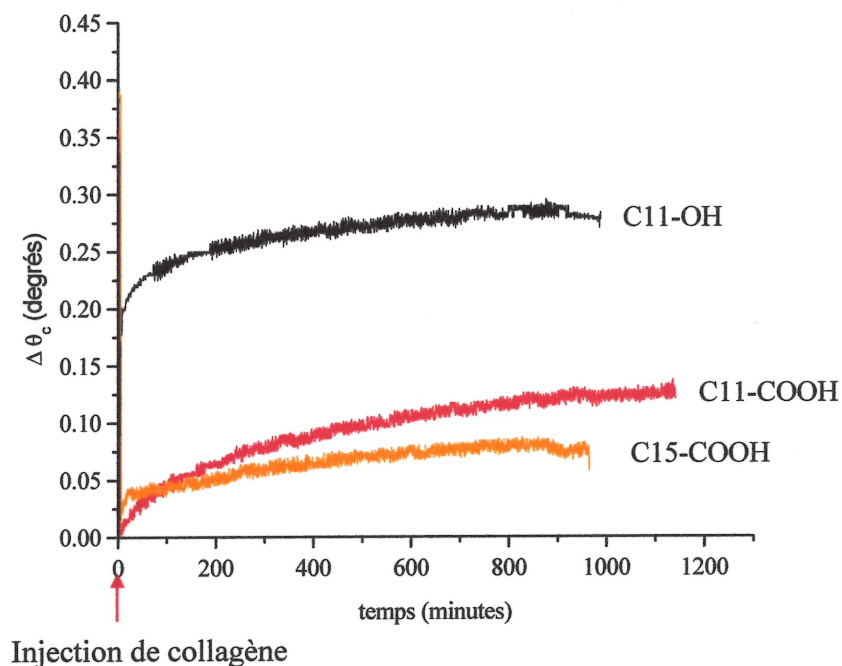


Figure 4.17 Cinétique de l'adhésion du collagène sur des SAMs de C11-OH, C10-COOH et C15-COOH par spectroscopie SPR.

La Figure 4.18 montre des images AFM prises en mode topographie à différents temps d'incubation du collagène. Les images A, B et C représentent l'adhésion du collagène sur un C11-OH à respectivement 15 minutes, 34 minutes et 15 heures. Les images D, E et F sont associées quant à elles à l'adhésion du collagène sur un C10-COOH, encore une fois à 15 minutes, 35 minutes et 15 heures d'incubation. Enfin, les images G, H et I représentent les mêmes temps d'incubation, mais pour l'adhésion du collagène sur un C15-COOH.

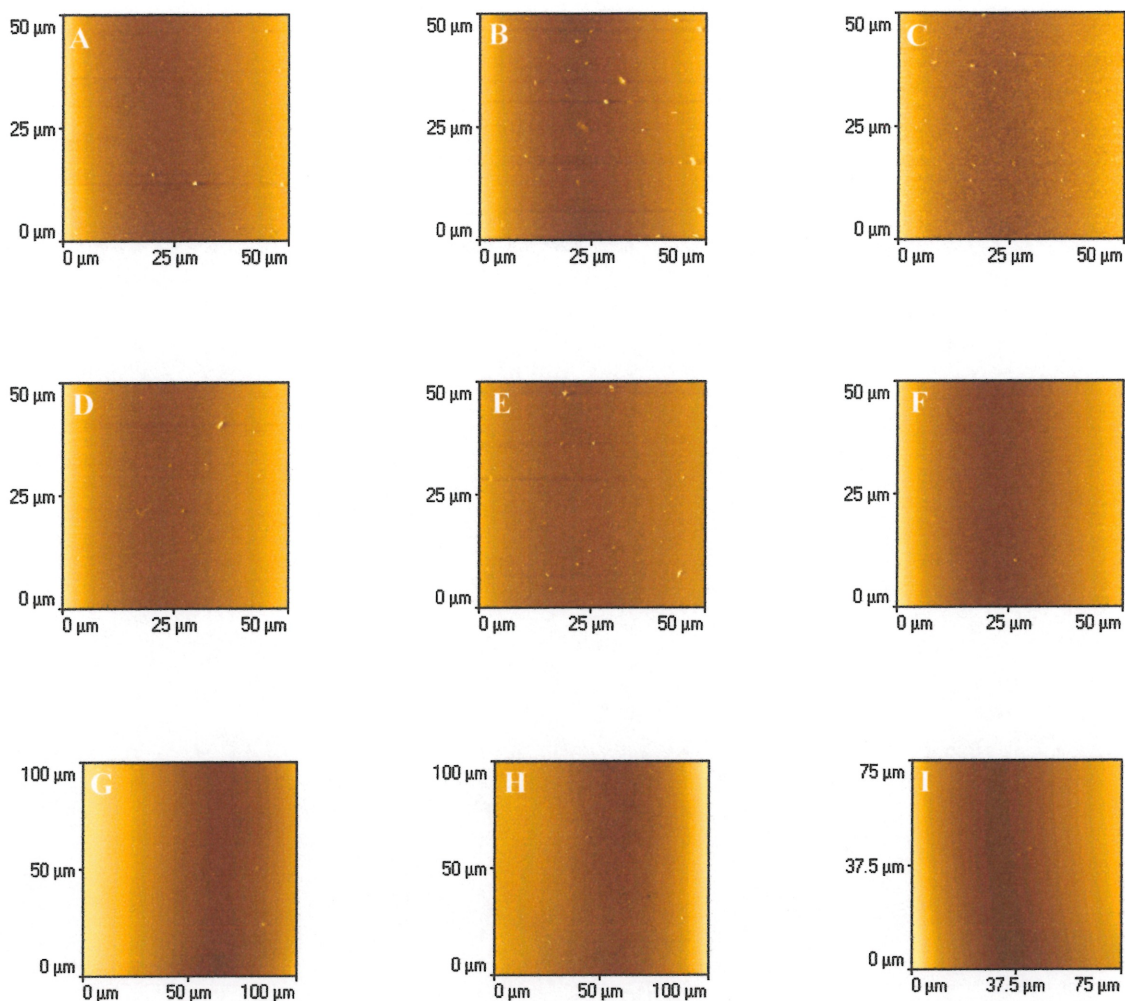


Figure 4.18 Images AFM (A à F : 50 μm x 50 μm ; G et H : 100 μm x 100 μm , I : 75 μm x 75 μm) de l'adhésion du collagène sur **A.** C11-OH (15 minutes), **B.** C11-OH (35 minutes), **C.** C11-OH (15 heures), **D.** C10-COOH (15 minutes), **E.** C10-COOH (35 minutes), **F.** C10-COOH (15 heures), **G.** C15-COOH (15 minutes), **H.** C15-COOH (35 minutes), **I.** C15-COOH (15 heures).

On remarque tout d'abord que contrairement aux surfaces hydrophobes, aucune fibrille n'est présente sur les images obtenues. De plus, si à l'occasion on observe quelques agglomérats de collagène, ceux-ci ne présentent pas de structure particulière. Ensuite, en comparant les images relatives aux C10-COOH avec celles du C15-COOH on remarque que dans le premier cas, quelques agglomérats sont tout de même présents, alors que dans le second, il est rare d'observer ce genre de structure. Enfin, les analyses effectuées ne semblent pas démontrer de couche mince uniforme de collagène sur ce type de surface. Le pourcentage de recouvrement est quasi-nul dans le cas du C15-COOH, peu importe le temps d'incubation, et se situe entre zéro et deux pourcents. Pour le C11-OH, on observe plutôt un taux de recouvrement variable dans le temps, passant de $10 \pm 5\%$ après 15 minutes, à $3 \pm 5\%$ après 34 minutes et se qui se termine finalement à $15 \pm 5\%$. Enfin, pour le C10-COOH, le pourcentage de recouvrement est d'environ trois pourcents dans tous les cas.

Dans le cas de la terminaison carboxylate, on sait que lorsqu'on travaille à pH physiologique ($\text{pH} = 7$), les groupements $-\text{COOH}$ sont déprotonnés et chargés négativement. En effet, le pK_a pour les terminaisons $-\text{COOH}$ des SAMs est d'environ $5,5-6,0$ ¹²⁻¹⁴. D'autre part, le pI du collagène se situe à $6,6$ ¹⁵. Ainsi, à pH physiologique, ce dernier sera légèrement chargé négativement. On peut donc penser qu'il se crée des répulsions électrostatiques entre la surface et la protéine, causées par les groupements négatifs présents de part et d'autre. Cette hypothèse pourrait ainsi expliquer la raison de l'adhésion quasi-nulle du collagène sur les surfaces carboxylates. Dans le cas de la terminaison $-\text{OH}$, la littérature montre que ce groupement ne change pas d'état d'ionisation en fonction du pH ¹⁴ et se présente donc à l'état neutre dans le système étudié. Ainsi, la faible adhésion n'est pas causée ici par des répulsions électrostatiques mais simplement par le fait que cette surface est hydrophile. C'est pourquoi le taux de recouvrement est légèrement plus élevé dans le cas des terminaisons hydroxyles que pour les terminaisons carboxylates.

4.3.2. Épaisseur du collagène par SPR.

Dans le cas des surfaces hydrophiles, l'épaisseur n'a pu être analysée que par la technique de spectroscopie SPR. Dans chacun des cas, l'épaisseur a été mesurée **après rinçage** de la couche. La Figure 4.19 présente l'épaisseur calculée par la modélisation de Fresnel à partir des courbes SPR obtenues pour les différentes terminaisons. On observe tout d'abord que l'épaisseur calculée est au moins trois fois plus grande pour le C11-OH que pour les deux terminaisons carboxylates. Pour cette terminaison, on observe aussi une diminution de plus de la moitié de l'épaisseur en fonction du temps. En effet, l'épaisseur passe de $3,2 \pm 0,2$ nm, pour 15 minutes d'incubation, à $1,1 \pm 0,1$ nm pour 900 minutes d'incubation. Dans le cas du C10-COOH, on n'observe pas de diminution significative de l'épaisseur en fonction du temps. La valeur reste plus ou moins constante. Cependant, pour le C15-COOH, même si l'épaisseur calculée est très petite après 15 minutes d'incubation ($0,7 \pm 0,1$ nm), elle diminue de manière significative après 900 minutes ($0,35 \pm 0,08$ nm). En effet, l'adhésion devient quasi-nulle.

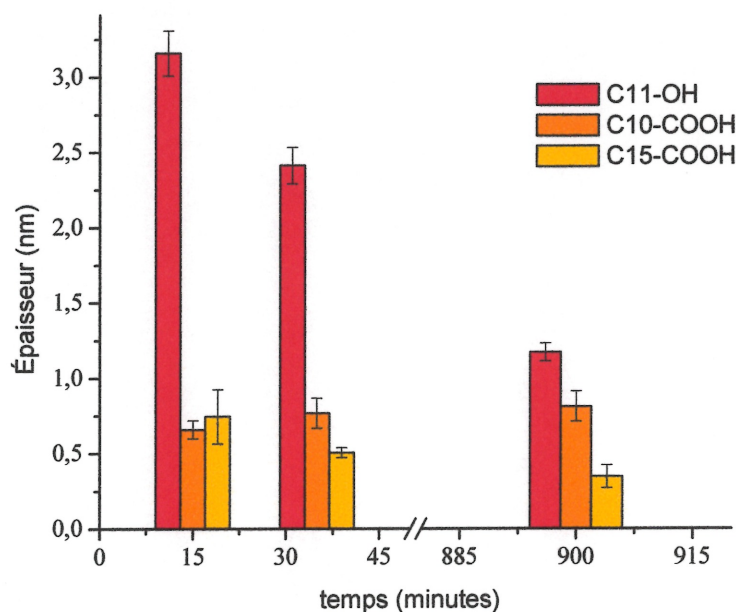


Figure 4.19 Épaisseur du collagène adhérent sur un C11-OH, un C10-COOH et un C15-COOH mesuré par SPR, à divers temps d'incubation.

