



**Université de Lille 1 Sciences et Technologies**

**Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de  
l'Environnement**

# **THESE**

**Pour l'obtention du grade de**

**Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille**

**Spécialité Molécules et Matière Condensée**

## **Elaboration de brosses de polymères à la surface du titane en vue d'applications biomédicales**

**Présentée et soutenue par**

**Cédric ZOBRIST**

**Le 2 décembre 2011**

**Pr. Maryse BACQUET**

**Dr. Christophe DETREMBLEUR**

**Dr Maude JIMENEZ**

**Dr H. Frédéric HILDEBRAND**

**Pr. Jean-Jacques ROBIN**

**Pr. Patrice WOISEL**

**Examinatrice**

**Rapporteur**

**Co-Encadrante**

**Examineur**

**Rapporteur**

**Directeur**





**Université de Lille 1 Sciences et Technologies**

**Ecole Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de  
l'Environnement**

# **THESE**

**Pour l'obtention du grade de**

**Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille**

**Spécialité Molécules et Matière Condensée**

## **Elaboration de brosses de polymères à la surface du titane en vue d'applications biomédicales**

**Présentée et soutenue par**

**Cédric ZOBRIST**

**Le 2 décembre 2011**

**Pr. Maryse BACQUET**

**Dr. Christophe DETREMBLEUR**

**Dr Maude JIMENEZ**

**Dr H. Frédéric HILDEBRAND**

**Pr. Jean-Jacques ROBIN**

**Pr. Patrice WOISEL**

**Examinatrice**

**Rapporteur**

**Co-Encadrante**

**Examineur**

**Rapporteur**

**Directeur**





*A ma famille.*

*A Nico, Thomas et Vincent, des amis qui sont de vrais frères.*

*« Acta Non Verba »*



## Remerciements

Les travaux de recherche rassemblés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du département Ingénierie des Systèmes Polymères de l'Unité Matériaux Et Transformations de l'Université de Lille 1, dans les équipes dirigées par les Prs. Patrice Woisel et Michel Traisnel.

Je tiens à remercier le Pr. Patrice Woisel pour l'accueil qu'il m'a réservé au sein de son équipe au cours de toutes ces années, pour son engouement pour la recherche qu'il a su me communiquer, ainsi que pour les nombreux conseils qu'il a su me prodiguer.

Cette thèse n'aurait pu arriver à maturation sans la contribution avisée des Dr David Fournier et Joël Lyskawa. Je les remercie pour tout le temps qu'ils ont su me consacrer, tant à la paillasse qu'au bureau.

Je remercie également le Pr. Michel Traisnel, ainsi que le Dr Maude Jimenez, sans qui les fonctionnalisations de titane au moyen des plasmas froids ne seraient à l'heure actuelle que des ébauches d'idées.

Je tiens aussi à remercier le Dr Frédéric Hildebrand, directeur de recherche à l'INSERM, de m'avoir permis de réaliser les évaluations biologiques au sein du Groupe de Recherche sur les Biomatériaux, ainsi que les Drs Feng Chai et Jonathan Sobocinski, pour leur aide dans ces recherches et pour les connaissances apportées.

Je m'en voudrais de ne pas mentionner tous celles et ceux qui m'ont aidés pour les diverses analyses qui nécessitent un savoir-faire d'expert ainsi que ceux qui m'ont autorisé à utiliser leurs installations : Dr. Valérie Miri, Dr. Nicolas Nuns, Léon Gengembre, Aurélie Malfait, Damien Creton et Pierre Bachelet.

Une bonne ambiance de travail contribue à une bonne motivation. L'ambiance de travail au sein du laboratoire n'aurait pu être ce qu'elle est sans tous ceux qui y ont participé de près ou de loin : Nicolas, Fred, Imen, Léna, Aurélie, Stéphanie, Stéphane, Matthew, et Guillaume.

Enfin je remercie le Pr. Jean-Jacques Robin de l'Université de Montpellier II et le Dr Christophe Detrembleur de l'Université de Liège pour le temps consacré à l'examen de ce manuscrit en qualité de rapporteurs.



# TABLE DES MATIERES

<b>Introduction Générale</b>	1
<b>PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	5
<b><u>Chapitre I</u> : l'athérosclérose et le stenting</b>	7
<b>1. L'athérosclérose</b>	9
<b>2. Angioplastie et stenting</b>	10
2.1. Historique	10
2.2. Complications liées au stenting	11
2.2.1. Thrombose	11
2.2.2. Resténose intrastent	11
2.3. Solutions existantes	12
2.3.1. Molécules thérapeutiques	12
2.3.2. Stents actifs	13
2.3.2.1. Généralités et historique	13
2.3.2.2. Molécules actives employées	14
2.3.2.3. Enveloppe du stent	15
2.3.2.4. Nouvelles générations de stents actifs	15
<b>3. Conclusion</b>	16
<b>Références bibliographiques</b>	17
<b><u>Chapitre II</u> : le Titane : structure, surface et fonctionnalisation</b>	21
<b>1. Le Titane</b>	23
1.1. Généralités	23
1.2. Cristallographie	23
1.3. Le titane et ses alliages dans le domaine médical	24
1.4. L'oxyde de titane	25
<b>2. Préparation du titane</b>	27
2.1. Voie physique	27
2.1.1. Implantation d'ions par immersion dans le plasma	28
2.1.2. Plasma radiofréquence	28
2.1.3. Anodisation	29
2.2. Oxydation par voie chimique	30
2.2.1. Traitements acides	30
2.2.2. Traitement basique	30
2.2.3. Traitements peroxydes	30
2.3. Conclusion sur l'oxydation de la surface du titane	31
<b>3. Fonctionnalisation chimique du titane</b>	31
3.1. Espèces en surface	31

3.2. Sites actifs	32
3.3. Ancres pour la fonctionnalisation du titane	33
3.3.1. Les silanes	34
3.3.2. Les acides carboxyliques et dérivés d'acides phosphoniques	36
3.3.3. Les catéchols	39
<b>4. Conclusion</b>	<b>43</b>
<b>Références bibliographiques</b>	<b>44</b>

## **Chapitre III : La Polymérisation Radicalaire Contrôlée appliquée à l'élaboration de brosses de polymères**

<b>1. Les Polymérisation Radicalaire Contrôlée (PRC)</b>	<b>55</b>
1.1. Principe	55
1.2. Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP)	56
1.3. Polymérisation radicalaire en présence de nitroxydes (NMP)	58
1.4. Polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition fragmentation (RAFT)	59
<b>2. La PRC : un outil de choix pour l'élaboration de « brosses » de polymères</b>	<b>62</b>
2.1. Approche « graft to »	62
2.2. Stratégie « graft from »	66
<b>3. Immobilisation de polymères brosses sur des surfaces de titane</b>	<b>67</b>
3.1. Fonctionnalisations des surfaces de titane au moyen de l'ATRP	67
3.2. Fonctionnalisation des surfaces de titane par le procédé NMP	70
3.3. Fonctionnalisation des surfaces de titane par la polymérisation RAFT	70
<b>Références Bibliographiques</b>	<b>72</b>
<b>Synthèse de l'étude bibliographique</b>	<b>77</b>

## **DEUXIEME PARTIE : DESCRIPTIF DES EXPERIENCES**

### **Chapitre IV : Elaboration par polymérisation RAFT de polymères parfaitement définis intégrant un motif catéchol en extrémité de chaîne**

<b>1. Synthèse et caractérisation des polymères fonctionnalisés en extrémité de chaîne par un motif catéchol</b>	<b>87</b>
1.1. Synthèse et caractérisation des différents agents de transfert fonctionnalisés	87
1.2. Polymérisation RAFT contrôlées par les agents de transfert CTA3 et CTA4	89
1.2.1. Polymérisations RAFT en présence de l'agent de transfert CTA3	89
1.2.2. Polymérisations RAFT en présence de l'agent de transfert CTA4	96
1.3. Synthèse, caractérisation et post-fonctionnalisation de polymères d'esters activés préparés par RAFT à partir des agents de transfert CTA3 et CTA4	99

1.3.1. Polymérisation du NAS en présence des agents de transferts CTA3 et CTA4	100
<b>2. Post-fonctionnalisation des polymères de NAS</b>	102
<b>3. Conclusion</b>	105
<b>Références bibliographiques</b>	107
<b><u>Chapitre V</u> : Elaborations de brosses de polymères sur les surfaces de titane</b>	109
<b>1. Préparation des surfaces de titane pour la fonctionnalisation</b>	111
1.1. Apprêtage des surfaces de titane	111
1.2. Traitement chimique des échantillons	112
<b>2. Greffage par la stratégie « graft to »</b>	113
2.1. Analyses des surfaces fonctionnalisées par IR-ATR et XPS	114
2.2. Identification du fragment catéchol dans le film de polymère greffé en surface par électrochimie	116
2.3. Etude du greffage des polymères sur le dioxyde de titane par résonance plasmonique de surface (SPR)	118
2.3.1. Etude de l'influence de l'ancre catéchol	120
2.3.2. Quantification de la matière greffée	121
2.4. Etude de la morphologie des films polymères greffés par microscopie à force atomique (AFM)	122
2.5. Effet du greffage sur les propriétés physico-chimiques des surfaces	123
<b>3. Stratégie combinée « graft to » et « click chemistry »: Elaboration d'une plateforme à base de titane "clickable"</b>	124
3.1. Synthèse de l'ancre Dopamine-N3	125
3.2. Fonctionnalisation du titane par l'ancre Dopamine-N3	126
3.3. Fonctionnalisation de la plateforme par une sonde électrochimique	127
3.4. Fonctionnalisation de la plateforme par une sonde fluorée	129
3.4.1 Analyse XPS des surfaces fonctionnalisées	130
3.4.2 Effet du greffage sur les propriétés physico-chimiques des surfaces	131
3.5. Conclusion	132
<b>4. Application de la stratégie « graft from » à la fonctionnalisation des surfaces de titane</b>	132
4.1. Caractérisations des surfaces de titane obtenues par la stratégie « graft from » par spectroscopie infrarouge ATR	134
4.2. Etude du greffage selon la stratégie « graft to » par électrochimie	135
4.3. Etude de la morphologie des films de polymères greffés obtenus par la stratégie « graft from » par microscopie à force atomique (AFM)	136
4.4. Modification des propriétés physico-chimiques des surfaces de titane fonctionnalisées	137
<b>5. Conclusion</b>	139
<b>Références bibliographiques</b>	141
<b><u>Chapitre VI</u> : Evaluations biologiques</b>	143
<b>1. Evaluation des propriétés biologiques des surfaces de titane non fonctionnalisées</b>	145

<b>2. Evaluation des propriétés biologiques des polymères de glucosamine</b>	148
2.1. Cytotoxicité l'agent de transfert CTA3	148
2.2. Cytotoxicité des polymères de glucosamine (CTA3-PNGlu et CTA4-PNGlu)	149
<b>3. Evaluation des propriétés biologiques des surfaces fonctionnalisées</b>	151
3.1. Cytocompatibilité des surfaces fonctionnalisées	151
3.2. Essais d'hémocompatibilité sur les surfaces fonctionnalisées	153
<b>4. Conclusion</b>	154
<b>Références bibliographiques</b>	155

## **Chapitre VII : Elaboration de films de polymères aminés sur des surfaces de titane par plasma froid**

157

<b>1. Rappels bibliographiques</b>	159
1.1. Généralités	159
1.2. Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma	160
1.3. Avantages, Inconvénients et limitations	161
<b>2. Polymérisation assistée par plasma</b>	162
2.1. Conception de l'enceinte plasma microonde pulsée	162
2.1.1. Choix du monomère	162
2.1.2. Elaboration d'une enceinte plasma	162
2.2. Expérimentations	164
2.2.1. Phase de test	164
2.2.2. Optimisation des paramètres	165
2.2.3. Réactivité du film de polymères aminés : immobilisation d'un agent de transfert RAFT et polymérisation du NAS	168
<b>3. Conclusion</b>	169
<b>Références bibliographiques</b>	171

## **TROISIEME PARTIE : PARTIE EXPERIMENTALE**

173

### **Chapitre VIII : Matériels et méthodes**

175

<b>1. Généralités</b>	177
<b>2. Synthèses et caractérisations des agents de transfert et du N-Acryloyloxysuccinimide</b>	178
2.1. Synthèse et caractérisation de l'acide 2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionique (CTA1) [2]	178
2.2. Synthèse et caractérisation du 2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionoxysuccinimide (CTA2)	179
2.3. Synthèse et caractérisation du N-(3,4-dihydroxyphényléthyl)-2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionamide (CTA3)	180
2.4. Synthèse et caractérisation du 2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionate de benzyle (CTA4)	181
2.5. Synthèse et caractérisation du N-acryloyloxysuccinimide (NAS) [3]	182
2.6. Synthèses et caractérisations des (co)polymères	182
2.6.1. Homopolymérisations RAFT : procédure générale	182



2.6.2. Purification des polymères	183
2.6.3. Post-fonctionnalisation des polymères PNAS par la glucosamine	183
2.7. Synthèse et caractérisation de l'ancre Dopamine-N3 5-(3,4-dihydroxyphénéthyl)carbamoylepentanoate de 3-azidopropyle)	184
2.7.1. Synthèse et caractérisation de l'acide 5-(3-azidopropyl)-5-oxocarbonylpentanoïque	184
2.7.2. Synthèse du 5-(3-azidopropyl)oxocarbonylpentanoate de succinimidyle	185
2.7.3. Synthèse du 5-(3,4-dihydroxyphénéthyl)carbamoylepentanoate de 3-azidopropyle (Ancre Dopamine-N3)	185
2.7.4. Synthèse du « pent-4-ynoate de Zonyl »	186
<b>3. Préparation des échantillons de titane</b>	187
3.1. Titane	187
3.2. Traitements de surface	189
3.2.1. Oxydation des surfaces	189
3.2.2. Traitement thermique	189
<b>4. Tests biologiques</b>	190
4.1. Lignées Cellulaires employées	190
4.2. Viabilité cellulaire par la méthode du clonage	191
4.3. Vitalité cellulaire	192
4.4. Prolifération cellulaire	193
4.5. Hémostabilité	195
<b>Références bibliographiques</b>	197
<b>Conclusion générale et perspectives</b>	199
<b>ANNEXES</b>	203
<b>ANNEXE 1 : Electrochimie</b>	205
<b>ANNEXE 2 : Résonance plasmonique de surface</b>	208

## Liste des abréviations couramment utilisées

### Réactifs et Solvants

DCC	Dicyclohexylcarboxydiimide
DMAP	4-diméthylaminopyridine
DMF	Diméthyle formamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
GluNH <sub>2</sub>	Glucosamine
NEt <sub>3</sub>	Triéthylamine
NEtOH	Ethanolamine
NHS	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
NIPAM	<i>N</i> -isopropylacrylamide
<i>t</i> BA	acrylate de <i>tert</i> -butyle
THF	Tétrahydrofurane

### Produits Synthétisés

CTA3	Agent de transfert RAFT comportant un fragment catéchol
CTA4	Agent de transfert RAFT comportant un fragment benzyle
NAS	<i>N</i> -acryloyloxysuccinimide
PNAS	poly( <i>N</i> -acryloyloxysuccinimide)
PNGlu	poly( <i>N</i> -glucosylacrylamide- <i>r-N</i> -2-hydroxyéthylacrylamide)
PNIPAM	poly( <i>N</i> -isopropylacrylamide)
PS	polystyrène
P <i>t</i> BA	poly(acrylate de <i>tert</i> -butyle)

### Techniques de caractérisation

(FT)IR	Infrarouge (à transformée de Fourier)
AFM	Microscopie à force atomique
ATR	Infrarouge en réflexion totale atténuée
GPC	Chromatographie d'exclusion stérique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SPR	Résonance plasmonique de surface
UV-Vis	Ultraviolet-visible
XPS	Spectroscopie des photoélectrons X

### Divers

LC50	Concentration létale à 50%
HPMEC	Cellules microvasculaires endothéliales pulmonaires d'origine humaine
I <sub>p</sub>	Indice de polymolécularité
L132	Cellules épithéliales humaines
MC3T3	Cellules ostéoblastiques d'origine murine
M <sub>n</sub>	Masse molaire en nombre

# **INTRODUCTION GENERALE**



## INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans les pays développés. L'athérosclérose (formation de dépôt localisé au niveau des artères) constitue la première origine du développement de ces maladies et conduit, dans les cas les plus graves, à l'obstruction de l'artère. Pour soigner cette pathologie, l'emploi de dispositifs médicaux implantables (DMI) sous forme de stents métalliques s'est généralisé depuis les années 1970. Cette technique consiste à déployer un ressort en métal, ou stent, à l'aide d'un ballonnet dans la partie de l'artère qui a été lésée afin de la maintenir ouverte. Cependant, ce geste n'est pas toujours sans conséquences pour le patient et occasionne fréquemment des complications postopératoires, telles que les phénomènes de thrombose (formation d'un caillot de sang) et de resténose (réobstruction de la lumière artérielle).

Le taux d'occurrence de thromboses aiguës, intervenant dans les 24H après le geste de dilation a été grandement diminué au cours de ces dernières années, grâce à une amélioration de l'hémocompatibilité des stents et surtout une meilleure gestion des traitements médicamenteux. Cependant, la resténose demeure très fréquente : elle concernerait environ 30 % des patients ayant subi un stenting et se développe dans les six mois suivant l'opération.

L'arrivée récente des stents « actifs », stents métalliques enrobés d'une substance pharmaco-active ciblée, offre la possibilité de limiter ces complications. Les modèles de stents « actifs » sur le marché fonctionnent sur la base d'une élution progressive de la molécule active dans le système par dégradation d'une matrice polymère enrobant le stent métallique. Néanmoins, les résultats à moyen termes de la première génération des stents actifs, couverts d'agents antiprolifératifs, ont déçu avec notamment un taux de thrombose secondaire important.

Un autre concept très prometteur vise à immobiliser à la surface du stent des molécules bioactives ciblées limitant ces complications et favorisant l'intégration du biomatériau dans l'artère. Pour que cette stratégie soit viable, il est impératif que la quantité de molécules actives greffées en surface soit contrôlée et que l'accroche au substrat métallique soit forte.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette thèse. En effet, ce travail a consisté à développer une nouvelle stratégie générale d'accès à des brosses de (co)polymères parfaitement définies intégrant des unités glucosidiques (glucosamine) sur du titane. Pour contrôler les paramètres macromoléculaires, nous avons fait appel à la polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT. Dans cette étude, ces polymérisations ont été conduites en présence d'un agent de transfert équipé d'un motif catéchol, connu pour interagir fortement avec, notamment, des surfaces à base de titane. Nous avons été ainsi en mesure d'élaborer différents copolymères parfaitement définis, fonctionnalisés en extrémité de chaîne par l'ancre catéchol et incorporant des unités glucosidiques sur leur partie latérale.

Ces polymères fonctionnels ont été immobilisés de manière spécifique sur des surfaces de titane, grâce à la présence de l'ancre catéchol. Les brosses de polymères ainsi obtenues ont été ensuite caractérisées par des techniques spectroscopiques propres aux surfaces avant d'être soumises à différents tests biologiques permettant d'évaluer la biocompatibilité du biomatériau hybride.

Ce mémoire s'articulera en deux grandes parties :

La première partie, consacrée aux études bibliographiques, traitera i) du stenting et des problèmes qui lui sont liés (Chapitre I), ii) des différentes méthodes existantes permettant de fonctionnaliser des surfaces à base de titane (Chapitre II) et iii) des techniques de polymérisation radicalaire contrôlée et leurs applications à l'élaboration de polymères brosses sur les surfaces. (Chapitre III)

La seconde partie, aura pour objectif de décrire, dans un premier temps, les différentes synthèses et caractérisations des nouveaux polymères élaborés au cours de cette thèse (Chapitre IV). Seront ensuite présentés, les différents outils mis en œuvre pour suivre l'immobilisation des polymères sur les surfaces de titane et caractériser les brosses de polymères résultantes (Chapitre V). Les premières évaluations biologiques relatifs à l'étude de biocompatibilité des nouvelles brosses de polymères immobilisées sur titane seront ensuite détaillées (Chapitre VI). Enfin, une étude supplémentaire sera dédiée à la mise au point d'une nouvelle technique de fonctionnalisation du titane par des polymères aminés faisant intervenir la technologie de plasma froid (Chapitre VII).

Nous concluons ce manuscrit en présentant les différentes perspectives qui s'ouvrent suite aux résultats obtenus au cours de cette thèse.

# **PREMIERE PARTIE**

**ETUDE**

**BIBLIOGRAPHIQUE**





# **Chapitre I**

## **L'athérosclérose et le stenting**



## 1. L'athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie systémique dont les complications cardiovasculaires constituent l'une des principales causes de mortalité dans le monde (environ 50% dans les pays développés). L'athérosclérose est un problème majeur de santé publique, même si le taux de mortalité cardiaque qui lui est liée est actuellement en diminution. Ce résultat est rattaché à l'amélioration de l'encadrement thérapeutique depuis le milieu des années 1980.

L'athérosclérose est un processus lent et progressif conduisant à la formation d'une plaque athéroscléreuse constituée de protéines matricielles (collagène, élastine et protéoglycanes), de cellules musculaires lisses et de macrophages remplis de dépôts lipidiques s'accumulant au sein de la tunique interne de la paroi vasculaire (Figure I.1) [1-2]. Bien que certaines théories sur le processus aient été émises [2], celui-ci est très complexe et n'est pas encore compris dans sa globalité. Cependant, un certain nombre de facteurs de risque favorisant son apparition ont été clairement identifiés, comme le tabagisme, l'hypertension artérielle, les dyslipidémies, le diabète, la surcharge pondérale, l'âge et le sexe. La croissance de cette plaque athéroscléreuse conduit à la diminution progressive de la lumière artérielle, ou sténose.

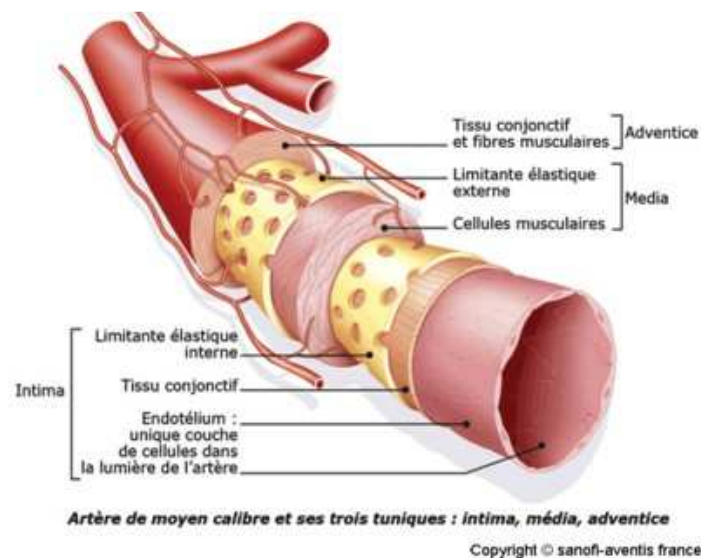


Figure I.1 : Les différentes couches composant une artère (Sanofi Aventis France)

La prise en charge de cette pathologie consiste dans un premier temps au contrôle des facteurs de risques cardiovasculaires auquel est associé un traitement constitué trois classes médicamenteuses : les antiagrégants plaquettaires (AAP), les statines et les inhibiteurs de

l'enzyme de conversion (ou antagonistes des récepteurs à l'angiotensine 2), qui ont fait preuve d'efficacité en réduisant significativement le risque d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux chez ces patients [3-5].

Toutefois, en cas de sténoses significatives symptomatiques, un traitement invasif spécifique de revascularisation peut être proposé au patient.

## **2. Angioplastie et stenting**

### **2.1. Historique**

Jusqu'à la fin des années 70, les gestes de revascularisation artérielle proposés au malade ayant une lésion artérioscléreuse occlusive étaient de deux types, et ce quelque soit la localisation : le pontage ou la thromboendartériectomie. Les travaux de Dotter [6] et de Grüntzig [7] ont abouti à l'élaboration de nouvelles techniques de revascularisation mini-invasive des lésions artérielles. Cette revascularisation mini-invasive, appelée angioplastie, se fait sous la forme d'une dilatation mécanique de la lésion athéroscléreuse rétrécissant la lumière artérielle à l'aide d'un ballonnet. Les résultats de l'angioplastie n'étaient guère satisfaisants, avec un taux important de complications peropératoires.

L'invention du stent par Sigwart en 1987 a grandement amélioré la technique d'angioplastie [8]. Le stent est un dispositif en métallique maillé (Figure 1.2), qui permet de contraindre les artères réfractaires aux méthodes d'angioplastie classiques à rester ouvertes. Ce dispositif a connu une popularité croissante au cours des années, s'adaptant à différentes localisations artérielles (aortique ou fémorale par exemple). De nos jours, en France, près de 95% des dilatations coronaires s'accompagnent de la pose d'un stent [9]. Les alliages les plus couramment employés pour la conception des stents sont l'acier 316L et le NiTiNOL. D'autres alliages ont été utilisés de façon plus rare, comme les mélanges cobalt-chrome ou encore les alliages de magnésium pour leur biodégradabilité. En France, en 2007, près de 167 000 stents ont été implantés en position coronaire [10]. Lors de toutes ces interventions, deux complications post opératoires sont toujours fréquemment diagnostiquées : la thrombose aigüe (1,9%) et surtout la resténose (30%).

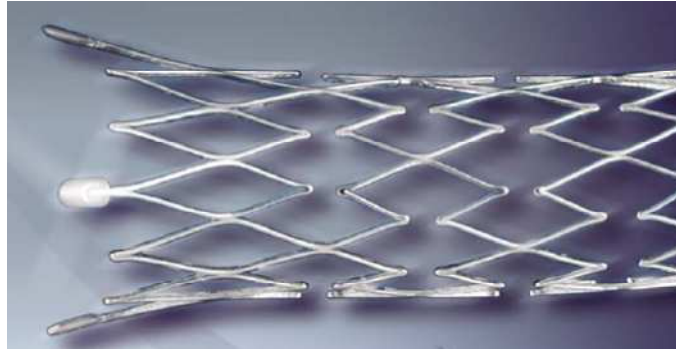


Figure I.2 : Exemple d'un stent en NiTiNOL : le Stent E-Luminexx™, Bard Vascular (C. R. Bard, Inc., Murray Hill, NJ, USA)

## **2.2. Complications liées au stenting**

### **2.2.1. Thrombose**

La thrombose aiguë survient dans les 24 heures après la pose du stent. Elle est favorisée par la perte des cellules endothéliales de la paroi vasculaire suite au geste chirurgical, ce qui engendre la formation d'un caillot sanguin. Ce caillot entraîne une diminution du flux sanguin vers les organes en aval, ce qui perturbe le fonctionnement. Le phénomène est d'autant plus grave s'il touche la zone coronaire, carotidienne ou encore digestive.

Le taux de ces thromboses s'est trouvé nettement diminué au cours de ces dernières années (entre 0,5 et 1,9%) [11]. Cette diminution est liée principalement à l'amélioration de l'hémocompatibilité des stents et une meilleure gestion des traitements systémiques (antiagrégants plaquettaires et statines) couvrant l'opération [12-13].

### **2.2.2. Resténose intrastent**

La resténose se produit entre quatre et six mois suivant l'implantation du stent. Elle concerne 15 à 26% des patients indépendamment de la zone où est posé le stent [14-17]. Le mécanisme de la resténose se décompose en deux parties : un remodelage constrictif autour de la zone traitée d'une part, une réaction de cicatrisation excessive de la paroi néointimale d'autre part (Figure I.3) [18-19]. Si le stent permet de lutter mécaniquement contre le remodelage constrictif, aucune solution efficace ne permet actuellement de régler les effets de la cicatrisation.



Figure 1.3 : Vue en microscopie optique (a) et vue macroscopique (b) d'une resténose intrastent (d'après P Lafont, HEGP, APHP)

Le mécanisme de cicatrisation est encore méconnu, car il fait intervenir de multiples éléments cellulaires ainsi que de nombreux processus de régulation.

Il semble cependant que la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses soit le facteur déterminant du mécanisme (Figure 1.1). En effet, en migrant vers l'intérieur de l'artère, ces cellules synthétisent une épaisse matrice extracellulaire qui va progressivement provoquer la réocclusion de la lumière artérielle.

## 2.3. Solutions existantes

### 2.3.1. Molécules thérapeutiques

Différentes molécules sont employées par voie systémique pour limiter ce phénomène, celles-ci peuvent être réparties en deux classes (Figure 1.4) :

- Les héparines : prescrites durant la période péri-opératoire, elles agissent sur les héparanes sulfates de la matrice extracellulaire de l'endothélium, et limiteraient le recrutement et la prolifération des cellules musculaires lisses et responsable de la resténose [20].
- Les statines : elles agissent à la fois sur la thrombose et sur la resténose [21], principalement en augmentant la production d'oxyde d'azote, ce qui a un impact bénéfique sur la prolifération des cellules endothéliales. Elles possèdent également un effet anti-inflammatoire reconnu permettant de lutter efficacement à la fois sur l'athérosclérose et sur la resténose.

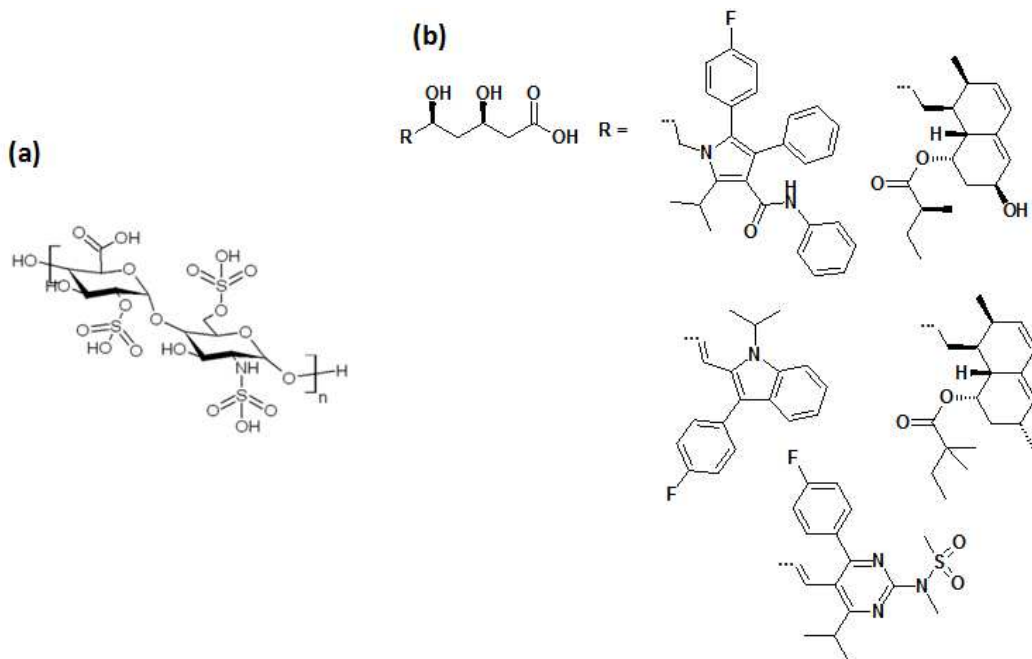


Figure 1.4 : Structure générale de l'héparine (a) et de différentes statines (b)

### 2.3.2. Stents actifs

#### 2.3.2.1. Généralités et historique

Un stent est dit « actif » lorsque sa surface a été modifiée de façon à comporter des molécules bioactives. Ces dernières peuvent être soit greffées directement à la surface du dispositif métallique, soit à l'aide d'une interface polymère, communément appelée matrice, où la molécule bioactive sera libérée dans le temps (DES)

Les premiers traitements de surface permettant de modifier la compatibilité des métaux ont d'abord été développés dans le domaine orthopédique. L'extension au domaine vasculaire est plus récente et les premiers stents actifs sont apparus au cours des années 90. En 1995, différentes matrices pouvant supporter des molécules bioactives ont été testées lors de l'étude Benestent II, mais les résultats n'ont pas été satisfaisants [22]. Depuis d'autres systèmes de matrices ont été développés, principalement à base de polysaccharides, d'hydrogels et de polymères synthétiques [23]. Ils servent à immobiliser les molécules bioactives par interactions ioniques et peuvent avoir eux-mêmes un effet anti-thrombogène.

Le cahier des charges auquel doit répondre un stent actif de nouvelle génération est très strict. Aux critères fondamentaux de résistance mécanique, de biocompatibilité et de résistance à la corrosion, vient s'ajouter la stabilité du dispositif qui doit être suffisante dans

le temps pour permettre le stockage. De plus, la matrice doit supporter les contraintes mécaniques liées au déploiement du stent dans la lumière artérielle. Enfin, il faut que la posologie ainsi que la pharmacocinétique de la molécule bioactive libérée dans le cadre des DES soient parfaitement maîtrisées.

### 2.3.2.2. Molécules actives employées

Ces molécules bioactives peuvent être séparées en deux groupes, en fonction de leur masse molaire :

- Les molécules dites à « faibles poids moléculaire » (Figure I.5) : il s'agit d'agents antiprolifératifs et antimitotiques dont la masse molaire n'excède pas  $2\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Dans cette catégorie se trouvent des lactones comme le sirolimus **(a)**, l'acide mycophénolique **(b)**, l'everolimus, le tacrolimus, des chaînes peptidiques, par exemple la séquence RGD (arginine-glycine-aspartate) et la dactinomycine **(c)**, ainsi que d'autres espèces (dexaméthasone **(d)**, 17- $\beta$ -estradiol, paclitaxel **(e)**)
- Les molécules à « haut poids moléculaires », appartenant à différentes familles de molécules, dont les protéines-ligands, comme les facteurs de croissance des cellules vasculaires endothéliales (VEGF) et les polysaccharides. Leurs masses molaires dépassent en général  $100\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

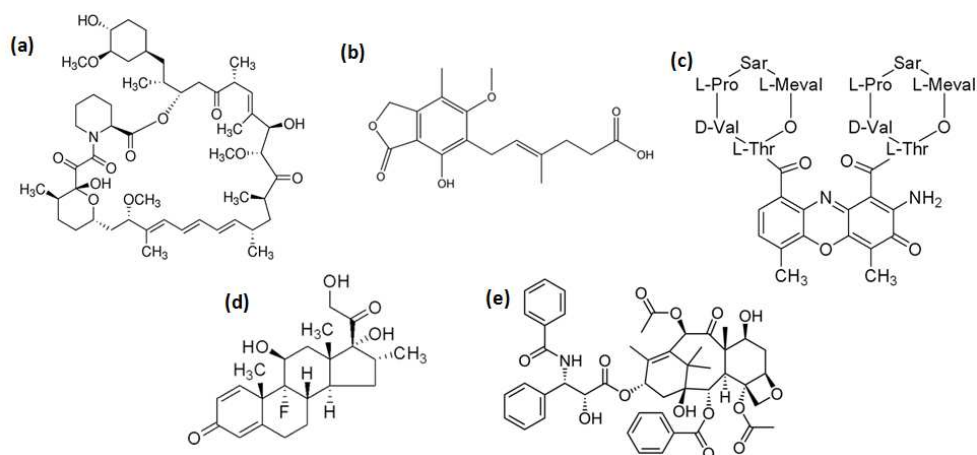


Figure I.5 : Structures du sirolimus **(a)**, de l'acide mycophénolique **(b)**, de la dactinomycine **(c)**, du dexaméthasone **(d)** et du paclitaxel **(e)**



Le rôle premier de ces molécules bioactives est avant tout de limiter la prolifération des cellules musculaires lisses, mais elles peuvent également jouer un rôle dans le contrôle de la cicatrisation artérielle en favorisant la réendothélisation.

#### 2.3.2.3. Enveloppe du stent

Les molécules bioactives sont adsorbées à la surface du stent à l'aide d'une matrice polymère. Celles-ci est constituées le plus souvent de polymères synthétiques comme le poly(acide lactique) (PLA) , le poly(acide glycolique) (PGA) , poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) [24-25], voire des polymères d'origine naturelle, dont le chitosan ou le dextran. D'un point de vue chronologique, le PLA a été le premier polymère à être exploité dans ce cadre [26]. Ces polymères sont biodégradables et sont tolérés par l'organisme. Cependant, leur capacité à délivrer des molécules bioactives de manière prolongée et contrôlée dans le temps est mal maîtrisée.

#### 2.3.2.4. Nouvelles générations de stents actifs

Il existe actuellement sur le marché six stents actifs portant le marquage CE. Cinq d'entre eux sont employés pour le traitement des lésions coronaires (Tableau I.1) et un seul pour le traitement des lésions fémorales superficielles, le stent Zilver PTX (Cook Medical, Bloomington, IN, USA). Ces stents emploient tous des molécules de faibles masses molaires de la famille du sirolimus et du tacrolimus qui seront libérés localement lors de l'implantation du stent.

Tableau I.1: Liste des stents actifs coronaires inscrits sur la LPPR (Liste des Produits et Prestations Remboursables)

<b>Nom Commercial</b>	<b>Industriel</b>	<b>Molécule active</b>
<b>Cypher</b>	Cordis, Johnson & Johnson, Warren, NJ, USA	Sirolimus
<b>Taxus</b>	Boston Scientific, Natick, Massachusetts, USA	Tacrolimus
<b>Endeavor</b>	Medtronic, Santa Rosa, CA, USA	Zotarolimus
<b>Promus</b>	Boston Scientific, Natick, MA, USA	Everolimus
<b>Xience</b>	Abbott Vascular, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA	Everolimus

Ces stents présentent, selon une étude de la Haute Autorité de Santé parue en 2009 [10] un bénéfice « confirmé mais limité » par rapport aux stents nus. Cette étude souligne que la différence importante de coût entre le stent classique et le stent actif restreint l'usage de ces stents pour une population de patients sélectionnés :

- chez les patients diabétiques [27-28]
- en cas de lésions longues de plus de 15 mm, dans les artères de moins de 3 mm de diamètre [29]
- pour traiter une resténose au sein d'une endoprothèse nue [30]
- en cas d'occlusion coronaire chronique de plus d'un mois [10]

En effet, dans ces différents cas, le rapport efficacité/coût est suffisamment important pour envisager l'emploi de ces stents. Toutefois, les résultats à moyen terme de la première génération des stents actifs a déçu notamment avec un taux de thrombose secondaire important mais de nouveaux agents thérapeutiques sont en cours d'évaluation. [31]

### **3. Conclusion**

L'angioplastie et la pose de stent restent à ce jour la stratégie la plus adoptée pour soigner l'athérosclérose, néanmoins le geste chirurgical doit être accompagné d'un traitement systémique afin de limiter les risques de thrombose et de resténose. Les stents actifs actuellement sur le marché fonctionnent sur le principe du « drug delivery system », dans lequel une matrice polymère entourant le stent libère progressivement des principes actifs, le plus souvent des antiprolifératifs. L'efficacité et les bénéfices de cette stratégie sont cependant limités selon plusieurs études [10, 22]. Toutefois, la mise au point d'une nouvelle génération de stents actifs permettent de lutter efficacement et dans le temps contre la thrombose et la resténose reste nécessaire.

## Références Bibliographiques

- [1] H. C. Stary, A. B. Chandler, S. Glagov, J. R. Guyton, W. Insull Jr, M. E. Rosenfeld, S. A. Schaffer, C. J. Schwartz, W. D. Wagner et R. W. Wissler, *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, american heart association*. *Circulation* **1994**, 89 (5), 2462-2478.
- [2] H. C. Stary, A. B. Chandler, R. E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull Jr, M. E. Rosenfeld, C. J. Schwartz, W. D. Wagner et R. W. Wissler, *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, american heart association*. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* **1995**, 15 (9), 1512-1531.
- [3] A. D. Blann, D. A. Fitzmaurice et G. Y. H. Lip, *Abc of antithrombotic therapy: Anticoagulation in hospitals and general practice*. *Brit. Med. J.* **2003**, 326 (7381), 153-156.
- [4] E. Braunwald, M. J. Domanski, S. E. Fowler, N. L. Geller, B. J. Gersh, J. Hsia, M. A. Pfeffer, M. M. Rice, Y. D. Rosenberg et J. L. Rouleau, *Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease*. *N. Engl. J. Med.* **2004**, 351 (20), 2058-2068.
- [5] *Mrc/bhf heart protection study of antioxidant vitamin supplementation in 20 536 high-risk individuals: A randomised placebo-controlled trial*. *The Lancet* **2002**, 360 (9326), 23-33.
- [6] C. T. Dotter, J. Rösch et M. P. Judkins, *Transluminal dilatation of atherosclerotic stenosis*. *Surg. Gynecol. Obstet.* **1968**, 127 (4), 794-804.
- [7] A. R. Gruentzig, A. Senning et W. E. Siegenthaler, *Nonoperative dilatation of coronary artery stenosis. Percutaneous transluminal coronary angioplasty*. *N. Engl. J. Med.* **1979**, 301 (2), 61-68.
- [8] U. Sigwart, J. Puel et V. Mirkovitch, *Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty*. *N. Engl. J. Med.* **1987**, 316 (12), 701-706.
- [9] D. Blanchard, *Cardiologie interventionnelle dans la vraie vie : L'expérience française*. XVIIes Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie **2007**.
- [10] *Evaluation des endoprothèses coronaires à libération de principe actif*; Haute Autorité de Santé: **2009**.
- [11] D. E. Cutlip, D. S. Baim, K. K. L. Ho, J. J. Popma, A. J. Lansky, D. J. Cohen, J. P. Carrozza Jr, M. S. Chauhan, O. Rodriguez et R. E. Kuntz, *Stent thrombosis in the modern era: A pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials*. *Circulation* **2001**, 103 (15), 1967-1971.
- [12] P. Barragan, J. Sainsous, M. Silvestri, J. L. Bouvier, B. Comet, J. B. Simeoni, P. Villain, P. Pietri, J. M. Quatre et G. Bayet, *A pilot study of the efficacy of ticlopidine in the early patency of coronary events*. *Etude pilote de l'efficacité de la ticlopidine dans la perméabilité précoce des endoprothèses coronaires* **1994**, 87 (11), 1431-1437.