La cinétique présentée à la figure 4.17 présente une augmentation continue de l'épaisseur alors que la figure 4.19 montre une diminution de cette dernière. Cette différence dans les résultats est due au fait que la surface est rincée avant de prendre la mesure finale de la couche chimisorbée. Ainsi, si certains agglomérats ne sont que physisorbés, ils seront éliminés de la surface lors du rinçage. Il faut aussi mentionner que dans le cas du C15-COOH, lorsque la cinétique d'adhésion du thiol donne une épaisseur de SAM plus grande que celle attendue (lorsqu'on obtient plus d'une monocouche et que des bicouches désorganisées sont formées), on obtient des résultats relatifs à l'adhésion du collagène qui sont différents de ceux mentionnés ci-dessus. En effet, dans ce cas, l'adhésion du collagène était beaucoup plus importante. Ce qui porte à croire que l'hypothèse émise que le C15-COOH formerait des bicouches peut être plausible. En effet, de cette manière, c'est un groupement -SH qui fait face au collagène, et non plus un groupement -COOH. Comme le groupement -SH est plus hydrophobe que celui -COOH, il est normal que l'adhésion du collagène soit augmentée.

Dans le même ordre d'idées, il est intéressant de noter que Penners *et al.*¹⁶ ont étudié l'adhésion du collagène sur différentes surfaces, possédant des degrés d'hydrophobicité différents. Ainsi, ils sont parvenus à la conclusion que la quantité de collagène adsorbé sur la surface augmentait avec l'hydrophobicité du substrat. Ces résultats viennent appuyer ceux obtenus dans le cadre de ce projet.

Il est intéressant de comparer les résultats obtenus dans ce chapitre avec d'autres résultats provenant de la littérature. Denis *et al.*¹⁷ ont récemment publié un article discutant de l'influence de la rugosité du substrat sur l'adhésion du collagène. Ils ont entre autre comparé l'adhésion sur une surface méthyle, ainsi que sur une surface hydroxyle. Même s'ils ont utilisé du collagène déjà en solution, le type de collagène utilisé reste le même que celui employé dans ce projet. Leurs résultats se comparent à ceux obtenus ici. En effet, ils ont observé une adhésion beaucoup plus importante du collagène sur les surfaces hydrophobes que sur les surfaces hydrophiles. Ils ont de plus conclu que les surfaces lisses permettent la formation de

structures fibrillaires alors que les surfaces plus rugueuses ne le permettent pas. Ils concluent enfin que le pourcentage de recouvrement de la surface pour une surface hydrophobe est de plus de 80 % alors que pour les surfaces hydrophiles, ils obtiennent plutôt un pourcentage de 40-50%. Dans le cas de nos expériences, nous pouvons dire qu'il varie entre 40% et 90% pour les surfaces hydrophobes, et est quasi-nul (moins de 10%) pour les surfaces hydrophiles. Il faut toutefois mentionner que les expériences effectuées par Denis *et al*¹⁷ permettent seulement d'étudier les résultats finaux d'adhésion du collagène. Les résultats obtenus au cours de ce projet permettent aussi de suivre en temps réel la cinétique d'adhésion du collagène sur les surfaces hydrophiles et hydrophobes. Dans le cas de ces dernières, il apparaît que la protéine s'attache tout d'abord sous forme de fibrilles pour ensuite s'étendre sur la surface sous forme de film uniforme. Tilton *et al*¹⁸ ont montré que les protéines peuvent diffuser sur une surface malgré le fait qu'elles soient adsorbées de manière irréversible. D'autres résultats similaires ont été observés dans le cas d'enzymes¹⁹. Il est donc possible que le collagène subisse le même genre de modification structurale et s'étende sur la surface après y avoir adhéré.

De plus, on peut comparer les résultats de cinétiques en SPR obtenus pour les surfaces hydrophobes et hydrophiles avec ceux de Wertz *et al*.²⁰. Dans une récente publication, ils présentent l'adhésion du fibrinogène, une autre protéine semblable au collagène sur l'hexadécyltrichlorosilane et sur une autre surface hydrophile non-chargée (N-[3-(triéthoxysilyl)propyl]-4hydroxybutyramide). Ceux-ci présentent des courbes de cinétique obtenues par fluorescence en réflectance totale interne (TIRF). L'allure de la courbe de modélisation de Γ^* (nombre maximal de molécules de protéine par unité d'aire) en fonction du temps qu'ils calculent à partir de leur courbe expérimentale correspond exactement aux résultats expérimentaux obtenus ici. Ils décrivent cette allure par une relaxation de la protéine sur la surface. La réorganisation du collagène adsorbé qu'on observe ici pourrait donc être expliquée de la même manière.

Les résultats obtenus permettent donc d'émettre l'hypothèse qu'une surface μ CP possédant des zones méthyles, et des zones C15-COOH permettraient possiblement de diriger spatialement la croissance du collagène. Cependant, avant de présenter les résultats expérimentaux relatifs à la technique de μ CP, la section 4.4 traite de la caractérisation du collagène par PM-IRRAS. Ces mesures ont été prises dans l'optique de caractériser le mieux possible la conformation du collagène adhérent sur les monocouches d'alkanethiols. En effet, la SPR démontre que la protéine adhère sur la surface, l'AFM présente la structure que prend cette protéine sur les surfaces, mais seule la technique de PM-IRRAS permet d'identifier chimiquement ce qui se trouve sur la surface, et donc de déterminer si le collagène est présent tel qu'on le pense, sans dénaturation occasionnée par les manipulations expérimentales. Enfin, il permet d'observer des changements de conformation possible de la structure du collagène.

4.4 ÉTUDE DE L'ADHÉSION DU COLLAGÈNE PAR PM-IRRAS

La caractérisation par PM-IRRAS permet d'observer les bandes caractéristiques pour la région des hautes et des basses fréquences du spectre. Cependant, pour ce système, l'intensité des pics varie en fonction de l'angle de l'échantillon par rapport au faisceau incident. Comme le système utilisé ne possède pas de position fixe pour l'échantillon, on ne peut rien conclure sur les intensités relatives des spectres entre eux. Il est par contre possible de comparer les intensités des pics d'un même spectre, ainsi que les positions des bandes d'un spectre à l'autre. La caractérisation faite ici s'en tiendra donc à ces deux paramètres. On comparera aussi les spectres obtenus avec ceux retrouvés dans la littérature. Afin de voir les pics importants associés à ce type de protéines, on retrouve, à la figure 4.20, un exemple de spectre infrarouge (photoacoustique, région basses fréquences) du collagène (type I, lavé à l'acétone pour éliminer les résidus de savon contenus dans le collagène à sa réception) provenant de la littérature²¹.

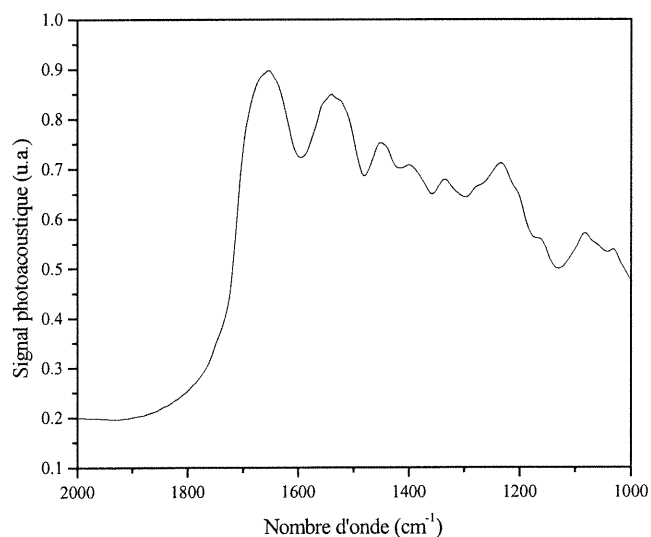


Figure 4.20 Exemple de spectre infrarouge du collagène de type I provenant de la littérature²¹.

4.4.1 Analyse de l'adhésion du collagène sur un C16

La séquence de spectres présentés à la Figure 4.21 montre la région des hautes fréquences à différents temps d'incubation. Le spectre A représente un spectre du C16 seul et les spectres B, C et D représentent respectivement l'adhésion du collagène pour 2, 4, et 24 heures d'incubation. Les positions exactes des pics sont présentées dans le Tableau 4.1.

Groupement structural	Mode d'élongation C-H	Position des pics pour $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{SH}$ avec collagène adsorbé $\pm 1 \text{ cm}^{-1}$			
		C16 seul	2 heures	4 heures	24 heures
-CH ₂ -	ν_a	2920	2923	2921	2928
	ν_s	2851	2852	2852	2855
-CH ₃	ν_a (dans le plan)	2963	2961	2961	2963
	$\nu_s(\text{RF})$	2877	2876	2873	-

Tableau 4.1 Attribution des pics de différents modes d'élongation pour l'adhésion du collagène sur un C16.

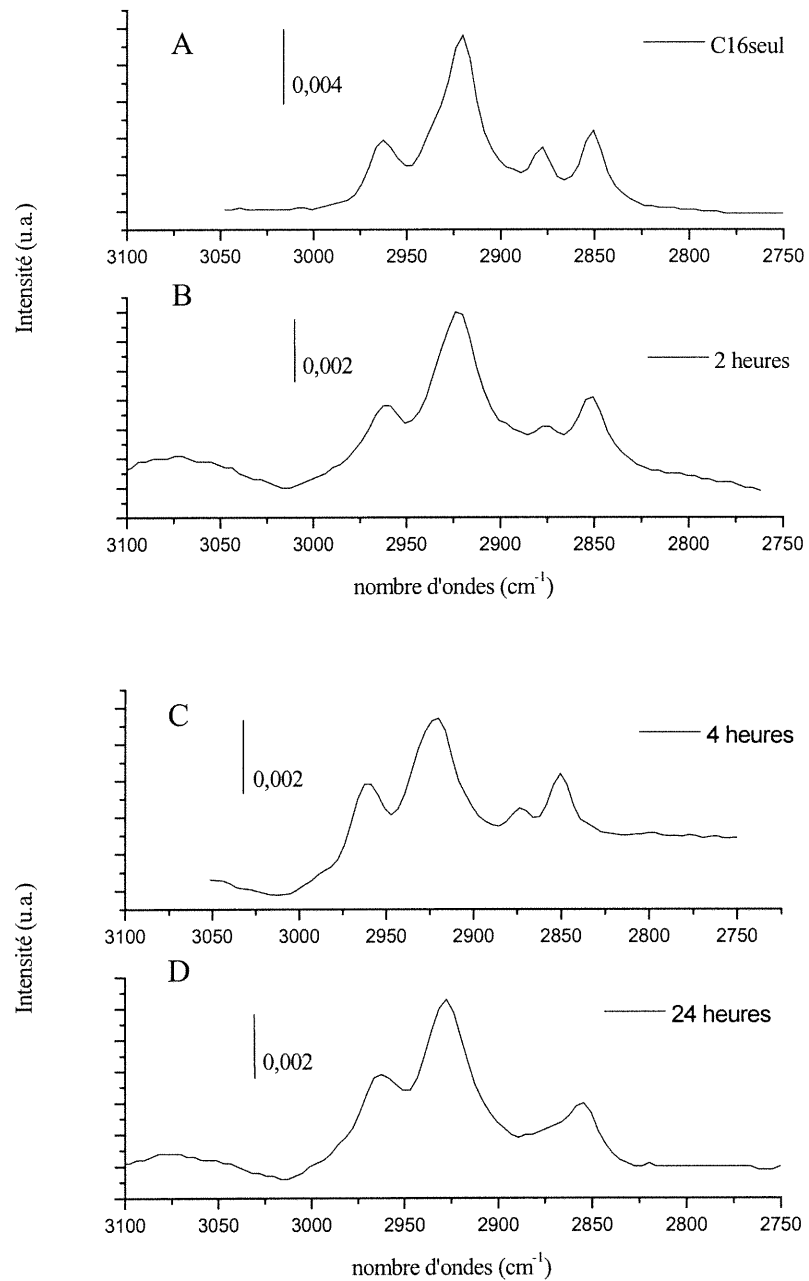


Figure 4.21 Spectres PM-IRRAS de la région des hautes fréquences du collagène sur le C16. **A.** C16 seul, **B.** 2 heures d'incubation, **C.** 4 heures d'incubation, **D.** 24 heures d'incubation.

Les pics associés aux élongations asymétriques (ν_a) et symétriques (ν_s) du groupement $-\text{CH}_2-$, apparaissent respectivement à environ 2920 cm^{-1} et 2851 cm^{-1} . Ces valeurs concordent bien avec la littérature²². De plus, on observe ν_a (dans le plan) du groupement $-\text{CH}_3$, à environ 2962 cm^{-1} . Enfin, la dernier pic apparaissant pour la région des hautes fréquences est ν_s provenant de la résonance de Fermi (RF). La position de ce pic change légèrement en fonction du temps d'incubation, en passant de 2877 à 2873 cm^{-1} , et disparaît finalement après 24 heures d'incubation. Le ν_a et le ν_s du $-\text{CH}_2-$ proviennent soit des thiols, soit des différents acides aminés présents dans la structure du collagène. Pour le $-\text{CH}_3$, ces pics sont associés aux thiols, et surtout à l'alanine présente dans le collagène.

Il est intéressant de noter le déplacement du pic RF du groupement $-\text{CH}_3$ vers des valeurs plus petites ainsi que le déplacement des élongations ν_a et ν_s du groupement $-\text{CH}_2-$ vers des fréquences plus élevées. Il est possible que ce déplacement soit causé par le fait que les modes de vibrations des thiols et du collagène n'ont pas exactement la même position. Au fur et à mesure que l'on augmente le temps d'incubation, donc la quantité de collagène sur la surface, l'intensité des pics associés à la protéine augmente par rapport à celle des pics associés aux thiols. De cette manière, on observe un déplacement « apparent » qui est dû au changement de provenance du signal.

Dans la région des basses fréquences d'un spectre, les protéines possèdent des pics caractéristiques de leur structure secondaire. C'est grâce à cette information qu'il est possible de conclure si le collagène étudié possède la structure escomptée. On peut aussi étudier à l'aide de ces pics la stabilité des structures dans le temps. Ces pics sont le pic *Amide I*, associée à l'élongation du lien $\text{C}=\text{O}$ et les pics *Amide II* et *Amide III*, tous deux associés aux modes de déformation du lien N-H et d'élongation du lien C-N ²². Le Tableau 4.2 présente les positions de ces deux pics en fonction de la structure secondaire des protéines^{15,23}.

Conformation de la protéine	Bande Amide I cm ⁻¹	Bande Amide II cm ⁻¹
Hélice- α	1650-1657	1516 (faible); 1546 (forte)
Feuillet- β Antiparallèle	1612-1640; 1670-1690 (faible)	1530 (forte)
Feuillet- β Parallèle	1626-1696	1530 (forte); 1550 (faible)
Désordonné	1640-1651	1535 (forte)

Tableau 4.2 Fréquences observées relatives aux bandes Amides I et II pour différentes conformations structurales des protéines^{15,23}.

Le collagène adoptant la conformation triple-hélice, on s'attend à obtenir les valeurs présentées pour l'hélice- α au Tableau 4.2²⁴. Il faut cependant mentionner que la littérature présente des cas où on observe le pic *Amide I* associé à une conformation triple-hélice, à des positions plus élevées que celles présentées dans le Tableau 4.2²⁵. La Figure 4.22 présente la région des basses fréquences associée à l'adhésion du collagène sur un C16 pour différents temps d'incubation. Les principaux pics retrouvés dans ces spectres sont précisés au Tableau 4.3.

Bandes	Position des pics pour CH ₃ (CH ₂) ₁₅ SH avec collagène adsorbé ± 2 cm ⁻¹		
	2 heures	4 heures	24 heures
<i>Amide I</i>	1660	1663	1661
<i>Amide II</i>	1547	1552	1549
<i>Amide III</i>	1262	1259*	1262

Tableau 4.3 Attribution des pics de la région des basses fréquences pour l'adhésion du collagène sur un C16. (* pic inversé)

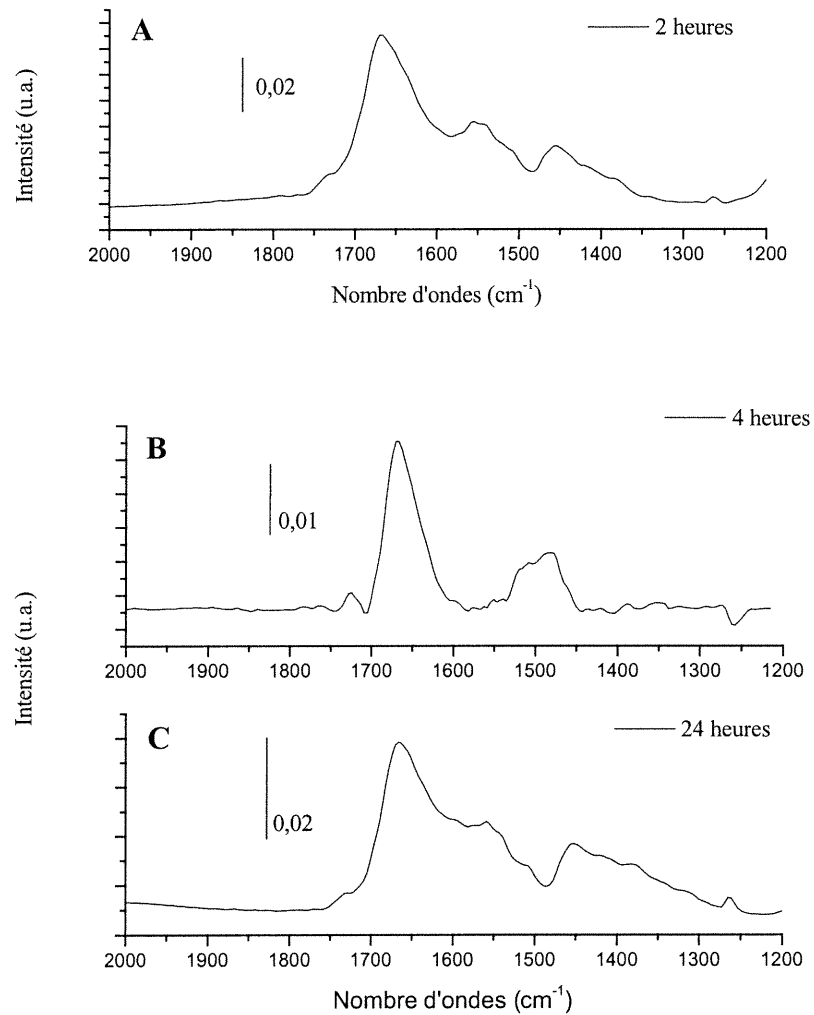


Figure 4.22 Spectres PM-IRRAS de la région des basses fréquences du collagène sur le C16. **A.** 2 heures d'incubation, **B.** 4 heures d'incubation, **C.** 24 heures d'incubation.

On remarque tout d'abord que les pics associés au collagène sont présents dans les spectres expérimentaux. De plus, leurs positions respectives concordent avec celles retrouvées dans la littérature^{15,21,23,25}. Ensuite, les valeurs obtenues pour le pic *Amide I* et le pic *Amide II* se comparent à celles associées à la structure hélice- α des protéines (Tableau 4.2). Aussi, on remarque que la position de ces bandes ne varie pas en fonction du temps. On peut donc conclure que les structures sont stables pour une période d'au moins 24 heures.

Le spectre présenté à la figure 4.22A présente un patron normal, alors que celui présenté à la figure 4.22B présente un patron inhabituel. Le fait est que la modélisation d'une ligne de base sur un spectre IRRAS dans la région des basses fréquences est difficile à effectuer et ne fonctionne pas toujours. Ce qui est présenté sur cette figure est donc le résultat d'une modélisation de la ligne de base à partir d'une fonction mathématique et la conséquence est qu'on perd des pics (absence ici du pic *Amide II*). La figure 4.22B illustre donc le problème dû à la soustraction de la ligne de base. Cependant, les positions présentées dans le Tableau 4.3 proviennent du spectre dont on n'a pas modélisé la ligne de base. De plus, toujours sur le même spectre, on remarque que le pic à 1262 cm^{-1} est inversé. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer ce phénomène est que cette situation survient lorsqu'on n'observe pas seulement la réflexion du faisceau réfléchi, mais aussi d'autres phénomènes, par exemple la diffusion du faisceau, qui est causée par une couche trop épaisse et non-uniforme de la protéine sur la surface d'or. Ces deux phénomènes (disparition du pic et pic inversé) font que seul le pic *Amide I* peut être clairement analysé dans le cadre de ce projet.

4.4.2. Analyse de l'adhésion du collagène sur le C8, le C11 et le C18

Dans le cas de l'adhésion du collagène sur des longueurs de chaînes différentes et possédant une terminaison méthyle, on ne présentera que des tableaux récapitulatifs des positions des pics obtenus expérimentalement. De manière générale, les spectres obtenus pour le C8, le C11 et le C18 sont très semblables à ceux obtenus pour le C16. Le Tableau 4.4 présente donc les positions des pics présents dans la région des hautes et des basses fréquences pour chacune des longueur de chaîne carbonée citée ci-haut.

Bande	Position des pics pour $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ avec collagène adsorbé $\pm 2 \text{ cm}^{-1}$					
	n=7		n=10		n=17	
	4 hrs	24 hrs	4 hrs	24 hrs	4 hrs	24 hrs
<i>Amide I</i>	1660	1653	1659	1666	1662	1670
<i>Amide II</i>	1551/1512	1542/1512	1536/1511	1551/1512	1548	1539/1506
<i>Amide III</i>	-	1261	1261	1262	1265	1265

Tableau 4.4 Attribution des pics pour l'adhésion du collagène sur un C8, un C11 et un C18 à divers temps d'incubation.