- [13] M. Kinoshita, S. I. Matsumura, K. Sueyoshi, S. Ogawa et K. Fukuda, *Randomized trial of statin administration for myocardial injury - is intensive lipid-lowering more beneficial than moderate lipid-lowering before percutaneous coronary intervention?* *Circ. J.* **2007**, *71* (8), 1225-1228.
- [14] P. Dick, H. Wallner, S. Sabeti, C. Loewe, W. Mlekusch, J. Lammer, R. Koppensteiner, E. Minar et M. Schillinger, *Balloon angioplasty versus stenting with nitinol stents in intermediate length superficial femoral artery lesions.* *Catheter. Cardio. Inte.* **2009**, *74* (7), 1090-1095.
- [15] R. Moreno, C. Fernández, F. Alfonso, R. Hernández, M. J. Pérez-Vizcayno, J. Escaned, M. Sabaté, C. Bañuelos, D. J. Angiolillo, L. Azcona et C. Macaya, *Coronary stenting versus balloon angioplasty in small vessels: A meta-analysis from 11 randomized studies.* *J. Am. Coll. Cardiol.* **2004**, *43* (11), 1964-1972.
- [16] M. G. M. Steinbauer, K. Pfister, M. Greindl, F. Schlachetzki, I. Borisch, G. Schuirer, S. Feuerbach et P. M. Kasprzak, *Alert for increased long-term follow-up after carotid artery stenting: Results of a prospective, randomized, single-center trial of carotid artery stenting vs carotid endarterectomy.* *J. Vasc. Surg.* **2008**, *48* (1), 93-98.
- [17] T. Zeller, A. Rastan, U. Schwarzwälder, C. Mueller, T. Schwarz, U. Frank, K. Bürgelin, S. Sixt, E. Noory, U. Beschorner, K. Hauswald, D. Branzan et F. J. Neumann, *Treatment of in-stent restenosis following stent-supported renal artery angioplasty.* *Catheter. Cardio. Inte.* **2007**, *70* (3), 454-459.
- [18] A. Lafont, L. A. Guzman, P. L. Whitlow, M. Goormastic, J. F. Cornhill et G. M. Chisolm, *Restenosis after experimental angioplasty: Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling.* *Circ. Res.* **1995**, *76* (6), 996-1002.
- [19] M. J. Post, C. Borst et R. E. Kuntz, *The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty: A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic yucatan micropig.* *Circulation* **1994**, *89* (6), 2816-2821.
- [20] L. Paka, I. J. Goldberg, J. C. Obunike, S. Y. Choi, U. Saxena, I. D. Goldberg et S. Pillarisetti, *Perlecan mediates the antiproliferative effect of apolipoprotein e on smooth muscle cells. An underlying mechanism for the modulation of smooth muscle cell growth?* *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (51), 36403-36408.
- [21] N. Katsiki, K. Tziomalos, Y. Chatzizisis, M. Elisaf et A. I. Hatzitolios, *Effect of hmg-coa reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: Beneficial or detrimental?* *Atherosclerosis* **2010**, *211* (1), 9-14.
- [22] P. W. Serruys, H. Emanuelsson, W. Van Der Giessen, A. C. Lunn, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Suryapranata, V. Legrand, J. J. Goy, P. Materne, H. Bonnier, M. C. Morice, J. Fajadet, J. Belardi, A. Colombo, E. Garcia, P. Ruygrok, P. De Jaegere et M. A. Morel, *Heparin-coated palmascat stents in human coronary arteries: Early outcome of the benestent-ii pilot study.* *Circulation* **1996**, *93* (3), 412-422.
- [23] A. I. San Juan, M. Bala, H. Hlawaty, P. Portes, R. Vranckx, L. J. Feldman et D. Letourneur, *Development of a functionalized polymer for stent coating in the arterial delivery of small interfering rna.* *Biomacromolecules* **2009**, *10* (11), 3074-3080.

- [24] U. Westedt, M. Wittmar, M. Hellwig, P. Hanefeld, A. Greiner, A. K. Schaper et T. Kissel, *Paclitaxel releasing films consisting of poly(vinyl alcohol)-graft- poly(lactide-co-glycolide) and their potential as biodegradable stent coatings*. *J. Controlled Release* **2006**, *111* (1-2), 235-246.
- [25] T. Xi, R. Gao, B. Xu, L. Chen, T. Luo, J. Liu, Y. Wei et S. Zhong, *In vitro and in vivo changes to plga/sirolimus coating on drug eluting stents*. *Biomaterials* **2010**, *31* (19), 5151-5158.
- [26] C. M. Agrawal, K. F. Haas, D. A. Leopold et H. G. Clark, *Evaluation of poly(l-lactic acid) as a material for intravascular polymeric stents*. *Biomaterials* **1992**, *13* (3), 176-182.
- [27] P. Jiménez-Quevedo, M. Sabaté, D. J. Angiolillo, F. Alfonso, R. Hernández-Antolín, M. SanMartín, J. A. Gómez-Hospital, C. Bañuelos, J. Escaned, R. Moreno, C. Fernández, F. Fernández-Avilés et C. Macaya, *Long-term clinical benefit of sirolimus-eluting stent implantation in diabetic patients with de novo coronary stenoses: Long-term results of the diabetes trial*. *Eur. Heart J.* **2007**, *28* (16), 1946-1952.
- [28] J. W. Moses, M. B. Leon, J. J. Popma, P. J. Fitzgerald, D. R. Holmes, C. O'Shaughnessy, R. P. Caputo, D. J. Kereiakes, D. O. Williams, P. S. Teirstein, J. L. Jaeger et R. E. Kuntz, *Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery*. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349* (14), 1315-1323.
- [29] E. Grube, K. D. Dawkins, G. Guagliumi, A. P. Banning, K. Zmudka, A. Colombo, L. Thuesen, K. Hauptman, J. Marco, W. Wijns, J. J. Popma, L. Buellesfeld, J. Koglin et M. E. Russell, *Taxus vi 2-year follow-up: Randomized comparison of polymer-based paclitaxel-eluting with bare metal stents for treatment of long, complex lesions*. *Eur. Heart J.* **2007**, *28* (21), 2578-2582.
- [30] A. Kastrati, J. Mehilli, N. Von Beckerath, A. Dibra, J. Hausleiter, J. Pache, H. Schühlen, C. Schmitt, J. Dirschinger et A. Schömig, *Sirolimus-eluting stent or paclitaxel-eluting stent vs balloon angioplasty for prevention of recurrences in patients with coronary in-stent restenosis: A randomized controlled trial*. *J. Amer. Med. Assoc.* **2005**, *293* (2), 165-171.
- [31] C. Simsek, M. Magro, E. Boersma, Y. Onuma, S. Nauta, J. Daemen, M. Gaspersz, R. J. Van Geuns, W. Van Der Giessen, R. Van Domburg et P. Serruys, *Comparison of six-year clinical outcome of sirolimus-and paclitaxel-eluting stents to bare-metal stents in patients with st-segment elevation myocardial infarction: An analysis of the research (rapamycin-eluting stent evaluated at rotterdam cardiology hospital) and t-search (taxus stent evaluated at rotterdam cardiology hospital) registries*. *Journal of Invasive Cardiology* **2011**, *23* (8), 336-341.



# **CHAPITRE II**

**Le Titane :**

**Structure, surface et fonctionnalisation**





# 1. Le Titane

## 1.1. Généralités

Le titane est le vingt-deuxième élément de la classification périodique. Il est également le neuvième élément le plus abondant sur Terre [1-2]. Il fut découvert en 1794, mais ne put être obtenu à haute pureté qu'à partir de 1910. Les premières productions industrielles de ce métal n'ont eu lieu qu'en 1945 par Kroll [3], dont le procédé de purification est encore aujourd'hui utilisé. Ce métal de transition de la période IVB de couleur blanc argent est connu pour sa solidité et sa légèreté. Avec sa densité de  $4,5 \text{ g.cm}^{-3}$  [4], il est environ 40% moins lourd que les aciers courants et présente, sous forme d'alliages, des caractéristiques mécaniques proches de ces derniers tout en possédant une meilleure résistance à la corrosion. Il possède deux autres avantages notables : il est non-magnétique et surtout biocompatible. C'est pourquoi aujourd'hui le titane est un élément incontournable dans les domaines de l'aéronautique, l'aérospatial [5-6], l'armement [7] et surtout les biomatériaux [8].

## 1.2. Cristallographie

Le titane possède deux structures thermodynamiquement stables : le titane  $\alpha$ , existant à basse température et possédant une structure hexagonale compacte [9] (Figure II.1.a), et le titane  $\beta$ , présent à haute température et se caractérisant par une structure cubique centrée [10] (Figure II.1.b).

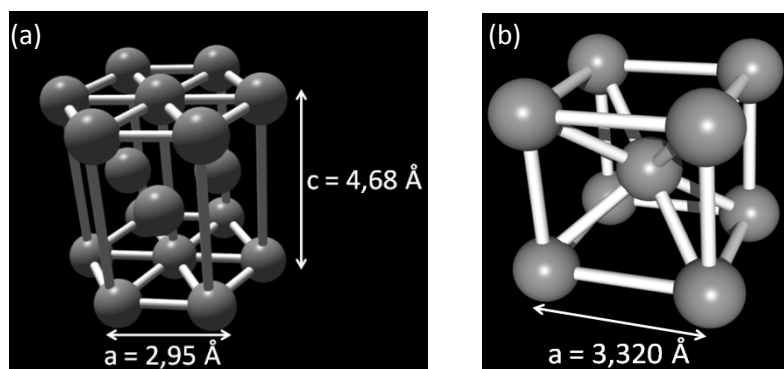


Figure II.1 : Maille cristalline du titane  $\alpha$  (a) et du titane  $\beta$  (b)

La transition allotropique  $\beta \rightarrow \alpha$ , de type martensitique, s'effectue à 882°C à pression atmosphérique [11]. Cette température de transition est largement influencée par les éléments pouvant être présents dans les alliages de titane. Les éléments comme N, O, C et Al sont des stabilisateurs de la phase  $\alpha$ , alors que Mo, V, Nb, Ta, Fe, W, Si, Cr, Co, Mn et H favorisent la formation de la phase  $\beta$ . D'autres éléments, comme le zirconium ou l'étain, sont considérés comme neutres [12-15]. Le molybdène sert de référence dans les diagrammes de phase (Figure II.2). D'autres phases peuvent également apparaître lors du refroidissement brutal des alliages de titane : la martensite  $\alpha'$  (hexagonale de même composition de la phase  $\beta$  dont elle est issue), la martensite  $\alpha''$  (orthorhombique), ainsi que les phases  $\omega$  athermique et isotherme que l'on retrouve dans les alliages  $\beta$ -métastables [16-17].

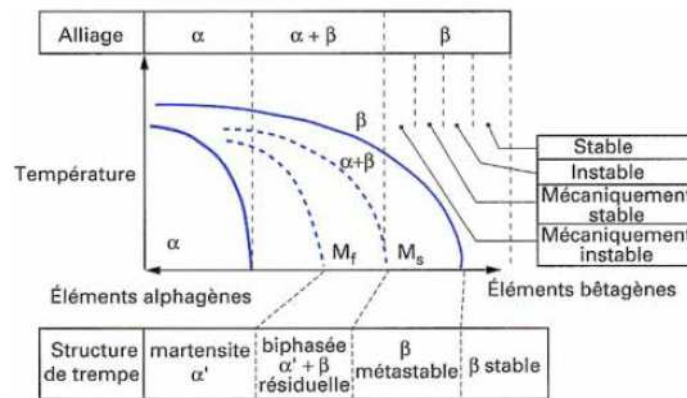


Figure II.2 : Diagramme de phase du titane en fonction du taux d'éléments alphagènes et bêtagènes [18]

### 1.3. Le titane et ses alliages dans le domaine médical

Le titane sous forme métallique est de nos jours très intensément employé en médecine et plus particulièrement pour élaborer des prothèses cardiovasculaires (stents) et orthopédiques [8]. Ses propriétés mécaniques et sa biocompatibilité permettent en effet la conception de prothèses légères et résistantes [19]. De plus, étant non-magnétique, le titane est compatible avec les techniques d'imagerie médicale actuelles (IRM) [20-21]. Comme le titane est un métal de transition, il peut former des solutions solides avec un grand nombre d'éléments d'addition. Ces éléments permettent de modifier les propriétés du titane pour l'adapter au mieux à ses applications. Dans le domaine médical, par exemple, le titane est employé sous quatre formes :

- Le titane pur (phase  $\alpha$ ) qui a été pendant longtemps employé pour les stents cardiovasculaires ou encore comme barre tutrice en orthopédie [22]. La pureté du titane employé pour ces applications va du grade 1 à 4, c'est-à-dire comprise entre 99,5 et 98,5%. Cependant, malgré ses nombreux avantages, le titane pur ne peut pas être employé dans la conception de prothèses orthopédiques à cause de sa faible résistance mécanique.
- Les alliages de type ( $\alpha + \beta$ ). Ces alliages sont également dits « duals », car le titane s'y retrouve sous ses deux structures  $\alpha$  et  $\beta$ . La présence dans la texture des grains hexagonaux compacts et des grains cubiques centrés permet de combiner une grande résistance à la corrosion et un module d'élasticité élevé. L'alliage de ce type le plus employé dans le domaine médical est le Ti-6Al-4V[19].
- Les alliages à base de titane  $\beta$  métastable. Elaborés initialement dans le but de concevoir des prothèses possédant un module d'Young proche de celui de l'os, ces alliages possèdent également une biocompatibilité accrue par rapport aux autres alliages de titane. Trois alliages principaux de ce type ont été développés : le Ti-29Nb-13Ta-4,6Zr, le Ti-12Mo-6Zr-2Fe (TMZF) et le Ti-35Nb-7Zr-5Ta (TiOsteum) [19, 23].
- Le Nitinol (pour Nickel Titanium Naval Ordinance Laboratory). Cet alliage, composé d'un mélange équimolaire de titane et de nickel, possède des propriétés mécaniques tout à fait remarquables puisqu'il se comporte à la fois comme un matériau à mémoire de forme et comme un alliage superélastique. Cette dernière caractéristique lui permet d'avoir une excellente résistance à la fatigue ainsi qu'une grande déformabilité. Le NiTiNOL est donc utilisé fréquemment pour la conception des stents périphériques [24].

Tous ces alliages possèdent par ailleurs une excellente résistance à la corrosion. Cette résistance est due à la formation d'une couche d'oxyde de titane qui passive la surface des alliages dès qu'ils sont au contact de l'air ou de l'eau.

#### **1.4. L'oxyde de titane**

Au contact de l'eau ou de l'air, le titane passe rapidement à un état d'oxydation IV, formant une couche protectrice régénérable de TiO<sub>2</sub>, épaisse de 3 à 7 nm, résistante à la corrosion et

chimiquement stable. Le dioxyde de titane passivant le titane peut se trouver sous deux formes nanocristallines principales, le rutile et l'anatase. Lors d'un traitement d'oxydation fort, comme l'emploi d'acides, il est également possible de trouver à la surface du titane une structure amorphe de  $\text{TiO}_2$ .

L'anatase est la structure cristalline de l'oxyde de titane qui croit naturellement à température ambiante, selon un système tétragonal (groupe d'espace  $I4_1/amd$ ). Elle peut être transformée en rutile en chauffant la pièce de titane au dessus de  $700^\circ\text{C}$ . Cette transformation ne s'inverse pas au refroidissement, le rutile étant plus stable que l'anatase. Cette forme de  $\text{TiO}_2$  est également tétragonale, mais de groupe d'espace  $I4/mmm$  [25]. Les études comparatives en termes de biocompatibilité de ces oxydes donnent des résultats variés en fonctions de la nature des cellules utilisées [26-27]. Par exemple, le rutile présente une meilleure biocompatibilité vis-à-vis des cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 que l'anatase [26].

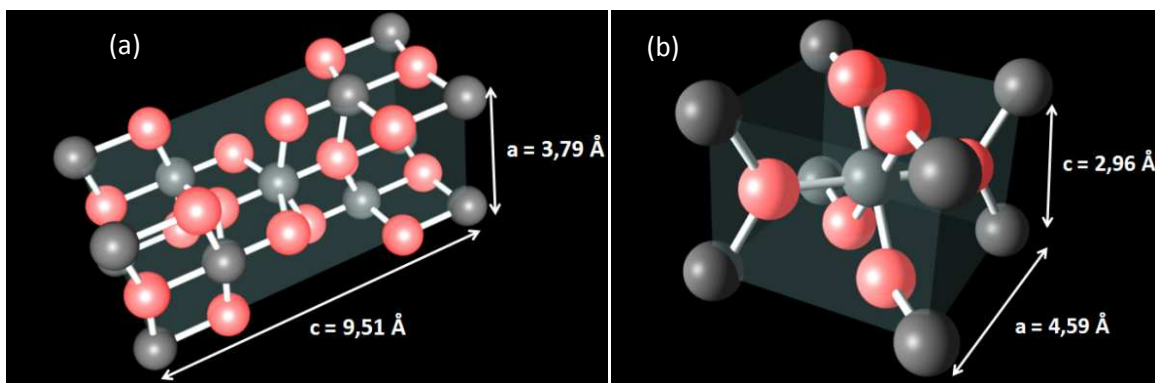


Figure II.3 : Maille cristalline de l'anatase (a) et du rutile (b). Les atomes de titane figurent en gris et ceux de l'oxygène en rouge.

La passivation « naturelle » (air ou eau) du titane pur conduit à la formation de différents types d'organisations au sein du matériau (Figure II.4) [28].

On distingue notamment :

- une couche caractérisée par un gradient en oxygène depuis l'interface  $\text{Ti}/\text{TiO}_2$  vers l'intérieur du matériau sur quelques dizaines de nanomètres (Figure II.4.a)
- une couche (3 à 7 nm) nanocristalline d'oxyde de titane  $\text{TiO}_2$  composée essentiellement d'anatase stable (Figure II.4.b)

- une couche présentant également des fonctions hydroxyles. Ces fonctions permettent ainsi d'envisager de modifier chimiquement la surface du titane et donc d'en modifier ses propriétés (Figure II.4.c)

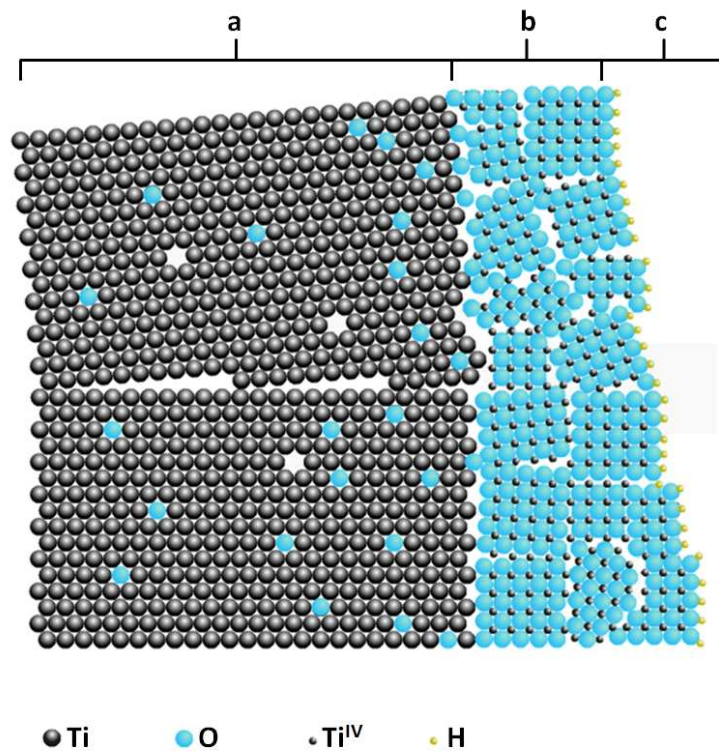


Figure II.4 : Vue en coupe d'une surface de titane

## 2. Préparation du titane

Afin d'améliorer entre autres la résistance à la corrosion, la biocompatibilité du titane et d'accroître le nombre de fonctions actives à la surface du titane, il est souvent nécessaire de modifier la composition chimique de l'extrême surface du titane. Dans ce cadre, différentes méthodes physiques et/ou chimiques ont été développées.

### 2.1. Voie physique

L'accroissement de l'épaisseur de la couche d'oxyde de titane peut être réalisée en employant des ondes électromagnétiques ou par électrochimie. Dans la littérature, trois systèmes ont été plus particulièrement décrits pour élaborer des films d'oxydes : l'implantation d'ions par immersion dans le plasma, le plasma radiofréquence et l'anodisation.

### 2.1.1. Implantation d'ions par immersion dans le plasma

Cette technique consiste à charger négativement l'échantillon à fonctionnaliser dans un plasma de décharge primaire, contenant des espèces chargées, pour attirer les cations et les greffer sur le substrat (Figure II.5). Dans le cas du titane, l'échantillon à traiter est placé dans une chambre basse pression et est soumis à des impulsions de haute tension négative, pouvant aller jusqu'à plusieurs milliers de volts [29]. Un mélange oxygène/argon est injecté dans la chambre et ionisé par un générateur de microondes. La pièce, chargée négativement va attirer les ions d'oxygène ( $O^+$ ) qui vont s'implanter à la surface. L'épaisseur de la couche obtenue va dépendre de la durée du traitement, de la température de la chambre, de la pression des gaz, de la puissance des microondes et de la tension appliquée au titane [30]. La formation d'oxyde de titane amorphe par cette méthode a permis l'amélioration de l'hémocompatibilité de prothèses [31].

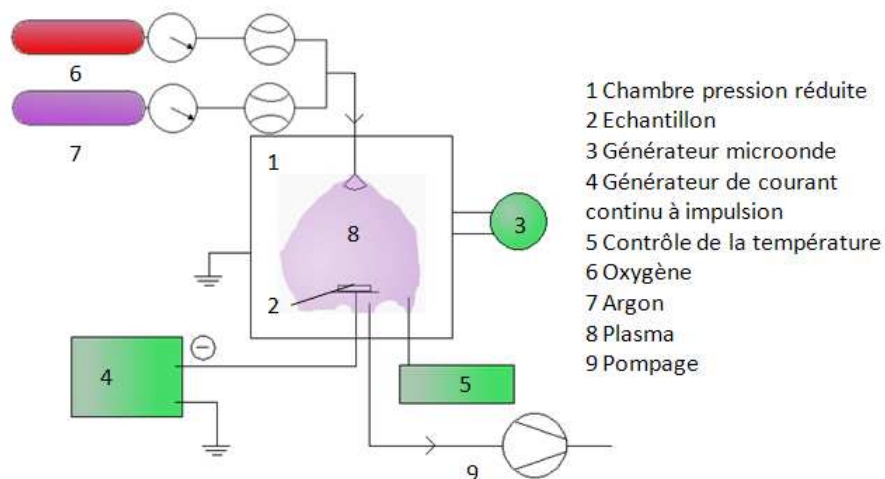


Figure II.5 : Représentation de l'installation permettant l'implantation d'ions par immersion dans le plasma

### 2.1.2. Plasma radiofréquence

Le titane peut être également oxydé dans des enceintes par un plasma argon-oxygène. Cette oxydation conduit le plus souvent à la formation d'une couche d'anatase sur le titane. Ici, le plasma est généré entre les électrodes d'un générateur de radiofréquences dont la fréquence est standardisée à 13,56 MHz. H. Ohsaki [32-33] a ainsi démontré qu'il était possible d'induire la cristallisation d'une couche de  $TiO_2$  amorphe en anatase en l'exposant à ce type de plasma. Ce type de cristallisation permet de favoriser l'accroche de certaines

espèces, tout en évitant de modifier les propriétés structurales du titane qu'occasionnerait par exemple un recuit.

### 2.1.3. Anodisation

L'électrochimie constitue également une technique de choix pour former une couche épaisse d'oxyde de titane. Ce procédé est aussi appelé anodisation ou oxydation anodique. Cette technique consiste à utiliser la pièce de titane à oxyder comme une anode, la cathode étant en platine (Figure II.6) [34].

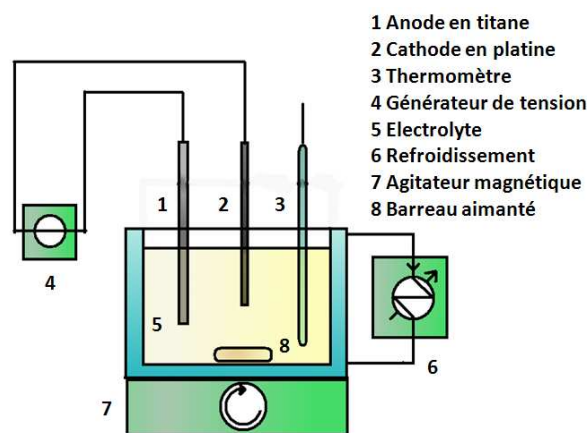
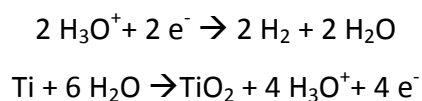


Figure II.6 : Représentation d'une cuve à anodisation

L'électrolyte pour l'anodisation est constitué d'un acide dilué. Les acides les plus couramment utilisés pour le titane sont l'acide phosphorique [35], l'acide sulfurique [36] et l'acide acétique [37]. La croissance du film d'oxyde se fait selon les réactions suivantes :



Équations II.1. : Processus d'anodisation du titane

L'épaisseur  $d$  de la couche d'oxyde formée suit une loi linéaire  $d = aU$  où  $U$  est la tension appliquée et  $a$  une constante dépendant du métal et de l'électrolyte. Cette loi reste valide jusqu'à ce que l'épaisseur du film de  $\text{TiO}_2$ , qui possède une grande résistivité, dépasse un seuil critique qui isole l'anode et empêche la circulation du courant [34].

## 2.2. Oxydation par voie chimique

Les traitements chimiques sur le titane reposent sur la réaction entre la surface de la pièce de titane à traiter et un ou plusieurs composés oxydants présents en solution. Les différentes méthodes d'oxydation par voie chimique du titane peuvent être regroupées en trois catégories : acides, basiques, et traitements au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 2.2.1. Traitements acides

Les traitements acides sont fréquemment employés comme prétraitement pour décontaminer la surface du titane et augmente légèrement l'épaisseur du film de TiO<sub>2</sub> (env. 10 nm).

Parmi les traitements acides, le plus employé consiste à plonger le titane dans une solution 30% HNO<sub>3</sub>/3% HF [38-39]. L'attaque est efficace, mais génère des fluorures de titane à la surface et peut produire une fragilisation du matériau par diffusion d'hydrogène. Ce phénomène est partiellement inhibé par l'acide nitrique [40]. D'autres mélanges d'acides fort peuvent être employés [41-42] comme par exemple, un mélange d'acide sulfurique et chlorhydrique qui permet d'oxyder et de décontaminer les surfaces de titane [43].

### 2.2.2. Traitement basique

Le premier traitement basique des surfaces de titane a été effectué par H.M. Kim pour en améliorer la biocompatibilité [44]. Le titane est traité par une solution de NaOH puis recuit. Il en résulte un film épais, poreux, mélange d'oxyde de titane sous forme anatase et rutile et d'une matrice titanate de sodium, comparable en structure à de l'hydroxyapatite.

### 2.2.3. Traitements peroxydes

La dernière catégorie de traitement chimique nécessite l'emploi combiné d'un acide fort et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [39, 45-46]. Dans un milieu acide, le peroxyde d'hydrogène réagit avec le titane pour former en premier lieu une couche d'oxyde amorphe. Sur des traitements de courtes durées, un film fin et poreux de TiO<sub>2</sub> se forme. Si le traitement est prolongé, l'épaisseur du film augmente et la porosité diminue. De plus Wang *et al.* ont montré que l'épaisseur de la



couche d'oxyde dans un mélange 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/HCl 0,1 mol.l<sup>-1</sup> évolue de façon linéaire en fonction du temps [45]. Cette couche amorphe d'oxyde de titane se transforme en structure cristalline si les échantillons de titane sont portés à haute température. A partir de 300°C, la couche amorphe passe sous forme d'anatase tout en conservant la porosité de la couche d'oxyde, puis, au-delà de 700°C, le TiO<sub>2</sub> devient du rutile, et la couche d'oxyde se densifie.

### **2.3. Conclusion sur l'oxydation de la surface du titane**

Les méthodes d'oxydation du titane qui viennent d'être présentées donnent des résultats variés en termes d'épaisseur et de composition de la couche de TiO<sub>2</sub> générée. Des films épais et lisses sont par exemple utiles pour la résistance à la corrosion et à l'abrasion de pièces mécaniques. Dans le cadre de pièces devant subir un greffage chimique à la surface, le choix se portera plutôt sur des films comportant un grand nombre de fonctions réactives, comme des hydroxyles de surface. De plus, l'objectif ciblé dans cette thèse étant l'application aux stents, il faut que le traitement ne soit pas agressif au point d'endommager la structure de celui-ci. Enfin, le film ne doit pas être trop épais, quelques dizaines de nanomètres, pour éviter que celui-ci ne soit trop cassant et ne se détache de la surface du titane par un effet de fatigue.

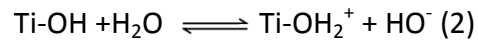
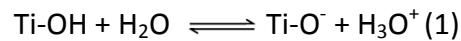
Les différentes méthodes permettent aussi de contrôler le type d'oxyde qui se forme en surface : amorphe, anatase ou rutile. Cette maîtrise est primordiale car elle conditionne en général l'efficacité de greffage et la densité avec laquelle les espèces viennent s'accrocher en surface.

## **3. Fonctionnalisation chimique du titane**

### **3.1. Espèces en surface**

Comme mentionné précédemment, au contact de l'eau, que soit par immersion ou simplement par l'humidité de l'air, des fonctions hydroxyles se forment sur la couche d'oxyde de titane. La densité de cette couche dépend principalement de la configuration de la couche d'oxyde [47-48]. L'acidité ou la basicité des fonctions hydroxyles dépendent en général du cation métallique auquel elles sont liées. Dans le cas du titane (Ti<sup>IV</sup>), ces espèces

sont amphotères, c'est-à-dire qu'elles ont à la fois des propriétés acides et basiques, ce qui donne lieu à deux réactions différentes :



Équation II.2 : caractère amphotère des hydroxydes de titanates

Ces deux réactions génèrent des charges à la surface de la couche d'oxyde de titane.

### 3.2. Sites actifs

La surface d'oxyde de titane hydratée comporte trois types de sites sur lesquels des espèces peuvent interagir pour former des liaisons covalentes et/ ou ioniques [48-51].

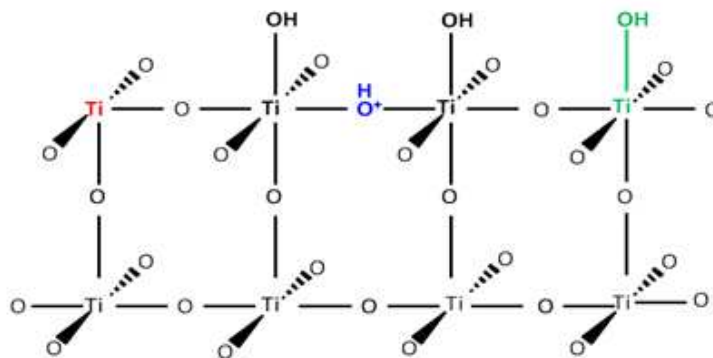


Figure II.7 : Représentation des sites actifs en extrême surface de l'oxyde de titane

- les sites « A » (Figure II.7, en vert) sont constitués d'atomes de titane hexavalents, liés à cinq d'oxygène impliqués dans le réseau et à une fonction hydroxyle localisée en surface
- les sites « B » (Figure II.7, en bleu) correspondent à des fonctions oxonium bloquées entre deux atomes de titane
- les sites « C » (Figure II.7, en rouge) correspondent aux atomes de titane se trouvant sur les arêtes des nanocristaux de TiO<sub>2</sub>. Leur liaison avec seulement quatre groupes oxo en font d'eux des acides forts de Lewis

La chimisorption des composés organiques sur la couche de TiO<sub>2</sub> peut être considérée comme une réaction acide-base de Lewis ou de Brønsted [52]. Par exemple, sur les arêtes,

les groupements donneurs d'électrons contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène, d'azote ou de soufre peuvent agir comme des bases de Lewis et céder leurs électrons aux acides de Lewis de la surface (les atomes de  $Ti^{IV}$ ). La structure et la stabilité des complexes formés dépendent entre autres de la cristallographie du  $TiO_2$ , du plan atomique exposé à la surface, des sites engagés par les ligands organiques et du pH. Trois principaux types de chélation peuvent être distingués [53] :

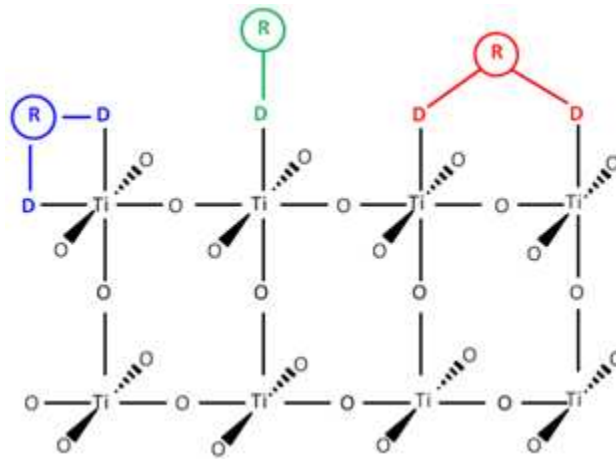


Figure II.8 : Les trois types de fonctionnalisation possibles sur un substrat de titane. R représente la molécule se greffant, D les ligands permettant l'accroche.

- une chélation de type monodentate (Figure II.8, en vert) où le ligand vient se lier en réagissant avec un site « A »
- une chélation de type bidentate (Figure II.8, en bleu), impliquant un seul atome de titane, et qui correspond à l'accroche sur un bord ou un coin d'un cristal par une base de Lewis *via* un site « C »
- une chélation de type bidentate mettant en jeu deux sites de type « A » et qui conduit à la formation d'un pont entre deux atomes de titane (Figure II.8, en rouge)

### 3.3. Ancres pour la fonctionnalisation du titane

La modification des surfaces métalliques est en général une étape incontournable pour conférer à ces surfaces des propriétés ciblées (prolifération cellulaire différenciée [54], catalytique [55], photovoltaïque [56]) et faciliter leur intégration dans des milieux biologiques [57].

Par exemple, dans le cas du titane servant pour une application de stenting, la surface est exposée en continu dans les artères à un milieu dynamique, le flux sanguin ; la création d'interactions fortes et stables entre molécules et substrat est donc à privilégier.

### 3.3.1. Les silanes

Etudiés depuis les années 70 [58-60], les silanes sont des espèces couramment utilisées dans la fonctionnalisation covalente de surfaces, comme la silice [61-63], les hydroxyapatites [64], les aciers inoxydables [65], les alliages chrome-cobalt [66] et de titane [67-68].

Dans le cas du titane, la fonctionnalisation nécessite l'emploi de dérivés de silanes intégrant des groupements labiles susceptibles de réagir avec une ou plusieurs fonctions hydroxyles (sites de type A) pour donner naissance à des structures monodentates ou polydentates. Dans ce cadre, les trihalogéno- et alcoxysilanes ont été incontestablement les plus employés (Figure II.9). Le choix des groupements partants est un facteur important pour l'optimisation du greffage. [69-70] Par exemple, sur une durée de traitement de 6 heures, le composé trihalogéné  $C_{18}H_{37}SiCl_3$  permet de fonctionnaliser le titane avec une densité de greffage deux fois plus élevée que le composé  $C_{18}H_{37}Si(OCH_3)_3$  [69].

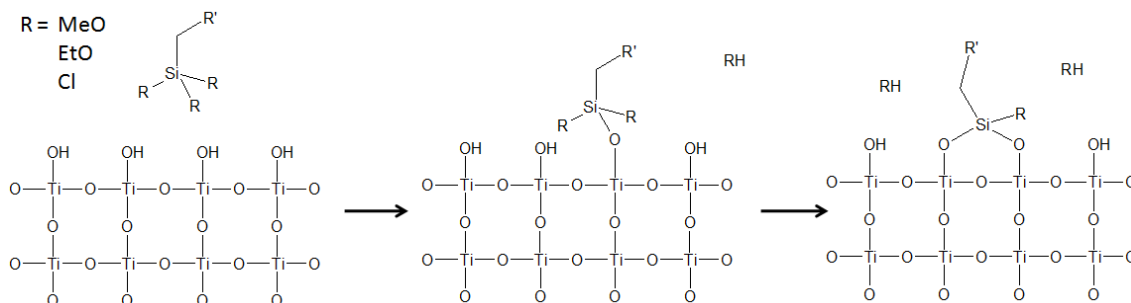


Figure II.9 : Greffage de silane sous la forme de structure monodentate et bidentate sur l'oxyde de titane  $TiO_2$

La fonction la plus couramment introduite de cette manière est indubitablement la fonction amine primaire  $-NH_2$  via l'utilisation du 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES) commercial. En effet, l'incorporation de cette fonctionnalité permet ensuite d'envisager de greffer des molécules d'intérêt biologique par des réactions d'amidation. Sargeant *et al.* [68] ont notamment greffé des nanofibres de peptides amphiphiles bioactifs sur le NiTiNOL prétraité par l'APTES (Figure II.10).

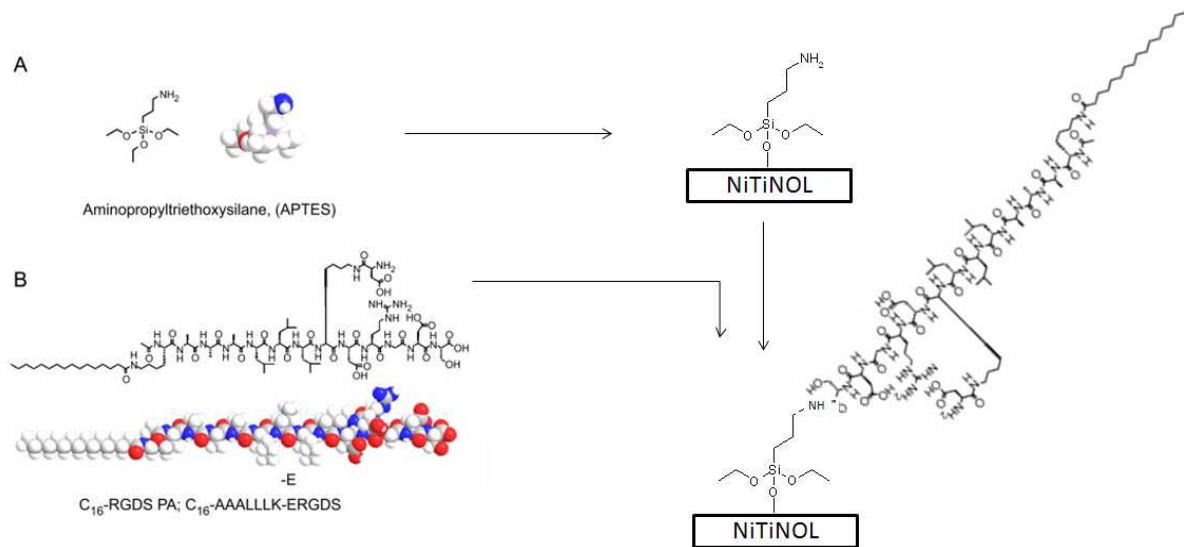


Figure II.10 : Fonctionnalisation par étapes d'une surface de NiTiNOL par des nanofibres de peptides amphiphiles (B) au moyen de l'APTES (A) [68]

Plus récemment, l'équipe de Textor est également parvenue à immobiliser des motifs RGD en plusieurs étapes à partir de surfaces de titane « aminées » [71] (Figure II.11). Dans cette étude, le fragment RGD a été introduit en mettant en œuvre une réaction de type « thiolène », assistée par ultrasons.

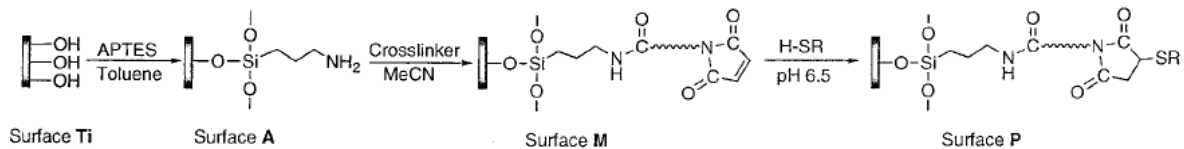


Figure II.11 : Fonctionnalisation d'une surface de titane par des polypeptides au moyen de l'APTES. (R : L-cystéine, RGDC, GRGDSPC) [71]

D'autres fonctions ont également pu être introduites par le biais de dérivés de silanes (Figure II.12) comme par exemple des fonctions méthacrylates (méthacrylate de 3-(triméthoxysilyl)propyle) [72] et des motifs vinyliques (7-oct-1-ènyletrichlorosilane) [73] susceptibles d'être engagés dans des processus de polymérisation radicalaire, ou encore des fonctions époxydes (3-glycidoxypropyldiméthylethoxysilane) autorisant la post-fonctionnalisation des surfaces de titane par ouverture de l'entité oxyrane en présence de nucléophiles [72, 74].

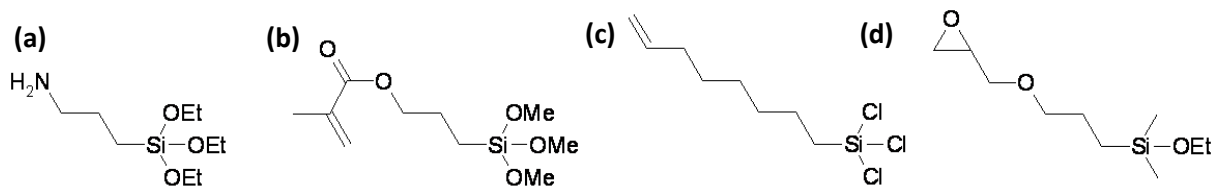


Figure II.12 : Structures du 3-aminopropyltriéthoxysilane **(a)**, du 3-(triméthoxysilyl)propyl méthacrylate **(b)**, du 7-oct-1-ène-trichlorosilane **(c)** et du 3-glycidoxypropyldiméthylethoxysilane **(d)**

De manière générale, la fonctionnalisation des surfaces par les silanes s'effectue dans des solvants anhydres (toluène, *o*-xylène) et très fréquemment à chaud [75-76]. En effet, la présence d'eau engendre la polymérisation des silanes et la formation d'agglomérats donnant des surfaces inhomogènes [70, 77]. Par ailleurs, les monocouches de silanes sont peu stables en milieu aqueux [78], s'hydrolysant assez facilement à pH physiologique en moins d'une semaine [79-80].

### 3.3.2. Les acides carboxyliques et dérivés d'acides phosphoniques

L'acide formique a été très largement utilisé comme molécule modèle pour étudier et caractériser l'adsorption sur les surfaces de titane de molécules organiques intégrant une fonction acide carboxylique [81]. Kim et Barteau [82] ont notamment montré que les acides aliphatiques courts (formique, acétique et propionique) s'adsorbent fortement à la surface du titane. Plus récemment, Ojamaä *et al.* [83] ont démontré par infrarouge que cette fonctionnalisation se fait sous forme de pont bidentate, y compris pour la glycine. L'utilisation de la fonction acide carboxylique comme ancre chimique peut paraître de prime abord très intéressante pour fonctionnaliser des substrats à base de titane, cependant la création de liaisons esters carboxyliques hydrolysables ne permet pas d'envisager un greffage maîtrisé et durable de fonctions d'intérêt biologique en milieu aqueux et dynamique [84].

Pour pallier à ce problème de stabilité, de nouvelles approches ont été envisagées comme le greffage de molécules possédant plusieurs fonctions acides carboxyliques ou l'utilisation de d'autres types d'acide, comme les acides phosphoniques. L'équipe de Grätzel a notamment utilisé des diacides carboxyliques, comme l'acide 2,2'-bipyridyl-4,4'-dicarboxylique (Figure II.13), afin de fonctionnaliser le dioxyde de titane par des pigments pour des applications dans le domaine du photovoltaïsme [85].

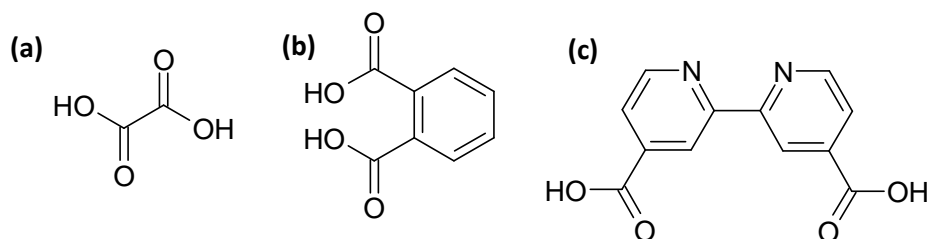


Figure II.13 : Structures des di- et triacides carboxyliques couramment étudiés pour la fonctionnalisation du titane : acide oxalique **(a)**, phtalique **(b)** et le 4,4'-dicarboxy-2-2'-dipyridine **(c)**

Les acides phosphoniques et les phosphonates ont été largement employés dans les modifications de surfaces comme le  $ZrO_2$  [86],  $Al_2O_3$  [87],  $Fe_2O_3$  [88],  $TiO_2$  [89-90] ou encore l'acier 316L [91]. Les dérivés phosphoniques se greffent sur l'oxyde de titane par réaction de déshydratation (Figure II.14) et forment des complexes monodentates et bidentates. D'un point de vue énergétique, ces liaisons Ti-O-P sont environ deux fois plus fortes que celles formées par les acides carboxyliques [92]. Le greffage des acides phosphoniques s'effectuent en général par simple immersion de la pièce à fonctionnaliser dans une solution d'acide phosphonique. Cette méthode fonctionne par ailleurs aussi bien dans les solvants organiques [93] que aqueux [94].

Pour rendre ce greffage plus efficace, il est possible de fonctionnaliser la surface dans une solution à reflux, ou encore de recuire la surface fonctionnalisée après traitement à des températures supérieures à  $100^\circ C$  pour forcer la déshydratation [95]. Une troisième solution est d'employer des esters d'acides phosphoniques [96].

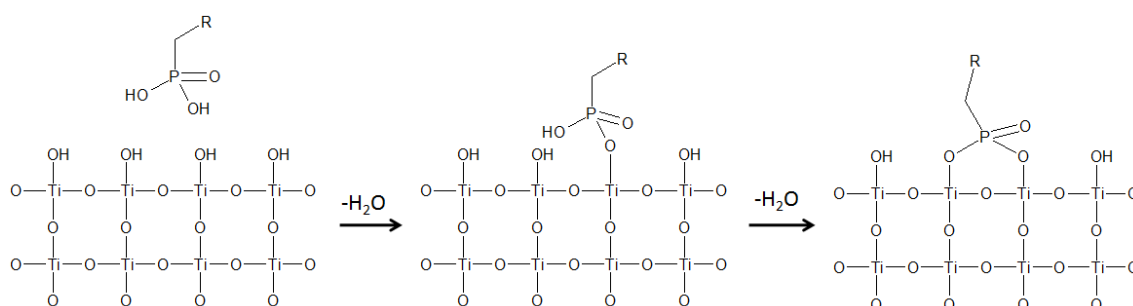


Figure II.14 : Fonctionnalisation du titane par des acides phosphoniques organiques.

Ces différentes méthodes permettent d'introduire des fonctions en surface, le plus souvent des groupes hydroxyles [97], mais aussi des acides carboxyliques [96] et des alcènes [98] (Figure II.15). Ces fonctions réactives peuvent être ensuite exploitées pour modifier chimiquement les propriétés des surfaces de titane.

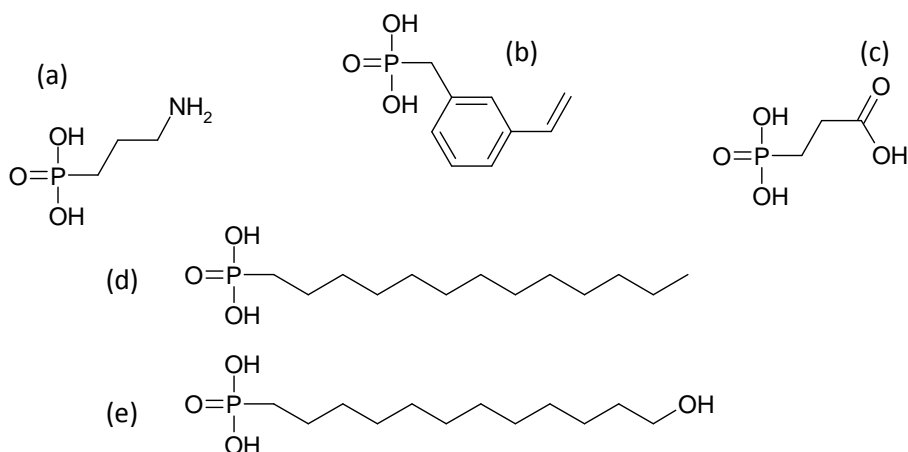


Figure II.15 : Structures des acides phosphoniques organiques couramment employés pour la modification de surface de titane : acide 3-aminopropylphosphonique **(a)**, acide (3-vinylbenzyl)phosphonique **(b)**, acide 3-phosphonopropionique **(c)**, acide dodecylphosphonique **(d)**, acide 11- hydroxyundecylphosphonique **(e)**

Les applications découlant de la fonctionnalisation du titane par les acides phosphoniques touchent de nombreux domaines : cellules photosensibles [99], piles à combustibles [100], nanoparticules [101] et biomatériaux [102]. Dans ce dernier cadre, des recherches ont été menées pour des applications dans le domaine de l'orthopédie [103] et des stents [104]. Par exemple, Mani *et al.* ont fonctionnalisé le titane avec l'acide 11-(hydroxyundecyl)phosphonique, puis ont couplé la fonction alcool à l'acide flufénamique, un anti-inflammatoire, pour étudier sa cinétique de relargage [94] (Figure II.16).

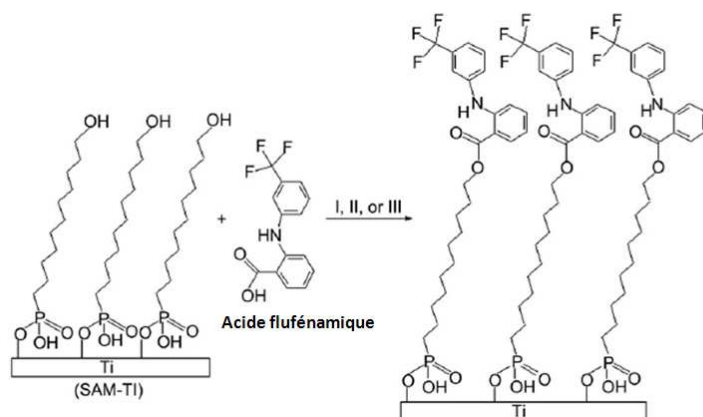


Figure II.16 : Fonctionnalisation du titane par l'acide flufénamique via une ancre à base d'acide phosphonique [94].

Les acides phosphoniques présentent néanmoins quelques inconvénients. Une fonctionnalisation optimale de la surface du titane à l'aide d'esters phosphoniques nécessite des températures supérieures à 100°C, rendant ainsi caduque le greffage direct de molécules biologiques sensibles à la température comme par exemples des polypeptides ou



encore des molécules à base de sucres. Par ailleurs, la préparation des ancres de ce type implique dans la plupart des cas de mettre en œuvre des stratégies multi-étapes comportant des étapes de protection et de déprotection [97 , 105].

### 3.3.3. Les catéchols

Les catéchols (1,2-dihydroxybenzène) sont des motifs que l'on retrouve dans certaines molécules naturelles synthétisées par des organismes vivants, le plus souvent par modification de la phénylalanine. Par exemple, les cyanobactéries utilisent les propriétés chélatantes des catéchols comme sidérophore, afin de capter le fer dans leur milieu naturel [106-107]. Les protéines adhésives sécrétées par les moules (MAP) quant à elles (Figure II.17) sont très riches en motifs catéchols, ce qui leur permet d'adhérer très efficacement aux surfaces céramiques, métalliques, comme l'acier [108] et polymères, y compris le PTFE [109 , 110].

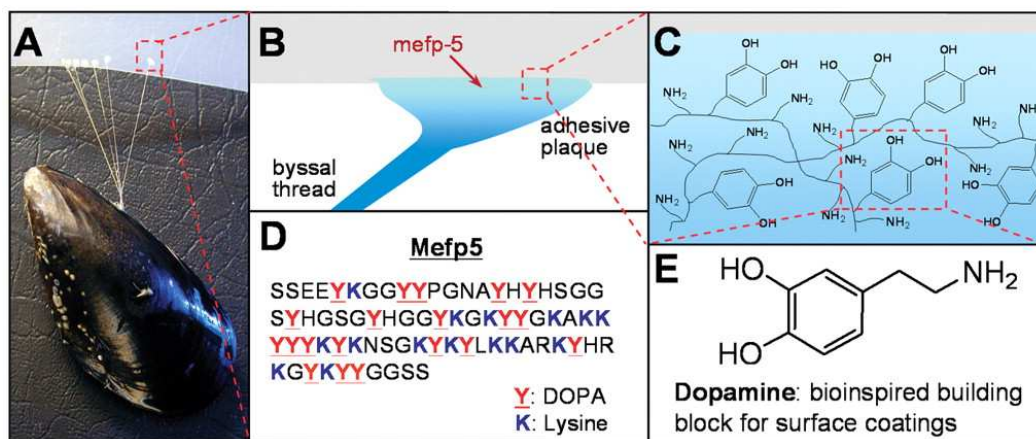


Figure II.17 : La protéine mfp5 (B), responsable des propriétés adhésives des byssus des moules (A) ont une concentration élevée en catéchols (C, D) [109]

Lee *et al.* [111] ont réalisé des études AFM afin d'estimer la force nécessaire pour arracher d'une surface du titane un motif catéchol immobilisé sur une pointe AFM en Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> par l'intermédiaire d'une chaîne poly(éthylène glycol). La force nécessaire à la rupture, évaluée à 805 ± 131 pN, témoigne de la robustesse du greffage (Figure II.18). A titre comparatif, la rupture d'une liaison covalente Si-C nécessite une force de 2,0 ± 0,3 nN [112].

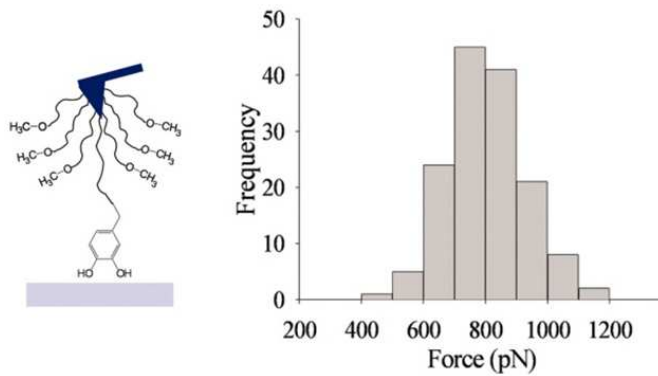


Figure II.18 : Mesure par AFM de la force nécessaire pour arracher un motif catéchol greffé sur une surface de titane [111]

Ces dernières années, de nombreuses études, notamment fondamentales, ont été également consacrées à la compréhension du ou des mécanismes d'adhésion du motif catéchol sur le titane. Il ressort de ces études que le motif catéchol est susceptible de s'adsorber sur le titane (Figure II.19.a et c) et/ou d'interagir très fortement avec la surface par le biais d'interactions supramoléculaires (liaisons hydrogène Figure II.19.b).

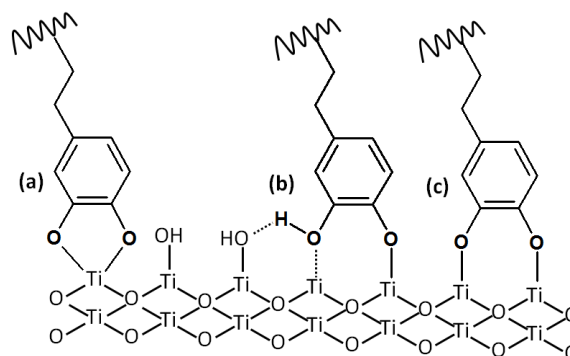


Figure II.19 : Les différents modes d'adhésion des catéchols sur le titane : chélation bidentate **(a)**, chélation monodentate **(b)** avec liaison hydrogène, pont bidentate **(c)**

En parallèle à ces recherches, l'équipe de Grätzel [113] a découvert au début des années 90 que les catéchols interagissent fortement avec des nanoparticules d'oxyde de titane pour former des complexes colorés (Figure II.20) de nature pont bidentate (Figure II.19.c) [114] [115]. La formation de ces complexes a été largement étudiée de manière théorique, car ils ont un grand intérêt dans le domaine du photovoltaïsme.

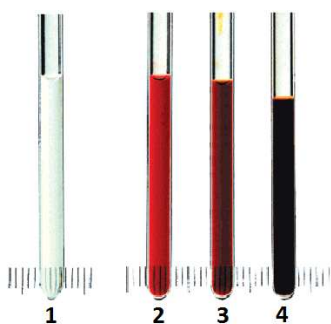


Figure II.20 : Coloration de nanoparticules  $\text{TiO}_2$ (1) par formation de complexes avec l'alizarine (2), la dopamine (3) et le *tert*-butyle catéchol (4) [114]

La grande affinité entre le  $\text{TiO}_2$  et les catéchols est également liée à la géométrie particulière des ènediols cycliques. En effet, la distance interatomique entre deux atomes de titane consécutifs dans le dioxyde de titane (2,96 Å) et entre les deux atomes d'oxygène de l'ènediol (2,71 Å) sont très proches [116], ce qui favorise la formation des complexes bidentates et l'obtention de densités de greffage élevées. Ainsi, Li *et al.* [117-118] ont observé par microscopie à effet tunnel (STM) que les catéchols forment une monocouche compacte et organisée à la surface du rutile et de l'anatase (Figure II.21).

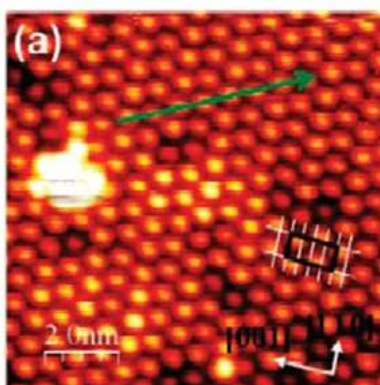


Figure II.21 : Image STM (10x10 nm) d'une monocouche de catéchols à la surface du rutile (110) [117-118] Les catéchols apparaissent comme des points lumineux sur l'image STM.

Les complexes formés par les catéchols à la surface du titane sont stables en milieu aqueux, pour des pH compris entre 3 et 10, avec un maximum d'absorption entre pH 6 et 8 [119]. Au-delà de pH 10, l'unité catéchol s'oxyde en quinone et perd ses propriétés d'adhésion [111]. L'électroactivité du catéchol peut par ailleurs être exploitée afin de démontrer le greffage de cette molécule à la surface du titane, le substrat fonctionnalisé jouant ici le rôle d'électrode de travail (Figure II.22). Par exemple, Lunsford *et al.* [120] ont synthétisé une électrode de carbone sonogel modifiée par des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  afin de détecter la présence de

catéchols. En outre, l'estimation de la charge participant au processus d'oxydation des espèces présentes en surface, permet de d'accéder à une donnée clé qu'est la densité de greffage.

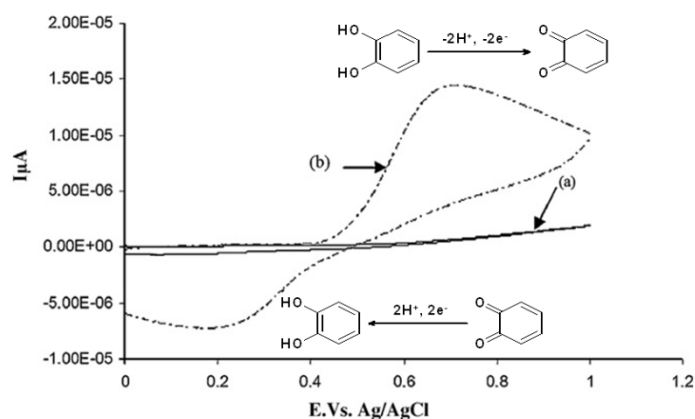


Figure II.22 : Suivi de l'oxydation et de la réduction de la dopamine immobilisée sur une électrode de carbone par voltampérométrie cyclique (b). La courbe (a) représente un voltampérogramme cyclique de l'électrode nue [121].

Parmi les différentes molécules intégrant le motif catéchol, la dopamine est incontestablement celle qui présente le plus grand potentiel. En effet, cette dernière est commerciale, biocompatible et surtout possède une fonction amine primaire libre susceptible d'être modifiée de manière sélective voire spécifique sans mettre en œuvre de stratégies multi-étapes. La Figure II.23 reprend quelques dérivés clés préparés à partir de la dopamine.

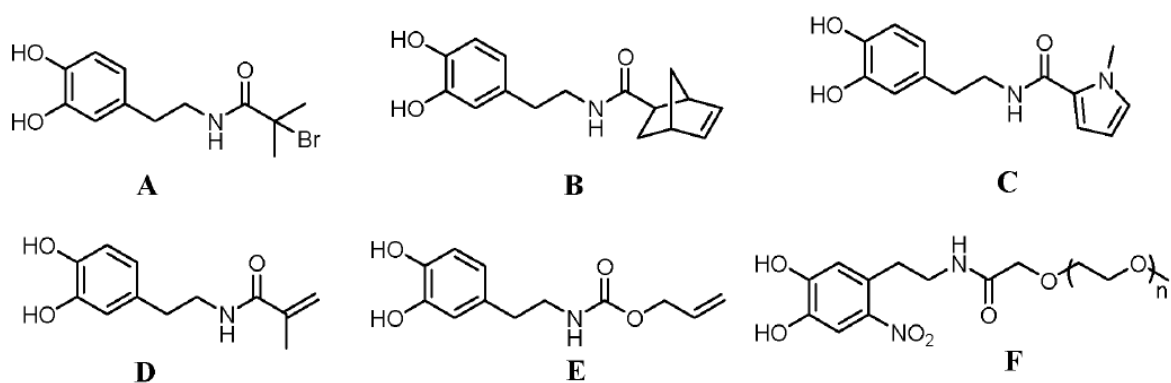


Figure II.23 : Exemples de dérivés de la dopamine obtenus par la modification sélective de la fonction amine [122]

La dopamine a notamment permis l'élaboration de dérivés capables de promouvoir des polymérisations radicalaires contrôlées de type ATRP (Figure II.23, A et D) [123] [124], des

polymérisations par ouverture de cycle (Figure II.23, B) [125], ainsi que de greffer des dérivés porteurs de chaînes PEG d'intérêts biologiques [126-127].

#### **4. Conclusion**

L'objectif principal de cette thèse est de fonctionnaliser de manière simple, souple et efficace des surfaces de titane par des polymères parfaitement définis, intégrant éventuellement des fonctions d'intérêt biologique, destinés à être implantés dans des milieux biologiques dynamiques.

Dans ce cadre, une approche intéressante consisterait à utiliser des ancres intégrant le motif catéchols pour immobiliser nos polymères. En effet, ce motif se greffe facilement sur l'oxyde de titane avec un fort taux de recouvrement, le greffage s'effectue dans des conditions douces (dilution dans un solvant protique à température ambiante), et la monocouche obtenue est stable en milieu physiologique. En outre, l'intérêt particulier pour les catéchols réside dans le fait qu'il existe des dérivés commercialisés, comme la dopamine, biocompatibles, et qui possèdent une ou plusieurs fonctions pouvant être exploitées pour la fonctionnalisation. Enfin, il est possible d'utiliser l'électrochimie pour démontrer l'efficacité du greffage des catéchols sur le substrat de titane.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons donc privilégié l'emploi de molécules incorporant le fragment catéchol afin d'immobiliser efficacement des polymères parfaitement définis sur des surfaces de titane.

Le chapitre suivant visera à introduire très succinctement les différentes techniques de polymérisation permettant d'accéder à ces polymères parfaitement définis. Dans le cadre de ce manuscrit, nous n'évoquerons que les méthodes de polymérisation faisant appels à des intermédiaires radicalaires. Dans une seconde phase, nous verrons comment ces techniques peuvent être transposées aux surfaces. Enfin, la dernière partie sera consacrée plus particulièrement à la fonctionnalisation de surfaces de titane par des polymères parfaitement définis.

## Références Bibliographiques

- [1] D. Knittel, *Encyclopaedia of chemical technology*. John Wiley and Sons: **1983**; Vol. 23.
- [2] W. W. Minkler et E. F. Baroch, *The production of titanium, zirconium and hafnium*. Metallurgical Treatises **1981**, 171–189.
- [3] T. Ikeshima In *Recent development in titanium sponge production*, Proceedings of the fifth international conference of titanium, G. Lutjering, Zwicker, U., Bunk, W., Ed. Titanium: Science and Technology: **1985**; pp 3–14.
- [4] B. Gelas, M. Armand, L. Séraphin et R. Tricot, *Titane et alliages de titane*. Techniques de l'ingénieur **1976**, M 557.
- [5] V. A. R. Henriques, *Titanium production for aerospace applications*. Journal of Aerospace Technology and Management **2009**, 1 (1), 7-17.
- [6] R. R. Boyer, *Beta titanium alloys in the 1990's*. TMS, Warrendale, PA: **1993**.
- [7] *Njc developing new technologies for joining titanium and its alloys*. Welding Journal (Miami, Fla) **2006**, 85 (5), 41.
- [8] X. Liu, P. K. Chu et C. Ding, *Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications*. Materials Science and Engineering R: Reports **2004**, 47 (3-4), 49-121.
- [9] P. Villard et L. D. Calvert, *Pearson's handbook of crystallographic data for intermetallic phases*. **1985**.
- [10] Y. Combres et B. Champin, *Traitement thermique des alliages de titane*. Revue Française des Métallurgistes **1994**, 68-71.
- [11] B. Champin et B. Gelas, *Traitement thermique des alliages de titane*. Techniques de l'ingénieur **1984**, M1335.
- [12] S. Ankem, S. R. Seagle et R. R. Boyer, *Beta titanium alloys in the 80's*. **1984**.
- [13] B. Champin, *Traitement thermique*. **1982**, (163).
- [14] R. Tricot, *Matériaux et techniques* **1988**, (1-2), 47.
- [15] J. C. Williams, B. S. Hickman et D. H. Leslie, *The effect of ternary additions on the decomposition of metastable beta-phase titanium alloys*. Metallurgical Transactions **1971**, 2 (2), 477-484.
- [16] Y. Murakami, *Phase transformation and heat treatment Titanium 80's* Science and Technology **1981**, 153-167.
- [17] I. Maeda et H. M. Flower, In *Sixth world conference on titanium*, France, **1988**; p 1589.

- [18] Y. Combres et B. Champin, *Traitements thermiques des alliages de titane*. Techniques de l'ingénieur **1995**. M1335
- [19] M. Long et H. J. Rack, *Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective*. Biomaterials **1998**, 19 (18), 1621-1639.
- [20] A. D. Martin, C. L. W. Driscoll, C. P. Wood et J. P. Felmlee, *Safety evaluation of titanium middle ear prostheses at 3.0 tesla*. Otolaryngology - Head and Neck Surgery **2005**, 132 (4), 537-542.
- [21] H. von Tengg-Kobligk, T. F. Weber, F. Rengier, D. Kotelis, P. Geisbüsch, D. Böckler, H. Schumacher et S. Ley, *Imaging modalities for the thoracic aorta*. Journal of Cardiovascular Surgery **2008**, 49 (4), 429-447.
- [22] R. Z. Valiev, V. V. Stolyarov, R. H.J.; et L. T.C., In *Medical device materials*, S. Shrivastava, Ed. ASM: Cleveland, OH, **2004**; p 362.
- [23] K. Wang, *The use of titanium for medical applications in the USA*. Materials Science and Engineering: A **1996**, 213 (1-2), 134-137.
- [24] J. S. Williams, *Mechanical devices used for carotid stenting*. Techniques in Vascular and Interventional Radiology **2000**, 3 (2), 102-113.
- [25] U. Diebold, *The surface science of titanium dioxide*. Surf. Sci. Rep. **2003**, 48 (5-8), 53-229.
- [26] H.-T. Chen, C.-J. Chung, T.-C. Yang, I. P. Chiang, C.-H. Tang, K.-C. Chen et J.-L. He, *Osteoblast growth behavior on micro-arc oxidized [beta]-titanium alloy*. Surf. Coat. Technol. **2010**, 205 (5), 1624-1629.
- [27] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Nakanishi, N. Soga et K. de Groot, *The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants*. Journal of Biomedical Materials Research **1994**, 28 (1), 7-15.
- [28] D. M. Brunette, P. Tengwall, M. Textor et P. Thomsen, *Titanium in medicine : Material science, surface science, engineering, biological responses, and medical applications*. Berlin and New York, 2001.
- [29] M. Rinner, J. Gerlach et W. Ensinger, *Formation of titanium oxide films on titanium and ti6al4v by o2-plasma immersion ion implantation*. Surf. Coat. Technol. **2000**, 132 (2-3), 111-116.
- [30] G. Thorwarth, S. Mändl et B. Rauschenbach, *Rutile formation and oxygen diffusion in oxygen piii-treated titanium*. Surf. Coat. Technol. **2001**, 136 (1-3), 236-240.
- [31] P. Yang, N. Huang, Y. X. Leng, J. Y. Chen, H. Sun, J. Wang, F. Chen et P. K. Chu, *In vivo study of ti-o thin film fabricated by piii*. Surf. Coat. Technol. **2002**, 156 (1-3), 284-288.
- [32] H. Ohsaki, Y. Shibayama, A. Nakajim, A. Kinbara et T. Watanabe, *Plasma treatment for crystallization of amorphous thin films*. Thin Solid Films **2006**, 502 (1-2), 63-66.

- [33] H. Ohsaki, Y. Shibayama, N. Yoshida, T. Watanabe et S. Kanemaru, *Room-temperature crystallization of amorphous films by rf plasma treatment*. *Thin Solid Films* **2009**, 517 (10), 3092-3095.
- [34] Y.-T. Sul, C. B. Johansson, Y. Jeong et T. Albrektsson, *The electrochemical oxide growth behaviour on titanium in acid and alkaline electrolytes*. *Medical Engineering & Physics* **2001**, 23 (5), 329-346.
- [35] N. K. Kuromoto, R. A. Simão et G. A. Soares, *Titanium oxide films produced on commercially pure titanium by anodic oxidation with different voltages*. *Mater. Charact.* **2007**, 58 (2), 114-121.
- [36] B. Yang, M. Uchida, H.-M. Kim, X. Zhang et T. Kokubo, *Preparation of bioactive titanium metal via anodic oxidation treatment*. *Biomaterials* **2004**, 25 (6), 1003-1010.
- [37] X. Cui, H. M. Kim, M. Kawashita, L. Wang, T. Xiong, T. Kokubo et T. Nakamura, *Preparation of bioactive titania films on titanium metal via anodic oxidation*. *Dental Materials* **2009**, 25 (1), 80-86.
- [38] F. He, F. Zhang, G. Yang, X. Wang et S. Zhao, *Enhanced initial proliferation and differentiation of mc3t3-e1 cells on hf/hno3 solution treated nanostructural titanium surface*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* **2010**, 110 (4), e13-e22.
- [39] A. Nanci, J. D. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal et M. D. McKee, *Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules*. *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, 40 (2), 324-335.
- [40] *Astm standard b600, annual book of astm standard*. American Society for Testing and Materials: Philadelphia, PA, 1997; Vol. 2.04.
- [41] N. Eliaz, O. Ritman-Hertz, D. Aronov, E. Weinberg, Y. Shenhar, G. Rosenman, M. Weinreb et E. Ron, *The effect of surface treatments on the adhesion of electrochemically deposited hydroxyapatite coating to titanium and on its interaction with cells and bacteria*. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* **2011**, 22 (7), 1741-1752.
- [42] C. Roux, F. Chai, N. Ollivier, A. Ochsenein, S. Winter, O. Melnyk et H. F. Hildebrand, *Ti-cp functionalization by deposition of organic/inorganic silica nanoparticles*. *Biomol. Eng.* **2007**, 24 (5), 549-554.
- [43] H. B. Wen, J. G. C. Wolke, J. R. de Wijn, Q. Liu, F. Z. Cui et K. de Groot, *Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments*. *Biomaterials* **1997**, 18 (22), 1471-1478.
- [44] H.-M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo et T. Nakamura, *Preparation of bioactive ti and its alloys via simple chemical surface treatment*. *Journal of Biomedical Materials Research* **1996**, 32 (3), 409-417.
- [45] X.-X. Wang, S. Hayakawa, K. Tsuru et A. Osaka, *Bioactive titania gel layers formed by chemical treatment of ti substrate with a h2o2/hcl solution*. *Biomaterials* **2002**, 23 (5), 1353-1357.
- [46] F. Variola, J.-H. Yi, L. Richert, J. D. Wuest, F. Rosei et A. Nanci, *Tailoring the surface properties of ti6al4v by controlled chemical oxidation*. *Biomaterials* **2008**, 29 (10), 1285-1298.



- [47] H. A. Al-Abadleh et V. H. Grassian, *Oxide surfaces as environmental interfaces*. Surf. Sci. Rep. **2003**, 52 (3-4), 63-161.
- [48] S. Tunesi et M. Anderson, *Influence of chemisorption on the photodecomposition of salicylic acid and related compounds using suspended titania ceramic membranes*. The Journal of Physical Chemistry **1991**, 95 (8), 3399-3405.
- [49] Y. Liu, J. I. Dadap, D. Zimdars et K. B. Eisenthal, *Study of interfacial charge-transfer complex on tio2 particles in aqueous suspension by second-harmonic generation*. The Journal of Physical Chemistry B **1999**, 103 (13), 2480-2486.
- [50] R. Rodríguez, M. A. Blesa et A. E. Regazzoni, *Surface complexation at the tio2(anatase)/aqueous solution interface: Chemisorption of catechol*. J. Colloid Interface Sci. **1996**, 177 (1), 122-131.
- [51] A. E. Regazzoni, P. Mandelbaum, M. Matsuyoshi, S. Schiller, S. A. Bilmes et M. A. Blesa, *Adsorption and photooxidation of salicylic acid on titanium dioxide: A surface complexation description*. Langmuir **1998**, 14 (4), 868-874.
- [52] A. Fahmi, C. Minot, P. Fourré et P. Nortier, *A theoretical study of the adsorption of oxalic acid on tio2*. Surf. Sci. **1995**, 343 (3), 261-272.
- [53] W. Macyk, K. Szacilowski, G. Stochel, M. Buchalska, J. Kuncewicz et P. Labuz, *Titanium(IV) complexes as direct tio2 photosensitizers*. Coord. Chem. Rev. **2010**, 254 (21-22), 2687-2701.
- [54] M. Textor, S. Tosatti, M. Wieland et D. M. Brunette, *Bio-implant interface: Improving biomaterials and tissue reactions*; CRC Press: London, **2003**; 114-132.
- [55] M.-C. Daniel et D. Astruc, *Gold nanoparticles: Assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology*. Chem. Rev. **2003**, 104 (1), 293-346.
- [56] I. Carmeli, L. Frolov, C. Carmeli et S. Richter, *Photovoltaic activity of photosystem I-based self-assembled monolayer*. J. Am. Chem. Soc. **2007**, 129 (41), 12352-12353.
- [57] C. K. Poh, Z. Shi, X. W. Tan, Z. C. Liang, X. M. Foo, H. C. Tan, K. G. Neoh et W. Wang, *Cobalt chromium alloy with immobilized bmp peptide for enhanced bone growth*. Journal of Orthopaedic Research **2011**, 29 (9), 1424-1430.
- [58] D. M. Ottenstein, *Comparison of Support Deactivation in Gas Chromatography*, Journal of Gas Chromatography **1968**, (6), 129.
- [59] A. M. Filbert et M. L. Hair, Journal of Gas Chromatography **1968**, (6), 150.
- [60] R. K. Gilpin et M. F. Burke, *Role of tri- and dimethylsilanes in tailoring chromatographic adsorbents*. Anal. Chem. **1973**, 45 (8), 1383-1389.
- [61] P. A. Heiney, K. Grüneberg, J. Fang, C. Dulcey et R. Shashidhar, *Structure and growth of chromophore-functionalized (3-aminopropyl)triethoxysilane self-assembled on silicon*. Langmuir **2000**, 16 (6), 2651-2657.

- [62] D. F. Siqueira Petri, G. Wenz, P. Schunk et T. Schimmel, *An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on sio2 and the vapor deposition of gold layers*. Langmuir **1999**, 15 (13), 4520-4523.
- [63] A. R. El-Ghannam, P. Ducheyne, M. Risbud, C. S. Adams, I. M. Shapiro, D. Castner, S. Golledge et R. J. Composto, *Model surfaces engineered with nanoscale roughness and rgd tripeptides promote osteoblast activity*. Journal of Biomedical Materials Research Part A **2004**, 68A (4), 615-627.
- [64] G. Balasundaram, M. Sato et T. J. Webster, *Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with rgd*. Biomaterials **2006**, 27 (14), 2798-2805.
- [65] T. Yoshioka, K. Tsuru, S. Hayakawa et A. Osaka, *Preparation of alginic acid layers on stainless-steel substrates for biomedical applications*. Biomaterials **2003**, 24 (17), 2889-2894.
- [66] D. A. Puleo, *Activity of enzyme immobilized on silanized co-cr-mo*. Journal of Biomedical Materials Research **1995**, 29 (8), 951-957.
- [67] J. Schwartz, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, J. E. Schwarzbauer, K. S. Midwood et E. S. Gawalt, *Cell attachment and spreading on metal implant materials*. Materials Science and Engineering: C **2003**, 23 (3), 395-400.
- [68] T. D. Sargeant, M. S. Rao, C.-Y. Koh et S. I. Stupp, *Covalent functionalization of niti surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers*. Biomaterials **2008**, 29 (8), 1085-1098.
- [69] R. Helmy et A. Y. Fadeev, *Self-assembled monolayers supported on tio2: Comparison of c18h37six3 (x = h, cl, och3), c18h37si(ch3)2cl, and c18h37po(oh)2*. Langmuir **2002**, 18 (23), 8924-8928.
- [70] L. D. White et C. P. Tripp, *Reaction of (3-aminopropyl)dimethylethoxysilane with amine catalysts on silica surfaces*. J. Colloid Interface Sci. **2000**, 232 (2), 400-407.
- [71] S.-J. Xiao, M. Textor, N. D. Spencer et H. Sigrist, *Covalent attachment of cell-adhesive, (arg-gly-asp)-containing peptides to titanium surfaces*. Langmuir **1998**, 14 (19), 5507-5516.
- [72] P. Dubruel, E. Vanderleyden, M. Bergadà, I. De Paepe, H. Chen, S. Kuypers, J. Luyten, J. Schrooten, L. Van Hoorebeke et E. Schacht, *Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of ti-surfaces*. Surf. Sci. **2006**, 600 (12), 2562-2571.
- [73] Q. Liu, J. Ding, F. K. Mante, S. L. Wunder et G. R. Baran, *The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil: A self-assembled monolayer technique*. Biomaterials **2002**, 23 (15), 3103-3111.
- [74] S. Demirci et T. Caykara, *Formation of dicarboxylic acid-terminated monolayers on silicon wafer surface*. Surf. Sci. **2010**, 604 (7-8), 649-653.
- [75] D. Olmos, J. González-Benito, A. J. Aznar et J. Baselga, *Hydrolytic damage study of the silane coupling region in coated silica microfibrils: Ph and coating type effects*. Journal of Materials Processing Technology **2003**, 143-144, 82-86.