On remarque que tant pour les pics présents dans la région des hautes fréquences que ceux présents dans la région des basses fréquences, les valeurs expérimentales obtenues concordent avec celles de la littérature^{15,21,23,25}. Toutefois, pour le C11 et le C18, la bande Amide I se déplace vers une fréquence plus élevée avec le temps. Cette observation concorde avec les résultats obtenus en imagerie AFM, où après un long temps d'incubation, le collagène tend à former un film plus ou moins uniforme sur la surface. Il en va de même pour la bande Amide II dans le cas du C11. Elle se déplace d'environ 15 cm^{-1} vers les fréquences plus élevées.

4.4.3. Analyse de l'adhésion du collagène sur les terminaisons hydrophiles

L'analyse effectuée en spectroscopie SPR et en imagerie AFM ont permis d'observer que sur des surfaces hydrophiles, il y a très peu de collagène adsorbé et ce dernier ne forme pas de fibrilles. On devrait donc observer dans le cas présent un déplacement de la bande Amide I puisque le collagène ne se présente pas sous la forme d'une triple-hélice. Cependant, même si de légères variations dans la position des bandes apparaissent, il n'en demeure pas moins que les spectres restent semblables. La seule différence notable réside dans l'intensité beaucoup plus faible des pics, et donc dans la difficulté de bien associer les pics à des bandes connues. Cependant, comme on ne peut pas bien comparer l'intensité des spectres entre eux, cette information n'est donnée qu'à titre qualitatif.

Le Tableau 4.5 présente l'assignation des pics pour le collagène adhérent sur une surface C11-OH. Tout d'abord, on remarque la bande *Amide I* est positionnée à des valeurs légèrement au-dessus de celles associées à une conformation d'hélice- α . Cette valeur reste stable dans le temps, tout comme toutes les autres bandes présentées ici. Aussi, le pic *Amide II* n'est présente qu'après 24 heures d'incubation. On peut donc confirmer par la spectroscopie PM-IRRAS que la conformation que revêt le collagène sur cette surface n'est pas celle d'une triple-hélice, mais que cette structure est stable dans le temps.

Dans les tableaux 4.6 et 4.7, on retrouve les pics associés au collagène adhérent respectivement sur une surface C15-COOH et sur une surface C10-COOH. Pour le C15-COOH, la bande *Amide I* est presque toujours absente, ce qui signifie qu'il n'y a pas d'élongation C=O. Il est donc très facile de conclure que dans ce cas, aucune hélice- α n'est présente sur la surface. Cependant, les pics *Amide II* et *Amide III* confirment tout de même la présence de protéine sur la surface.

Bandes	Position des pics pour HO(CH ₂) ₁₁ SH avec collagène adsorbé ±2 cm ⁻¹		
	15 min	34 min	17 hrs
<i>Amide I</i>	1671	1667	1670
<i>Amide II</i>	-	-	1550
<i>Amide III</i>	1264	1262	1262

Tableau 4.5 Attribution des pics pour l'adhésion du collagène sur un C11-OH à divers temps d'incubation.

Bandes	Position des pics pour HOOC(CH ₂) ₁₅ SH avec collagène adsorbé ±2 cm ⁻¹		
	15 min	32 min	19 hrs
<i>Amide I</i>	-	1650	-
<i>Amide II</i>	1547	1545	1546
<i>Amide III</i>	1262	1264	1262

Tableau 4.6 Attribution des pics pour l'adhésion du collagène sur un C15-COOH à divers temps d'incubation.

Bandes	Position des pics pour HOOC(CH ₂) ₁₀ SH avec collagène adsorbé ±2 cm ⁻¹	
	38 min	19 hrs
<i>Amide I</i>	1666	1667
<i>Amide II</i>	1555	1549
<i>Amide III</i>	1257	1257

Tableau 4.7 Attribution des pics pour l'adhésion du collagène sur un C10-COOH à divers temps d'incubation.

Dans le cas du C10-COOH, le pic *Amide I* est présent, à une position très proche de celles observées sur les surfaces méthyles. Cependant, l'analyse AFM nous présente une surface sans fibrilles. Dans ce cas, on ne peut donc rien conclure par rapport à la position de ce pic. Cependant, elle reste très stable dans le temps, ce qui amène à poser l'hypothèse qu'il n'y a pas de changement de structure qui survient.

Les observations faites par spectroscopie PM-IRRAS sur les surfaces de thiols ayant incubé dans une solution de collagène pendant divers temps d'incubation permettent de confirmer l'hypothèse que le collagène adhère sur les surfaces méthyles, sous forme de fibrilles, alors que sur les surfaces hydrophiles, on observe une structure différente. Cette structure semble d'ailleurs être différente d'une terminaison hydrophile à l'autre, si on regarde la présence, le cas échéant, de la position du pic *Amide I*. De plus, on remarque que les structures de collagène adsorbé sont stables dans le temps.

4.5 ÉTUDE DE L'ADHÉSION DU COLLAGÈNE SUR DES SURFACES μ CP

Dans ce dernier volet, on a étudié la sélectivité de l'adhésion du collagène en présence de deux surfaces différentes, de manière à voir s'il est possible de diriger la croissance des fibrilles. Ces surfaces ont été préparées à l'aide de la technique d'impression par micro-contact (μ CP)²⁶. On a étudié deux systèmes différents, qui ont été choisis selon les résultats obtenus précédemment. Ainsi, on a préparé des surfaces (C15-COOH)-(C15-CH₃) et des surface (C7-CH₃)-(C15-CH₃). Les résultats obtenus en AFM sont présentés dans ce chapitre.

La méthode de fabrication des substrats ayant été présentée dans la partie expérimentale, on ne montre qu'à la figure 4.23 le genre de surface obtenue à partir de cette dernière. Cette figure représente un substrat composé de zone hydrophiles (C15-COOH), et de zones hydrophobes (C15-CH₃). Pour tous les résultats obtenus dans ce volet, le fond reste toujours le C15-CH₃ et les cercles sont constitués de C15-COOH ou encore de C7-CH₃. Selon le type de surface (hydrophile-hydrophobe ou hydrophobe-hydrophobe), la méthode d'imagerie AFM varie quelque peu. Dans les deux cas, il est possible d'utiliser le mode topographie, mais dans certains cas, le mode friction donne de meilleurs résultats (pour des longueurs de chaînes semblables où il y a très peu de différence de topographie, ex. C15-COOH et C15-CH₃)

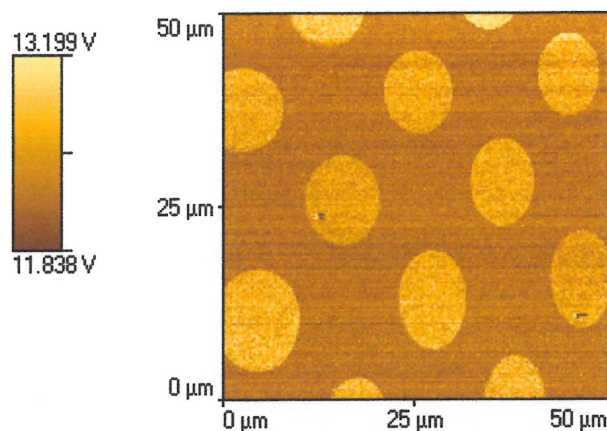


Figure 4.23 Image AFM obtenue en mode friction d'une surface C15-COOH (cercles) et de C15-CH₃ (fond). Une grande friction est observée entre la pointe AFM (hydrophile) et les cercles.

4.5.1 Adhésion du collagène sur une surface μCP (C7-CH₃)-(C15-CH₃)

Le premier essai effectué était composé d'une surface ayant la même terminaison chimique -CH₃, mais possédant des longueurs de chaînes différentes. De cette manière, il était possible de vérifier si le collagène a une préférence d'adhésion lorsqu'en présence de deux surfaces possédant une longueur de chaîne différente. Les figures 4.24 et 4.25 présentent les résultats obtenus pour cette manipulation. Afin de faciliter la visualisation des diverses zones de l'échantillon, les cercles ont été identifiés par un pointillé blanc sur chacune des images présentées.

Pour toutes les images présentées, on remarque que le collagène n'a pas de préférence pour l'une ou l'autre des surfaces. Il adhère de manière aléatoire un peu partout sur la surface, et les fibrilles ne semblent pas se diriger de manière contrôlée dans une zone particulière. On conclut donc que ce type de surface n'est pas intéressant pour diriger la croissance des fibrilles de collagène.

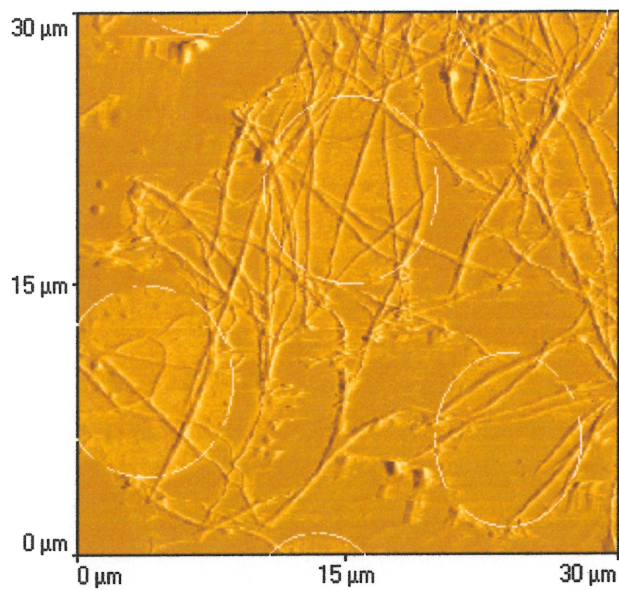


Figure 4.24 Image AFM (mode friction) d'une surface $\mu\text{CP C15-CH}_3$ (fond)- C7-CH_3 (cercles) recouverte de collagène (incubation 48 heures).

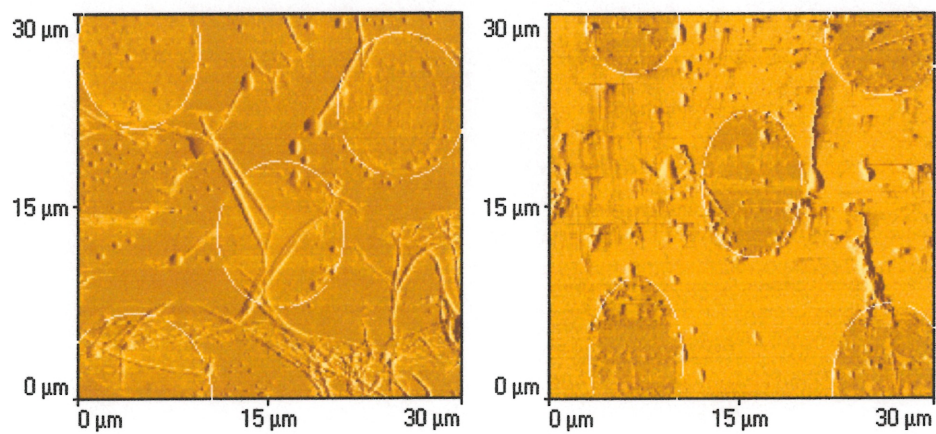


Figure 4.25 Images AFM (2 exemples différents en mode friction) d'une surface $\mu\text{CP C15-CH}_3$ (fond)- C7-CH_3 (cercles) recouverte de collagène (incubation 1 heure).