- [76] J. A. Howarter et J. P. Youngblood, *Surface modification of polymers with 3-aminopropyltriethoxysilane as a general pretreatment for controlled wettability*. *Macromolecules* **2007**, *40* (4), 1128-1132.
- [77] H. Watson, A. Norström, Å. Torrkulla et J. Rosenholm, *Aqueous amino silane modification of e-glass surfaces*. *J. Colloid Interface Sci.* **2001**, *238* (1), 136-146.
- [78] M. Etienne et A. Walcarius, *Analytical investigation of the chemical reactivity and stability of aminopropyl-grafted silica in aqueous medium*. *Talanta* **2003**, *59* (6), 1173-1188.
- [79] Q. Weiping, X. Bin, W. Lei, W. Chunxiao, Y. Danfeng, Y. Fang, Y. Chunwei et W. Yu, *Controlled site-directed assembly of antibodies by their oligosaccharide moieties onto aptes derivatized surfaces*. *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *214* (1), 16-19.
- [80] D. A. Puleo, *Retention of enzymatic activity immobilized on silanized co-cr-mo and ti-6al-4v*. *Journal of Biomedical Materials Research* **1997**, *37* (2), 222-228.
- [81] P. R. McGill et H. Idriss, *Dft study of carboxylic acids modes of adsorption on rutile tio<sub>2</sub>(0 1 1) surfaces*. *Surf. Sci.* **2008**, *602* (24), 3688-3695.
- [82] K. S. Kim et M. A. Barteau, *Pathways for carboxylic acid decomposition on titania*. *Langmuir* **1988**, *4* (4), 945-953.
- [83] L. Ojamäe, C. Aulin, H. Pedersen et P.-O. Käll, *Ir and quantum-chemical studies of carboxylic acid and glycine adsorption on rutile tio<sub>2</sub> nanoparticles*. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *296* (1), 71-78.
- [84] M. Nilsing, S. Lunell, P. Persson et L. Ojamäe, *Phosphonic acid adsorption at the tio<sub>2</sub> anatase (1 0 1) surface investigated by periodic hybrid hf-dft computations*. *Surf. Sci.* **2005**, *582* (1-3), 49-60.
- [85] N. Vlachopoulos, P. Liska, J. Augustynski et M. Graetzel, *Very efficient visible light energy harvesting and conversion by spectral sensitization of high surface area polycrystalline titanium dioxide films*. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110* (4), 1216-1220.
- [86] S. Pawsey, M. McCormick, S. De Paul, R. Graf, Y. S. Lee, L. Reven et H. W. Spiess, *1h fast mas nmr studies of hydrogen-bonding interactions in self-assembled monolayers*. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (14), 4174-4184.
- [87] M. J. Pellerite, T. D. Dunbar, L. D. Boardman et E. J. Wood, *Effects of fluorination on self-assembled monolayer formation from alkanephosphonic acids on aluminum: Kinetics and structure*. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107* (42), 11726-11736.
- [88] C. Yee, G. Kataby, A. Ulman, T. Prozorov, H. White, A. King, M. Rafailovich, J. Sokolov et A. Gedanken, *Self-assembled monolayers of alkanesulfonic and -phosphonic acids on amorphous iron oxide nanoparticles*. *Langmuir* **1999**, *15* (21), 7111-7115.
- [89] E. S. Gawalt, G. Lu, S. L. Bernasek et J. Schwartz, *Enhanced bonding of alkanephosphonic acids to oxidized titanium using surface-bound alkoxyzirconium complex interfaces*. *Langmuir* **1999**, *15* (26), 8929-8933.

- [90] P. Ardalan, T. P. Brennan, H.-B.-R. Lee, J. R. Bakke, I. K. Ding, M. D. McGehee et S. F. Bent, *Effects of self-assembled monolayers on solid-state cds quantum dot sensitized solar cells*. ACS Nano **2011**, 5 (2), 1495-1504.
- [91] A. Raman, M. Dubey, I. Gouzman et E. S. Gawalt, *Formation of self-assembled monolayers of alkylphosphonic acid on the native oxide surface of ss316l*. Langmuir **2006**, 22 (15), 6469-6472.
- [92] M. Nilsing, P. Persson et L. Ojamäe, *Anchor group influence on molecule-metal oxide interfaces: Periodic hybrid dft study of pyridine bound to tio2 via carboxylic and phosphonic acid*. Chem. Phys. Lett. **2005**, 415 (4-6), 375-380.
- [93] A. Kanta, R. Sedev et J. Ralston, *The formation and stability of self-assembled monolayers of octadecylphosphonic acid on titania*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects **2006**, 291 (1-3), 51-58.
- [94] G. Mani, D. M. Johnson, D. Marton, M. D. Feldman, D. Patel, A. A. Ayon et C. M. Agrawal, *Drug delivery from gold and titanium surfaces using self-assembled monolayers*. Biomaterials **2008**, 29 (34), 4561-4573.
- [95] E. L. Hanson, J. Schwartz, B. Nickel, N. Koch et M. F. Danisman, *Bonding self-assembled, compact organophosphonate monolayers to the native oxide surface of silicon*. J. Am. Chem. Soc. **2003**, 125 (51), 16074-16080.
- [96] T. Arita, K.-i. Moriya, T. Yoshimura, K. Minami, T. Naka et T. Adschiri, *Dispersion of phosphonic acids surface-modified titania nanocrystals in various organic solvents*. Ind. Eng. Chem. Res. **2010**, 49 (20), 9815-9821.
- [97] N. Adden, L. J. Gamble, D. G. Castner, A. Hoffmann, G. Gross et H. Menzel, *Phosphonic acid monolayers for binding of bioactive molecules to titanium surfaces*. Langmuir **2006**, 22 (19), 8197-8204.
- [98] T. Zeller, A. Rastan, U. Schwarzwälder, C. Mueller, T. Schwarz, U. Frank, K. Bürgelin, S. Sixt, E. Noory, U. Beschorner, K. Hauswald, D. Branzan et F. J. Neumann, *Treatment of instent restenosis following stent-supported renal artery angioplasty*. Catheter. Cardio. Inte. **2007**, 70 (3), 454-459.
- [99] I. Gillaizeau-Gauthier, F. Odobel, M. Alebbi, R. Argazzi, E. Costa, C. A. Bignozzi, P. Qu et G. J. Meyer, *Phosphonate-based bipyridine dyes for stable photovoltaic devices*. Inorg. Chem. **2001**, 40 (23), 6073-6079.
- [100] H. Wu, W. Hou, J. Wang, L. Xiao et Z. Jiang, *Preparation and properties of hybrid direct methanol fuel cell membranes by embedding organophosphorylated titania submicrospheres into a chitosan polymer matrix*. J. Power Sources **2010**, 195 (13), 4104-4113.
- [101] I. Řehoř, V. Vilímová, P. Jendelová, V. c. Kubíček, D. Jiráček, V. t. Herynek, M. Kapcalová, J. Kotek, J. Černý, P. Hermann et I. Lukeš, *Phosphonate-titanium dioxide assemblies: Platform for multimodal diagnostic-therapeutic nanoprobes*. J. Med. Chem. **2011**, 54 (14), 5185-5194.
- [102] S. Monge, B. Camicioni, A. Graillot et J.-J. Robin, *Phosphorus-containing polymers: A great opportunity for the biomedical field*. Biomacromolecules **2011**, 12 (6), 1973-1982.

- [103] E. S. Gawalt, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, K. S. Midwood, J. E. Schwarzbauer et J. Schwartz, *Bonding organics to ti alloys: Facilitating human osteoblast attachment and spreading on surgical implant materials*. Langmuir **2002**, *19* (1), 200-204.
- [104] R. Quiñones et E. S. Gawalt, *Study of the formation of self-assembled monolayers on nitinol*. Langmuir **2007**, *23* (20), 10123-10130.
- [105] T. M. Putvinski, M. L. Schilling, H. E. Katz, C. E. D. Chidsey, A. M. Muijsce et A. B. Emerson, *Self-assembly of organic multilayers with polar order using zirconium phosphate bonding between layers*. Langmuir **1990**, *6* (10), 1567-1571.
- [106] A. Walsby, *The extracellular products of anabaena cylindra lemm. I. Isolation of a macromolecular pigment-peptide complex* British Phycological Journal **1974**, (9), 371-381.
- [107] K. Gademann, J. Kobylinska, J.-Y. Wach et T. Woods, *Surface modifications based on the cyanobacterial siderophore anachelin: From structure to functional biomaterials design*. BioMetals **2009**, *22* (4), 595-604.
- [108] E. Faure, P. Lecomte, S. Lenoir, C. Vreuls, C. Van De Weerd, C. Archambeau, J. Martial, C. Jerome, A.-S. Duwez et C. Detrembleur, *Sustainable and bio-inspired chemistry for robust antibacterial activity of stainless steel*. J. Mater. Chem. **2011**, *21* (22), 7901-7904.
- [109] H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller et P. B. Messersmith, *Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings*. Science **2007**, *318* (5849), 426-430.
- [110] J. H. WAITE et M. L. TANZER, *Polyphenolic substance of mytilus edulis: Novel adhesive containing l-dopa and hydroxyproline*. Science **1981**, *212* (4498), 1038-1040.
- [111] H. Lee, N. F. Scherer et P. B. Messersmith, *Single-molecule mechanics of mussel adhesion*. Proceedings of the National Academy of Sciences **2006**, *103* (35), 12999-13003.
- [112] F. Oesterhelt et et al., *Single molecule force spectroscopy by afm indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water*. New Journal of Physics **1999**, *1* (6), 1-12.
- [113] J. Moser, S. Punchihewa, P. P. Infelta et M. Graetzel, *Surface complexation of colloidal semiconductors strongly enhances interfacial electron-transfer rates*. Langmuir **1991**, *7* (12), 3012-3018.
- [114] T. Rajh, L. X. Chen, K. Lukas, T. Liu, M. C. Thurnauer et D. M. Tiede, *Surface restructuring of nanoparticles: An efficient route for ligand-metal oxide crosstalk*. The Journal of Physical Chemistry B **2002**, *106* (41), 10543-10552.
- [115] A. Nawrocka, A. Zdyb et S. Krawczyk, *Stark spectroscopy of charge-transfer transitions in catechol-sensitized tio2 nanoparticles*. Chem. Phys. Lett. **2009**, *475* (4-6), 272-276.
- [116] J. B. Simonsen, *The interaction between hexahydroxytriphenylene and the rutile tio2(110)-(1 × 1) surface at uhv conditions*. Surf. Sci. **2010**, *604* (15-16), 1300-1309.
- [117] S.-C. Li, J.-g. Wang, P. Jacobson, X. Q. Gong, A. Selloni et U. Diebold, *Correlation between bonding geometry and band gap states at organic-inorganic interfaces: Catechol on rutile tio2(110)*. J. Am. Chem. Soc. **2009**, *131* (3), 980-984.

- [118] L.-M. Liu, S.-C. Li, H. Cheng, U. Diebold et A. Selloni, *Growth and organization of an organic molecular monolayer on tio<sub>2</sub>: Catechol on anatase (101)*. J. Am. Chem. Soc. **2011**, 133 (20), 7816-7823.
- [119] S. T. Martin, J. M. Kesselman, D. S. Park, N. S. Lewis et M. R. Hoffmann, *Surface structures of 4-chlorocatechol adsorbed on titanium dioxide*. Environmental Science & Technology **1996**, 30 (8), 2535-2542.
- [120] S. K. Lunsford, H. Choi, J. Stinson, A. Yeary et D. D. Dionysiou, *Voltammetric determination of catechol using a sonogel carbon electrode modified with nanostructured titanium dioxide*. Talanta **2007**, 73 (1), 172-177.
- [121] N. Izaoumen, L. M. Cubillana-Aguilera, I. Naranjo-Rodríguez, J. L. H.-H. de Cisneros, D. Bouchta, K. R. Temsamani et J. M. Palacios-Santander, *B-sonogel-carbon electrodes: A new alternative for the electrochemical determination of catecholamines*. Talanta **2009**, 78 (2), 370-376.
- [122] Q. Ye, F. Zhou et W. Liu, *Bioinspired catecholic chemistry for surface modification*. Chem. Soc. Rev. **2011**, 40 (7), 4244-4258.
- [123] L. M. Hamming, X. W. Fan, P. B. Messersmith et L. C. Brinson, *Mimicking mussel adhesion to improve interfacial properties in composites*. Comp. Sci. Tech. **2008**, 68 (9), 2042-2048.
- [124] J. Liu, W. Yang, H. M. Zareie, J. J. Gooding et T. P. Davis, *Ph-detachable polymer brushes formed using titanium–diol coordination chemistry and living radical polymerization (raft)*. Macromolecules **2009**, 42 (8), 2931-2939.
- [125] Q. Ye, X. Wang, S. Li et F. Zhou, *Surface-initiated ring-opening metathesis polymerization of pentadecafluorooctyl-5-norbornene-2-carboxylate from variable substrates modified with sticky biomimic initiator*. Macromolecules **2010**, 43 (13), 5554-5560.
- [126] J. L. Dalsin, L. Lin, S. Tosatti, M. Textor et P. B. Messersmith, *A single biomimetic strategy for the versatile pegylation of metals, metal oxides, polymers, and semiconductors*, Transactions - 7th World Biomaterials Congress **2004**, 19.
- [127] B. P. Lee, J. L. Dalsin et P. B. Messersmith, *Synthesis and gelation of dopa-modified poly(ethylene glycol) hydrogels*. Biomacromolecules **2002**, 3 (5), 1038-1047.

# **Chapitre III**

**La Polymérisation Radicalaire Contrôlée  
appliquée à l'élaboration de brosses de  
polymères**





## INTRODUCTION

Comme susmentionné, l'objectif principal de cette thèse est d'immobiliser des polymères bioactifs parfaitement définis, de taille, de composition et de fonctionnalité maîtrisées sur des surfaces de titane en utilisant une ancre chimique de type catéchol.

Ainsi, la méthode d'accès aux polymères doit répondre au cahier des charges suivant :

- garantir la présence de l'ancre à la fin du processus de polymérisation
- permettre un contrôle strict des paramètres macromoléculaires ( $I_p$ ,  $M_n$ ),
- autoriser la polymérisation de monomères activés susceptibles d'être chimiquement modifiés une fois incorporés dans la chaîne polymère

Plusieurs techniques de polymérisation permettent d'accéder à des polymères parfaitement définis. Parmi celles-ci, on peut citer les polymérisations anionique [1], cationique [2-3], par ouverture de cycle [4] (ROMP : ring opening metathesis polymerization) et les polymérisations radicalaires contrôlées (ATRP, NMP, RAFT, etc ...). Si les deux premières méthodes précitées permettent effectivement d'accéder à des polymères parfaitement définis, la haute réactivité des espèces actives ne permet pas d'envisager l'incorporation directe d'unités dites « sensibles » comme par exemple des unités glucosidiques ou des esters activés au sein d'une chaîne polymère. En ce qui concerne la polymérisation par métathèse, celle-ci fait appel à des dérivés organométalliques souvent toxiques. Notre choix s'est donc tout naturellement porté vers les méthodes de polymérisations radicalaires contrôlées (PRC).

## 1. Les Polymérisation Radicalaire Contrôlée (PRC)

### 1.1. Principe

Le principe de la PRC consiste à insérer une étape réactionnelle dans le processus de polymérisation radicalaire classique. Ce peut être soit une réaction de terminaison réversible reposant sur une réaction d'activation et de désactivation des chaînes en croissance, soit une réaction de transfert réversible fondée sur un équilibre d'addition et de fragmentation (Figure III.1).

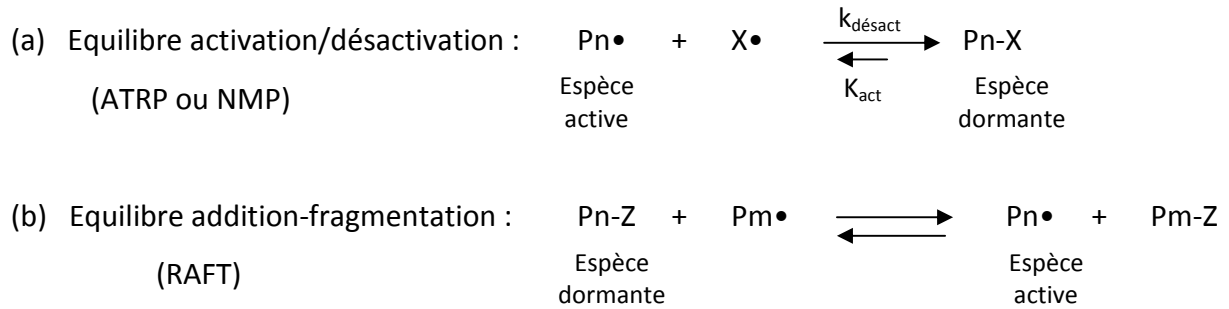


Figure III.1 : Etapes d'équilibre lors des polymérisations radicalaires contrôlées.

Pour qu'un processus de polymérisation radicalaire puisse être considéré comme contrôlé, il faut qu'il remplisse les critères suivants :

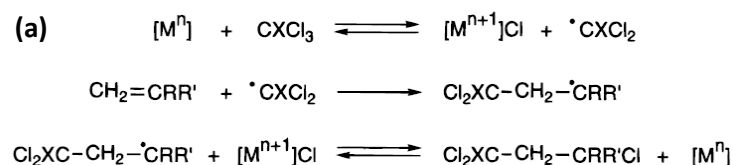
- l'incorporation des unités de monomère dans la chaîne polymère suit une cinétique d'ordre 1
- la masse molaire moyenne en nombre (Mn) expérimentale est proche du Mn théorique
- l'indice de polymolécularité doit être proche de 1

Pour que cela soit possible, il faut que :

- la vitesse d'amorçage soit élevée devant celle de propagation permettant ainsi la croissance uniforme de toutes les chaînes
- les réactions de transferts et de terminaisons irréversibles soient quasi-inexistantes.

## 1.2. Polymérisation radicalaire contrôlée par transfert d'atome (ATRP)

Cette technique de polymérisation, mise au point indépendamment par l'équipe de Matyjaszewski [5] et celle de Sawamoto [6], découle de la réaction d'Addition Radicalaire par Transfert d'Atome ATRA [7](Figure III.1.b), elle-même provenant de l'addition de Kharasch [8] (Figure III.1.a).





Les systèmes ATRP les plus fréquemment utilisés emploient comme métal le cuivre [10]. Les ligands sont choisis en fonction du monomère à polymériser et de l'amorceur. D'autres métaux ont également été employés, comme le ruthénium [11], le palladium [12], le molybdène [13], le rhodium [14], le rhénium [15], le nickel [16], le fer [17], ou encore le cobalt [11].

Le rôle du ligand est double, il permet d'accroître la solubilité de l'espèce active métallique dans le milieu réactionnel mais également de moduler le potentiel redox du métal et donc permet d'adapter la réactivité du couple au monomère à polymériser.

### 1.3. Polymérisation radicalaire en présence de nitroxydes (NMP)

Les nitroxydes, comme par exemple le nitroxyde 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy (TEMPO, Figure III.4), sont des espèces couramment employées en chimie organique pour capter les radicaux et étudier les intermédiaires réactionnels [18].

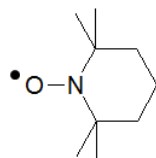


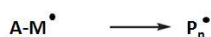
Figure III.4 : Structure du TEMPO

La nouvelle liaison C-O de l'alkoxylamine ainsi formée devient labile à haute température (120°C-150°C). C'est cette propriété qui est l'origine de la NMP. En effet, La NMP repose sur le même principe que l'ATRP, c'est-à-dire sur un équilibre activation/désactivation des espèces propageantes, à la différence près que la NMP n'utilise pas de système catalytique à base de métal et de ligand.

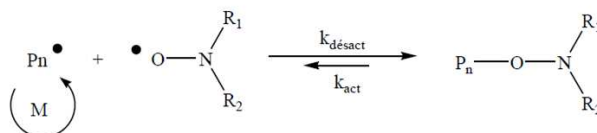
Amorçage



Propagation



Terminaison réversible



Terminaison irréversible

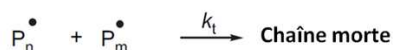


Figure III.5 : Mécanisme de la polymérisation NMP [19]

Le schéma réactionnel (Figure III.5) illustre le mécanisme général de la polymérisation NMP. La première phase correspond à un amorçage classique qui consiste à générer les premières espèces radicalaires  $A^\bullet$  par rupture homolytique d'un amorceur symétrique. Ces espèces réactives vont ensuite réagir avec le monomère conduisant au transfert du radical sur le monomère, lequel est ensuite piégé par le nitroxyde. La polymérisation NMP peut être également initiée à partir de nitroxydes « masqués », ou alkoxyamines, comme ceux répertoriés dans le Figure III.6 [20-21].

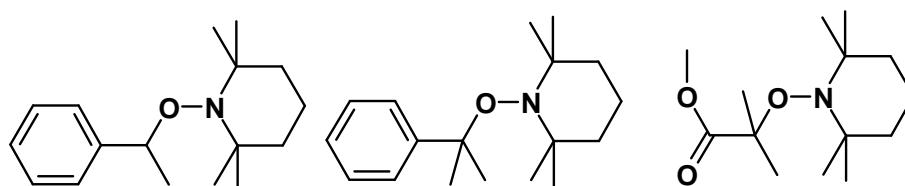
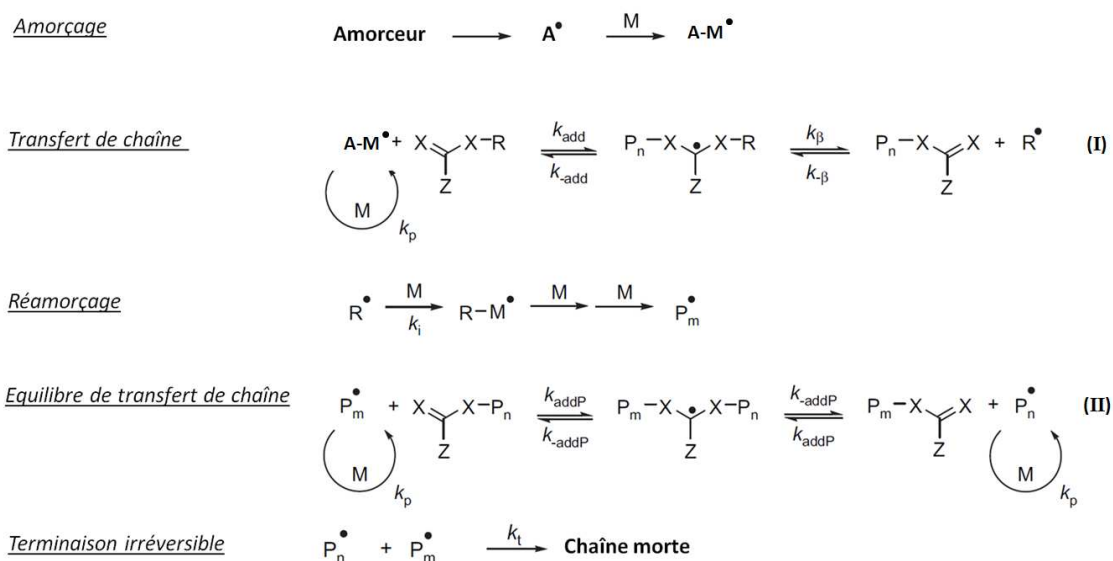


Figure III.6 : Structures de différentes alkoxyamines utilisées lors de polymérisation par NMP

#### 1.4. Polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition fragmentation (RAFT)

Le processus de polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) est l'une des techniques les plus récentes de polymérisation radicalaire contrôlée. Son principe diffère de l'ATRP et de la NMP, car il s'appuie sur un processus réversible de dégénérescence [22-24] des chaînes par fragmentation afin d'assurer le contrôle de la polymérisation. Le mécanisme réactionnel de la polymérisation est décrit dans la Figure III.7.



A = Amorceur	$k_{-add}/k_{\beta}$ = constante de vitesse de fragmentation
$P_n^{\bullet}$ , $P_m^{\bullet}$ = Radical polymère	$k_p$ = constante de vitesse de propagation
M = Monomère	$k_{add}/k_{-\beta}$ = constante de vitesse d'addition
	$k_i$ = constante de vitesse d'amorçage
	$k_t$ = constante de vitesse de terminaison

Figure III.7 : Mécanisme de polymérisation RAFT

Comme pour une polymérisation radicalaire dite "classique" après décomposition de l'amorceur (AIBN et dérivés), la première espèce radicalaire générée s'additionne sur le monomère pour donner naissance au radical carboné dérivé du monomère. Ce radical réagit ensuite rapidement avec l'agent de transfert (Figure III.7. (I)) pour conduire à la formation de l'entité radicalaire correspondante (non active vis-à-vis du processus de polymérisation) qui se fragmente pour donner un macroamorceur et un radical  $R^{\bullet}$  capable de réamorcer une polymérisation.

Cette étape réactionnelle se définit comme la période durant laquelle tous les agents de transfert vont se dissocier et ajouter au moins un monomère au radical  $R^{\bullet}$  pour former une chaîne  $P_m^{\bullet}$ . L'étape d'activation est régie par quatre constantes cinétiques  $k_{add}$ ,  $k_{-add}$ ,  $k_{\beta}$  et  $k_{-\beta}$ . Pour obtenir un polymère possédant une faible distribution statistique, il faut que la durée de cette étape soit la plus courte possible. Ainsi toutes les chaînes polymères entrent dans la phase d'équilibre en même temps.

Au cours de l'étape d'équilibre de transfert de chaîne par addition-fragmentation, un système en équilibre se forme entre les chaînes propageantes et un intermédiaire radicalaire constitué de l'agent de transfert et deux chaînes dormantes (Figure III.7. (II)). Par dégénérescence, cet intermédiaire se fragmente et les groupes terminaux (des chaînes polymères) sont libérés. Ces groupes libres vont soit s'additionner à nouveau sur un agent de transfert pour redevenir une chaîne dormante, soit réagir avec un monomère, allongeant ainsi la chaîne polymère. La vitesse de transfert entre chaîne propageante et chaîne dormante est suffisamment élevée pour permettre une addition équiprobable de monomère entre toutes les chaînes.

Comme toute polymérisation dite « vivante », la polymérisation RAFT minimise les réactions de terminaison irréversible en limitant le nombre de radicaux présents simultanément dans le milieu réactionnel. Il arrive cependant qu'une réaction de terminaison irréversible

produise entre deux espèces actives par couplage radicalaire ou par dismutation. Le taux de ces réactions de terminaison est directement lié à la concentration en amorceur. Dans le cas des polymérisations RAFT, le rapport entre la concentration initiale en amorceur et la concentration initiale en agent de transfert doit être suffisamment bas pour que le taux de terminaisons n'excède pas 5%. Les agents de transfert les plus utilisés appartiennent à la famille des « thiocarbonylthio » (Figure III.8)

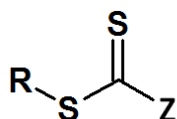


Figure III.8 : Structure générale d'un agent de transfert de type thiocarbonylthio

Le groupe R doit être un bon groupe partant et il doit être également capable d'amorcer efficacement la polymérisation [25].

Le groupement Z a un double rôle. En fonction de sa nature, il va tout d'abord déterminer la réactivité globale de la liaison C=S vis-à-vis de l'addition radicalaire [26]. En second lieu, il est le facteur essentiel de la durée de vie de l'intermédiaire réactionnel généré par l'addition du radical sur la liaison C=S [27]. Les agents de transfert RAFT les plus courants (dithiocarbonates [28-29], xanthates [30-31], dithiocarbamates [32-33], trithiocarbonates [34-35]) sont représentés sur le Figure III.9.

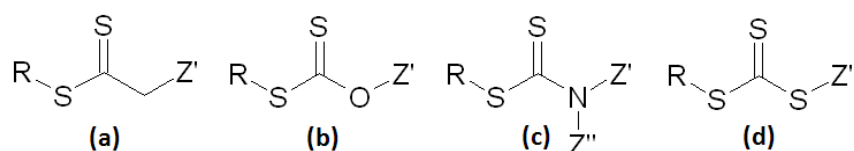


Figure III.9 : Les principaux agents de transfert « thiocarbonylthio » : dithiocarbonate **(a)**, xanthate **(b)**, dithiocarbamate **(c)** et trithiocarbonate **(d)**.

L'atout majeur de la polymérisation RAFT est lié à la grande variété d'agents de transfert disponibles ou facilement synthétisables. Ainsi, en choisissant judicieusement l'agent de transfert, il est possible de polymériser de manière contrôlée une très large gamme de monomères « classiques » (styréniques, acrylates, acrylamides, acétate de vinyle,...) mais également activés (N-acryloyloxysuccinimide) [36-37] ou incorporant des unités bioactives (peptides, sucres) [38].

## **2. La PRC : un outil de choix pour l'élaboration de « brosses » de polymères**

L'immobilisation de polymères sur des surfaces [39-40] est de nos jours une technique couramment employée pour en modifier ses propriétés, comme l'hydrophobicité, l'adhésion ou encore la résistance à la corrosion. Cette technique est notamment utilisée en microélectronique [41] pour protéger les composants de la corrosion, sur les implants médicaux [42-43] pour améliorer la biocompatibilité, ainsi que dans le domaine de l'adhésion thermo-stimulables [44] et de la nanographie [45].

Les brosses de polymères [46], c'est-à-dire de manière générale les polymères fixés par une de leur extrémité sur une surface, peuvent être principalement obtenues soit par physisorption [47-49] soit en mettant en œuvre un greffage covalent. Au vu de la littérature extrêmement abondante relative à l'élaboration des brosses de polymères, nous nous limiterons, dans le cadre de ce chapitre, à la description des différentes approches permettant de les concevoir de manière covalente.

Le greffage covalent de polymères sur des surfaces peut être envisagé de deux façons distinctes [50] : la première consiste à synthétiser un polymère possédant une ancre en extrémité de chaîne, puis de venir le greffer en surface (stratégie « graft to »), la seconde implique l'élaboration du polymère directement à partir de la surface à l'aide d'une ancre préalablement immobilisée sur celle-ci (stratégie « graft from »).

### **2.1. Approche « graft to »**

La stratégie « graft to » consiste à synthétiser un polymère possédant une ancre en bout de chaîne susceptible de se greffer de manière covalente à la surface d'un matériau brut (fonctionnalisation directe, Figure III.10.a) ou préfonctionnalisé (fonctionnalisation en deux étapes Figure III.10.b)



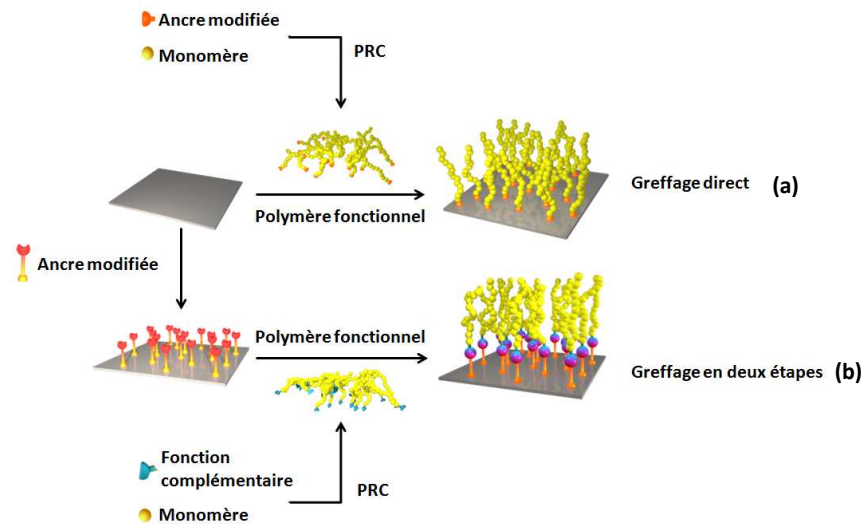


Figure III.10 : Elaboration de polymères brosses au moyen de la stratégie « graft to » par greffage direct **(a)** ou en deux étapes **(b)**

Cette approche a été exploitée afin de modifier directement des films organiques, comme le nylon [51], le polyéthylène ou le polystyrène [52], ainsi que des substrats inorganiques, comme la silice [53-54] ou l'or [55-57]. En employant la stratégie dite « directe », Tran et Auroy [53] sont, par exemple, parvenus à concevoir des brosses de polystyrène à partir d'une surface à base de silice en utilisant des polystyrènes parfaitement définis possédant une ancre de type silane. (Figure III.11).

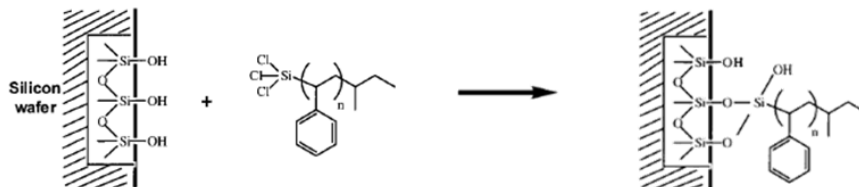


Figure III.11. : Fonctionnalisation d'une surface de silice par un polystyrène fonctionnalisé en extrémité de chaîne par un silane [53]

Lorsque la surface brute ne peut pas réagir directement avec le polymère ou n'est pas assez réactive, une solution consiste à apprêter la surface en y greffant des fonctions (époxy azoture, alcène, diène, ...) susceptibles de réagir efficacement et éventuellement de manière spécifique avec une fonction dite complémentaire localisée en extrémité de chaîne d'un polymère (fonctionnalisation « graft to » en deux étapes.

Cette stratégie a été très largement employée au cours de la dernière décennie non seulement pour greffer des polymères de nature variés, mais aussi pour concevoir de

nouvelles surfaces servant de plateforme de greffage. Par exemple, le 3-glycidoxypropyldiméthyléthoxysilane une fois greffé à la surface du silicium fournit des fonctions époxydes facilitant le greffage de polymères dotés d'une fonction acide carboxylique en extrémité de chaîne (Figure III.12) [58].

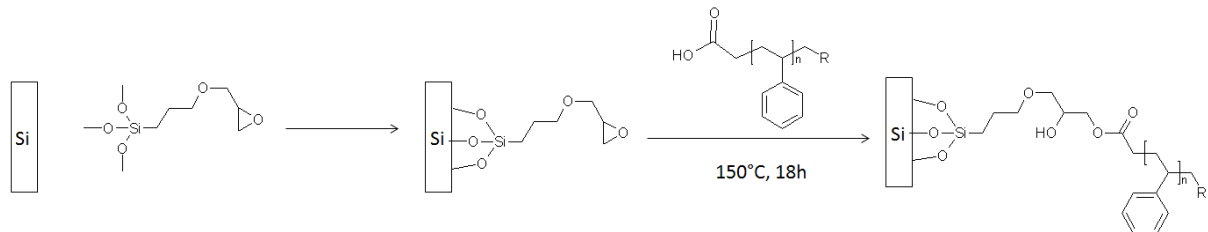


Figure III.12 : Fonctionnalisation d'une surface de silicium en deux étapes par des polystyrènes au moyen du 3-glycidoxypropyldiméthyléthoxysilane [58]

Dans ce cadre, une autre approche intéressante est d'utiliser des réactions chimiques répondant aux critères de la chimie «click». Ces réactions conduisent en effet à des rendements de greffage élevés et ceux ci dans des conditions douces. Parmi ces réactions (Diels-Alder [59-60], thiol-ènes [61], thiol-yne [62]...), la plus employée est incontestablement la cycloaddition [3+2] de Huisgen catalysée au cuivre I (Figure III.13).

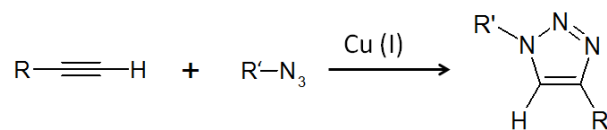


Figure III.13 : Equation réactionnelle de la cycloaddition [3+2] de Huisgen catalysée au Cu (I)

En effet, la fonction azoture est facilement intégrée à l'extrémité d'une chaîne polymère préparée par polymérisation ATRP en remplaçant l'halogène ayant servi à la polymérisation à l'aide d'une réaction de substitution nucléophile en présence d'azoture de sodium [63]. Cette approche a été exploitée par Druckenmüller pour greffer des chaînes de poly(éthylène glycol) (PEG) sur une surface de silice préfonctionnalisées par des fonctions alcynes vrais [64]. Les chaînes de PEG greffées de cette manière forment un film homogène d'une dizaine de nanomètres d'épaisseur, avec une densité de greffage atteignant 1,3 chaîne.nm<sup>-2</sup>, soit l'équivalent d'une monocouche autoassemblée.

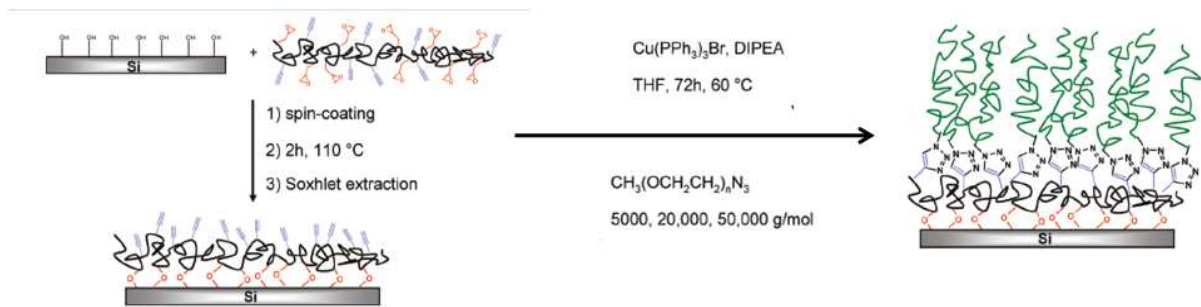


Figure III.14. : Fonctionnalisation de substrats de silice par des copolymères bifonctionnels et formation de polymères brosses par cycloaddition [3+2] de Huisgen [64]

La stratégie « graft to » conduit généralement à des densités de greffage plus faibles que celles obtenues par la stratégie « graft from ». Cependant, l'atout majeur de cette méthode réside dans le fait que les paramètres macromoléculaires des polymères (composition, indice de polymolécularité,...) sont, contrairement à la méthode « grafting from », connus avant l'étape de greffage, et il devient alors possible d'élaborer des surfaces mixtes à partir de polymères de natures différentes. Par exemple, Draper *et al.* [65] ont élaboré des brosses de polymères mixtes à partir de mélanges de polystyrène (PS) et de poly(2-vinyl pyridine) (P2VP), parfaitement définis, au moyen d'une stratégie « graft to » en deux étapes (greffage d'époxydes en surface, puis réaction avec les acides carboxyliques en extrémité de chaîne des polymères). En traitant la surface par des solvants de nature différente (THF : bon solvant des deux polymères ; éthanol : bon solvant de la P2VP et mauvais solvant du PS ; toluène : bon solvant du PS et mauvais solvant de la P2VP), les auteurs ont ainsi réussi à contrôler la morphologie et la mouillabilité des surfaces. (Figure III.15).

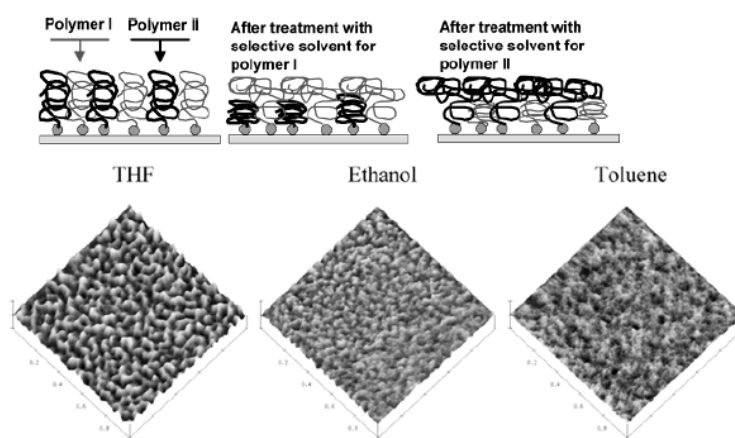


Figure III.15 : Effet de la nature du solvant de rinçage sur la morphologie (AFM) d'un matériau fonctionnalisé par deux types de polymères (polymer I : PS, Polymer II : P2VP) [65]

## 2.2. Stratégie « graft from »

Comme représentée dans la Figure III.16, la stratégie « graft from » repose sur la formation du polymère à partir de la surface. Cette approche peut être ainsi transposée aux trois grandes classes de PRC, cependant la plus souvent utilisée pour modifier les supports reste l'ATRP. D'une façon générale, la première étape de cette stratégie consiste à immobiliser sur la surface un amorceur ou un agent de transfert, puis à échafauder le polymère depuis la surface [39].

Comme le montre la littérature [66-69], il est souvent nécessaire d'ajouter dans le milieu réactionnel un amorceur (ATRP) ou un agent de transfert (RAFT) non greffé, dit « sacrificiel », pour maintenir un contrôle de la polymérisation. En effet, sans cet agent sacrificiel, la concentration en complexe désactivant peut s'avérer insuffisante pour assurer le contrôle. La présence de cet amorceur sacrificiel conduit alors également à la formation de polymères en solution.