4.5.2 Adhésion du collagène sur une surface μCP (C15-COOH)-(C15-CH₃)

Un second type de surface où on retrouve des cercles hydrophiles et un fond hydrophobe a été utilisé afin de vérifier l'adhésion du collagène sur des surfaces bi-fonctionnalisées. Afin d'étudier uniquement le paramètre de la terminaison chimique, on a utilisé des chaînes de même longueur pour les deux terminaisons. Notre choix s'est arrêté sur le C15-COOH et le C15-CH₃ étant donné les résultats obtenus en SPR (Section 4.3), où on a pu observer une adhésion quasi-nulle sur le C15-COOH. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 4.26, pour une incubation d'une heure et à la figure 4.27 pour une incubation de 24 heures.

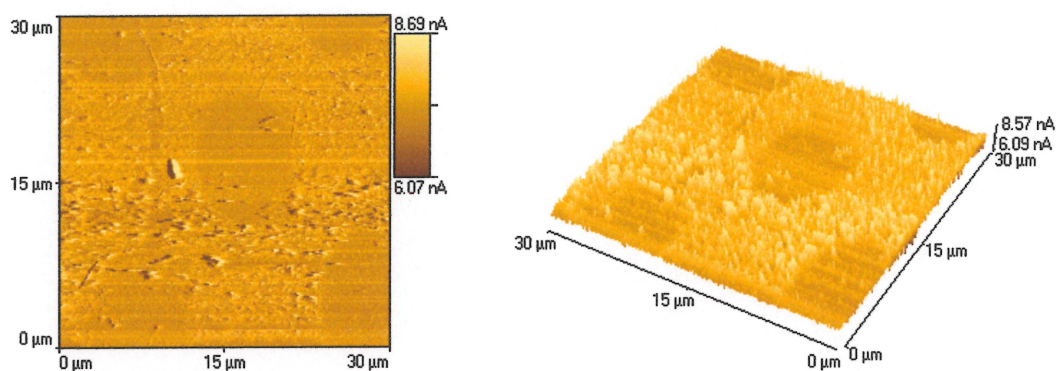


Figure 4.26 Images AFM obtenues en mode friction d'une surface μCP C15-CH₃(fond)-C15-COOH(cercles) recouverte de collagène. Temps d'incubation : 1 heure.

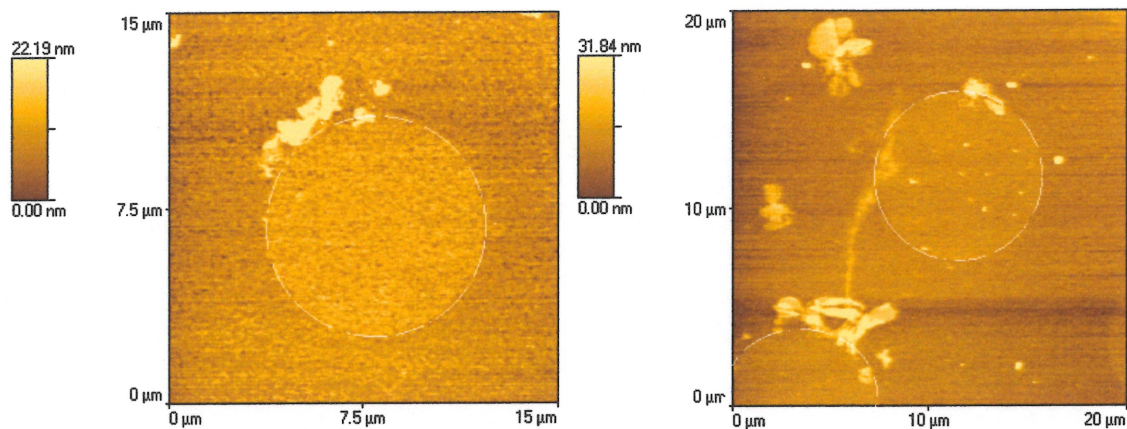


Figure 4.27 Images AFM obtenues en mode topographie de surfaces $\mu\text{CP C15-CH}_3(\text{fond})\text{-C15-COOH}(\text{cercles})$ recouverte de collagène. Temps d'incubation : 24 heures.

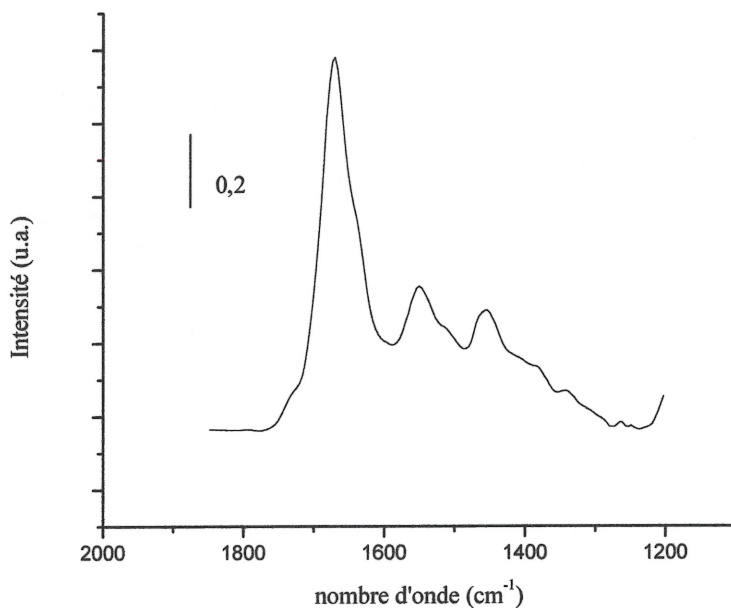


Figure 4.27 Spectres PM-IRRAS de la région des basses fréquences du collagène sur le $(\text{C15-CH}_3)\text{-(C15-COOH)}$. (1 heure d'incubation)

Les résultats obtenus à la figure 4.26 montrent que l'adhésion du collagène est limitée aux régions hydrophobes, et ce, après une heure d'incubation. Cependant, on n'observe pas de structure fibrillaire après une heure d'incubation. De plus, la conformation adoptée par le collagène n'est pas celle d'un film uniforme. En effet, le collagène adsorbé sur cette surface présente un relief très hétérogène, possédant une épaisseur variant entre environ 3 et 60 nm, différent de tous les films uniformes observés. Un exemple du relief observé est présenté à la figure 4.28.

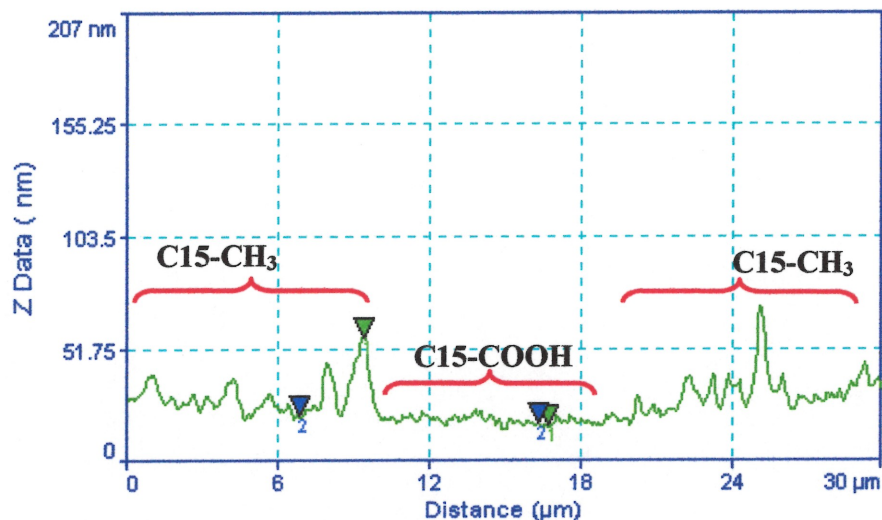


Figure 4.28 Relief observé une surface $\mu\text{CP C15-CH}_3(\text{fond})\text{-C15-COOH}(\text{cercles})$ recouverte de collagène (24 heures d'incubation).

La figure 4.27 présente quant à elle un spectre PM-IRRAS de cette surface. Il est intéressant de remarquer que la bande *Amide I* se situe à 1668 cm^{-1} . Le collagène est donc bien présent, mais sans revêtir la structure escomptée. C'est pourquoi on a laissé incuber l'échantillon plus longtemps, soit 24 heures, et on a pu observer l'image présentée à la figure 4.26. Ces images montrent une adhésion sélective du collagène, en ce sens qu'il n'y a pas de collagène déposé dans les régions hydrophiles (cercles). Par contre, on remarque clairement que le collagène préfère les interfaces entre les deux différents thiols pour s'adhérer. Cependant, il n'a pas été possible d'évaluer la périodicité à l'aide de l'AFM sur le collagène

présent sur ces figures. On ne peut donc pas conclure qu'il s'agit de fibrilles de collagène. Ces agglomérats de collagène possèdent de plus une hauteur variant entre 20 et 35 nm. De plus, sur ces surfaces μ CP, on n'a pas observé de films uniformes après une longue incubation. Ce qui porte à croire que la présence de groupements hydrophiles inhibe la croissance de ce genre de film.

Les résultats obtenus mènent de plus à poser la question suivante : le collagène adhère-t-il aux interfaces parce qu'il préfère un endroit physiquement moins uniforme ou plutôt parce que la présence des deux groupements chimiques simultanément engendre des interactions favorables à l'adhésion du collagène sur l'interface? Ceci reste une question fondamentale à élucider. Selon la littérature, les propriétés mécaniques de surface influencent l'organisation à l'échelle nanométrique du collagène^{17,27}. Cependant, les interactions Van der Waals, hydrophobes et électrostatiques influencent-elles aussi l'adhésion et la structure du collagène? Il faudrait donc trouver un moyen d'étudier séparément ces deux paramètres.

De plus, afin de poursuivre ces recherches, il serait intéressant d'utiliser des moules de formes différentes pour observer l'adhésion des protéines. En effet, sachant maintenant que le collagène semble préférer l'interface entre les deux surfaces pour s'adhérer, en fabriquant un moule possédant de larges bandes, il serait peut-être possible de diriger la croissance des fibrilles dans la direction voulue.

4.6 CONCLUSIONS

Ce chapitre a permis de caractériser l'adhésion du collagène sur différentes surfaces constituées de SAMs hydrophobes (terminaison $-\text{CH}_3$) et hydrophiles (terminaisons $-\text{OH}$ et $-\text{COOH}$). Tout d'abord, la cinétique d'adhésion du collagène a été suivie par la spectroscopie SPR. La morphologie du collagène adsorbé a été observée par microscopie AFM et la conformation du collagène a été confirmée par spectroscopie PM-IRRAS.

L'adhésion du collagène sur des thiols à terminaisons méthyles a tout d'abord été étudiée. Le collagène adhère bien sur ces dernières. La cinétique d'adsorption observée en SPR associée aux mesures prises sur les images AFM permet de conclure qu'on observe une réorganisation structurale du collagène dans le temps. En comparant l'adhésion du collagène en fonction de la longueur de la chaîne carbonée, on a remarqué que le taux de recouvrement augmentait en fonction de la longueur de la chaîne, et qu'il augmentait légèrement dans le temps (augmentation d'au plus 10% en 15 heures). Cependant, dans le cas du C18, on observe plutôt un film uniforme au détriment de structures fibrillaires après plusieurs heures d'incubation, ce qui augmente nécessairement le taux de recouvrement. D'autre part, la grosseur des fibrilles diminue avec le temps, pour toutes les longueurs de chaîne étudiées.

Les résultats obtenus en spectroscopie PM-IRRAS renforcent l'idée d'une réorganisation structurale, puisque pour le C11 et le C18, la bande *Amide I* se déplace vers des positions plus élevées dans le temps. Par contre, dans le cas du C16, elle reste assez stable, à la position associée à une structure en hélice- α . Le PM-IRRAS ne peut donc pas confirmer la réorganisation structurale dans ce cas.

L'adhésion du collagène sur des thiols ayant des terminaisons hydrophiles a aussi été investiguée. La cinétique d'adhésion en SPR diffère de celle observée sur les surfaces hydrophobes : elle ne suggère aucune restructuration de la surface.

L'imagerie AFM a permis de remarquer que le collagène ne revêt pas de structure fibrillaire sur les surfaces hydrophiles; on retrouve plutôt de petits agglomérats. Toutefois, le collagène adhère légèrement plus sur les surfaces hydroxyles que sur les surfaces carboxylates. En effet, on obtient un taux de recouvrement d'environ $10 \pm 5\%$ pour le C11-OH alors que dans le cas des terminaisons carboxylates, le recouvrement oscille entre zéro et deux pourcents. Cette différence peut être expliquée par le fait qu'à pH physiologique, le collagène et les thiols possédant une terminaison $-\text{COOH}$ sont chargés négativement. Il se produit donc des répulsions électrostatiques qui nuisent encore plus à l'adhésion du collagène sur ce type de surface. Les terminaisons $-\text{OH}$, quant à elles, restent neutres à pH physiologique.

La spectroscopie PM-IRRAS permet de conclure aussi que les structures observées sont du collagène, grâce à la présence des bandes *Amide II* et *Amide III*, propres aux protéines. Cependant, l'absence dans certains cas ou la position à des fréquences plus élevées dans d'autres de la bande *Amide I* permet de constater avec certitude que la conformation adoptée n'est pas fibrillaire.

Enfin, il a été possible d'étudier brièvement la sélectivité d'adhésion du collagène lorsque la protéine est en présence de deux surfaces différentes. Lorsqu'en présence de deux surfaces méthyles, de longueur de chaîne carbonée différentes, le collagène n'a aucune préférence et s'adsorbe partout. Cependant, en présence d'une surface possédant des terminaisons $-\text{COOH}$ et $-\text{CH}_3$, le collagène adhère préférentiellement aux surfaces hydrophobes, de manière uniforme, après une heure d'incubation. Cependant, après 24 heures, on a observé que le collagène se positionne plutôt aux interfaces entre les deux terminaisons, sous forme non-définie.

RÉFÉRENCES

- (1) Tylewska, S., Wadström, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1981**, *20*, 563.
- (2) Shah, N. K., Ramshaw, J. A. M., Kirkpatrick, A., Shah, C. Brodsky, B. *Biochemistry* **1996**, *35*, 10262.
- (3) Bansal, M., Ramachandran, G. N. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1978**, *11*, 73.
- (4) Jones, E. Y., Miller, A. *J. Mol. Biol.* **1991**, *218*, 209.
- (5) Holmes, D. F., Capaldi, M. J., Chapman, J. A. *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, *8*, 161.
- (6) Salamon, Z., Macloed, H. A., Tollin, G. *Biochimica Biophysica Acta* **1997**, *1331*, 131.
- (7) Boussaad, S., Pean, J., Tao, N.J. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 222.
- (8) Elsdale, T., Bard, J. *J Cell Biol* **1972**, *54 (3)*, 626.
- (9) Zhang, R., Ma, Peter, X. *J. Biomed Mater Res* **2000**, *52*, 430.
- (10) Nimni, M. E. *Collagen, Vol. 1, Biochemistry*; CRC Press: Florida, 1988.
- (11) Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D.L., Chidsey, C.E.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 3559.

- (12) Luo L. Q., C., Z. L., Yang, X. R., Wang, E. K. *Chinese Journal of Chemistry* **2000**, *18*, 863.
- (13) Schmitt, H., Badia, A., Dickson, L. , Reven, L. Lennox, B. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 475.
- (14) Vezenov, D. M., Noy, A., Rozsnyau, L. F., Lieber, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2006.
- (15) Mahler, H. R., Cordes, E. H *Biological Chemistry, 2nd Edition*; Harper & Row: New-York, 1971.
- (16) Penners, G., Priel, Z. Silberberg, A. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *80*, 437.
- (17) Denis, F. A., Hanarp, P., Sutherland, D. S., Gold, J., Mustin, C. Rouxhet, P. G. Dufrêne, Y. F. *Langmuir* **2002**, *18*, 819.
- (18) Tilton, R. D., Robertson, C. R., Gast, A. P. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *137*, 192.
- (19) Gaspers, P. B., Robertson, C. R., Gast, A. P. *Langmuir* **1994**, *10*, 2699.
- (20) Wertz, C. F., Santore, M.M. *Langmuir* **2002**, *18*, 706.
- (21) L'Ecuyer, P. Étude Spectroscopique du collagène de type I traité avec des solutions acides ; influence du pH et du temps d'exposition. Mémoire de Maîtrise, Université de Montréal, 2001.

- (22) Silverstein, R. M., Webster, F. X. *Spectrometric Identification of Organic Compounds, 6th Ed.*; John Wiley & Sons, Inc.: New-York, 1998.
- (23) Pelton, J. T., McLean, L. R. *Anal. Biochem.* **2000**, *277*, 167.
- (24) Beck, K., Brodsky, B. *J. Struct. Biol.*, *122*, 17.
- (25) Jackson, M., Choo, L-O. Watson, P. H., Halliday, W. C., Mantsch, H. H. *Biochimica Biophysica Acta* **1995**, *1270*, 1.
- (26) Ostuni, E. K., R., Chen, C. S., Ingber, D. E., Whitesides, G. M. *Langmuir* **2000**, *16*, 7811.
- (27) Dufrêne, Y. F., Marchal, T.G., Rouxhet, P. G. *Langmuir* **1999**, *15*, 2871.

CHAPITRE 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

5.1 IMPLICATION DES RÉSULTATS OBTENUS POUR L'ADHÉSION DU COLLAGÈNE

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce projet démontre clairement que la surface joue un rôle très important vis-à-vis de l'adhésion du collagène. Les données expérimentales ont montré que les surfaces méthyles permettent une adsorption importante du collagène alors que ce n'est pas le cas pour les surfaces ayant des terminaisons $-\text{COOH}$ et $-\text{OH}$.

Sur les surfaces méthyles, le collagène se présente sous forme de fibrilles, qui tendent à devenir plus petites avec le temps. Ensuite, on remarque la présence de films uniformes, qui apparaissent d'ailleurs après de longs temps d'incubation. Aussi, on a remarqué que dans la plupart des cas, le pourcentage de recouvrement augmente avec le temps. De plus, pour les terminaisons hydrophiles, aucune de ces structures n'a été observée. Enfin, la spectroscopie PM-IRRAS a permis de déterminer que les films de collagène ne sont pas dénaturés.

Les résultats obtenus nous amènent donc à proposer un modèle de l'adhésion du collagène sur les surfaces. On remarque des fibrilles à des temps courts d'incubation, et à ce point, aucun film uniforme de collagène n'est présent. Après une incubation plus longue, il y a présence de films uniformes de collagène, alors que les fibrilles sont plus petites. On peut donc émettre l'hypothèse suivante : tout d'abord, on observe l'adhésion de fibrilles sur les surfaces; par la suite, celles-ci s'étendent pour devenir un film uniforme sur cette même surface. On observe donc une réorganisation de la structure tertiaire du collagène, lorsqu'en présence de surface méthyle. Ceci nous amène à conclure que les fibrilles sont formées en solution pour ensuite coller sur la surface et que cette même surface engendre une destruction des fibrilles pour former un film uniforme. Ces fibrilles « sacrifiées » permettent à d'autres fibrilles, plus petites cependant, de garder leur structure tertiaire fibrillaire.

À partir de cette hypothèse, il est possible de discuter des surfaces hydrophiles. Sachant que les fibrilles se forment en solution, on peut conclure que ces dernières n'adhèrent pas du tout sur des surfaces hydrophiles. Les agglomérats présents sont plutôt une structure différente des fibrilles et des films uniformes, et il reste à la définir. De plus, ces agglomérats ne s'étendent pas sur les surfaces avec le temps. Enfin, les expériences effectuées en présence de zones hydrophiles et de zones hydrophobes sur une même surface ont démontré que les zones hydrophiles inhibaient la diffusion de la protéine sur la surface.

Plusieurs publications viennent appuyer les résultats d'adhésion obtenus au cours de ce projet¹⁻³. Tous s'accordent pour dire que le collagène adhère mieux sur des surfaces hydrophobes plutôt que sur des surfaces hydrophiles. Cependant, la présente recherche a permis d'observer un changement dans la conformation du collagène de type I dans le temps. Ce genre de phénomène a déjà été observé pour les cellules, qui tendent à diffuser sur les surfaces⁴. La même observation a été faite pour des enzymes, par Gaspers *et al*⁵. Enfin, le même phénomène a déjà été vérifié pour certaines protéines⁶. Il est donc possible que le modèle présenté ici pour le collagène de type 1 suive la même tendance.

Cette proposition de modèle doit cependant être vérifiée plus amplement. Des expériences en QCM ont été effectuées afin d'observer qu'aucune diminution de masse n'apparaissait dans le temps. Cependant, les résultats obtenus n'amènent pas d'information nouvelle, puisque le système utilisé n'était pas adéquat. En effet, il est nécessaire de travailler avec un système permettant l'analyse dans un liquide, afin de suivre l'expérience *in situ*.

Aussi, l'imagerie AFM a permis d'observer une diminution de l'épaisseur des fibrilles dans le temps. Cependant, ces mesures ont été effectuées dans l'air. Il serait nécessaire de répéter les analyses dans le liquide, *in situ*, de manière à ce que les fibrilles ne soient pas déshydratées.

5.2 PERSPECTIVES

L'étude de l'adhésion du collagène sur différentes surfaces est reportée à plusieurs reprises dans la littérature et a été investiguée sous plusieurs angles^{1,2,7}. Au cours du présent projet, l'emphase a été mise sur l'adhésion du collagène sur différentes SAMs, utilisées ici à titre de systèmes-modèles. On cherchait d'une part, à comprendre, au niveau moléculaire, ce qui arrivait lorsqu'on mettait le collagène en présence de différentes surfaces. Un modèle d'adhésion a d'ailleurs été présenté à la section précédente. D'autre part, on cherchait à caractériser le mieux possible l'adhésion de cette protéine sur différentes surfaces afin de trouver un système permettant de diriger sa croissance.

Les résultats obtenus permettent de conclure qu'en préparant un système ayant des surfaces hydrophiles et hydrophobes, selon un système (C15-COOH)- (C15-CH₃), le collagène tend à adhérer préférentiellement sur les surfaces hydrophobes, pour un temps court d'incubation, et aux interfaces des deux surfaces après un temps long d'incubation. En modifiant le patron utilisé, il serait peut-être possible de diriger cette croissance, ce qui reste en soi le but ultime du premier volet d'un gros projet.