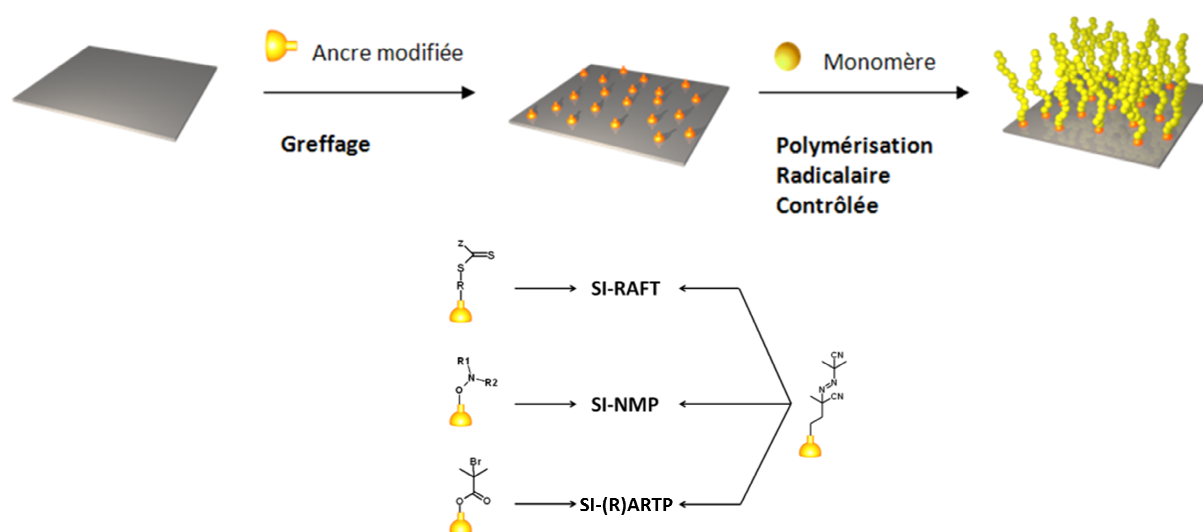


Figure III.16 : Fonctionnalisation de surface par l'approche « graft from » (SI = Surface Initiated)

La stratégie « graft from », à l'instar de la stratégie « graft to », possède des avantages et des inconvénients. L'avantage majeur de la stratégie « graft from » est de donner naissance à des films denses et de recouvrir dans la majeure partie des cas l'intégralité de la surface en polymère [39]. Cependant, il est en général difficile de caractériser de manière précise les polymères immobilisés en surface. Par ailleurs, l'immobilisation sur une même surface de polymères de différentes natures au moyen de cette stratégie est en général difficilement réalisable [70].

### 3. Immobilisation de polymères brosses sur des surfaces de titane

La formation de polymères brosses sur la surface du titane a été abordée majoritairement par l'approche « graft from », en utilisant la polymérisation par ouverture de cycle [71] et les différentes techniques de polymérisation radicalaire contrôlée.

#### 3.1. Fonctionnalisations des surfaces de titane au moyen de l'ATRP

La stratégie « graft from » est la plus fréquemment employée pour le greffage des polymères sur les substrats de titane. Dans ce cadre, différentes catégories d'ancres chimiques susceptibles d'amorcer des polymérisations de type ATRP ont été mises au point.

Les premières méthodes exploitent la fonctionnalisation des surfaces de titane par des silanes [72-74]. Raghuraman [72] a notamment rapporté l'élaboration de brosses de PMMA par SI-ATRP (SI : Surface Initiated) à partir de nanoparticules de titane. Le greffage de l'amorceur est effectué en deux étapes : les nanoparticules de titane sont fonctionnalisées par l'APTES puis le bromure de 2-bromoisobutyryle est immobilisé *via* les fonctions amines nouvellement créées.

Cette approche a également été explorée par l'équipe de Kang [73] pour faire croître des polymères de poly(méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) (HEMA) à partir du trichloro(4-méthyl(phényl))silane greffé sur le titane. Ces polymères ont été ensuite post-fonctionnalisés par la pénicilline et la gentamycine pour des applications biomédicales (Figure III.17).

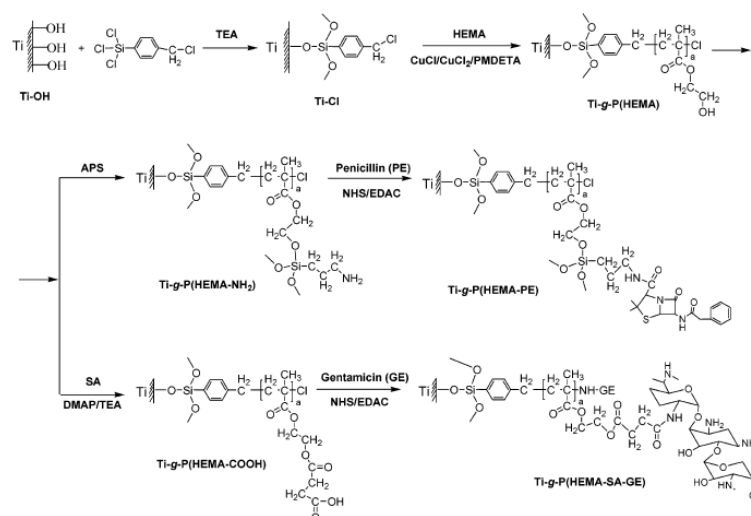


Figure III.17 : Fonctionnalisation du titane par la pénicilline et la gentamycine à l'aide de polymères brosses de p(HEMA) obtenus par ATRP (stratégie « graft from ») [73]

Des dérivés organiques de l'acide phosphonique ont été également exploités pour modifier les surfaces de titane par des polymères en utilisant la stratégie « graft from ». Par exemple Barthélémy *et al.* [75] ont synthétisé l'acide 11-(2-bromo-2-méthylpropionyloxy)-undécyl-1-phosphonique, qui, une fois immobilisé sur un substrat de titane, a permis la polymérisation par ATRP du styrène (Figure III.18).

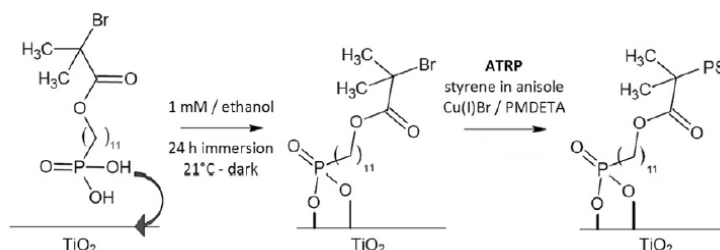


Figure III.18 : Stratégie « graft from » réalisée au moyen de l'acide 11-(2-bromo-2-méthylpropionyloxy)-undécyl-1-phosphonique pour la fonctionnalisation d'un substrat de titane par le polystyrène [75]

L'équipe de Vaia [76] a également utilisé une ancre phosphoniques pour immobiliser des polymères par le biais d'une stratégie « graft to » en deux étapes. La méthode employée consiste à générer des fonctions azotures sur des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  à partir de l'acide 3-bromopropylphosphonique, avant de réaliser une réaction de cycloaddition [3+2] de Huisgen sur des polystyrènes obtenus par ATRP (Figure III.19).

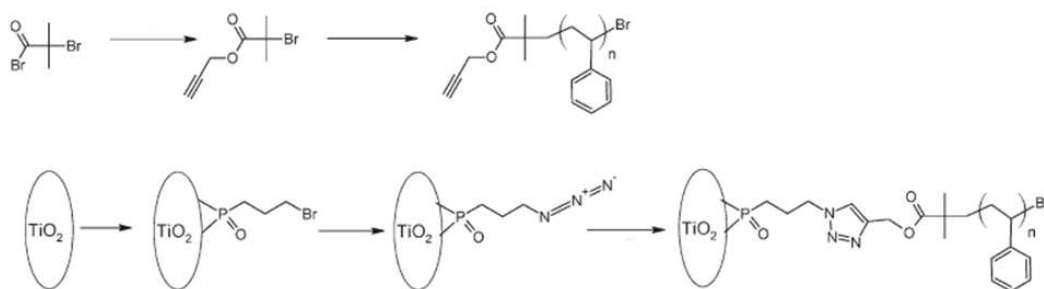


Figure III.19 : Fonctionnalisation de nanoparticules de titane par une stratégie « graft to » en deux étapes à l'aide d'un dérivé d'acide phosphonique [76]

Enfin, comme mentionné dans le chapitre précédent, le motif catéchol constitue une ancre très efficace pour fonctionnaliser des surfaces de titane. Messersmith a été le premier à développer un amorceur ATRP intégrant ce fragment (Figure III.20.a) [77]. Cette ancre a ensuite été notamment exploitée pour concevoir, par la stratégie « grafting from », des brosses polymères de poly(méthacrylate d'oligo(éthylène glycol)méthyl éther) (POEGMEMA) (Figure III.20.b) empêchant l'adhésion de cellules ostéoblastes 3T3 sur la surface ainsi traitée [77-79].

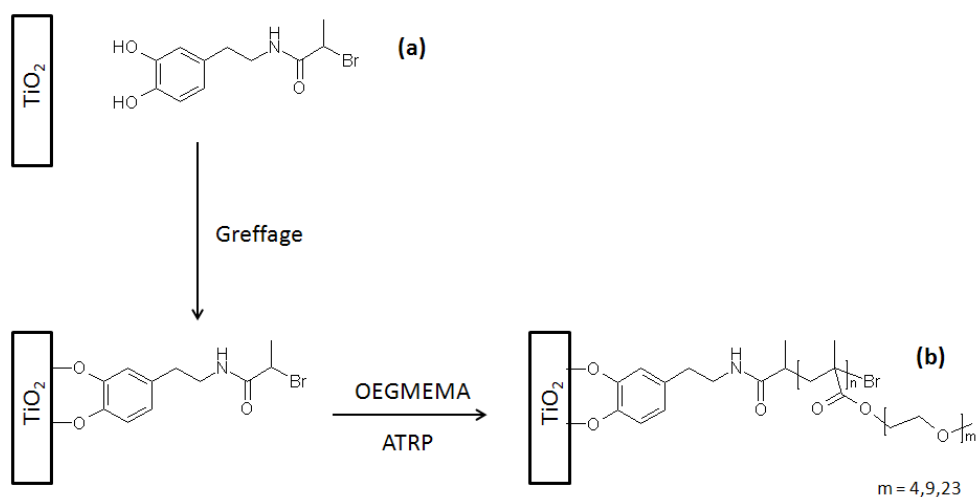


Figure III.20 : Structure de l'amorceur ATRP développé par Messersmith (a) et la stratégie de polymérisation « graft from » à partir d'une surface de titane du méthacrylate d'oligo(éthylène glycol)méthyle éther (b) [77]

Si les amorceurs comportant le motif catéchol se révèlent très efficaces pour immobiliser des polymères sur des surfaces de titane dans le cadre d'une stratégie « graft from », la forte complexation du cuivre (II) par le motif catéchol (constante de complexation  $K > 10^{10} \text{mol}^{-1}$  [80]) rend caduque l'utilisation directe de ces amorceurs pour greffer des polymères selon une stratégie « graft to ». Une solution, proposée par Gao *et al.* [81], consiste à protéger les hydroxyles de l'unité catéchol par un motif *tert*-butyldiméthylsilyle, la déprotection étant assurée en présence de TBAF (fluorure de tétra *n*-butylammonium) après la polymérisation (Figure III.21).

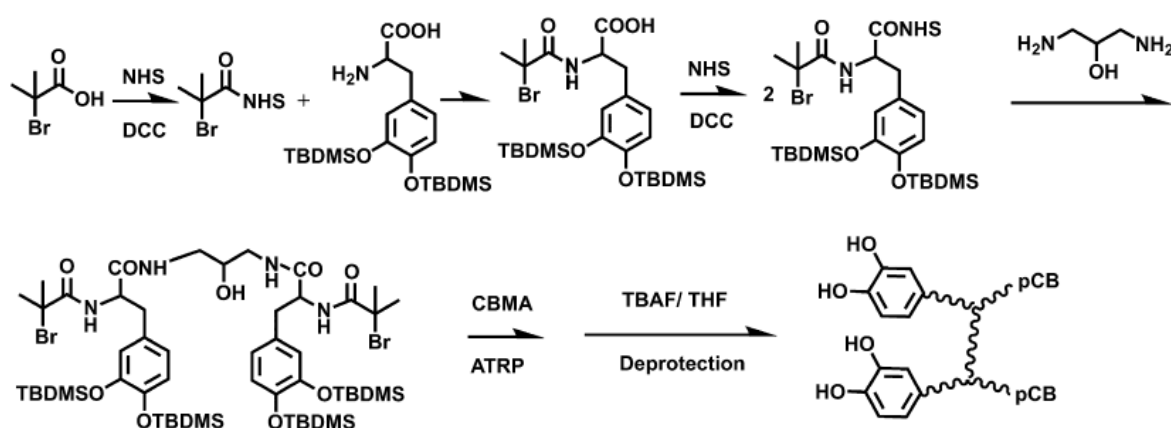


Figure III.21 : Synthèse par ATRP (stratégie « graft to ») d'un polymère de carboxybétaine comportant des motifs catéchols [81].

### 3.2. Fonctionnalisation des surfaces de titane par le procédé NMP

Bien que la NMP ait servi à immobiliser des polymères sur de nombreux types de surfaces, à notre connaissance, il n'y a qu'une seule étude qui mentionne l'utilisation de cette technique pour modifier une surface de titane. Cette étude, effectuée par l'équipe de Takahara [82], concerne le greffage de chaînes de PS sur des nanoparticules de titane. Pour ce faire, le styrène a été polymérisé à partir d'une ancre relativement sophistiquée comportant une fonction acide phosphonique et un motif dérivé du TEMPO préalablement immobilisé sur des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  (Figure III.22)

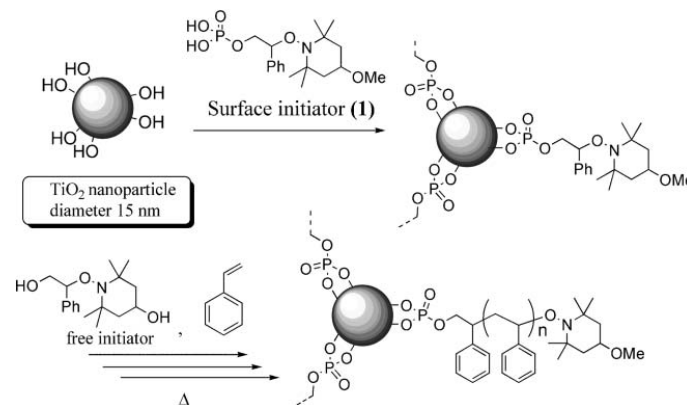


Figure III.22 : Fonctionnalisation de nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  par des brosses de PS à partir d'une alkoxyamine immobilisée [82]

### 3.3. Fonctionnalisation des surfaces de titane par la polymérisation RAFT

Etonnamment, la polymérisation RAFT n'a été que peu exploitée pour obtenir des polymères brosses sur le titane. Ceci est fort dommageable lorsque l'on sait que la polymérisation RAFT permet de polymériser une très grande gamme de monomères dans des conditions opératoires relativement douces, tout en s'affranchissant des systèmes de type métal/ligand. A notre connaissance, la littérature ne fait état que de sept articles traitant de la conception de polymères brosses parfaitement définis par polymérisation de type RAFT sur des surfaces de titane [83-89].

Lowes *et al.* [87] ont notamment exploité la polymérisation RAFT pour fonctionnaliser des nanoparticules de titane par des chaînes de PS en immobilisant un amorceur diazoïque sur des nanoparticules de  $\text{TiO}_2$  au moyen d'une ancre comportant une fonction acide carboxylique. De même, Hojjati et Charpentier [84-86] ont polymérisé l'acide acrylique et le



méthacrylate de méthyle à partir d'agent de transfert greffé sur des nanoparticules de titane via leur groupement R (Figure III.23).

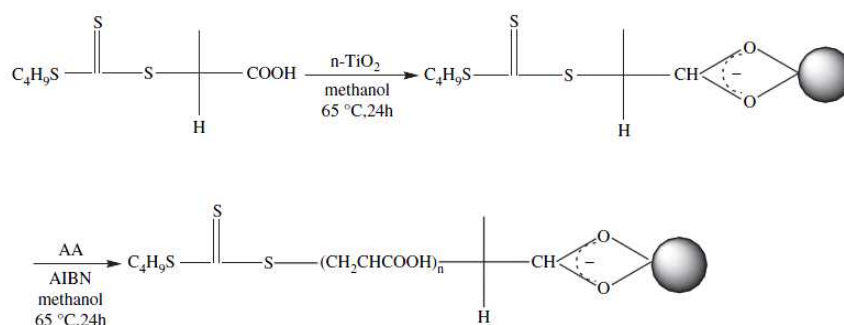


Figure III.23 : Elaboration de polymères brosses de poly(acide acrylique) à partir d'un dithiobenzoate immobilisé sur des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> [85]

Enfin, la seule stratégie mettant en jeu une polymérisation RAFT et l'utilisation d'une ancre de type catéchol a été développée par l'équipe de Zentel, l'objectif affiché étant de concevoir de nouveaux cristaux liquides [88-89]. Pour ce faire, un polymère dibloc, composé d'une part d'un bloc de méthacrylate de méthyle ou de 2-(méthoxyéthoxy)éthyle, et d'autre part d'un bloc d'acrylate de pentafluorophénol a été élaboré par polymérisation RAFT puis mis en contact avec un excès de dopamine pour conduire à la formation d'une « macroancre » (Figure III.24)

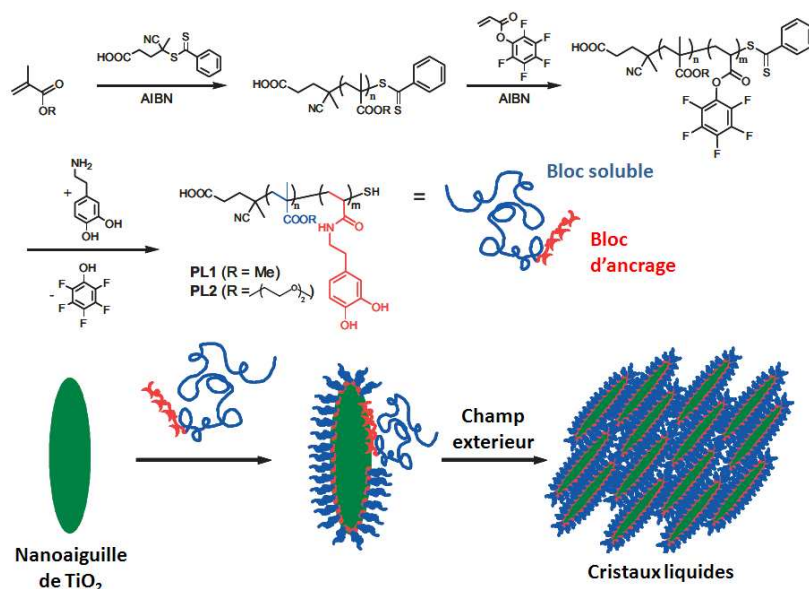


Figure III.24 : Synthèse de polymère dibloc comportant une macroancre à base de catéchols pour la fonctionnalisation de nanoaiguilles de TiO<sub>2</sub> [88]

## Références bibliographiques

- [1] M. Szwarc, 'living' polymers. *Nature* **1956**, 178 (4543), 1168-1169.
- [2] T. Higashimura et O. Kishiro, *Possible formation of living polymers of p-methoxystyrene by iodine*. *Polym. J.* **1977**, 9 (1), 87-93.
- [3] D. Takeuchi, A. Inoue, F. Ishimaru et K. Osakada, *Living ring-opening polymerization of 2-alkoxy-1-methylenecyclopropanes initiated by pd complexes*. *Macromolecules* **2008**, 41 (17), 6339-6346.
- [4] S. Hilf et A. F. M. Kilbinger, *Functional end groups for polymers prepared using ring-opening metathesis polymerization*. *Nat Chem* **2009**, 1 (7), 537-546.
- [5] J.-S. Wang et K. Matyjaszewski, *Controlled/"living" radical polymerization. Atom transfer radical polymerization in the presence of transition-metal complexes*. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117 (20), 5614-5615.
- [6] M. Kato, M. Kamigaito, M. Sawamoto et T. Higashimura, *Polymerization of methyl methacrylate with the carbon tetrachloride/dichlorotris-(triphenylphosphine)ruthenium(ii)/methylaluminum bis(2,6-di-tert-butylphenoxide) initiating system: Possibility of living radical polymerization*. *Macromolecules* **1995**, 28 (5), 1721-1723.
- [7] D. Curran, *The Design and Application of Free Radical Chain Reactions in Organic Synthesis*, *Synthesis* **1988**, 417-439.
- [8] M. S. Kharasch, E. V. Jensen et W. H. Urry, *Addition of carbon tetrachloride and chloroform to olefins*. *Science* **1945**, 102 (2640), 128.
- [9] K. Matyjaszewski, J.-L. Wang, T. Grimaud et D. A. Shipp, *Controlled/"living" atom transfer radical polymerization of methyl methacrylate using various initiation systems*. *Macromolecules* **1998**, 31 (5), 1527-1534.
- [10] T. Pintauer et K. Matyjaszewski, *Structural aspects of copper catalyzed atom transfer radical polymerization*. *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249 (11-12), 1155-1184.
- [11] X. Luo, X. Zhao, S. Xu et B. Wang, *The exo-substituted [eta]4-cyclopentadiene cpco(i) complexes: A new kind of atrp catalysts and the actual catalyst for the cobaltocene-catalyzed atrp*. *Polymer* **2009**, 50 (3), 796-801.
- [12] P. Lecomte, I. Drapier, P. Dubois, P. Teyssié et R. Jérôme, *Controlled radical polymerization of methyl methacrylate in the presence of palladium acetate, triphenylphosphine, and carbon tetrachloride*. *Macromolecules* **1997**, 30 (24), 7631-7633.
- [13] J. A. M. Brandts, P. van de Geijn, E. E. van Faassen, J. Boersma et G. van Koten, *Controlled radical polymerization of styrene in the presence of lithium molybdate(v) complexes and benzylic halides*. *J. Organomet. Chem.* **1999**, 584 (2), 246-253.

- [14] T. Opstal, J. Zedník, J. Sedláček, J. Svoboda, J. Vohlídal et F. Verpoort, *Atom transfer radical polymerization of styrene and methyl methacrylate induced by rhi(cycloocta-1,5-diene) complexes*. Collect. Czech. Chem. Commun. **2002**, 67 (12), 1858-1871.
- [15] S. H. Chan, L. S. M. Lam, C. W. Tse, K. Y. K. Man, W. T. Wong, A. B. Djurišić et W. K. Chan, *Photosensitivity of functional polystyrene and poly(methyl methacrylate) synthesized by controlled radical polymerization*. Macromolecules **2003**, 36 (15), 5482-5490.
- [16] H. Uegaki, Y. Kotani, M. Kamigaito et M. Sawamoto, *Nickel-mediated living radical polymerization of methyl methacrylate*<sup>1</sup>. Macromolecules **1997**, 30 (8), 2249-2253.
- [17] H. Bergenudd, M. Jonsson et E. Malmström, *Investigation of iron complexes in atrp: Indications of different iron species in normal and reverse atrp*. J. Mol. Catal. A: Chem. **2011**, 346 (1-2), 20-28.
- [18] G. Moad, E. Rizzardo et D. H. Solomon, *Selectivity of the reaction of free radicals with styrene*. Macromolecules **1982**, 15 (3), 909-914.
- [19] E. Rizzardo, Chem. Aust. **1987**, 54, 32-36.
- [20] Y. Miura, K. Hirota, H. Moto et B. Yamada, *High-yield synthesis of functionalized alkoxyamine initiators and approach to well-controlled block copolymers using them*. Macromolecules **1999**, 32 (25), 8356-8362.
- [21] K. Matyjaszewski, S. Gaynor, D. Greszta, D. Mardare et T. Shigemoto, *Synthesis of well defined polymers by controlled radical polymerization*. Macromol. Symp. **1995**, 98 (1), 73-89.
- [22] M. C. Iovu et K. Matyjaszewski, *Controlled/living radical polymerization of vinyl acetate by degenerative transfer with alkyl iodides*. Macromolecules **2003**, 36 (25), 9346-9354.
- [23] S. Perrier et P. Takolpuckdee, *Macromolecular design via reversible addition-fragmentation chain transfer (raft)/xanthates (madix) polymerization*. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. **2005**, 43 (22), 5347-5393.
- [24] G. Moad, E. Rizzardo et S. H. Thang, *Living radical polymerization by the raft process*. Aust. J. Chem. **2005**, 58 (6), 379-410.
- [25] Y. K. Chong, J. Krstina, T. P. T. Le, G. Moad, A. Postma, E. Rizzardo et S. H. Thang, *Thiocarbonylthio compounds [sc(ph)s-r] in free radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (raft polymerization). Role of the free-radical leaving group (r)*. Macromolecules **2003**, 36 (7), 2256-2272.
- [26] J. Chiefari, R. T. A. Mayadunne, C. L. Moad, G. Moad, E. Rizzardo, A. Postma et S. H. Thang, *Thiocarbonylthio compounds (sc(z)s-r) in free radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (raft polymerization). Effect of the activating group z*. Macromolecules **2003**, 36 (7), 2273-2283.
- [27] A. B. Lowe et C. L. McCormick, *Reversible addition-fragmentation chain transfer (raft) radical polymerization and the synthesis of water-soluble (co)polymers under homogeneous conditions in organic and aqueous media*. Prog. Polym. Sci. **2007**, 32 (3), 283-351.

- [28] M. A. Harvison, T. P. Davis et A. B. Lowe, *Macromolecular thiolysis of oxiranes: End-group modification of raft prepared homopolymers*. *Polym. Chem.* **2011**, 2 (6), 1347-1354.
- [29] Y. Mitsukami, M. S. Donovan, A. B. Lowe et C. L. McCormick, *Water-soluble polymers. 81. Direct synthesis of hydrophilic styrenic-based homopolymers and block copolymers in aqueous solution via raft*. *Macromolecules* **2001**, 34 (7), 2248-2256.
- [30] K. Chen, N. Grant, L. Liang, H. Zhang et B. Tan, *Synthesis of co2-philic xanthate-oligo(vinyl acetate)-based hydrocarbon surfactants by raft polymerization and their applications on preparation of emulsion-templated materials*. *Macromolecules* **2010**, 43 (22), 9355-9364.
- [31] J. T. Lai et R. Shea, *Controlled radical polymerization by carboxyl- and hydroxyl-terminated dithiocarbamates and xanthates*. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2006**, 44 (14), 4298-4316.
- [32] R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, Y. K. Chong, G. Moad et S. H. Thang, *Living radical polymerization with reversible addition-fragmentation chain transfer (raft polymerization) using dithiocarbamates as chain transfer agents*. *Macromolecules* **1999**, 32 (21), 6977-6980.
- [33] S. Jana et A. Parthiban, *Cyclic-amine-based dithiocarbamate chain transfer agents for the raft polymerization of less activated monomers*. *Macromol. Chem. Phys.* **2011**, 212 (8), 790-798.
- [34] R. T. A. Mayadunne, E. Rizzardo, J. Chiefari, J. Krstina, G. Moad, A. Postma et S. H. Thang, *Living polymers by the use of trithiocarbonates as reversible addition-fragmentation chain transfer (raft) agents: A triblock copolymers by radical polymerization in two steps*. *Macromolecules* **2000**, 33 (2), 243-245.
- [35] C. Zhang, Y. Zhou, Q. Liu, S. Li, S. b. Perrier et Y. Zhao, *Facile synthesis of hyperbranched and star-shaped polymers by raft polymerization based on a polymerizable trithiocarbonate*. *Macromolecules* **2011**, 44 (7), 2034-2049.
- [36] A. Favier, F. D'Agosto, M. T. Charreyre et C. Pichot, *Synthesis of n-acryloxysuccinimide copolymers by raft polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights*. *Polymer* **2004**, 45 (23), 7821-7830.
- [37] P. Relógio, M. T. Charreyre, J. P. S. Farinha, J. M. G. Martinho et C. Pichot, *Well-defined polymer precursors synthesized by raft polymerization of n,n-dimethylacrylamide/n-acryloxysuccinimide: Random and block copolymers*. *Polymer* **2004**, 45 (26), 8639-8649.
- [38] Z. Qin, W. Liu, L. Li, L. Guo, C. Yao et X. Li, *Galactosylated n-2-hydroxypropyl methacrylamide-b-n-3-guanidinopropyl methacrylamide block copolymers as hepatocyte-targeting gene carriers*. *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22 (8), 1503-1512.
- [39] R. Barbey, L. Lavanant, D. Paripovic, N. Schüwer, C. Sugnaux, S. Tugulu et H.-A. Klok, *Polymer brushes via surface-initiated controlled radical polymerization: Synthesis, characterization, properties, and applications*. *Chem. Rev.* **2009**, 109 (11), 5437-5527.
- [40] K. C. Caster, *Applications of polymer brushes and other surface-attached polymers*. In *Polymer brushes*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: **2005**; pp 329-370.
- [41] L. Li, W. Hu, L. Chi et H. Fuchs, *Polymer brush and inorganic oxide hybrid nanodielectrics for high performance organic transistors*. *J. Phys. Chem. B* **2010**, 114 (16), 5315-5319.

- [42] H. Ma, M. Wells, T. P. Beebe et A. Chilkoti, *Surface-initiated atom transfer radical polymerization of oligo(ethylene glycol) methyl methacrylate from a mixed self-assembled monolayer on gold*. *Adv. Funct. Mater.* **2006**, *16* (5), 640-648.
- [43] H. Ma, D. Li, X. Sheng, B. Zhao et A. Chilkoti, *Protein-resistant polymer coatings on silicon oxide by surface-initiated atom transfer radical polymerization*. *Langmuir* **2006**, *22* (8), 3751-3756.
- [44] X. Liu, Q. Ye, B. Yu, Y. Liang, W. Liu et F. Zhou, *Switching water droplet adhesion using responsive polymer brushes*. *Langmuir* **2010**, *26* (14), 12377-12382.
- [45] J. Bünsow, T. S. Kelby et W. T. S. Huck, *Polymer brushes: Routes toward mechanosensitive surfaces*. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *43* (3), 466-474.
- [46] W. J. Brittain et S. Minko, *A structural definition of polymer brushes*. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2007**, *45* (16), 3505-3512.
- [47] J. Marra et M. L. Hair, *Double-layer forces in nonadsorbing ionic micellar solution and polyelectrolyte solution*. *Colloids Surf.* **1989**, *34*, 215.
- [48] D. Guzonas, D. Boils et M. L. Hair, *Surface force measurements of polystyrene-block-poly(ethylene oxide) adsorbed from a nonselective solvent on mica*. *Macromolecules* **1991**, *24* (11), 3383-3387.
- [49] W. M. de Vos, G. Meijer, A. de Keizer, M. A. Cohen Stuart et J. M. Kleijn, *Charge-driven and reversible assembly of ultra-dense polymer brushes: Formation and antifouling properties of a zipper brush*. *Soft Matter* **2010**, *6* (11), 2499-2507.
- [50] S. Minko, *Grafting on solid surfaces: "Grafting to" and "grafting from" methods polymer surfaces and interfaces*. M. Stamm, Ed. Springer Berlin Heidelberg: **2008**; pp 215-234.
- [51] J. Sherrill, S. Michielsen et I. Stojilkovic, *Grafting of light-activated antimicrobial materials to nylon films*. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2003**, *41* (1), 41-47.
- [52] J. Hyun, Y. Zhu, A. Liebmman-Vinson, T. P. Beebe et A. Chilkoti, *Microstamping on an activated polymer surface: Patterning biotin and streptavidin onto common polymeric biomaterials*. *Langmuir* **2001**, *17* (20), 6358-6367.
- [53] Y. Tran et P. Auroy, *Synthesis of poly(styrene sulfonate) brushes*. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (16), 3644-3654.
- [54] A. Papra, N. Gadegaard et N. B. Larsen, *Characterization of ultrathin poly(ethylene glycol) monolayers on silicon substrates*. *Langmuir* **2001**, *17* (5), 1457-1460.
- [55] V. Koutsos, E. W. van der Vegte et G. Hadziioannou, *Direct view of structural regimes of end-grafted polymer monolayers: A scanning force microscopy study*. *Macromolecules* **1999**, *32* (4), 1233-1236.
- [56] J. Shan, M. Nuopponen, H. Jiang, T. Viitala, E. Kauppinen, K. Kontturi et H. Tenhu, *Amphiphilic gold nanoparticles grafted with poly(*n*-isopropylacrylamide) and polystyrene*. *Macromolecules* **2005**, *38* (7), 2918-2926.

- [57] A. Housni, Y. Zhao et Y. Zhao, *Using polymers to photoswitch the aggregation state of gold nanoparticles in aqueous solution*. *Langmuir* **2010**, 26 (14), 12366-12370.
- [58] I. Luzinov, D. Julthongpiput, H. Malz, J. Pionteck et V. V. Tsukruk, *Polystyrene layers grafted to epoxy-modified silicon surfaces*. *Macromolecules* **2000**, 33 (3), 1043-1048.
- [59] A. J. Inglis, S. Sinnwell, M. H. Stenzel et C. Barner-Kowollik, *Ultrafast click conjugation of macromolecular building blocks at ambient temperature*. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, 48 (13), 2411-2414.
- [60] A. Dag, H. Durmaz, U. Tunca et G. Hizal, *Multiarm star block copolymers via diels-alder click reaction*. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2009**, 47 (1), 178-187.
- [61] O. Gok, H. Durmaz, E. S. Ozdes, G. Hizal, U. Tunca et A. Sanyal, *Maleimide-based thiol reactive multiarm star polymers via diels-alder/retro diels-alder strategy*. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, 48 (12), 2546-2556.
- [62] T. Cai, K. G. Neoh et E. T. Kang, *Poly(vinylidene fluoride) graft copolymer membranes with "clickable" surfaces and their functionalization*. *Macromolecules* **2011**, 44 (11), 4258-4268.
- [63] J.-F. Lutz, H. G. Börner et K. Weichenhan, *Combining atom transfer radical polymerization and click chemistry: A versatile method for the preparation of end-functional polymers*. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, 26 (7), 514-518.
- [64] R.-V. Ostaci, D. Damiron, Y. Grohens, L. Léger et E. Drockenmuller, *Click chemistry grafting of poly(ethylene glycol) brushes to alkyne-functionalized pseudobrushes*. *Langmuir* **2009**, 26 (2), 1304-1310.
- [65] J. Draper, I. Luzinov, S. Minko, I. Tokarev et M. Stamm, *Mixed polymer brushes by sequential polymer addition: Anchoring layer effect*. *Langmuir* **2004**, 20 (10), 4064-4075.
- [66] M. Ejaz, S. Yamamoto, K. Ohno, Y. Tsujii et T. Fukuda, *Controlled graft polymerization of methyl methacrylate on silicon substrate by the combined use of the langmuir-blodgett and atom transfer radical polymerization techniques*. *Macromolecules* **1998**, 31 (17), 5934-5936.
- [67] M. Ejaz, Y. Tsujii et T. Fukuda, *Controlled grafting of a well-defined polymer on a porous glass filter by surface-initiated atom transfer radical polymerization*. *Polymer* **2001**, 42 (16), 6811-6815.
- [68] K. Ohno, Y. Kayama, V. Ladmiral, T. Fukuda et Y. Tsujii, *A versatile method of initiator fixation for surface-initiated living radical polymerization on polymeric substrates*. *Macromolecules* **2010**, 43 (13), 5569-5574.
- [69] K. Ohno, T. Morinaga, K. Koh, Y. Tsujii et T. Fukuda, *Synthesis of monodisperse silica particles coated with well-defined, high-density polymer brushes by surface-initiated atom transfer radical polymerization*. *Macromolecules* **2005**, 38 (6), 2137-2142.
- [70] P. Ye, H. Dong, M. Zhong et K. Matyjaszewski, *Synthesis of binary polymer brushes via two-step reverse atom transfer radical polymerization*. *Macromolecules* **2011**, 44 (7), 2253-2260.

- [71] Q. Ye, X. Wang, S. Li et F. Zhou, *Surface-initiated ring-opening metathesis polymerization of pentadecafluorooctyl-5-norbornene-2-carboxylate from variable substrates modified with sticky biomimic initiator*. *Macromolecules* **2010**, 43 (13), 5554-5560.
- [72] G. Raghuraman, J. Ruhe et R. Dhamodharan, *Grafting of pmma brushes on titania nanoparticulate surface via surface-initiated conventional radical and "controlled" radical polymerization (atrp)*. *J. Nanopart. Res.* **2008**, 10 (3), 415-427.
- [73] F. Zhang, F. J. Xu, E. T. Kang et K. G. Neoh, *Modification of titanium via surface-initiated atom transfer radical polymerization (atrp)*. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, 45 (9), 3067-3073.
- [74] J. E. Raynor, T. A. Petrie, K. P. Fears, R. A. Latour, A. s. J. Garca et D. M. Collard, *Saccharide polymer brushes to control protein and cell adhesion to titanium*. *Biomacromolecules* **2009**, 10 (4), 748-755.
- [75] B. Barthelmy, S. Devillers, I. Minet, J. Delhalle et Z. Mekhalif, *Induction heating for surface triggering styrene polymerization on titanium modified with atrp initiator*. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, 354 (2), 873-879.
- [76] M. N. Tchoul, S. P. Fillery, H. Koerner, L. F. Drummy, F. T. Oyerokun, P. A. Mirau, M. F. Durstock et R. A. Vaia, *Assemblies of titanium dioxide-polystyrene hybrid nanoparticles for dielectric applications*. *Chem. Mater.* **2010**, 22 (5), 1749-1759.
- [77] X. Fan, L. Lin et P. B. Messersmith, *Cell fouling resistance of polymer brushes grafted from ti substrates by surface-initiated polymerization: Effect of ethylene glycol side chain length*. *Biomacromolecules* **2006**, 7 (8), 2443-2448.
- [78] W. Wang, H. Cao, G. Zhu et P. Wang, *A facile strategy to modify tio2 nanoparticles via surface-initiated atrp of styrene*. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2010**, 48 (8), 1782-1790.
- [79] X. Fan, L. Lin et P. B. Messersmith, *Surface-initiated polymerization from tio2 nanoparticle surfaces through a biomimetic initiator: A new route toward polymer-matrix nanocomposites*. *Comp. Sci. Tech.* **2006**, 66 (9), 1198-1204.
- [80] M. J. Sever et J. J. Wilker, *Visible absorption spectra of metal-catecholate and metal-tironate complexes*. *Dalton Trans.* **2004**, (7), 1061-1072.
- [81] C. Gao, G. Li, H. Xue, W. Yang, F. Zhang et S. Jiang, *Functionalizable and ultra-low fouling zwitterionic surfaces via adhesive mussel mimetic linkages*. *Biomaterials* **2010**, 31 (7), 1486-1492.
- [82] R. Matsuno, H. Otsuka et A. Takahara, *Polystyrene-grafted titanium oxide nanoparticles prepared through surface-initiated nitroxide-mediated radical polymerization and their application to polymer hybrid thin films*. *Soft Matter* **2006**, 2 (5), 415-421.
- [83] X.-C. Che, Y.-Z. Jin et Y.-S. Lee, *Preparation of nano-tio2/polyurethane emulsions via in situ raft polymerization*. *Prog. Org. Coat.* **2010**, 69 (4), 534-538.
- [84] B. Hojjati et P. A. Charpentier, *Synthesis and kinetics of graft polymerization of methyl methacrylate from the raft coordinated surface of nano-tio2*. *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* **2008**, 46 (12), 3926-3937.

- [85] B. Hojjati et P. A. Charpentier, *Synthesis of tio2-polymer nanocomposite in supercritical co2 via raft polymerization*. *Polymer* **2010**, *51* (23), 5345-5351.
- [86] B. Hojjati, R. Sui et P. A. Charpentier, *Synthesis of tio2/paa nanocomposite by raft polymerization*. *Polymer* **2007**, *48* (20), 5850-5858.
- [87] B. Lowes, A. Bohrer, T. Tran et D. Shipp, *Grafting of polystyrene “from” and “through” surface modified titania nanoparticles*. *Polym. Bull.* **2009**, *62* (3), 281-289.
- [88] S. Meuer, K. Fischer, I. Mey, A. Janshoff, M. Schmidt et R. Zentel, *Liquid crystals from polymer-functionalized tio2 nanorod mesogens*. *Macromolecules* **2008**, *41* (21), 7946-7952.
- [89] S. Meuer, P. Oberle, P. Theato, W. Tremel et R. Zentel, *Liquid crystalline phases from polymer-functionalized tio2 nanorods*. *Adv. Mater.* **2007**, *19* (16), 2073-2078.



## SYNTHESE DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'ensemble des informations contenues dans cette étude bibliographique nous a permis d'aborder la problématique de la resténose, qui représente problème majeur de santé publique. Nous avons évoqué les problématiques liées aux traitements actuels, en particulier l'efficacité modérée des stents « actifs » de dernière génération. Les six stents « actifs » ayant obtenus un marquage CE fonctionnent tous sur le principe de la libération prolongée de principes actifs. Toutefois, l'efficacité de ces stents est limitée à la fois dans le temps et en termes d'efficacité. Afin d'améliorer les bénéfices thérapeutiques apportés par la fonctionnalisation de surface des stents, notamment pour limiter les phénomènes de resténose et de thrombose, de nombreux groupes de recherche travaillent actuellement sur la mise au point de nouveaux stents fonctionnalisés en surface par des drogues, soit en mettant au point des systèmes de relargage prolongé plus performants, soit par immobilisation directe des ces principes actifs sur le stent.

Cette thèse s'inscrit dans ce cadre et vise à concevoir des brosses de polymères incorporant des unités bioactives sur des surfaces à base de titane.