L'utilisation du collagène de type I permet d'envisager de nombreuses applications futures destinées au domaine des biotechnologies. En effet, une fois la croissance du collagène maîtrisée, il est possible de se diriger dans deux directions différentes.

En minéralisant à l'aide de l'hydroxyapatite les fibrilles de collagène dirigées sur une surface, il est possible de fabriquer une dentine artificielle. Plusieurs groupes de recherche ont déjà travaillé sur la minéralisation du collagène⁸⁻¹², sans cependant utiliser des systèmes ordonnés. En accédant à de tels résultats, il serait donc possible de mieux comprendre les interactions entre une dentine artificielle et une dentine naturelle pour finalement tenter de modifier la surface des implants dentaires de manière à obtenir de la dentine artificielle à certains endroits précis. On obtiendrait ainsi une surface poreuse qui

permettrait d'augmenter la reconnaissance moléculaire entre l'implant et la dentine naturelle, et donc de diminuer les risques de rejets.

Dans un autre ordre d'idées, la croissance guidée des cellules est contrôlée par un nombre important d'interactions qui ne sont pas totalement comprises jusqu'à maintenant^{13,14}. Comme le collagène constitue le tissu conjonctif présent entre les cellules, une surface avec du collagène ayant crû de manière contrôlée permettrait d'étudier ces interactions entre les cellules et cette protéine afin de mieux comprendre la réponse cellulaire. De plus, une réussite de l'adhésion de cellules sur de telles surfaces permettrait de miniaturiser les cultures cellulaires, et donc d'ouvrir la voie à de nombreuses applications biomédicales.

Enfin, d'une manière un peu plus fondamentale, même si la structure du collagène est bien comprise et caractérisée de manière importante, il reste que la cinétique menant à son organisation structurale n'est pas totalement élucidée. Les résultats présentés amènent peut-être des informations sur le changement de la structure dans le temps, mais les explications relevant de ce phénomène comportent des lacunes. Il reste donc beaucoup de travail à faire autour de la compréhension des phénomènes entourant la structure du collagène.

RÉFÉRENCES

- (1) Dufrêne, Y. F., Marchal, T.G., Rouxhet, P. G. *Langmuir* **1999**, *15*, 2871.
- (2) Denis, F. A., Hanarp, P., Sutherland, D. S., Gold, J., Mustin, C. Rouxhet, P. G. Dufrêne, Y. F. *Langmuir* **2002**, *18*, 819.
- (3) Whittle, J. D., Bullet, N. A., Short, R. D., Douglas, C. W., Hollander, A. P., Davies, J. J. *Mater. Chem.* **2002**, *12*, sous presse.
- (4) Ostuni, E., Chapman, R.G., Liang, M. N., Meluleni, G., Pier, G., Ingber, D.E., Whitesides, G. M. *Langmuir* **2001**, *17*, 6336.
- (5) Gaspers, P. B., Robertson, C. R., Gast, A. P. *Langmuir* **1994**, *10*, 2699.
- (6) Tilton, R. D., Robertson, C. R., Gast, A. P. *J. Colloid Interface Sci.* **1990**, *137*, 192.
- (7) Paige, M. F., Rainey, J. K, Goh, C. *Biophysical Journal* **1998**, *74*, 3211.
- (8) Bradt, J.-H., Mertig, M., Teresiak, A. Pompe, W. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 2694.
- (9) Falini, G., Gazzano, M., Ripamonti, A. *J. Mater. Chem.* **2000**, *10*, 535.
- (10) About, I., Bottero, M.-J., de Denato., Camps, J. *Exp. Cell Research* **2000**, *258*, 33.
- (11) Du, C., Cui, F. Z., Zhang, W., Feng, Q. L., Zhu, X. D., de Groot, K. *J. Biomed Mater Res* **2000**, *50*, 518.

- (12) Mann, S. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3392.
- (13) Ohl, A., Schröder, K. *Surface and Coating Technologie* **1999**, *116-119*, 820.
- (14) Blawas, A. S., Reichert, W. M. *Biomaterials* **1998**, *19*, 595.

ANNEXE 1

Notes sur les plasmons de volume et les plasmons de surface.

On peut définir un métal comme étant un grand nombre d'ions positifs entourés d'un gaz d'électrons libres, le tout possédant une charge totale nulle. On peut donc considérer le gaz d'électrons libres comme un plasma. Lorsqu'on place le tout dans un champ électromagnétique E , les électrons se déplacent selon l'équation¹ :

$$\frac{md^2x}{dt^2} = -eE \quad [1]$$

où m est la masse de l'électron, e la charge de l'électron et x , le déplacement de l'électron. De plus, si le champ électrique varie selon une loi en $e^{-i\omega t}$, où ω est la fréquence angulaire de l'onde, l'équation du mouvement des électrons devient la suivante¹ :

$$-\omega^2 mx = -eE \quad [2]$$

À partir des équations [1] et [2], il est possible de trouver une équation pour la fonction diélectrique du métal ($\epsilon(\omega)$), où ϵ_0 est la constante diélectrique du vide et où n est la densité moyenne des électrons¹.

$$\epsilon(\omega) = 1 - \left(\frac{ne^2}{\epsilon_0 m \omega^2} \right) \quad [3]$$

Enfin, il est possible à partir de cette expression de définir la fréquence de plasma (ω_p) qui est¹ :

$$ne^2 = \omega_p^2 \epsilon_0 m \quad [4]$$

Cette fréquence est dépendante de la nature du métal et correspond généralement à la fréquence d'une onde électromagnétique dans l'ultraviolet. De plus, lorsqu'on insère la fréquence de plasma dans l'équation de la fonction diélectrique du métal, celle-ci devient¹ :

$$\varepsilon(\omega) = 1 - \left(\frac{\omega_p^2}{\omega^2} \right) \quad [5]$$

Cette dernière fonction est présentée à la figure A.1 :

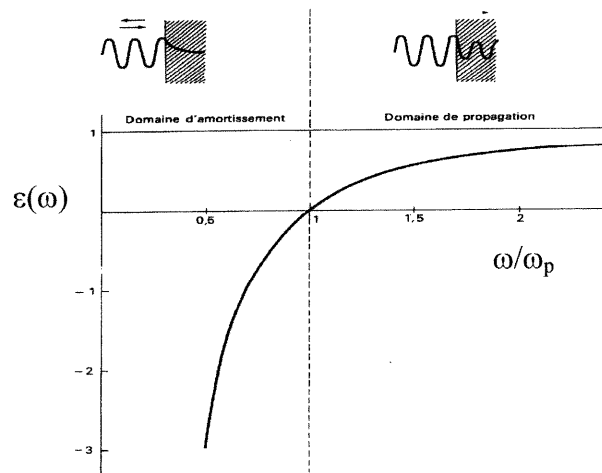


Figure A.1 Fonction diélectrique du gaz d'électrons libres en fonction de la fréquence angulaire de l'onde incidente exprimée par rapport à la fréquence de plasma ω_p .

On remarque sur cette figure que la constante diélectrique d'un métal prend une valeur soit positive, soit négative, suivant que la fréquence angulaire de l'onde électromagnétique transversale incidente est supérieure ou inférieure à ω_p . Ainsi, on peut conclure que les ondes incidentes se propagent ou s'amortissent dans le gaz d'électrons libres en fonction de leur fréquence angulaire. À partir de la figure A.1, on remarque que les ondes électromagnétiques se propagent dans un métal seulement lorsque que $\varepsilon(\omega)$ est positif, c'est-à-dire lorsque la fréquence angulaire

incidente est supérieure à ω_p . Cependant, elles sont totalement réfléchies lorsque $\varepsilon(\omega)$ est négatif. Donc, on peut conclure que les ondes incidentes dont la fréquence est comprise entre 0 et ω_p sont totalement réfléchies par un métal, ce phénomène étant responsable de l'éclat métallique. On s'attend donc à ce que, lorsqu'on est en présence d'une fréquence supérieure à ω_p , le métal y sera transparent, c'est-à-dire qu'il ne les réfléchira pas².

Plasmons de volume

Il existe dans un plasma des ondes qui ne sont pas transversales. En effet, on retrouve aussi des ondes longitudinales qui ressemblent à des ondes sonores. L'existence de ces ondes s'explique par le fait que la densité de charges totale des ions positifs fixes et des électrons libres est nulle en moyenne, mais que les électrons, parce qu'ils sont toujours en mouvement (à cause des fluctuations thermiques), font varier continuellement la charge électronique locale dans le plasma. Donc, si la position des électrons fait que la densité de charge électronique locale est plus faible dans une région que dans une autre, la charge des ions positifs n'est alors plus neutralisée et une charge résultante positive est ainsi créée, ce qui attire les électrons voisins. Les électrons, tendant à restaurer la neutralité de charge, sont attirés, gagnent de la vitesse et finalement dépassent la « cible ». Il s'accumule donc dans la région concernée plus d'électrons qu'il n'en faut pour neutraliser la charge positive créée précédemment. On a donc en résultante une zone chargée négativement, qui tend à repousser les autres électrons. C'est ainsi qu'une oscillation de densité de charge tridimensionnelle, aussi appelée oscillation de plasma, naît dans le métal³.

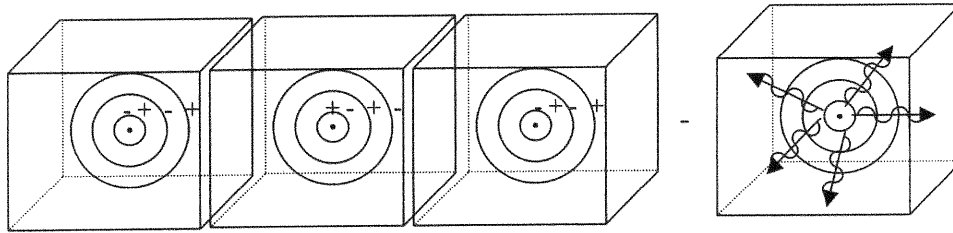


Figure A.2 Représentation schématique de l'évolution d'un plasmon de volume dans le temps.

Ces oscillations de plasma, aussi nommées modes optiques longitudinaux, se produisent à différentes fréquences (ω_L) déterminés par les zéros de la fonction diélectrique. Si on réfère au cas d'un gaz d'électrons libres, on remarque que cette condition est vraie si $\omega_L = \omega_p$. Donc, on peut conclure que dans un métal, les modes d'oscillation longitudinaux du gaz électronique ont une fréquence angulaire égale à la fréquence de plasma. Donc, une oscillation longitudinale est décrite comme un déplacement uniforme d'un gaz électronique où les électrons oscillent par rapport à leur position d'équilibre à une fréquence angulaire ω_L ¹.

On peut donc représenter les oscillations de plasma comme étant un ensemble d'oscillateurs harmoniques de fréquence angulaire ω_p , dont l'énergie correspond à l'expression

$$E = (n + \frac{1}{2})\hbar\omega_p \quad [6]$$

où n est un entier positif. En conclusion, une oscillation de plasma quantifiée de cette manière se nomme plasmon. Lorsque n est nul, le plasmon est à l'état d'équilibre et possède une énergie égale à :

$$E_{n=0} = \frac{1}{2}\hbar\omega_p \quad [7]$$

Cependant, l'énergie requise pour amener un plasmon à un état excité est égale à $\hbar\omega_p$ et varie généralement entre 3 et 25 eV. Par contre, l'énergie thermique peut généralement être négligée et donc, les plasmons restent dans leur état d'équilibre jusqu'à ce qu'ils soient excités par le passage d'un électron ou alors par la réflexion d'un électron ou d'un photon. Ainsi, lors du passage de l'électron, il y a couplage entre la charge de l'électron et les fluctuations de champ électrostatique des oscillations de plasma. De plus, l'électron perd une énergie égale à un multiple entier de l'énergie du plasmon. Il se produit un phénomène similaire lorsque le plasmon est excité par un photon. Il est également possible d'exciter des oscillations collectives de plasma dans des médias électriques. Dans un cas semblable, l'oscillation de plasma ressemble à celle d'un métal; le nuage d'électrons de valence oscille par rapport aux ions positifs¹.

Plasmons de surface

Des oscillations de densité de charge de surface bidimensionnelles, aussi nommées plasmons de surface, peuvent être retrouvées à l'intérieur d'un métal et peuvent se propager le long de l'interface métal-vide, métal-métal ou encore métal-diélectrique. De plus, il est possible de calculer la fréquence caractéristique des plasmons de surface selon l'équation suivante où ϵ_1 et ϵ_2 sont les constantes diélectriques des constituants de l'interface⁴:

$$\epsilon_1 + \epsilon_2 = 0 \quad [8]$$

Donc pour l'interface métal-vide, la fréquence des plasmons de surface est représentée par :

$$\omega_{ps} = \frac{\omega_p}{\sqrt{2}} \quad [9]$$

On peut ainsi conclure que le plasmon de surface possède une énergie plus faible que le plasmon de volume. La Figure A.3 montre les pertes d'énergie qu'un électron subit lorsqu'il traverse un film mince métallique. Cet électron peut exciter un ou plusieurs plasmons de volume et de surface. La figure montre donc d'une part des pics associés à l'énergie perdue par l'électron lors de l'excitation de plasmons de volume (11 eV) et de surface (8 eV)⁵.

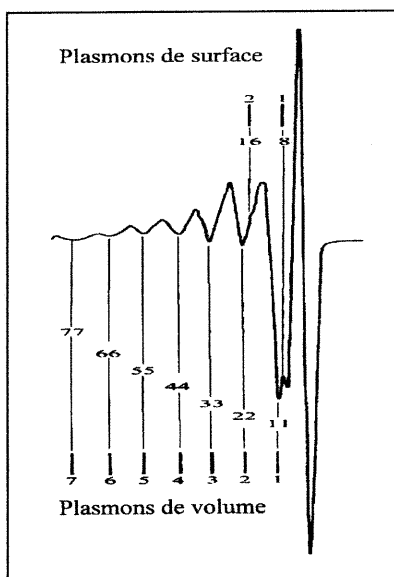


Figure A.3 Pertes d'énergie d'un électron lors de l'excitation des plasmons de volume et de surface

Résonance des plasmons de surface

Il est possible d'exciter les plasmons de surface de deux manières. On peut tout d'abord le faire par le passage d'un électron à travers un mince film métallique. Il est aussi possible d'exciter le plasmon par réflexion d'un électron ou d'un photon à la surface du métal. La résonance des plasmons de surface consiste donc à exciter les plasmons de surface à l'aide d'une onde électromagnétique réfléchie sur un métal. Une condition nécessaire à l'existence des plasmons de surface consiste en le fait que les constantes diélectriques des deux constituants de l'interface doivent être

de signe contraire. Enfin, puisque les constantes diélectriques varient avec la fréquence de l'onde incidente, l'excitation des plasmons est spécifique à certaines fréquences.

On peut caractériser la propagation des ondes électromagnétiques du plasmon de surface et de l'onde incidente par des vecteurs d'onde (k_{ps} et k_b) qui peuvent être définis ainsi⁶ :

$$k_{ps} = k_0 \sqrt{\epsilon_m \epsilon_b / (\epsilon_m + \epsilon_b)} \quad [10]$$

$$k_b = k_0 \sqrt{\epsilon_b} \quad [11]$$

Dans ces équations, k_{ps} est le vecteur d'onde du plasmon de surface, k_b est le vecteur d'onde de l'onde incidente dans l'air, k_0 , celui de l'onde dans le vide, ϵ_m , la constante diélectrique du métal et ϵ_b celle de l'air.

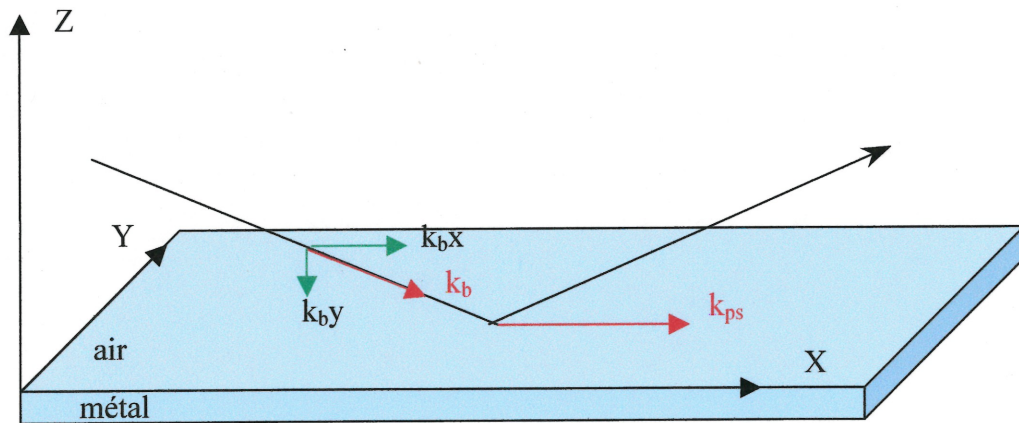


Figure A.4 Couplage d'une onde électromagnétique incidente polarisée-p (plan xz) avec un plasmon de surface.

La manière d'exciter un plasmon de surface est de transformer l'onde de volume en onde de plasmon de surface. Pour ce faire, il faut que $k_{bx} = k_{ps}$. Cependant, dans les conditions présentées à la figure A.4, k_{ps} est plus grand que k_{bx} pour n'importe quel angle d'incidence de l'onde excitatrice. Pour éviter ceci, on couple donc au métal un prisme dont l'indice de réfraction répond à l'égalité suivante :

$$n_p = \sqrt{\epsilon_p} > \sqrt{\epsilon_b} > 1 \quad [12]$$

RÉFÉRENCES

- (1) Kittel, C., traduction: Honnart, A. *Introduction à la physique de l'état solide*; Dunod: Paris, 1972.
- (2) Ashcroft, N. W., Mermin, N. D. *Solid State Physics*; Saunders College: Philadelphie, 1976.
- (3) Raimès, S. *The wave mechanics of electrons in metals*; North-Holland Publishing: Amsterdam, 1961.
- (4) Myers, H. P. *Introductory Solid State Physics*; Taylor & Francis: London, 1990.
- (5) Prutton, M. *Surface Physics, 2nd Edition*; Oxford University Press: Oxford, 1983.
- (6) Green, R. B., Frazier, R.A., Shakesheff, K.M., Davies, M.C., Roberts, C.J., Tendler, S.J.B. *Biomaterials* **2000**, *21*, 1823.

ANNEXE 2

Exemple de modélisation sur les courbes SPR pour les mesures d'épaisseur du collagène

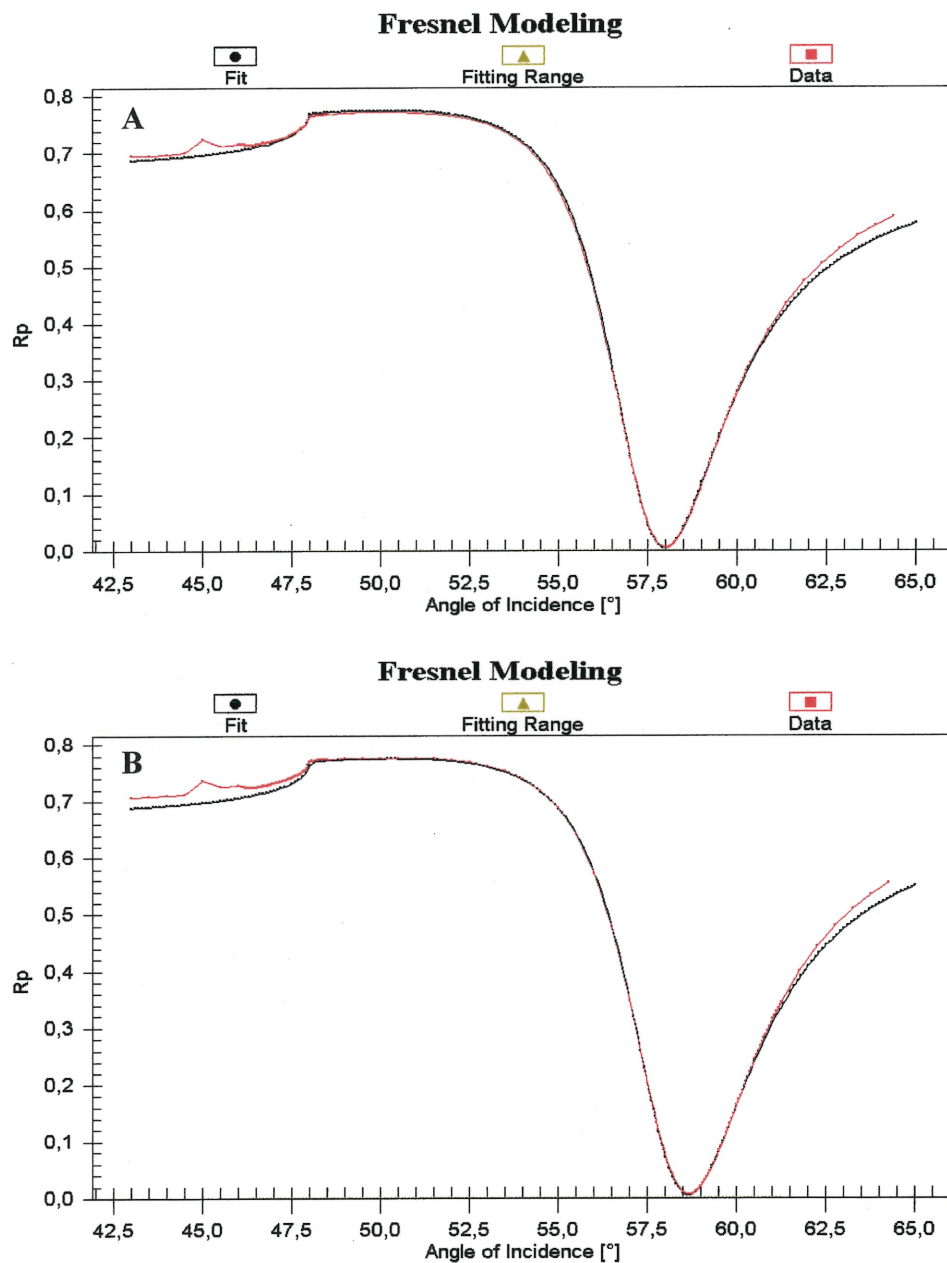


Figure A.5 Courbes de modélisation de Fresnel de A. C16 dans la solution tampon et B. C16 avec collagène dans la solution tampon (rouge : expérimental, noir : modélisation)