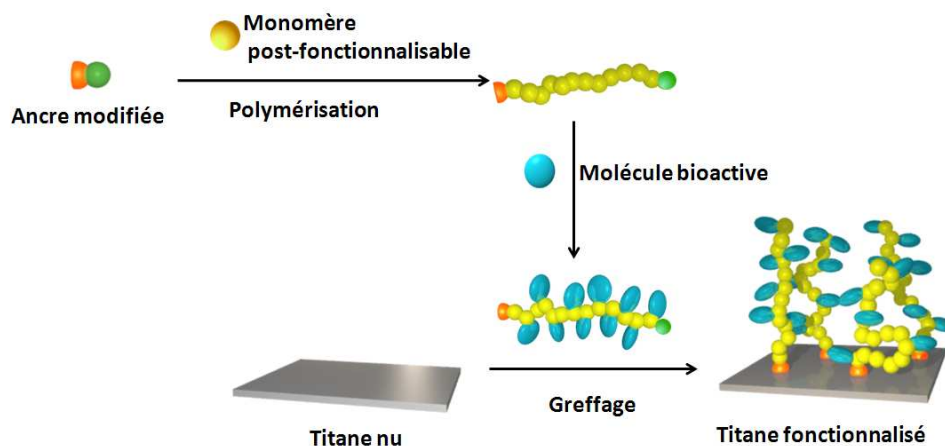


Figure : Stratégie de greffage de brosses de polymères incorporant des unités bioactives à la surface du titane

Comme mentionné précédemment, le stent est destiné à être placé dans un milieu extrêmement dynamique (flux sanguin), l'immobilisation des molécules bioactives doit donc faire intervenir des liaisons chimiques robustes. Nous avons tout naturellement choisi dans le cadre de cette thèse de greffer les polymères par l'intermédiaire d'une nouvelle ancre

chimique intégrant un motif catéchol et capable d'induire des polymérisations contrôlées. En effet, comme indiqué dans la partie bibliographique, l'efficacité de ce greffon a été démontré à maintes reprises et notamment pour modifier des surfaces de titane. En outre, le fait de pouvoir exploiter les propriétés électrochimiques de ce motif pour estimer les densités de greffage sans utiliser nécessairement des techniques d'imagerie est un atout majeur. Par ailleurs, il est impératif de pouvoir maîtriser la quantité de molécules actives greffées à la surface du matériau, afin de pouvoir en optimiser son efficacité. Dans ce cadre, une approche intéressante et souple consisterait à échafauder une plateforme polymère parfaitement définie que nous pourrions post-fonctionnaliser efficacement avec la molécule active choisie dans des proportions maîtrisées puis de l'immobiliser sur le support en titane (« grafting to »). De cette manière, il serait possible de faire fluctuer la quantité de molécules greffées sur le polymère et donc sur la surface. Cette stratégie permettrait également de changer d'agent thérapeutique si les essais biologiques ne sont pas concluants, sans avoir à recommencer l'intégralité du processus.

La technique de polymérisation que nous préconisons ici pour remplir ce cahier des charges est la polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT. En effet cette dernière permet à la fois de synthétiser des polymères de longueur maîtrisée avec des indices de polymolécularité proche de 1, mais surtout elle autorise l'emploi de monomères activés. L'objectif principal sera donc ici de montrer que des polymérisations de type RAFT peuvent être menées et contrôlées en présence d'un agent de transfert intégrant un motif catéchol. La maîtrise des paramètres moléculaires devrait nous permettre ainsi d'obtenir une fonctionnalisation homogène en surface et d'étudier l'impact de la longueur de la chaîne polymère sur les propriétés biologiques.

Ce projet, développé dans le cadre de la Fédération des Biomatériaux du Nord Pas de Calais, est nouveau dans notre laboratoire. Ainsi, avant de travailler sur des polymères parfaitement définis intégrant les motifs bioactives (glucosamines) notre premier objectif a été de montrer que des polymérisations de type RAFT, à partir de monomères plus communs (styrène, acrylate de *tert*-butyle, *N*-isopropylacrylamide) pouvaient être menées et contrôlées en présence d'un agent de transfert intégrant un motif catéchol. Une fois le concept validé, nous avons ensuite mis au point la synthèse de polymères activés incorporant des groupes partant *N*-hydroxysuccinimide et étudié leur réactivité en présence

de glucosamine. Les résultats concernant cette étude générale de faisabilité ont été regroupés dans le chapitre IV.

Dans une seconde phase, il s'agit de valider le choix de l'ancre catéchol pour le greffage. Pour ce faire, nous avons étudié l'immobilisation sur le titane des polymères précédemment synthétisés au moyen de différentes techniques d'analyses. Parmi celles-ci, l'infrarouge à réflexion totale atténuée (ATR) et la spectroscopie de photoélectrons X (XPS) nous donnerons une première évaluation de l'évolution des surfaces de titane en fonction des modifications par les polymères. La morphologie des surfaces modifiées sera estimée au moyen de la microscopie à force atomique (AFM). La signature électrochimique du catéchol a été également mise à profit pour démontrer la présence du fragment dopamine sur les surfaces. Enfin, une étude par résonance plasmonique de surface, nous permettra de mettre en avant l'efficacité de l'ancre sur le greffage des polymères sur le titane.

Par ailleurs, l'ancre catéchol sera également exploitée pour fonctionnaliser le titane en employant la stratégie « graft from », afin de et démontrer la polyvalence de ce système. En plus de la polymérisation de quelques monomères usuels (styrène, acrylate de *tert*-butyle, *N*-isopropylacrylamide), l'accent sera particulièrement mis sur la conception de brosses de poly(*N*-acryloyloxysuccinimide) et de sa post-fonctionnalisation directe en surface.

En marge de ces études de polymérisation, nous avons également voulu exploiter la réaction de Huisgen catalysée au Cu(I) à partir d'une nouvelle ancre chimique constituée d'un fragment catéchol et dotée d'une fonction azoture immobilisée sur le titane.

L'intégralité des études de la modification de surface de titane au moyen de l'ancre catéchol ont été rassemblées au sein du chapitre V.

Au cours du chapitre VI de ce manuscrit, nous présenterons les études biologiques réalisées sur les polymères fonctionnalisés par la glucosamine ainsi que celles des substrats de titane avant et après fonctionnalisation. Cette étude, réalisée en collaboration avec le Groupe de Recherche sur les Biomatériaux (GRB), permettra de mettre en évidence l'influence de paramètres, tels que le taux de fonctionnalisation de polymères en molécules bioactives, sur la vitalité et la prolifération de différentes lignées de cellules. Par ailleurs, des études d'hémocompatibilité ont également été réalisées

Le chapitre VII sera consacré à une méthode alternative de fonctionnalisation des substrats de titane. Cette étude, menée en partenariat avec l'équipe de Procédés d'Elaboration de Revêtements Fonctionnels, visera à pourvoir la surface du titane en fonctions amines primaires, enrichissant ainsi les possibilités de fonctionnalisation du titane. Cette fonctionnalisation sera réalisée par le biais de technologies utilisant les plasmas froids par deux méthodes. La première, utilisant un plasma radiofréquence, servira à greffer directement des fonctions amines sur le titane. La seconde utilisera la formation de films de polymères aminés au moyen d'une enceinte microonde pulsée, conçue et optimisée spécifiquement pour cette étude.

Enfin, nous conclurons l'ensemble de ces travaux en présentant les nouvelles et nombreuses perspectives qu'ils ont permis d'ouvrir.

# **DEUXIEME PARTIE**

## **DESCRIPTIF DES EXPERIENCES**



# **Chapitre IV**

**Elaboration par polymérisation RAFT de polymères parfaitement définis intégrant un motif catéchol en extrémité de chaîne**





## INTRODUCTION

L'objectif de ce chapitre est de décrire les synthèses et les caractérisations des différents polymères comprenant en extrémité de chaîne une ancre chimique de type catéchol.

Suite à l'étude bibliographique, la polymérisation RAFT a été retenue comme étant la méthode de polymérisation la mieux adaptée pour échafauder les polymères susmentionnés.

Après avoir synthétisé un agent de transfert RAFT comportant une ancre catéchol, une première étude décrira la synthèse de différents polymères « classiques » afin d'établir la faisabilité du processus. Ensuite, une plateforme polymère dotée du motif catéchol et incorporant sur sa partie latérale des fonctions esters activés, pouvant être post-fonctionnalisées sera élaborée.

Dans le cadre de cette étude, la glucosamine ( $\text{GluNH}_2$ ) a servi de molécule modèle pour étudier la faisabilité de cette post-fonctionnalisation. Notre choix s'est porté sur la glucosamine car cette unité glucosidique est présente dans la structure de nombreuses molécules d'intérêt biologiques comme par exemple des antithrombotiques (héparine).

### 1. Synthèse et caractérisation des polymères fonctionnalisés en extrémité de chaîne par un motif catéchol

#### 1.1. Synthèse et caractérisation des différents agents de transfert fonctionnalisés

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi de greffer sur le motif catéchol une fonction de type trithiocarbonate équipée d'un motif Z de type isobutyle (Figure IV.1). En effet, comme le montre la littérature, les agents CTA de type trithiocarbonate se révèlent être facile d'accès et permettent de polymériser de manière contrôlée, sans altérer les fonctions annexes du CTA, aussi bien le styrène et ses dérivés, que les monomères acryliques et acrylamides [1]. De plus, l'innocuité des polymères préparés à partir d'agent de transfert trithiocarbonate vis-à-vis notamment de cellules a très récemment été décrite. En effet, Pissuwan *et al.* [2] ont démontré que les groupements trithiocarbonates étaient non-toxiques pour des lignées de cellules CHO-K1, Raw264.7, et NIH3T3. Enfin, les travaux réalisés par l'équipe de Winnik [3] ont démontré la « neutralité » du motif isobutyle vis-à-vis

des phénomènes de micellisation en milieu aqueux. Ces derniers peuvent être en effet problématiques lors de l'étape de greffage de nos polymères sur la surface du titane.

L'agent de transfert **CTA3**, porteur de la fonction catéchol, a été préparé en deux étapes par réaction de l'agent de transfert activé **CTA2** [4], préparé à partir de l'acide **CTA1** correspondant, avec le chlorhydrate de dopamine commercial en présence de triéthylamine (Figure IV.1). Afin de démontrer ultérieurement le rôle clé joué par le motif catéchol dans le processus de greffage des polymères sur les surfaces de titane, nous avons également élaboré l'agent de transfert **CTA4** doté d'un groupe benzyle, en mettant en œuvre un couplage activé par le *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide entre le **CTA1** et l'alcool benzylique.

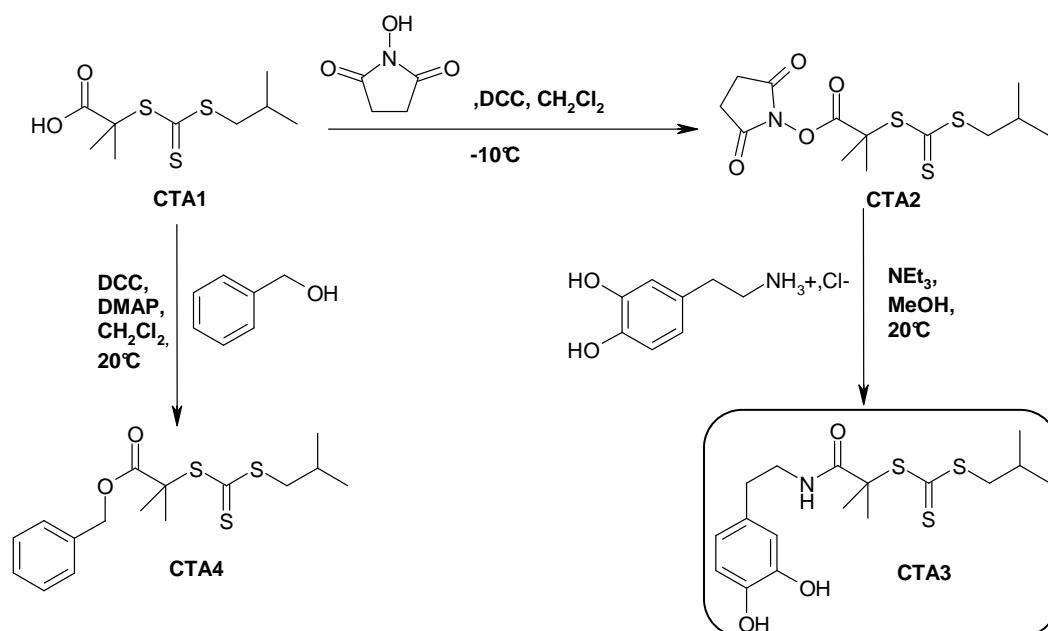


Figure IV.1 : Synthèse des agents de transfert de chaînes **CTA2**, **CTA3** et **CTA4**

Les dérivés **CTA2**, **CTA3** et **CTA4** ont été obtenus avec de bons rendements compris entre 70 et 90%. Les structures des différents agents de transfert **CTA1**, **CTA2**, **CTA3** et **CTA4** ont été élucidés par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Les spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  de l'agent de transfert **CTA3** ont été répertoriés dans la Figure IV.2. Les spectres correspondants aux autres agents de transfert sont décrits en partie expérimentale.

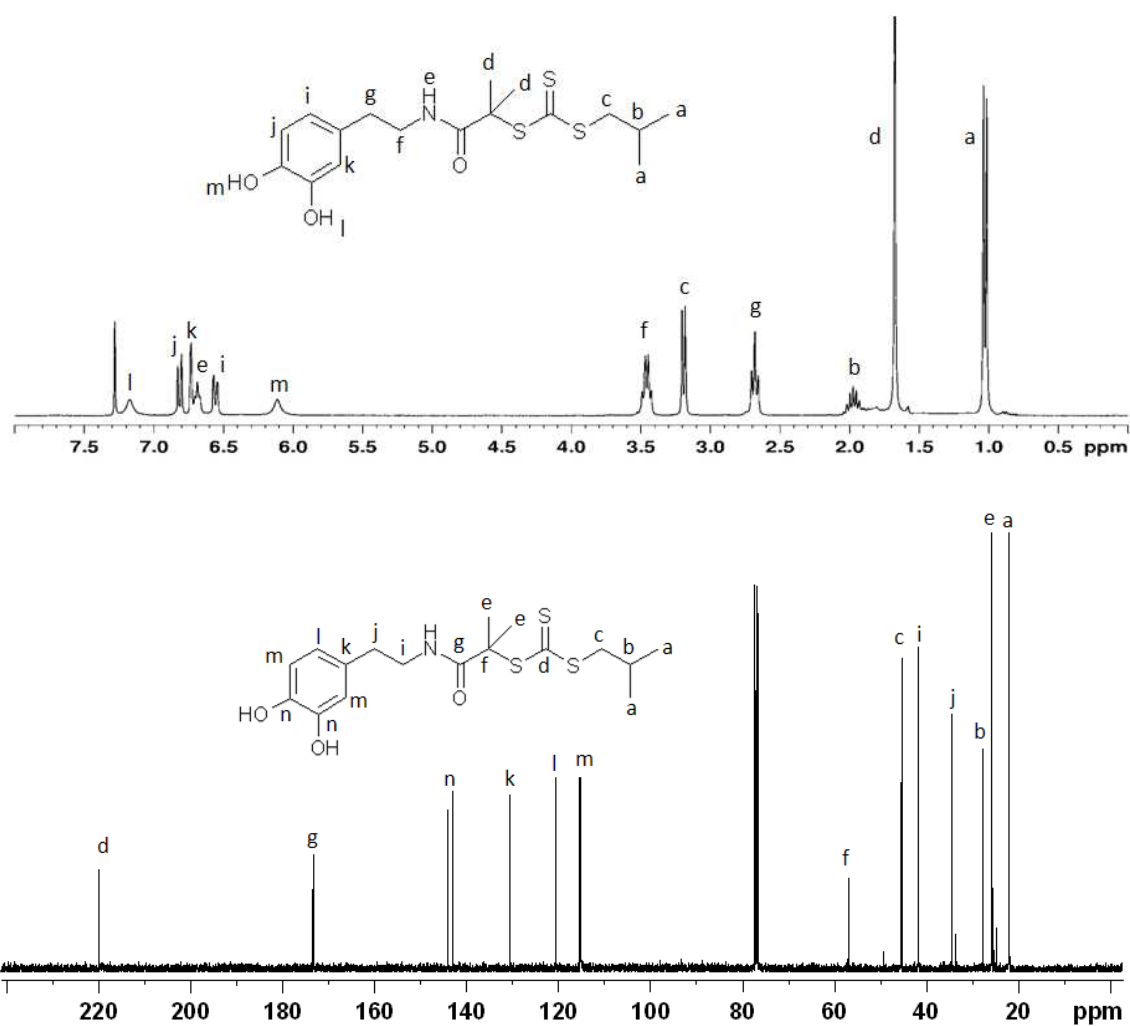


Figure IV.2 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  enregistrés dans le  $\text{CDCl}_3$  de l'agent de transfert **CTA3**

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  permet d'identifier sans ambiguïté les protons portés par le fragment trithiocarbonyle à  $\delta_a = 0,89$  ppm ;  $\delta_b = 1,85$  ppm ;  $\delta_c = 3,09$  ppm, ainsi que les résonances des protons aromatiques du fragment catéchol ( $\delta_i = 6,47$  ppm ;  $\delta_j = 6,73$  ppm ;  $\delta_k = 6,65$  ppm ;  $\delta_l = 6,1$  ppm ;  $\delta_m = 7,15$  ppm ). Le spectre RMN  $^{13}\text{C}$  témoigne également de la présence de la fonction trithiocarbonyle ( $\delta_{\text{C-S}} \approx 220$  ppm) et de la fonction ester ( $\delta_{\text{C=O}} \approx 175$  ppm).

## 1.2. Polymérisation RAFT contrôlées par les agents de transfert CTA3 et CTA4

Suite à la synthèse des agents **CTA3** et **CTA4**, nous avons ensuite évalué leur capacité à contrôler les polymérisations de monomères usuels comme le styrène (S), l'acrylate de *tert*-butyle (*t*BA) et le *N*-isopropylacrylamide (NIPAM). Cette étude a plus particulièrement consisté à optimiser les conditions de polymérisation afin d'obtenir des polymères parfaitement définis dans une gamme de masse molaire maîtrisée.

### 1.2.1. Polymérisations RAFT en présence de l'agent de transfert CTA3

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la polymérisation RAFT du NIPAM, du *t*BA et du styrène en présence de l'agent **CTA3**. Les cinétiques de polymérisation ont été suivies par RMN <sup>1</sup>H pour déterminer les taux de conversions et par chromatographie d'exclusion stérique (GPC) pour mesurer les masses molaires moyennes en nombre *M*<sub>n</sub> et les indices de polymolécularité *I*<sub>p</sub>. Pour cela, des prélèvements sont effectués dans les milieux réactionnels à intervalles réguliers. Les conditions opératoires pour chaque monomère ont été répertoriées dans le Tableau IV.1.

Tableau IV.1 : Paramètres de polymérisation utilisés pour le NIPAM, le *t*BA et le styrène

Monomère	Solvant	[M]/[CTA3]/[AIBN]	Température
NIPAM	DMF	100/1/0,1	75°C
<i>t</i> BA	Toluène	100/1/0,05	75°C
Styrène	Toluène	150/1/0,3	80°C

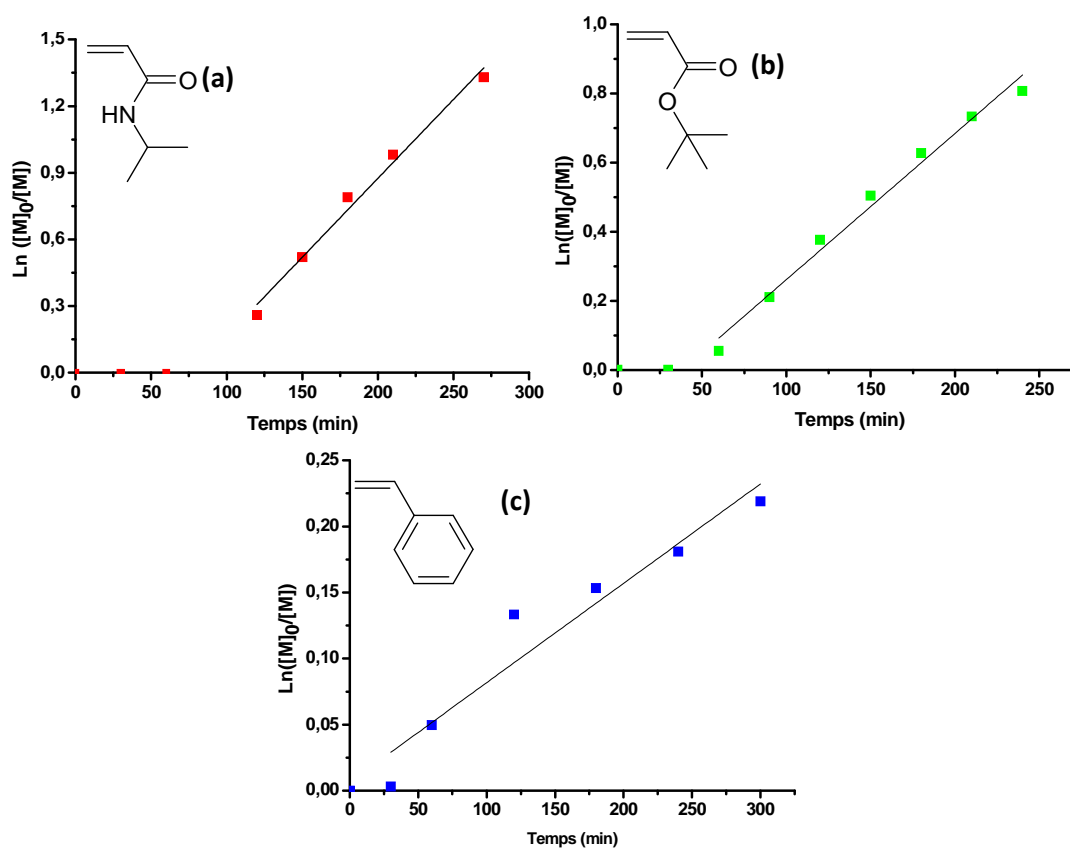


Figure IV.3 : Evolution du  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction du temps lors de la polymérisation RAFT du NIPAM (a), du *t*BA (b) et du styrène (c)

Les trois courbes présentées dans la Figure IV.3 montrent, selon une échelle semi-logarithmique, l'évolution de la conversion du monomère en fonction du temps de réaction. Les trois courbes montrent, après un temps d'inhibition compris entre 30 et 60 minutes [5-6], une partie linéaire indiquant une concentration en espèces radicalaires constante au cours du temps.

En outre, les masses moyennes en nombre (Figure IV.4) évoluent, pour l'ensemble des monomères, de façon croissante et linéaire jusqu'à des taux de conversion de 55% pour le *t*BA, 80% pour le NIPAM et 20% pour le styrène.

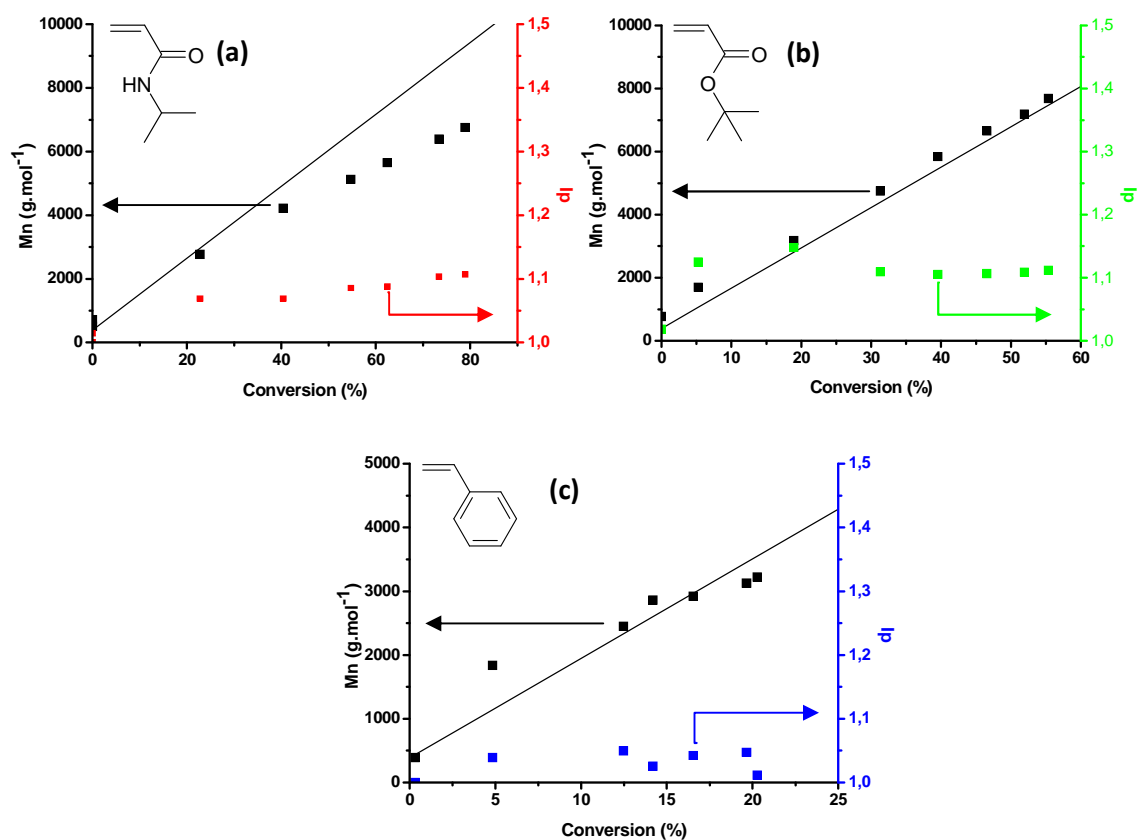


Figure IV.4 : Evolution des masses molaires  $M_n$  et des indices de polymolécularité en fonction de la conversion lors de la polymérisation du NIPAM **(a)** du *t*BA **(b)** et du styrène **(c)**

Dans le cas de la polymérisation du PNIPAM, une déviation de pente est cependant visible pour les plus hauts taux de conversion par rapport à la droite théorique. Ce comportement met en évidence des réactions de transferts irréversibles, peu nombreuses, puisque les indices de polymolécularité restent faibles. En effet, comme indiqué dans la Figure IV.4, les analyses GPC des différents polymères isolés indiquent des indices  $I_p$  inférieurs à 1,2.

Il ressort ainsi de ces différentes études cinétiques que le nouvel agent de transfert **CTA3** intégrant le motif catéchol est apte à contrôler des polymérisations RAFT avec des monomères dits classiques.

Les polymères ont été également caractérisés par RMN  $^1\text{H}$ . Les spectres RMN  $^1\text{H}$  des polymères **CTA3-PNIPAM**, **CTA3-PtBA** et **CTA3-PS** sont représentés dans la Figure IV.5 ci-dessous.

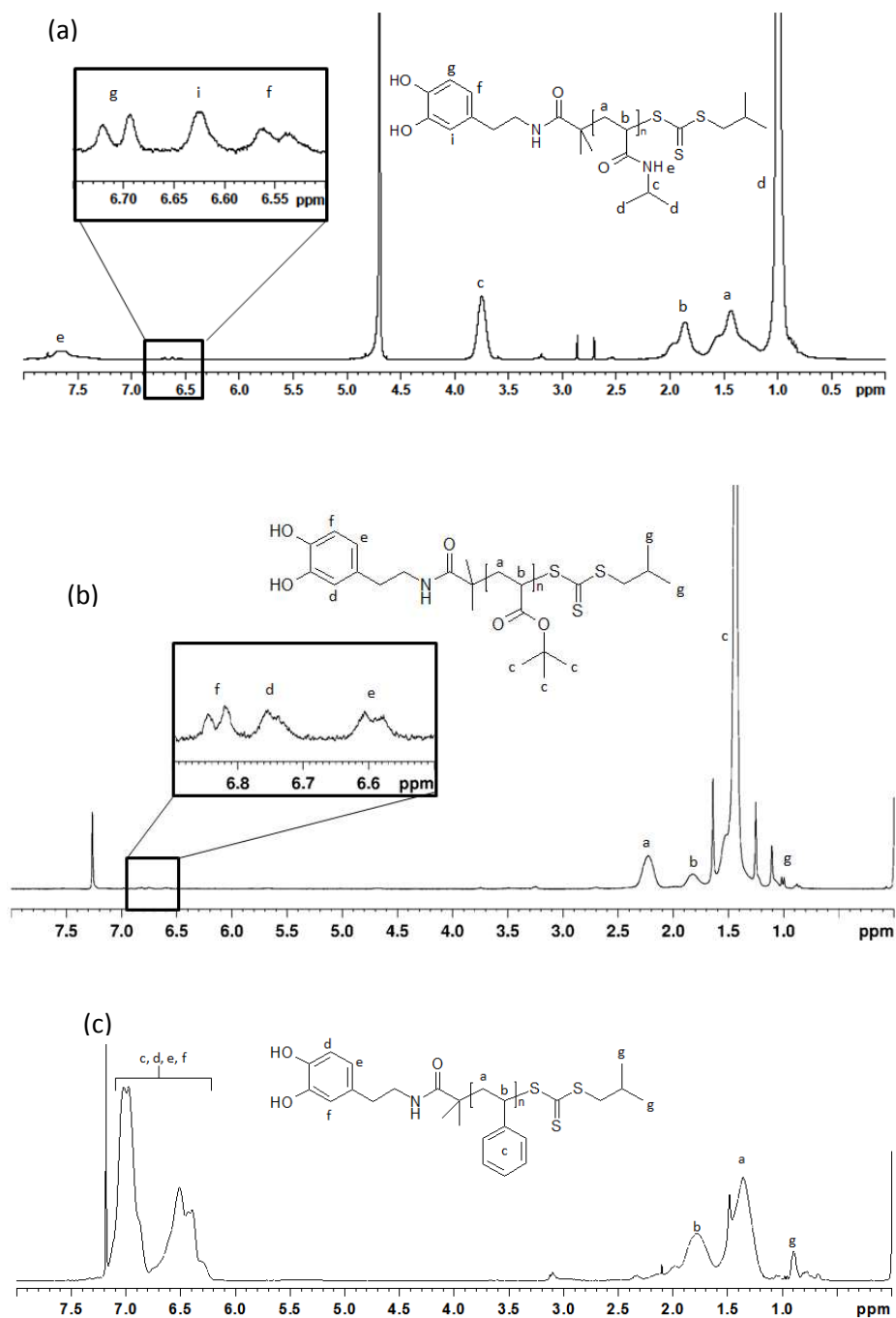


Figure IV.5 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des polymères de **CTA3-NIPAM** (a) (Solvant  $\text{D}_2\text{O}$ ), **CTA3-PtBA** (b) et **CTA3-PS** (c) (Solvant  $\text{CDCl}_3$ )

Sur chaque spectre RMN, les signaux caractéristiques des protons des différents motifs répétitifs sont facilement observables. A titre d'exemple, pour le **CTA3-PNIPAM** (Figure IV.5.a.), les protons caractéristiques de la chaîne polymère H<sub>a</sub>, H<sub>b</sub> et du groupe butyle H<sub>c</sub> et H<sub>d</sub> résonnent respectivement à  $\delta = 1,25-1,7$ ,  $1,7-2,1$ ,  $0,8-1,1$ , et  $3,6-4,9$  ppm. L'analyse spectrale des polymères met aussi en évidence la présence du groupe de protons aromatiques caractéristiques du fragment catéchol résonnants entre 6,5 et 6,9 ppm. En intégrant les signaux des protons aromatiques du motif catéchol et de la chaîne polymère, la masse molaire moyenne en nombre a pu être calculée (Équation IV.1) (**CTA3-PNIPAM**  $Mn_{RMN} = 12\ 500\text{ g.mol}^{-1}$ , **CTA3-PtBA**  $Mn_{RMN} = 11\ 000\text{ g.mol}^{-1}$ ). Dans le cas du **CTA3-PS** (Figure IV.5.c), les signaux du motif catéchol étant confondus, avec les protons aromatiques du styrène, la masse molaire du **CTA3-PS** ( $Mn_{RMN} = 5\ 000\text{ g.mol}^{-1}$ ) a été évaluée en utilisant l'intégration des protons H<sub>g</sub> du fragment isobutyle.

$$Mn_{RMN} = \frac{I_{pol}/n_{pol}}{I_{CTA}/n_{CTA}} \times M_{mono} + M_{CTA}$$

$Mn_{RMN}$	Masse molaire moyenne en nombre estimée par RMN
$I_{pol}$	Intégration du signal d'un groupe de protons du polymère
$n_{pol}$	nombre de protons correspondant à $I_{pol}$ .
$I_{CTA}$	Intégration du signal d'un groupe de proton de l'agent de transfert
$n_{CTA}$	nombre de protons correspondant à $I_{CTA}$
$M_{mono}$	Masse molaire du monomère
$M_{CTA}$	Masse molaire de l'agent de transfert

Équation IV.1 : Calcul de la masse moyenne en nombre par RMN pour les polymères synthétisés avec CTA3

Dans le cas du **CTA3-PS**, les masses molaires  $Mn_{RMN}$  et  $Mn_{GPC}$  sont identiques. Les masses molaires moyennes  $Mn$  calculées par RMN sont supérieures à celles mesurées par GPC pour le **CTA3-PNIPAM** et le **CTA3-PtBA**. Cette différence provient du fait que la chromatographie GPC est calibrée à l'aide de standards polystyrènes.

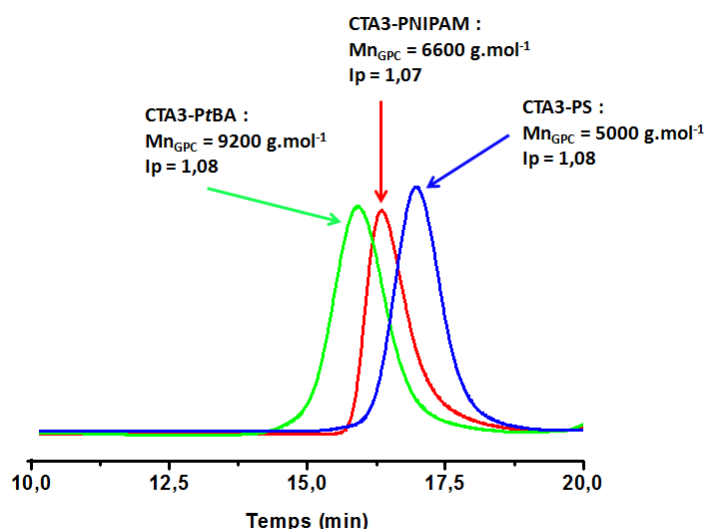


Figure IV.6 : Tracés GPC des polymères obtenus après le procédé RAFT au moyen de l'agent de transfert **CTA3**. Phase mobile : THF (40°C, 1 ml.min<sup>-1</sup>), détecteur : réfractomètre, calibration : standards polystyrènes.

Les pics caractéristiques du groupe Z du trithiocarbonate du **CTA3-PNIPAM** et **CTA3-PtBA** sont en général très difficilement identifiables par RMN, car ils se trouvent englobés dans les signaux de la chaîne hydrocarbonée du polymère ( $\delta = 0,9-3$  ppm). Afin de démontrer la présence du groupe Z sur la chaîne polymère, une étude par spectrophotométrie UV-visible a ensuite été réalisée (Figure IV.7). Cette étude a, plus particulièrement, consisté à enregistrer les spectres UV-Visible des polymères **CTA3-PNIPAM**, **CTA3-PtBA** et **CTA3-PS** et à les comparer à celui obtenu pour le **CTA1**. Les différents spectres UV-visibles ont été répertoriés dans la Figure IV.7 et prouvent sans ambiguïté la présence de la bande d'absorption centrée sur 310 nm caractéristique de la fonction trithiocarbonate.

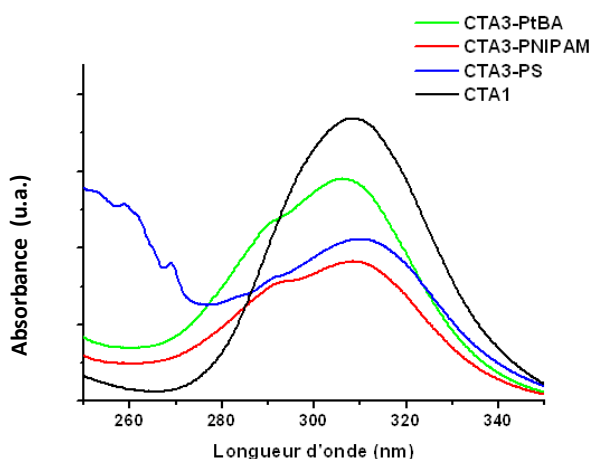


Figure IV.7 : Spectres UV-Vis des polymères **CTA3-PtBA** (solvant : CH<sub>3</sub>CN), **CTA3-PNIPAM** (solvant : CH<sub>3</sub>CN), **CTA3-PS** (solvant :CH<sub>3</sub>CN/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 :1)) et **CTA1** (MeOH). Les spectres ont été enregistrés à 10<sup>-4</sup> mol.l<sup>-1</sup> et à 20°C.



Afin de démontrer qualitativement la présence du motif catéchol au sein des chaînes de polymères **CTA3-PtBA**, **CTA3-PNIPAM** et **CTA3-PS**, nous avons exploité sa signature électrochimique caractéristique par voltampérométrie cyclique.

Le comportement électrochimique des polymères **CTA3-PtBA** ( $Mn_{GPC} = 10\ 000\ g.mol^{-1}$ ,  $I_p = 1,22$ ) et **CTA3-PNIPAM** ( $Mn_{GPC} = 7\ 500\ g.mol^{-1}$ ,  $I_p = 1,10$ ) a été étudié dans l'acétonitrile. Pour des raisons de solubilité, le polymère **CTA3-PS** ( $Mn_{GPC} = 5\ 000\ g.mol^{-1}$ ,  $I_p = 1,08$ ) a été pour sa part étudié dans un mélange dichlorométhane/acétonitrile (1/1). L'électrolyte support employé pour les mesures est le  $Bu_4NPF_6$  ( $0,05\ mol.l^{-1}$ ) (Figure IV.8).

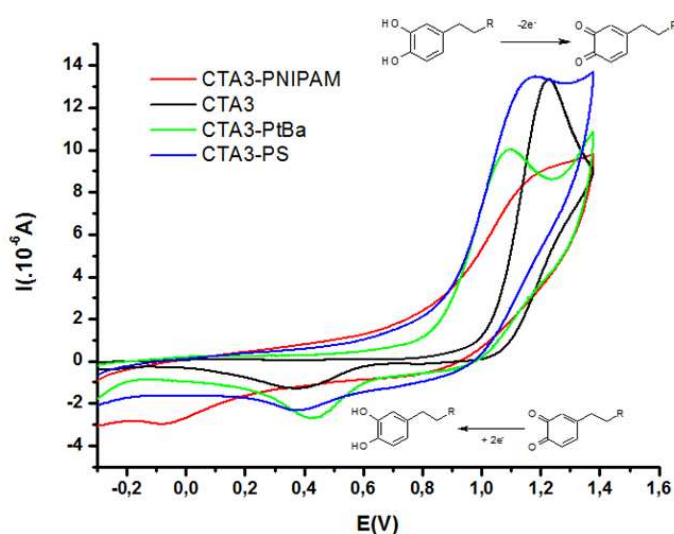


Figure IV.8 : Voltampérogrammes cycliques de l'agent de transfert **CTA3** et des polymères dans l'acétonitrile (**CTA3**, **CTA3-PNIPAM**, **CTA3-PtBa**) et dans  $CH_3CN/CH_2Cl_2$  (**CTA3-PS**). Electrode de référence Ag/AgCl. Electrode de travail en platine. Vitesse de balayage  $50\ mV.s^{-1}$ . Concentration des solutions  $C = 1.10^{-3}\ mol.l^{-1}$

Pour les trois polymères synthétisés en présence de l'agent de transfert **CTA3**, une vague d'oxydation, correspondant à l'oxydation du motif catéchol en quinone, est observée aux alentours de 1,20V. La vague de réduction de la quinone en catéchol est quant à elle visible vers 0,4V.

Les vagues d'oxydation et de réduction des polymères **CTA3-PtBA** et **CTA3-PS** se trouvent sensiblement au même niveau que celles observées pour l'agent de transfert **CTA3** seul, montrant ainsi que ces chaînes polymères n'ont pas d'impact sur les propriétés électrochimiques du catéchol. En revanche, un décalage et un écrasement de la vague d'oxydation est observée dans le cas du **CTA3-PNIPAM**. Ce phénomène a déjà été observé avec d'autres molécules électroactives [7] et aurait pour origine l'existence d'interactions entre les espèces oxydées du catéchol et la chaîne **PNIPAM**.

### 1.2.2. Polymérisations RAFT en présence de l'agent de transfert **CTA4**

Nous nous sommes ensuite intéressés à la polymérisation du NIPAM, du *t*BA et du styrène en présence de l'agent de transfert **CTA4**. Le motif benzyle ne présentant pas d'interactions spécifiques avec les surfaces de titane, les polymères issus de ces synthèses seront utilisés pour réaliser des expériences contrôles lors de l'état de greffage (chapitre V). Les conditions opératoires sont les mêmes que celles utilisées pour élaborer les polymères en présence du **CTA3** (Tableau IV.1).

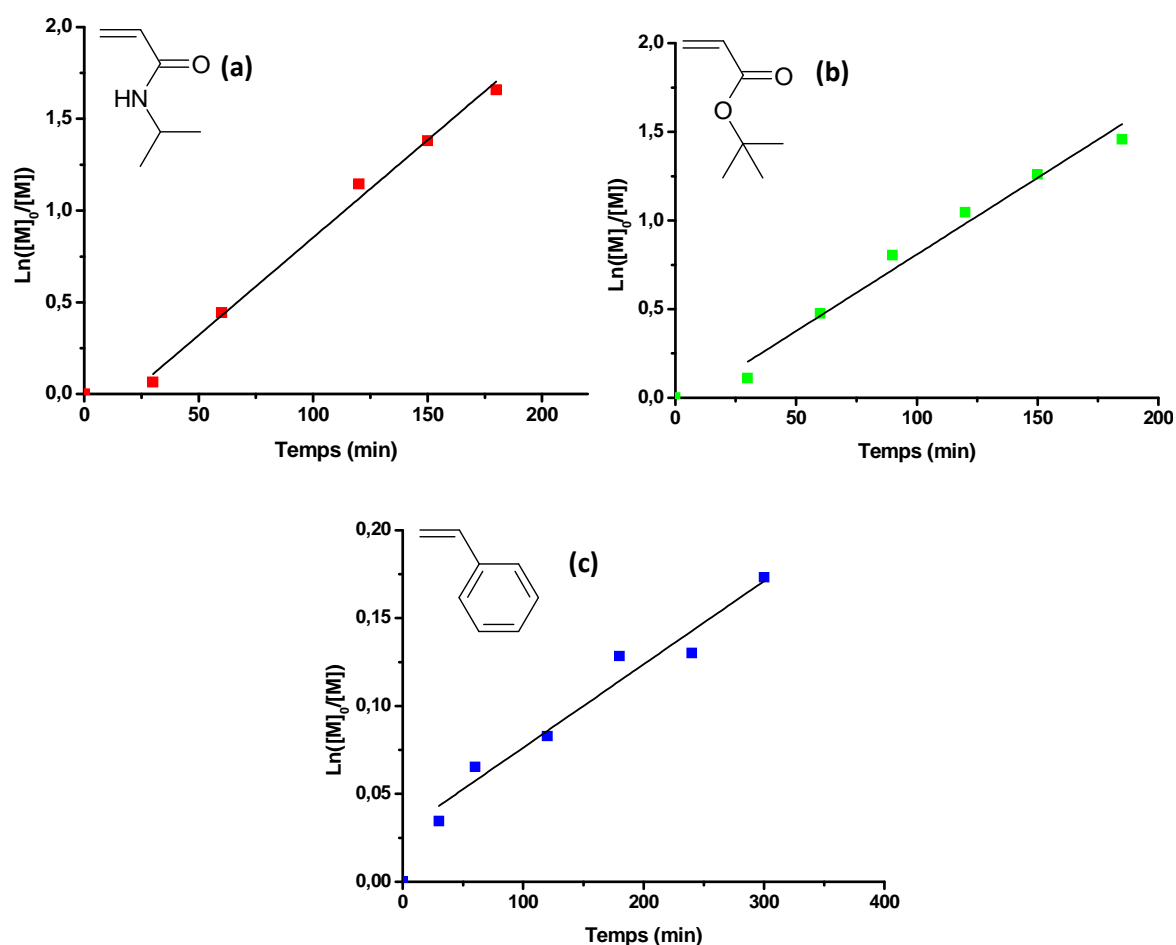


Figure IV.9 : Evolutions du  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction du temps pour le NIPAM (a), le *t*BA (b) et le styrène (c)

Les suivis cinétiques de polymérisation du NIPAM, du *t*BA et du styrène (Figure IV.9) montrent une linéarité durant la polymérisation, ce qui indique que la concentration en espèces radicalaires est constante au cours du temps.

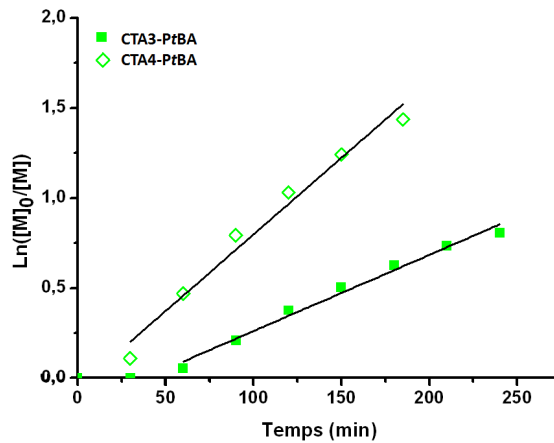


Figure IV.10 : Comparaison des polymérisations du tBA en fonction de l'agent de transfert employé (**CTA3** et **CTA4**)

D'un point de vue cinétique, la polymérisation est plus rapide en utilisant l'agent de transfert **CTA4** que **CTA3** (Figure IV.10), les autres paramètres de polymérisation étant identiques. La partie catéchol de l'agent **CTA3** peut donc avoir un léger effet inhibiteur, d'autant que la période de latence est plus importante qu'avec l'agent fonctionnalisé par le fragment benzyle.

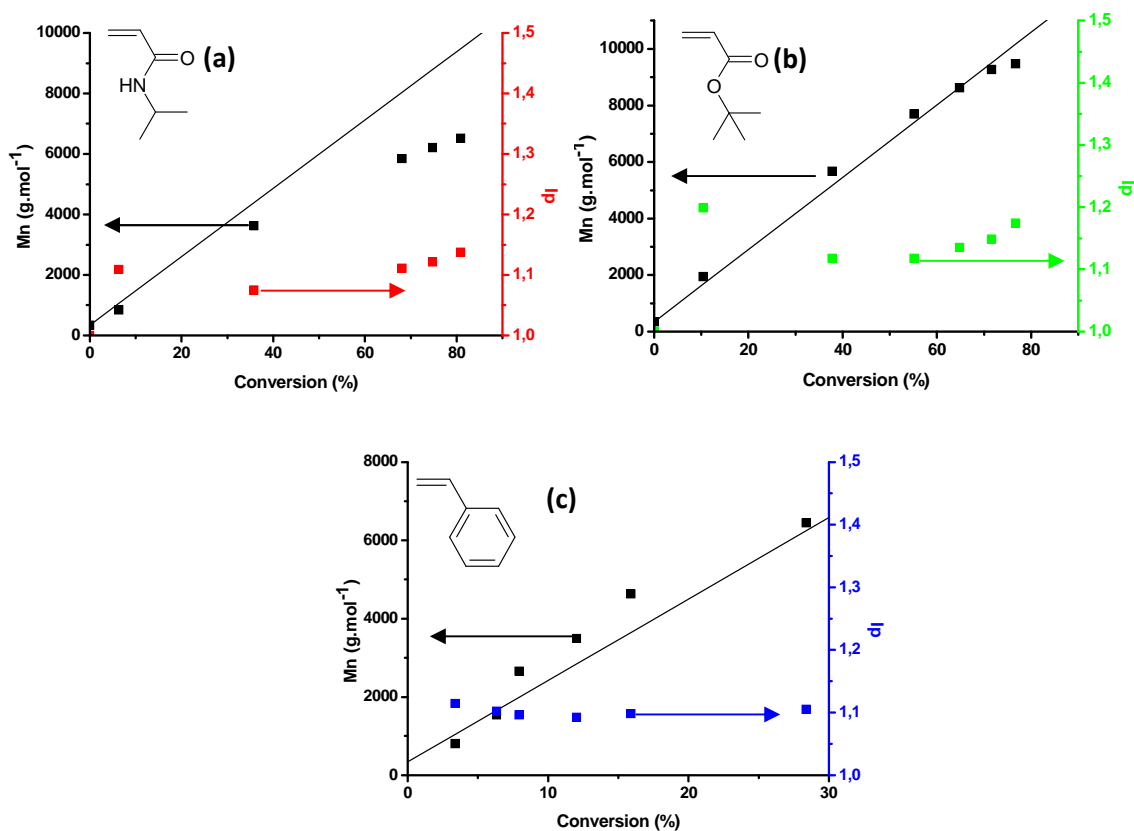


Figure IV.11 : Evolution de la masse molaire moyenne en nombre  $M_n$  et de l'indice de polymolécularité  $I_p$  en fonction de la conversion pour le NIPAM **(a)**, le tBA **(b)** et le styrène **(c)**

Sur la Figure IV.11, les indices de polymolécularité restent faibles, et les masses molaires  $M_n$  croissent de manière linéaire avec le taux de conversion. Le **CTA4** permet donc également de contrôler des polymérisations radicalaires de type RAFT de ces monomères. Les polymères, une fois précipités et séchés, ont été analysés par RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.12)

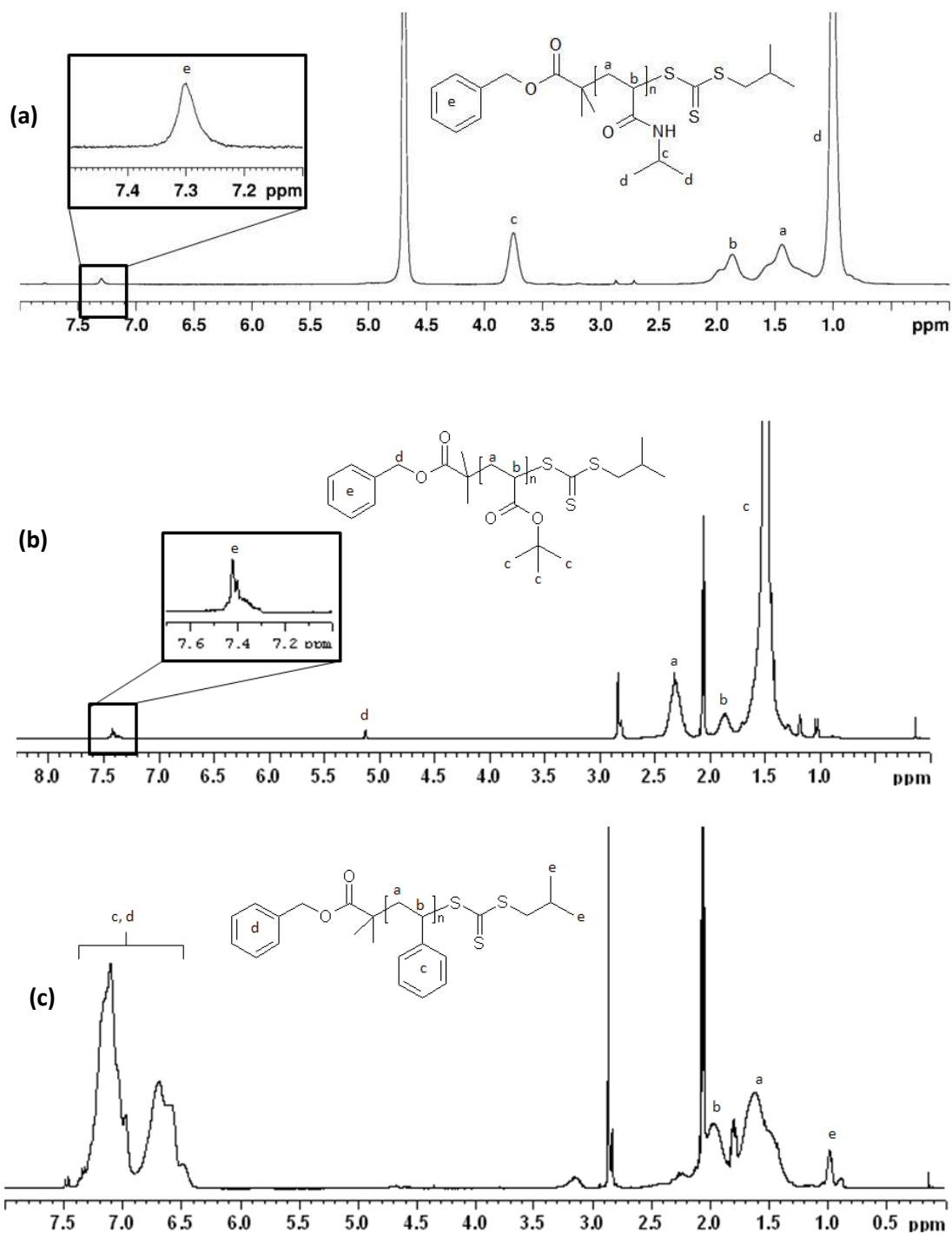


Figure IV.12 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  du **CTA4-PNIPAM** (a) (Solvant :  $\text{D}_2\text{O}$ ), **CTA4-PtBA** (b) et du **CTA4-PS** (c) (Solvant :  $\text{acétone-}d_6$ )

Chaque spectre RMN présente les signaux caractéristiques des protons des différents motifs de répétition. Par exemple, sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  du **CTA4-PtBA** (Figure IV.12.b), les protons du squelette polymère  $\text{H}_a$  et  $\text{H}_b$  et du groupement *tert*-butyle  $\text{H}_c$  résonnent respectivement à  $\delta = 2,19\text{-}2,42$ ,  $1,95\text{-}1,77$  et  $1,70\text{-}1,32$  ppm. Les spectres du proton révèlent également pour le **CTA4-PNIPAM** et le **CTA4-PtBA** la présence des protons aromatiques localisés sur le fragment benzylique de l'agent de transfert, qui résonnent entre 7,2 et 7,5 ppm. Ces signaux ne sont pas visibles dans le cas du **CTA4-PS**, car ils se confondent avec ceux des protons aromatiques du styrène. Comme dans le cas du **CTA3-PS**, ce sont en conséquence le signal des protons  $\text{H}_e$  du fragment isobutyle de l'agent de transfert ( $\delta = 0,9$  ppm) qui ont été utilisés pour calculer la masse molaire  $M_{n,\text{RMN}}$ .

Les masses molaires moyennes en nombre des polymères **CTA4-PNIPAM** et **CTA4-PtBA** et **CTA4-PS** ont été ainsi estimées à respectivement 13 500, 15 000 et 6 500  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Équation IV.1). Comme dans le cas des polymères obtenus à l'aide de l'agent **CTA3**, les masses molaires  $M_{n,\text{RMN}}$  de **CTA4-PNIPAM** et de **CTA4-PtBA** sont supérieures à celles estimées par GPC et (Figure IV.13).

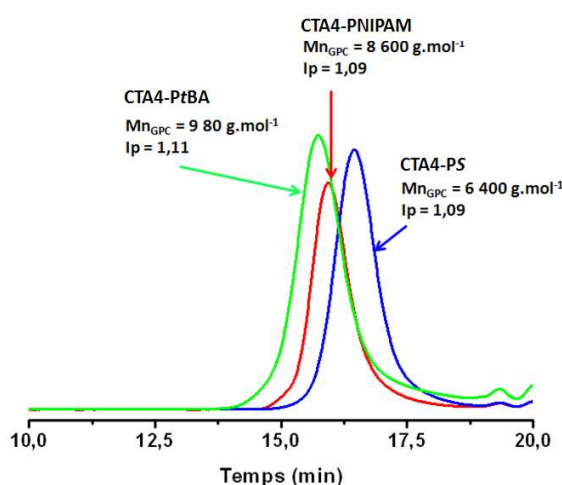


Figure IV.13 : Chromatogrammes GPC des polymères obtenus après le procédé RAFT au moyen de l'agent de transfert **CTA4**. Phase mobile : THF ( $40^\circ\text{C}$ ,  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ), détecteur : réfractomètre, calibration : standards polystyrènes.

### 1.3. Synthèse, caractérisation et post-fonctionnalisation de polymères d'esters activés préparés par RAFT à partir des agents de transfert CTA3 et CTA4

Après avoir démontré le potentiel de la procédure RAFT pour concevoir des polymères dits "classiques" parfaitement définis et intégrant en extrémité de chaîne une ancre catéchol,

nous avons ensuite envisagé, pour l'application visée, de concevoir une plateforme polymère parfaitement définie et facilement post-fonctionnalisable par des molécules d'intérêt biologique.

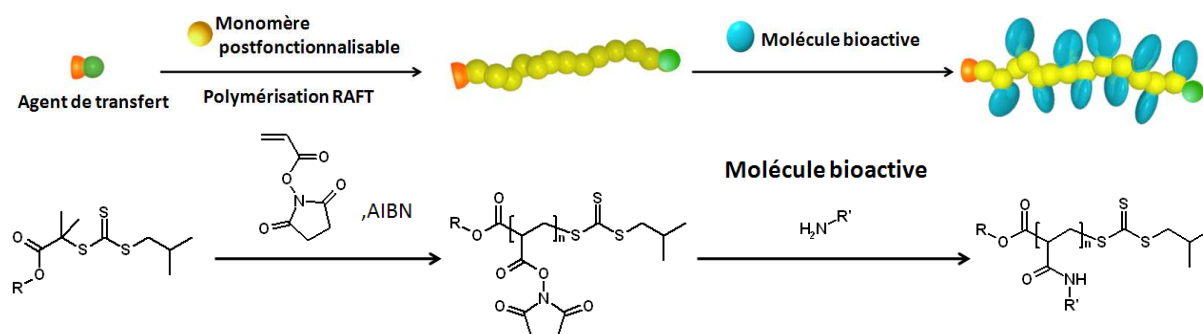


Figure IV.14 : Synthèse des polymères bioactifs

Dans cette optique, nous avons opté pour une plateforme polymère intégrant des fonctions esters activés de type *N*-hydroxysuccinimide qui présentent en effet l'avantage d'être facilement déplacées de manière spécifique par des composés aminés (Figure IV.14).

Dans un premier temps, nous avons mis au point la polymérisation du monomère NAS (*N*-acryloyloxysuccinimide) [8] en présence des agents de transfert **CTA3** et **CTA4**.

### 1.3.1. Polymérisation du NAS en présence des agents de transferts CTA3 et CTA4

Le NAS est d'abord synthétisé selon un protocole décrit dans la littérature [9] et qui consiste à traiter le *N*-hydroxysuccinimide (NHS) par le chlorure d'acryloyle (Figure IV.15).

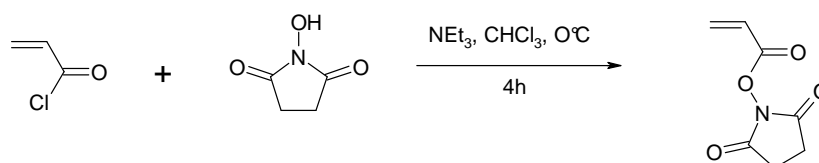


Figure IV.15 : Synthèse du *N*-acryloyloxysuccinimide

Les paramètres choisis pour le suivi cinétique de polymérisation du NAS en présence des agents de transfert **CTA3** et **CTA4** sont [NAS]/[CTA]/[AIBN] : 100/1/0,1 dans la DMF.

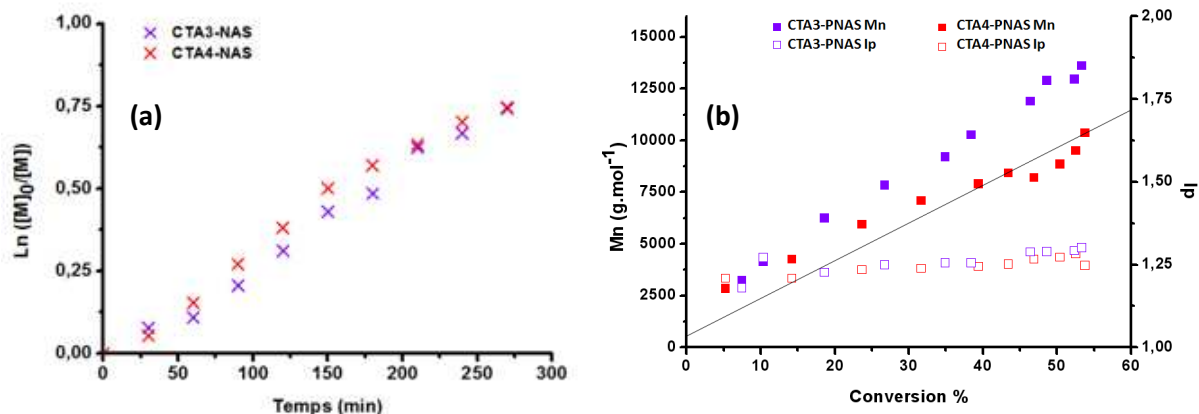
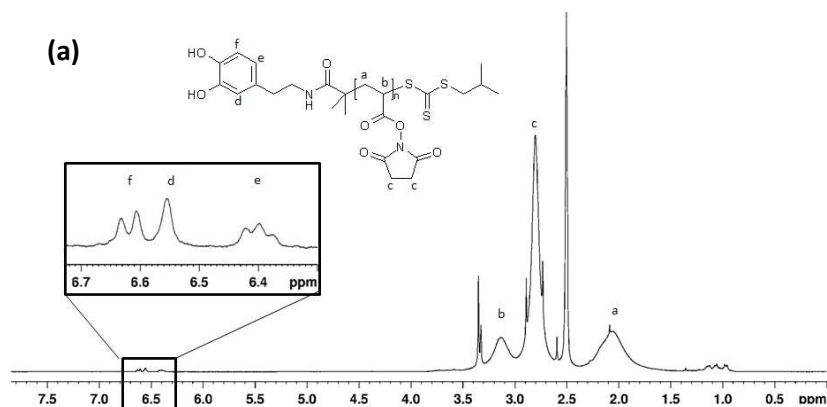


Figure IV.16 : Cinétique de polymérisation par RAFT du NAS par les agents **CTA3** et **CTA4**. **(a)** Evolution de la conversion en fonction du temps. **(b)** Evolution de la masse molaire  $M_n$  et de l'indice de polymolécularité en fonction du taux de conversion

Le suivi cinétique de la polymérisation du NAS en présence des agents de transfert **CTA3** et **CTA4** (Figure IV.16.a) démontre une croissance linéaire du  $\ln([M]_0/[M])$  en fonction du temps, indiquant de ce fait une concentration en radicaux constante lors des polymérisations RAFT. En outre, les vitesses de polymérisation sont similaires en employant l'agent de transfert **CTA3** et **CTA4**. Le groupe terminal, benzyle ou catéchol, de l'agent de transfert n'a donc ici aucune influence sur la vitesse de polymérisation, contrairement au cas des monomères usuels (Figure IV.10).

L'évolution des masses molaires  $M_n$  et des indices de polymolécularité en fonction de la conversion est représentée sur la Figure IV.16.b. Les masses molaires  $M_n$  croissent de façon linéaire avec la conversion et suivent la pente de la droite théorique de conversion (ligne sur le graphe Figure IV.16.b). Par ailleurs, les indices  $I_p$  demeurent inférieurs à 1,3 tout au long de la polymérisation. Les agents de transfert employés permettent donc de contrôler la polymérisation du NAS. Les polymères, précipités et séchés, ont été caractérisés par RMN  $^1\text{H}$  (Figure IV.17).



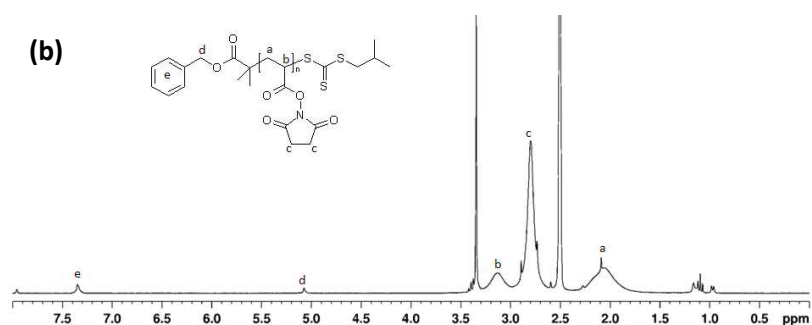


Figure IV.17 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  des polymères **CTA3-PNAS (a)** et **CTA4-PNAS (b)** (Solvant DMSO- $d_6$ )

Le spectre RMN  $^1\text{H}$  confirme la présence de l'ancre catéchol ( $\delta = 6,35\text{-}6,70$  ppm) en extrémité de chaîne pour le **CTA3-PNAS** (Figure IV.17.a), et le groupe benzyle ( $\delta = 7,35$  ppm) pour le **CTA4-PNAS** (Figure IV.17.b). La comparaison des intégrales relatives aux signaux des protons  $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_e$ ,  $\text{H}_f$  portés par le motif catéchol à celle des protons  $\text{H}_b$  localisés sur la chaîne principale, nous a permis de calculer la longueur des chaînes selon l'Équation IV.2.a :

$$Dp = \frac{3I_{H_b}}{I_{H_d} + I_{H_e} + I_{H_f}} \quad (\text{a}) \qquad Dp = \frac{5I_{H_b}}{I_{H_e}} \quad (\text{b})$$

Équation IV.2 : Détermination du nombre d'unité de répétition pour le **CTA3-PNAS (a)** et le **CTA4-PNAS (b)**

Où  $I_n$  représente l'intégration des pics correspondant aux protons  $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_d$ ,  $\text{H}_e$  et  $\text{H}_f$  (Figure IV.17. a et b.). Les  $DP_n$ , ont été ainsi estimés à 98 (**CTA3-PNAS**,  $Mn_{\text{RMN}} = 17\,000 \text{ g.mol}^{-1}$ ) et 79 (**CTA4-PNAS**,  $Mn_{\text{RMN}} = 13\,700 \text{ g.mol}^{-1}$ , Équation IV.2.b) unités de répétition.

## 2. Post-fonctionnalisation des polymères de NAS

Les études cinétiques montrent qu'il est possible d'élaborer des polymères d'esters activés de longueur contrôlée et possédant des indices de polymolécularité proche de 1. La polymérisation par le procédé RAFT a permis entre autres de préparer à partir des agents de transfert **CTA3** et **CTA4**, des polymères possédant 50 unités ( $Mn_{\text{RMN}} = 8\,800 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $I_p = 1,15$ ) et 100 unités ( $Mn_{\text{RMN}} = 16\,500 \text{ g.mol}^{-1}$ ,  $I_p = 1,25$ ).

Ces deux polymères d'esters activés seront utilisés dans la suite de l'étude afin d'accéder à une large gamme de copolymères inédits comportant une quantité variable d'unités glucosidiques (glucosamines).



Comme représentée dans la Figure IV.18 notre stratégie a consisté à insérer dans un premier temps des unités de glucosamine en quantité connue sur la charpente polymère, puis à déplacer les fonctions activées restantes par l'éthanolamine. Ces deux étapes de post-fonctionnalisation, ont du être optimisées afin d'éviter d'éventuelles réactions secondaires, comme la réaction de Maillard, et pour préserver la fonction trithiocarbonate localisée en extrémité de chaîne. Les conditions optimales sont reportées sur la flèche de réaction de la Figure IV.18.

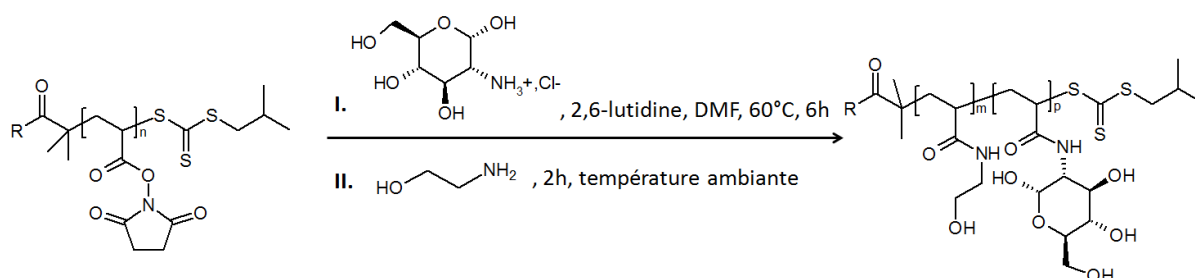


Figure IV.18 : Principe de la post-fonctionnalisation des polymères PNAS par la glucosamine et l'éthanolamine

A partir des différents **CTA3-PNAS** ( $DP_n=50$  et  $100$ ) et **CTA4-PNAS** ( $DP_n=50$  et  $100$ ), 12 copolymères de type poly(*N*-glucosacrylamide)-*co*-(*N*-(2-hydroxyéthyl)acrylamide) ont pu être conçus contenant respectivement 10, 20 et 40% molaire de glucosamine. Afin de distinguer ces polymères, la nomenclature suivante a été employée : nom du polymère = agent de transfert + PNGlu + nombre d'unités + pourcentage de glucosamine. Ainsi, un polymère de 100 unités avec 20% de glucosamine formé à partir d'un **CTA3-PNAS** sera décrit comme suit : **CTA3-PNGlu 100u – 20%**. Par souci de clarté, seuls les résultats et les analyses physicochimiques réalisées sur le **CTA3-PNGlu 100u – 40%** seront présentées ici. Les données concernant les autres copolymères ont été regroupées en annexe.

Les deux réactions de post-fonctionnalisation ont été réalisées en « one pot » sans étape de purification intermédiaire [9]. Pour cela, une quantité choisie de glucosamine est introduite puis, un excès d'éthanolamine est injecté dans le milieu pour réagir avec les fonctions succinimides restantes. Les polymères sont ensuite précipités dans l'acétone et séchés.

Sur le spectre RMN  $^1H$  de la glucosamine (Figure IV.19, spectre vert) représenté en Figure IV.19 apparaissent les protons des deux anomères  $\alpha$  ( $H_a$ ) et  $\beta$  ( $H_b$ ) du chlorhydrate de glucosamine. L'attribution des signaux des protons de la glucosamine a été faite d'après la littérature [10]. Les protons du motif hémiacétal sous forme  $\alpha$  et  $\beta$  sont détectés

respectivement à  $H_a = 5,3$  ppm et  $H_b = 4,8$  ppm. Le spectre RMN  $^1H$  du polymère après les deux étapes de post-fonctionnalisation (bleu) est reporté dans la Figure IV.19.

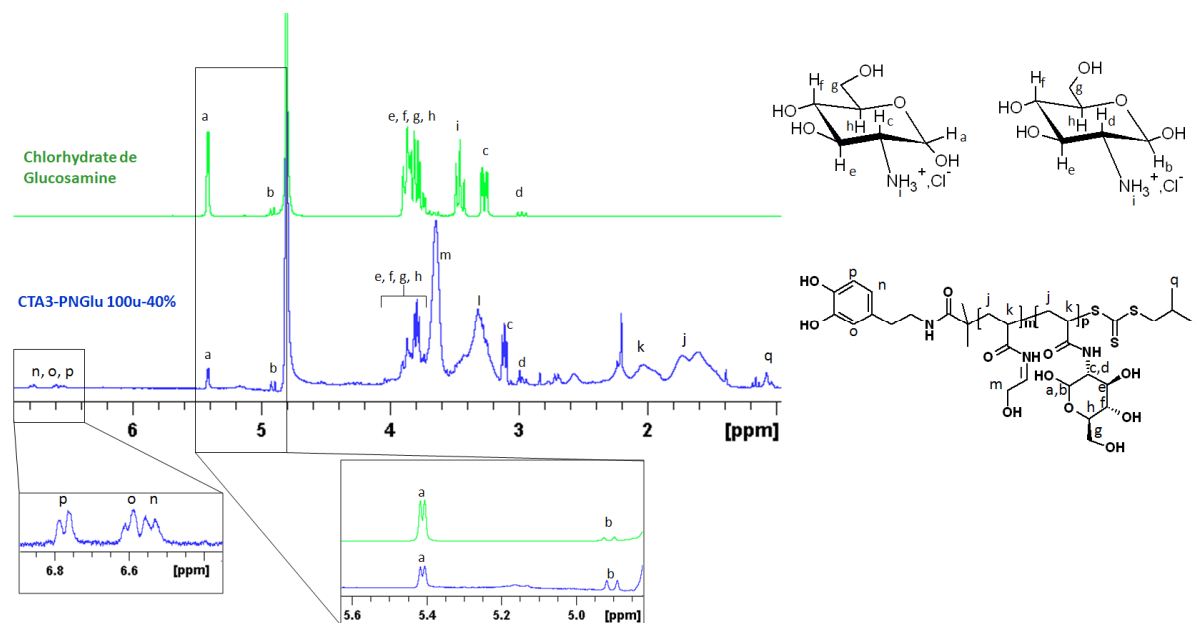


Figure IV.19: Spectres RMN  $^1H$  de chlorhydrate de glucosamine (vert), et des polymères de **CTA3-PNGlu 100u-40%** (bleu).

Sur le spectre RMN  $^1H$  du polymère post-fonctionnalisé, les pics correspondant aux protons du squelette polymère  $H_j$  et  $H_k$  sont identifiés respectivement à  $\delta = 1,2-1,75$  ppm et  $\delta = 1,75-2,2$  ppm. De même, les protons  $H_l$  et  $H_m$  situés respectivement en  $\alpha$  et  $\beta$  de l'atome d'azote des fonctions amides générées lors de la seconde étape résonnent sur les spectres RMN  $^1H$  à  $\delta = 4,52$  ppm et  $\delta = 3,19$  ppm. Il est à noter que le pic caractéristique de la fonction succinimide à  $\delta = 2,8$  ppm a entièrement disparu, témoignant ainsi de l'efficacité du couplage envisagé. Par ailleurs, les spectres montrent très clairement la présence des protons  $H_e$ ,  $H_f$ ,  $H_g$  et  $H_h$  ( $\delta = 3,6-3,85$  ppm) caractéristiques du motif glucosidique.

Concernant les extrémités de chaînes, le spectre RMN du copolymère permet de distinguer les protons  $H_n$ ,  $H_o$ ,  $H_p$  entre 6,0-6,5 ppm portés par l'unité catéchol (Figure IV.19, encart) ainsi que les protons  $H_q$  centrés sur 0,89 ppm du fragment isobutyle de la partie Z de l'agent de transfert. Par ailleurs, l'intégration de ces signaux (rapport  $H_q/H_{n,o,p}=2$ ) montre très clairement que les différents traitements chimiques permettent de préserver la fonction trithiocarbonate localisée en extrémité de chaîne. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons ensuite réalisé une étude par spectroscopie UV-visible (Figure IV.20).

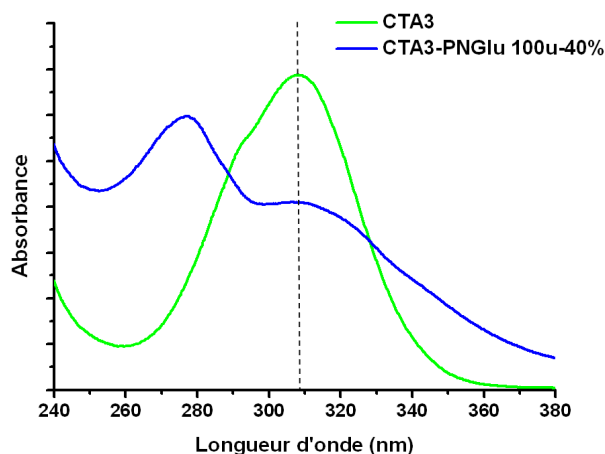


Figure IV.20 : Spectroscopie UV du **CTA3-PNGlu 100u – 40%** (bleu), et de l'agent de transfert **CTA3** (vert)  $C = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$

La présence du groupement trithiocarbonate en fin de traitement est confirmée pour le polymère traité à l'éthanolamine à température ambiante au travers de l'existence de la bande d'absorption caractéristique de la fonction trithiocarbonate centrée sur 310 nm (Figure IV.20).

Afin de mener des évaluations biologiques (chapitre VI), quatre polymères PNAS ont été synthétisés avec des longueurs de chaîne 50 et 100 unités et incorporant en extrémité de chaîne soit un fragment catéchol, soit un fragment benzyle. Chacun de ces quatre polymères a été ensuite post-fonctionnalisé en intégrant trois taux de glucosamine différents (10, 20 et 40%).

Ces premiers résultats ouvrent des perspectives intéressantes et devraient notamment nous permettre d'incorporer ultérieurement des molécules plus complexes comme des GAGs ou des peptides.

### 3. Conclusion

En conclusion, nous sommes parvenus, après synthèse de différents agents de transfert, à échafauder des polymères de natures variées, de masses molaires maîtrisées avec des indices de polymolécularité faibles. De plus, nous avons démontré qu'il est possible de synthétiser ces polymères tout en conservant les motifs en extrémités de chaîne, que ce soit un groupement benzyle, catéchol ou trithiocarbonate.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé à partir de deux agents de transfert comportant, des polymères parfaitement définis de *N*-isopropylacrylamide, d'acrylate de *tert*-butyle et de styrène. Ces polymères, comportant en extrémité de chaîne soit un groupe benzyle, soit un motif catéchol, seront exploités au cours du chapitre suivant pour étudier la fonctionnalisation des surfaces de titane par la stratégie « graft to ».

Par ailleurs, nous avons mis en place par polymérisation radicalaire contrôlée RAFT la synthèse de polymères d'esters activés parfaitement échafaudés, incluant une ancre de type catéchol ou un fragment benzyle en extrémité de chaîne. Concernant le greffage d'unités glucosidiques sur des charpentes polymères, grâce à la stratégie globale développée et aux protocoles mis au point, douze copolymères de longueurs différentes et intégrant des taux variables d'unités glucosidiques ont pu être échafaudés. Les différentes analyses réalisées sur ces copolymères montrent également la présence des fonctions dopamine et benzyle localisées en extrémité de chaîne. Ces polymères de glucosamine seront utilisés ultérieurement pour les évaluations biologiques (Chapitre VI).

## Références bibliographiques

- [1] M. A. Tasdelen, M. U. Kahveci et Y. Yagci, *Telechelic polymers by living and controlled/living polymerization methods*. Prog. Polym. Sci. **2011**, 36 (4), 455-567.
- [2] D. Pissuwan, C. Boyer, K. Gunasekaran, T. P. Davis et V. Bulmus, *In vitro cytotoxicity of raft polymers*. Biomacromolecules **2010**, 11 (2), 412-420.
- [3] P. Kujawa, F. Segui, S. Shaban, C. Diab, Y. Okada, F. Tanaka et F. M. Winnik, *Impact of end-group association and main-chain hydration on the thermosensitive properties of hydrophobically modified telechelic poly(*n*-isopropylacrylamides) in water*. Macromolecules **2005**, 39 (1), 341-348.
- [4] W. Lv, L. Liu, Y. Luo, X. Wang et Y. Liu, *Biotinylated thermoresponsive core cross-linked nanoparticles via raft polymerization and "click" chemistry*. J. Colloid Interface Sci. **2011**, 356 (1), 16-23.
- [5] A. Favier, C. Barner-Kowollik, T. P. Davis et M. H. Stenzel, *A detailed on-line ft/nir and 1h nmr spectroscopic investigation into factors causing inhibition in xanthate-mediated vinyl acetate polymerization*. Macromol. Chem. Phys. **2004**, 205 (7), 925-936.
- [6] M. M. Stamenović, P. Espeel, W. V. Camp et F. E. Du Prez, *Norbornenyl-based raft agents for the preparation of functional polymers via thiol-ene chemistry*. Macromolecules **2011**, 44 (14), 5619-5630.
- [7] J. Bigot, B. Charleux, G. Cooke, F. Delattre, D. Fournier, J. Lyskawa, F. Stoffelbach et P. Woisel, *Synthesis and properties of tetrathiafulvalene end-functionalized polymers prepared via raft polymerization*. Macromolecules **2009**, 43 (1), 82-90.
- [8] P. Relógio, M.-T. Charreyre, J. P. S. Farinha, J. M. G. Martinho et C. Pichot, *Well-defined polymer precursors synthesized by raft polymerization of *n,n*-dimethylacrylamide/*n*-acryloxysuccinimide: Random and block copolymers*. Polymer **2004**, 45 (26), 8639-8649.
- [9] Z. Hu, Y. Liu, C. Hong et C. Pan, *Synthesis of well-defined glycoconjugate polyacrylamides via preactivated polymers prepared by atp*. J. Appl. Polym. Sci. **2005**, 98 (1), 189-194.
- [10] E. Mendis, M.-M. Kim, N. Rajapakse et S.-K. Kim, *Suppression of cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages by novel cationic glucosamine derivative involves down-regulation of *nf-kb* and *mapk* expressions*. Bioorg. Med. Chem. **2008**, 16 (18), 8390-8396.



# **Chapitre V**

**Elaboration de brosses de polymères sur  
les surfaces de titane**





## INTRODUCTION

L'objectif de ce chapitre vise à montrer le potentiel des polymères parfaitement définis décrits dans le chapitre précédent pour élaborer de brosses de polymères sur des surfaces de titane. Le défi majeur est ici de pouvoir contrôler les propriétés physiques et biologiques de ces surfaces. Dans ce chapitre, nous développerons dans un premier temps les stratégies exploitées pour apprêter les surfaces de titane et les fonctionnaliser par les différents polymères synthétisés précédemment. Ces stratégies doivent répondre au cahier des charges sous-mentionné:

- Tous les échantillons de titane préparés avant le greffage doivent être similaires pour que les essais puissent être reproductibles et donc interprétables
- Il faut que le greffage sur les surfaces soit uniquement induit par l'ancre chimique (catéchol) présente en extrémité de chaîne des polymères et non par simple physisorption des polymères
- Le greffage doit présenter une bonne tenue au rinçage et être stable dans des matrices biologiques

Dans ce chapitre seront également présentées les différentes études physico-chimiques que nous avons réalisées pour i) caractériser les polymères immobilisés sur les surfaces (par ATR, XPS) ii) pour suivre en temps réel l'immobilisation des polymères sur les surfaces (SPR) et évaluer la densité de greffage (SPR, AFM, électrochimie) et iii) étudier la mouillabilité des surfaces (angle de goutte).

## 1. Préparation des surfaces de titane pour la fonctionnalisation

### 1.1. Apprêtage des surfaces de titane

Les échantillons de titane doivent également répondre au cahier des charges suivant :

- Les états de surface entre les différents échantillons doivent être les plus proches possible et doivent s'approcher de l'état de surface des stents, c'est-à-dire environ 0,1  $\mu\text{m}$ .
- Les dimensions des échantillons doivent être adaptées aux différentes méthodes d'analyses et aux tests biologiques.
- Les délais de production des échantillons doivent être les plus courts possibles.

C'est pourquoi nous avons opté pour des échantillons de titane de pureté commerciale de grade 4 (Ti cp4, 99,6 % de pureté) sous forme de pastilles de diamètre de 15 mm et d'épaisseur 3 mm. Ces échantillons sont adaptés aux puits standards des tests biologiques et peuvent être montés sur une polisseuse automatique par lot de 6. De cette façon, le polissage est rapide et identique pour tous les échantillons. Les pastilles de titane polies « miroir » ainsi obtenues, c'est-à-dire avec une rugosité comprise entre 50 et 100 nm, sont finalement rincées aux ultrasons dans l'eau, l'acétone et l'éthanol.

## 1.2. Traitement chimique des échantillons

Lorsque le titane se passive naturellement dans l'eau ou au contact de l'air, la couche d'oxyde formée comporte des fonctions hydroxyles en surface. Afin d'augmenter l'épaisseur de la couche d'oxyde, d'augmenter la densité de fonctions hydroxyles et donc d'optimiser ultérieurement le greffage des polymères, les échantillons de titane sont plongés dans une solution oxydante dite « piranha », (mélange 1 : 1 de  $H_2O_2$  et de  $H_2SO_4$ ), puis rincés abondamment par de l'eau distillée sous ultrasons pour éliminer notamment les traces de sulfates.

En effet, le traitement par la solution oxydante « piranha » génère à la surface des sulfates de titane, qui sont gênants pour la suite des expériences car ils peuvent représenter une source de pollution non négligeable pour les analyses XPS, et possèdent une toxicité avérée, pouvant altérer les résultats des évaluations biologiques. Par ailleurs, l'influence du traitement oxydant sur l'état des surfaces a été suivie par microscopie optique. La Figure V.1 rassemble une succession de clichés enregistrés à l'aide d'un microscope optique (zoom 20x) de pastilles de titane polies miroir après différents temps de contact avec la solution « piranha ».

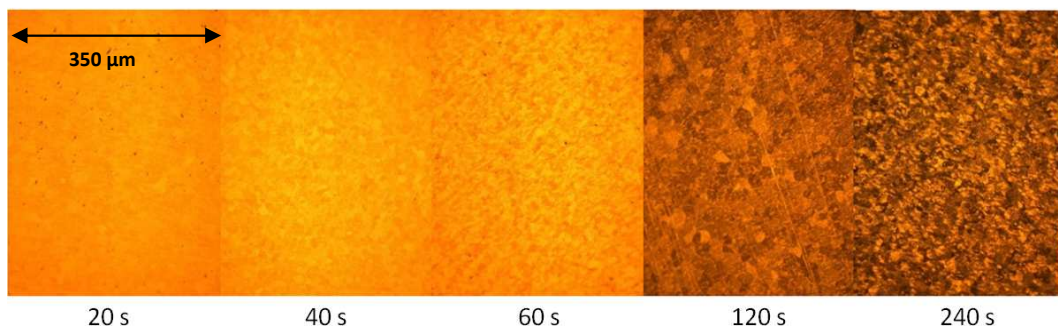


Figure V.1 : Vue au microscope optique de la surface des échantillons de titane oxydés par la solution « piranha » en fonction de la durée du traitement. (Grossissement x 20)

Au vu des images obtenues en microscopie optique, l'état de surface final dépend très nettement du temps d'immersion des pièces de titane dans la solution oxydante (Figure V.1). Dans le cadre de cette étude, nous avons fixé la durée d'immersion à 120 s. En effet, cette durée semble suffisante pour avoir la formation d'une couche d'oxyde, tout en conservant un aspect miroir, proche de l'état de surface des stents. Au-delà de cette durée, comme le montre le cliché pris à 240s, une couche d'oxyde très épaisse se forme en surface, augmentant la rugosité du matériau et faisant perdre le bénéfice du polissage miroir.

Afin de greffer les polymères à la surface de ces échantillons, trois stratégies ont été exploitées. Deux de ces méthodes font appel à un greffage de type "graft to". La première repose sur le greffage sur les échantillons de titane de polymères parfaitement définis intégrant en extrémité de chaîne le motif catéchol, dont la synthèse est décrite dans le chapitre IV. La deuxième méthode s'appuie sur une fonctionnalisation préalable de la surface par une ancre chimique intégrant le motif catéchol assurant le greffage et une fonction azoture, susceptible d'être engagé dans une réaction de cycloaddition de Huisgen [3+2] catalysée au Cu(I) (« click chemistry »).

La deuxième stratégie repose sur le greffage de type "graft from", dans laquelle les polymères sont générés à partir de la surface de titane fonctionnalisée au préalable par l'agent de transfert **CTA3**.

## 2. Greffage par la stratégie « graft to »

La première stratégie développée dans ce travail concerne la fonctionnalisation du titane par la stratégie « graft to » (Figure V.2).

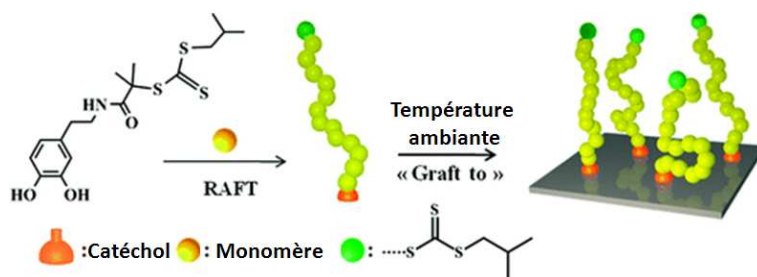


Figure V.2 : Schéma de principe de la fonctionnalisation des surfaces de titane par la stratégie « graft to »

Pour ce faire, les échantillons de titane sont immergés pendant une nuit à l'abri de la lumière dans différentes solutions contenant les polymères synthétisés au chapitre IV et dont les caractéristiques sont répertoriées dans le Tableau V.1.

Tableau V.1 : Récapitulatif des conditions utilisées pour le de greffage des polymères synthétisés sur le titane

Polymère	Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	Ip	Solvant	C (mol/l)
CTA3-PNIPAM	7 500	1,10	eau	5.10 <sup>-4</sup>
CTA3-PtBA	9 500	1,15	acétonitrile	5.10 <sup>-4</sup>
CTA3-PS	3 500	1,05	THF+ eau	5.10 <sup>-4</sup>

Après l'étape de greffage, les échantillons sont abondamment rincés par un bon solvant du polymère pour éliminer l'excès de polymère non greffé puis séchés sous d'azote.

### 2.1. Analyses des surfaces fonctionnalisées par IR-ATR et XPS

Afin de vérifier le greffage des polymères sur les supports de titane, les surfaces ont été caractérisées par infrarouge par Réflexion Totale Atténuée (ATR). La Figure V.3 répertorie les spectres obtenus par ATR (en noir) des surfaces modifiées, juxtaposés aux spectres des polymères ayant servi au greffage, acquis par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR, en couleur).

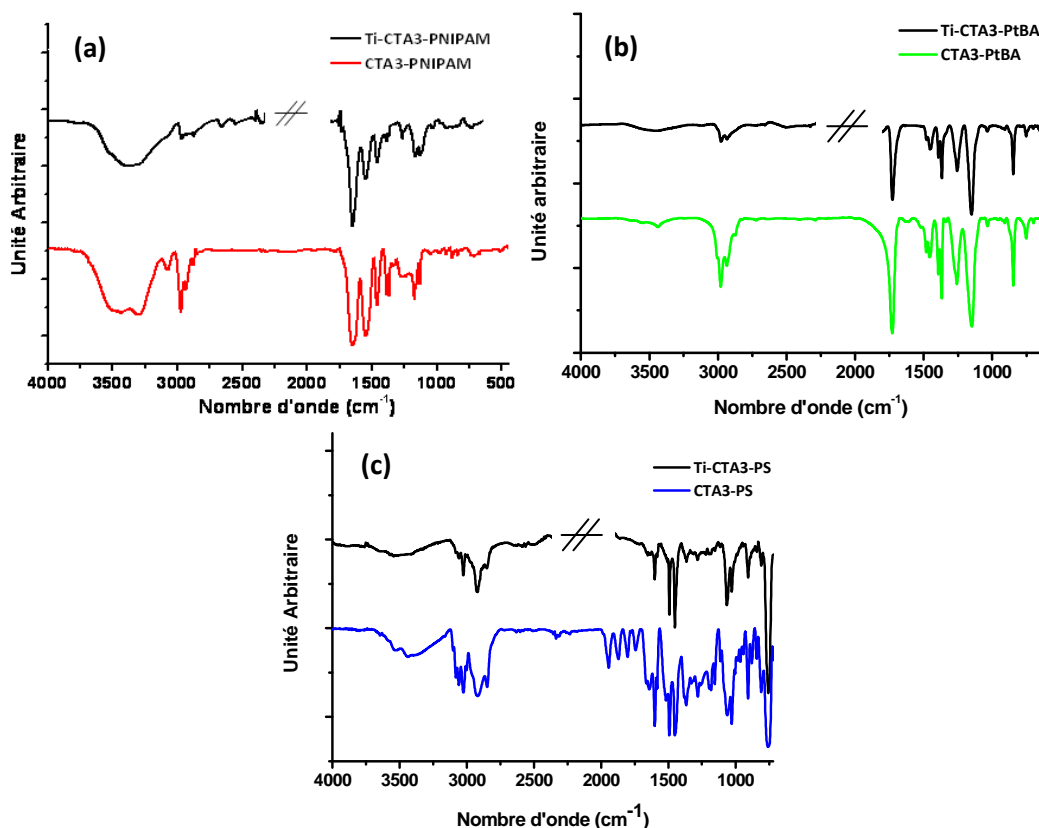


Figure V.3 : Spectres ATR (en noir) des échantillons de titane modifiés par les polymères de NIPAM (a) de tBA (b) et de styrène (c). Pour comparaison, les spectres FTIR des polymères ayant servi au greffage figurent en couleur. La région correspondant aux bandes d'absorption du cristal ZnSe a été exclue

Le spectre ATR de la surface modifiée par le polymère **CTA3-PNIPAM** (Figure V.3.a) présente les bandes de vibrations caractéristiques d'élongation des liaisons N-H et C=O, respectivement à  $3350\text{ cm}^{-1}$  et  $1650\text{ cm}^{-1}$  du PNIPAM. De plus, la bande de déformation de la liaison N-H à  $1546\text{ cm}^{-1}$  indique la présence de fonctions amides dans le film de polymère.

L'analyse de la surface traitée par le polymère **CTA3-PtBA** (Figure V.3.b) révèle quant à elle la présence d'une bande de vibration caractéristique du groupe carbonyle à  $1725\text{ cm}^{-1}$  et confirme le greffage du polymère **CTA3-PtBA** sur le titane.

Enfin, la fonctionnalisation de la surface de titane par le polymère **CTA3-PS** (Figure V.3.c) a été mise en évidence par la présence de bandes d'absorptions caractéristiques à  $3025\text{ cm}^{-1}$  d'une part et  $1450$ ,  $1490$  et  $1600\text{ cm}^{-1}$  d'autre part, correspondant respectivement aux vibrations d'élongations des liaisons C-H aromatiques et des élongations des C=C aromatiques du motif styrène.

En parallèle, l'immobilisation des polymères à la surface du titane a été confirmée par XPS. La composition chimique des surfaces de titane modifiées est répertoriée dans le Tableau V.2. Comme attendu, le spectre XPS de la surface non fonctionnalisée montre la présence de titane (Ti 2p, 458 eV) et d'oxygène (O 1s, 531 eV). Du carbone, de l'azote et des espèces cationiques ont également été détectées, ce qui correspond à une contamination de l'échantillon comme il est fréquemment observé dans la littérature pour les échantillons de titane polis et rincés par des solvants organiques [1-2].

Tableau V.2 : Concentration atomique de surface obtenue par XPS à partir des surfaces de titane fonctionnalisées par les polymères

Echantillon	XPS : Concentration Atomique (%)			
	C 1s	O 1s	Ti 2p	N 1s
Ti	30.0	37.6	19.3	0.9
CTA3-PNIPAM	46.9	28.9	10.4	4.14
CTA3-PtBA	64.6	21.2	6.27	0.6
CTA3-PS	54.6	26.32	8.40	1.03

Après immobilisation des polymères sur le titane, on observe principalement selon ces résultats, le signal du carbone augmente et ceux du titane et de l'oxygène diminuent, ce qui concorde avec un greffage des polymères à la surface. De plus, dans le cas du titane modifié

par le polymère **CTA3-PNIPAM**, une augmentation du signal de l'azote N 1s à 400 eV a été observée comme le montre le spectre XPS (Figure V.4).

En mesurant l'intensité des signaux du niveau de cœur correspondant au titane Ti 2p avant ( $I_0$ ) et après fonctionnalisation ( $I$ ) de la surface, l'épaisseur du film déposé peut-être déterminée en utilisant l'Équation V.1 [3].

$$\frac{I}{I_0} = e^{\left(-\frac{d}{\lambda \sin \theta}\right)}$$

$I$	Intensité du signal après fonctionnalisation
$I_0$	Intensité du signal avant fonctionnalisation
$d$	Épaisseur du film formé
$\lambda$	Libre parcours moyen des photoélectrons
$\theta$	Angle d'incidence des rayons X

Équation V.1 : Formule permettant de déterminer l'épaisseur des films par XPS

L'angle d'incidence employé pour nos mesures étant de 90 degrés par rapport à la surface des échantillons, l'épaisseur du film de **CTA3-PNIPAM** est estimée entre 3 et 5 nm.

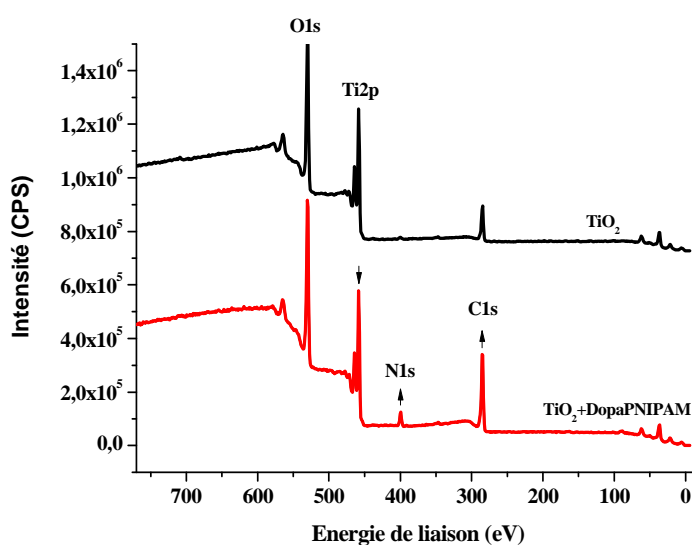


Figure V.4 : Spectres XPS (partiel) de la surface du titane avant (en noir) et après (en rouge) greffage du polymère **CTA3-PNIPAM**

## 2.2. Identification du fragment catéchol dans le film de polymère greffé en surface par électrochimie

Les polymères immobilisés sur les substrats de titane possèdent tous un fragment catéchol en extrémité de chaîne. Comme évoqué précédemment, ce groupement constitue une excellente sonde électrochimique permettant ainsi de contrôler la présence du motif catéchol sur la surface de titane après greffage par électrochimie. Les voltampérogrammes

des échantillons de titane fonctionnalisés par les polymères **CTA3-PNIPAM**, **CTA3-PS** et **CTA3-PtBA** ont été enregistrés (Figure V.5) et présentent une vague d'oxydation correspondant à la signature électrochimique du motif catéchol, c'est-à-dire à l'oxydation du motif catéchol en quinone.

Par ailleurs, l'intégration du signal du motif catéchol permet d'estimer la densité de greffage des polymères sur les surfaces de titane en utilisant l'Équation V.2.

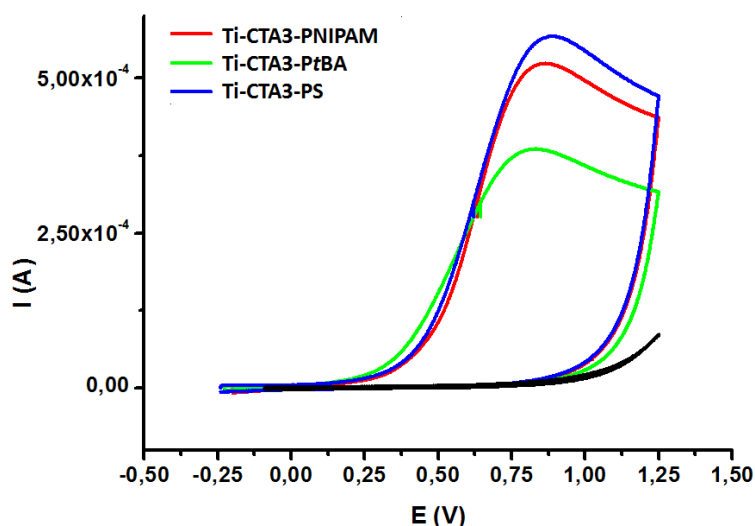


Figure V.5. : Voltampérogrammes cycliques (CV) réalisés à partir d'une surface non fonctionnalisée (noir) et des surfaces de titane fonctionnalisées par les polymères **CTA3-PNIPAM** (rouge), **CTA3-PtBA** (vert) et **CTA3-PS** (bleu).

Conditions : Electrode de référence Ag/AgCl. Vitesse de balayage  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ . Solution électrolyte : tampon phosphate pH = 7.

$$\Gamma = \frac{QN_A}{nFA}$$

$\Gamma$  = Taux de recouvrement en molécules.cm<sup>-2</sup>

$Q$  = Quantité de charges

$N_A$  = Nombre d'Avogadro

$n$  = nombre d'électrons échangés dans le processus d'oxydo-réduction

$F$  = Constante de Faraday en C

$A$  = Aire de la surface analysée en cm<sup>2</sup>

Équation V.2. : Formule permettant de déterminer le taux de recouvrement  $\Gamma$  à partir de la charge  $Q$  mesurée sur chacun des CV.

Dans cette équation,  $Q$  représente la quantité de charge, calculée en intégrant l'aire sous le pic d'oxydation, et  $n = 2$  correspondant au nombre d'électrons échangés lors de la réaction d'oxydation de la dopamine en quinone. Nous obtenons les résultats répertoriés dans le Tableau V.3.

Tableau V.3 : Taux de recouvrement estimés des substrats de titane modifiés par les polymères

Polymère	Q	C (mol.cm <sup>-2</sup> )	Γ (molécules.cm <sup>-2</sup> )
CTA3-PNIPAM	2,351	3,45.10 <sup>-9</sup>	2,08.10 <sup>15</sup>
CTA3-PS	2,542	3,73.10 <sup>-9</sup>	2,24.10 <sup>15</sup>
CTA3-PtBA	1,92	2,82.10 <sup>-9</sup>	1,70.10 <sup>15</sup>

Ces résultats démontrent que la couche de polymère greffée en surface est plutôt dense avec une quantité de molécules greffées de l'ordre de 10<sup>15</sup> molécules.cm<sup>-2</sup>.

### 2.3. Etude du greffage des polymères sur le dioxyde de titane par résonance plasmonique de surface (SPR)

Les techniques de caractérisation précédentes ont permis de mettre en évidence le greffage des polymères sur la surface de titane mais celles-ci ne permettent pas d'obtenir des informations sur la dynamique de greffage.

Un outil puissant pour observer « en direct » le greffage du polymère et mesurer la quantité de matière greffée est la résonance plasmonique de surface (SPR). Cette méthode optique est sensible à l'indice de réfraction du milieu environnant le métal, qui varie au cours d'un dépôt. Un descriptif complet de la technique figure en annexe.

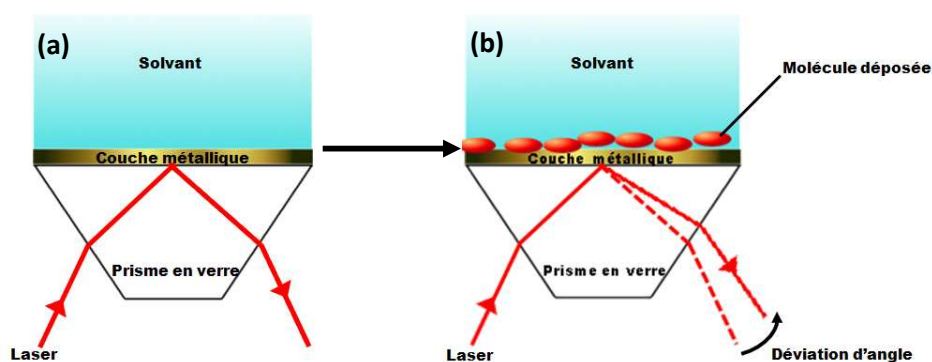


Figure V.6 : Schématisation du principe de la SPR avant dépôt (a), après dépôt (b)

Pour résumer, un laser vient se réfléchir *via* un prisme sur une fine couche métallique selon un angle précis, de telle sorte qu'il fasse entrer en résonance les plasmons de surface de la couche métallique. Cet angle de résonance dépend fortement de l'indice de réfraction du milieu diélectrique situé de l'autre côté de la couche métallique (noté « solvant » sur la Figure V.6). Par conséquent, le dépôt sur la surface métallique de molécules va engendrer



une déviation de l'angle SPR. Cette variation d'angle est mesurée au cours du temps pour donner un sensogramme SPR (Figure V.7).

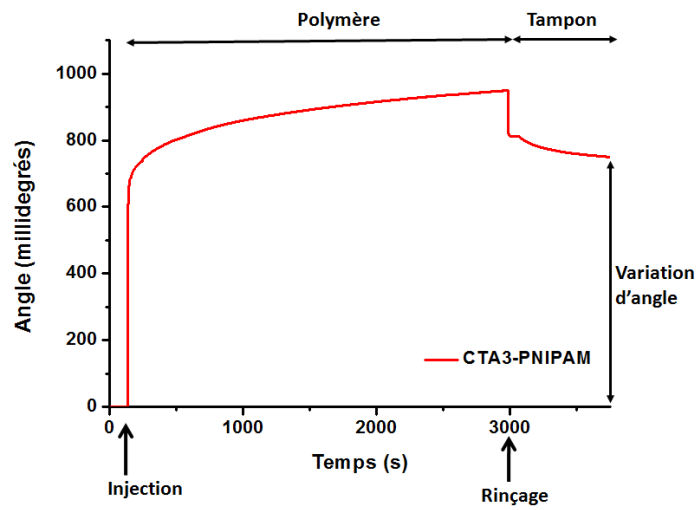


Figure V.7 : Sensogramme SPR obtenu lors du dépôt du polymère **CTA3-PtBA** sur une surface de  $\text{TiO}_2$

Lors des études d'immobilisation, une ligne de base est enregistrée pendant 150 s environ puis une solution contenant le polymère en concentration connue est injectée. Le polymère est laissé en interaction avec la surface pendant 3000s (zone polymère), puis cette dernière est rincée par une solution constituée de solvant pur (zone tampon).

Par ailleurs, à l'aide de la variation de l'angle SPR observé, il est possible, en utilisant l'équation de De Feijter [4] de déterminer la quantité de matière greffée à la surface (Équation V.3).

$$\Gamma = \frac{d(n_f - n_s)}{dn/dc} = \frac{\Delta\theta(n_f - n_s)}{(d\theta/dd)(dn/dc)}$$

$\Gamma$	Taux de recouvrement
$d$	épaisseur du film de polymère
$n_f$	indice de réfraction du film de polymère
$n_s$	indice de réfraction du solvant
$dn/dc$	variation de l'indice de réfraction du solvant en fonction de la concentration en polymère
$\Delta\theta$	variation de l'angle SPR

Équation V.3. : Equation de De Feijter permettant de calculer le taux de recouvrement ( $\Gamma$ ) en polymère

Cette technique a donc été utilisée pour suivre en direct la fonctionnalisation du titane par le **PNIPAM** et le **PtBA** et montrer l'efficacité de l'ancre catéchol. Les solvants pouvant être utilisés pour cette technique doivent avoir un indice de réfraction proche de 1,33. C'est pour cette raison que les études SPR ont été réalisées soit dans l'eau distillée ( $n=1,33$ ) ou

l'acétonitrile ( $n=1,34$ ). La faible solubilité du **PS** dans ces deux solvants limite l'emploi du **CTA3-PS** dans cette technique.

### 2.3.1. Etude de l'influence de l'ancre catéchol

Afin de démontrer l'importance et l'efficacité du motif catéchol en extrémité de chaîne pour le greffage, nous avons synthétisé deux polymères possédant la même structure de chaîne que **CTA3-PtBA** et **CTA3-PNIPAM** mais possédant en extrémité de chaîne un groupement différent. L'agent de transfert **CTA4** a permis d'élaborer les polymères **CTA4-PNIPAM** ( $M_n = 7\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ ,  $I_p = 1,10$ ) et **CTA4-PtBA** ( $M_n = 10\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ ,  $I_p = 1,14$ ), dépourvus d'ancre catéchol et présentant des caractéristiques physico-chimiques proches des polymères incluant une unité catéchol en extrémité de chaîne (**CTA3-PNIPAM** ( $M_n = 7\ 500\ \text{g.mol}^{-1}$ ,  $I_p = 1,10$ ) et **CTA3-PtBA** ( $M_n = 9\ 000\ \text{g.mol}^{-1}$ ,  $I_p = 1,12$ )). Les profils SPR correspondant à l'injection de ces polymères sur la surface de titane sont représentés en Figure V.8.

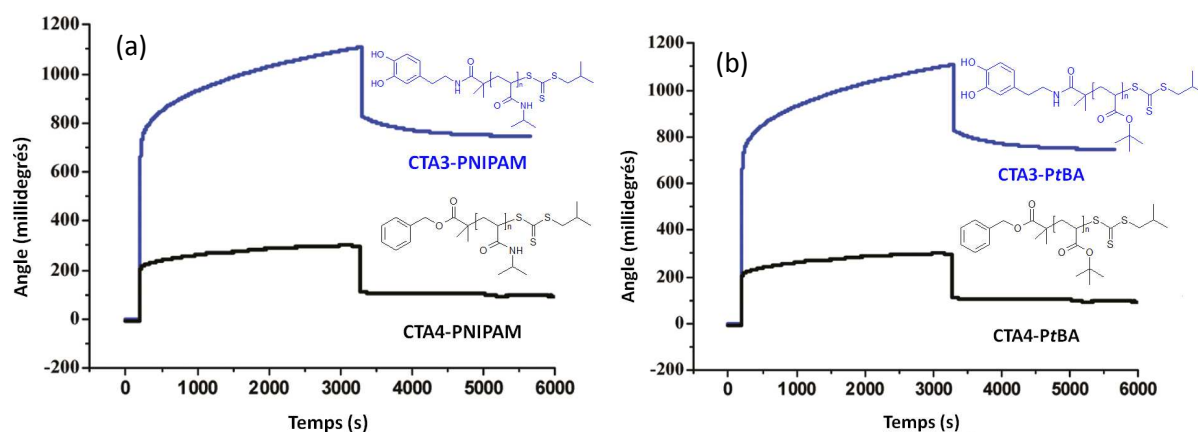


Figure V.8 : Sensogrammes SPR enregistrés lors de l'injection des polymères incluant un motif catéchol (en bleu) et dépourvus de motif catéchol (en noir). Etudes réalisées dans l'eau pour les **PNIPAM** (a) et dans l'acétonitrile pour les **PtBA** (b).  $C_{\text{polymères}} = 1.10^{-3}\ \text{mol.l}^{-1}$

Les profils SPR enregistrés montrent clairement une différence de comportement des polymères fonctionnalisés à l'égard de la surface de titane selon qu'ils possèdent ou non une ancre catéchol en extrémité de chaîne. En effet, dans le cas du **PtBA** (Figure V.8.b), le polymère intégrant le fragment catéchol se greffe sur la surface et une certaine quantité de matière reste immobilisée à la surface après rinçage comme l'indique la différence d'angle de résonance observée entre l'état initial et l'état final. En revanche, le profil SPR enregistré avec le **CTA4-PtBA** montre que le greffage de ce polymère sur la surface de titane n'a pas lieu dans la mesure où l'angle SPR enregistré après rinçage correspond à l'angle initial.

Les expériences SPR réalisées avec le **PNIPAM** (Figure V.8.a) montrent que le greffage du **CTA3-PNIPAM** s'opère également. Il est à noter qu'une faible quantité de matière reste adsorbée à la surface de titane après injection du **CTA4-PNIPAM** dépourvu d'ancre. Ce résultat peut s'expliquer par la présence d'interactions entre la surface comportant des groupements hydroxyles et les fonctions amides polaires du polymère.

### 2.3.2. Quantification de la matière greffée

Comme évoqué précédemment, l'équation de De Feijter (Équation V.3) permet d'estimer la quantité de matière greffée en surface à partir des variations d'angle SPR observées entre l'état initial et final. Nous avons appliqué cette équation aux variations d'angles SPR obtenus après rinçage lors de l'injection des polymères **CTA3-PNIPAM** et **CTA3-PtBA**. De plus, une étude de l'influence de la concentration en polymère injecté sur la quantité de matière greffée à été menée. Les résultats de cette étude sont répertoriés dans le Tableau V.4

Tableau V.4 : Récapitulatif des taux de recouvrement calculés par SPR lors de l'injection des polymères à différentes concentrations sur les surfaces de titane

<b>CTA3-PtBA</b>			<b>CTA3-PNIPAM</b>		
C (mmol.l <sup>-1</sup> )	m greffée (ng.mm <sup>-2</sup> )	densité molécules (molécules.nm <sup>-2</sup> )	C (mmol.l <sup>-1</sup> )	m greffée (ng.mm <sup>-2</sup> )	densité molécules (molécules.nm <sup>-2</sup> )
2	1,02	0,065	2	0,9	0,072
1	1,32	0,084	1	0,72	0,058
0,5	1,03	0,065	0,5	0,57	0,046
0,25	0,91	0,058	0,25	0,39	0,032
0,125	0,87	0,055	0,125	0,21	0,017

Dans les deux cas, la quantité de matière greffée en surface avoisine les 10<sup>12</sup> molécules.cm<sup>-2</sup>. Cette valeur est légèrement inférieure à celles obtenues lors de la formation de monocouches auto-assemblées (SAMs), soit 10<sup>13</sup> molécules.cm<sup>-2</sup> [5]. Il est important de noter que ces quantités de matières sont mille fois inférieures à celles estimées par voltampérométrie cyclique. Cette différence peut avoir plusieurs explications :

- le temps d'exposition des surfaces SPR aux polymères n'est que de 3000s, alors que les échantillons de titane sont traités pendant une nuit

- le greffage en SPR est réalisé en milieu statique, alors que les échantillons de titane sont fonctionnalisés sur banc d'agitation, ce qui augmente les possibilités d'interaction entre les polymères et la surface
- les surfaces sont chimiquement différentes. En effet, le wafer SPR comporte une couche de  $\text{TiO}_2$  de 10 nm déposé par PVD (Dépôt par voie physique). Seuls 15% des atomes de titane en extrême surface comportent des fonctions hydroxyles [6], nécessaires à l'accroche des fonctions catéchols. Dans le cas des échantillons de titane, le traitement piranha augmente ce pourcentage, facilitant ainsi l'accroche des différents polymères.

#### 2.4. Etude de la morphologie des films polymères greffés par microscopie à force atomique (AFM)

Un point important du processus de fonctionnalisation est de pouvoir estimer l'épaisseur et connaître la morphologie du film de polymère greffé à la surface des substrats en titane. Une méthode souvent utilisée à cette échelle pour visualiser la surface est la microscopie à force atomique (AFM). Les analyses AFM d'un échantillon de titane poli miroir (Figure V.9.a) et d'un second fonctionnalisé par le **CTA3-PNIPAM** (Figure V.9.b) ont été réalisés. Les images ont été enregistrées en mode tapping (non contact).

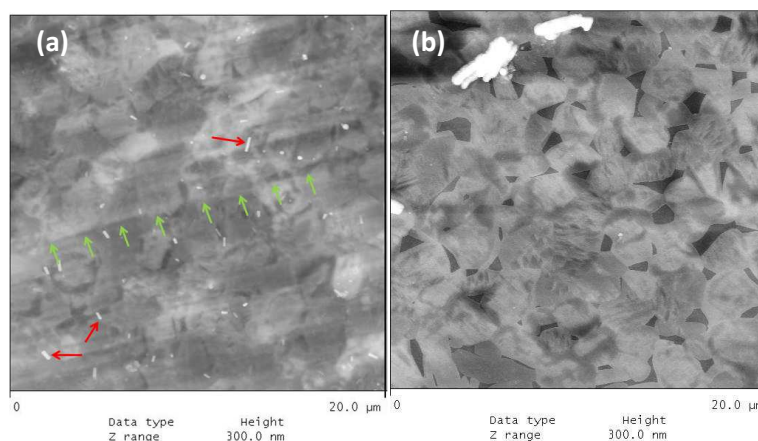


Figure V.9 : Clichés AFM d'un échantillon poli miroir (a) et d'un échantillon modifié par **CTA3-PNIPAM** (b)

Sur l'image AFM de l'échantillon non fonctionnalisé, des stries parallèles sont clairement visibles (flèches vertes sur la Figure V.9.a). Celles-ci proviennent de l'opération de polissage mécanique. Il est à noter que les grains du titane sont également visibles, ainsi que des

particules de silice provenant du polissage (Figure V.9.a, flèches rouges), et ce malgré le traitement de lavage aux ultrasons. Une fois la surface modifiée par **CTA3-PNIPAM**, les stries disparaissent mais les grains sont toujours visibles. Il se forme donc *a priori* une couche homogène qui vient recouvrir la surface des grains. Malheureusement, il n'est pas possible de mesurer l'épaisseur du film à cause de la rugosité initiale de l'échantillon due à la finition « miroir » (environ 100 nm) du polissage.

Pour résoudre ce problème, nous avons utilisé un wafer de silicium sur lequel a été déposée par PVD une fine couche d'oxyde de titane (Nanolane). Ce wafer, présentant une faible granulométrie, est ensuite immergé à moitié dans une solution de **CTA3-PNIPAM** ( $M_n = 21\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $I_p = 1,15$ ) (Figure V.11) afin d'obtenir une marche mesurable par AFM.

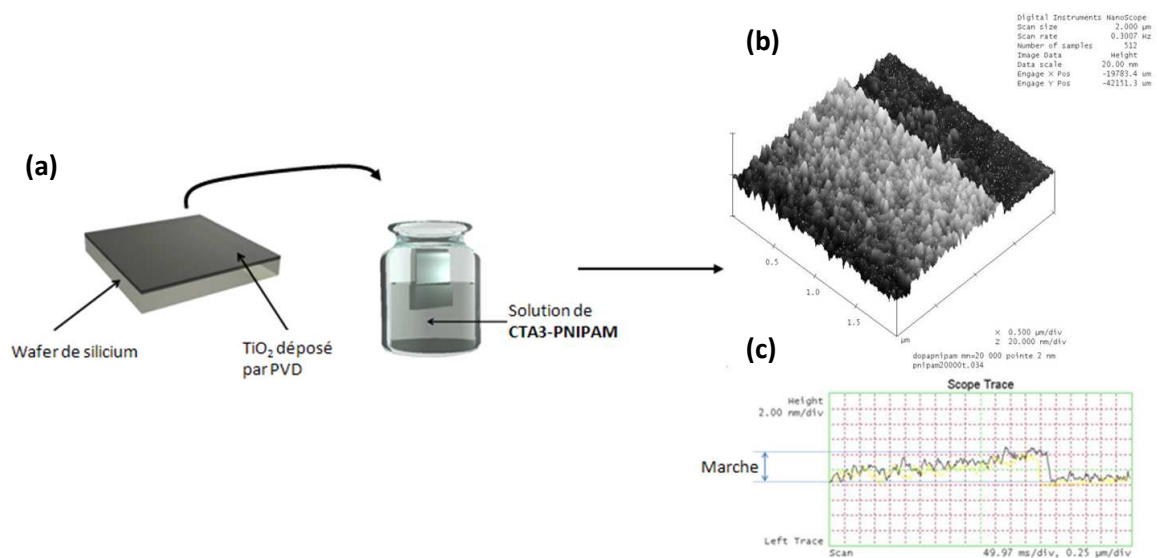


Figure V.10 : Méthode de fonctionnalisation du wafer de silicium (a), image AFM (b) et profil de surface du wafer fonctionnalisé (c) par le **CTA3-PNIPAM** obtenus par microscopie AFM.

Sur l'image AFM enregistrée au niveau du ménisque (Figure V.10), la partie restée émergée du wafer est clairement identifiable. La partie immergée montre sans ambiguïté le greffage du polymère fonctionnalisé en bout de chaîne sur la surface. A partir du profil de surface obtenu sur ce même échantillon, nous avons accès à l'épaisseur du film greffé dans la mesure où la différence de hauteur entre les deux parties est d'environ 5 nm.

## 2.5. Effet du greffage sur les propriétés physico-chimiques des surfaces

La modification des substrats de titane par les différents polymères est susceptible de moduler les propriétés physico-chimiques des surfaces, en particulier leur balance

hydrophile/hydrophobe. Pour le vérifier, nous avons réalisé des analyses d'angle de contact (eau) (Figure V.11).

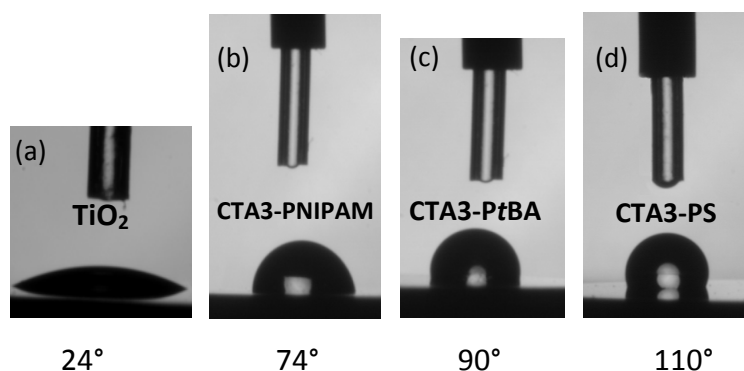


Figure V.11 : Angles de contact (eau) mesurés sur les échantillons de titane traités par la solution « piranha » (a), par les polymères **CTA3-PNIPAM** (b), **CTA3-PtBA** (c) et **CTA3-PS** (d)

Le titane traité par la solution piranha est hydrophile (24°), ce qui s'explique par le grand nombre de fonctions hydroxyles présentes en surface générées lors de l'étape d'oxydation. L'échantillon fonctionnalisé par le polymère **CTA3-PNIPAM** présente un angle de contact de 74°, ce qui est en accord avec les résultats répertoriés dans la littérature concernant les brosses de polymères à base de **PNIPAM** [7]. L'angle de contact augmente lors de la modification du titane à l'aide du **CTA3-PtBA** (90°) et du **CTA3-PS** (110°), ces polymères présentant une hydrophobicité croissante. A la vue de ces résultats, Il s'avère donc possible de moduler la mouillabilité des échantillons de titane en fonction de la nature du polymère choisi pour le greffage.

### 3. Stratégie combinée « graft to » et « click chemistry »: Elaboration d'une plateforme à base de titane "clickable"

Cette stratégie repose sur une fonctionnalisation de la surface de titane en deux étapes. La première consiste à greffer sur le substrat une ancre catéchol possédant une fonction azoture (N<sub>3</sub>) pour donner naissance à une plateforme dite "clickable". La deuxième étape repose sur la post-fonctionnalisation de cette plateforme en mettant en œuvre une réaction de cycloaddition de Huisgen [3+2] catalysée par le Cu (I) en présence d'une (macro)molécule munie d'une fonction alcyne vrai (Figure V.12). Cette approche permet ainsi de combiner l'efficacité du motif catéchol en matière de greffage à celle de la réaction de chimie "click", connue pour présenter de bons rendements dans des conditions de réactions douces.

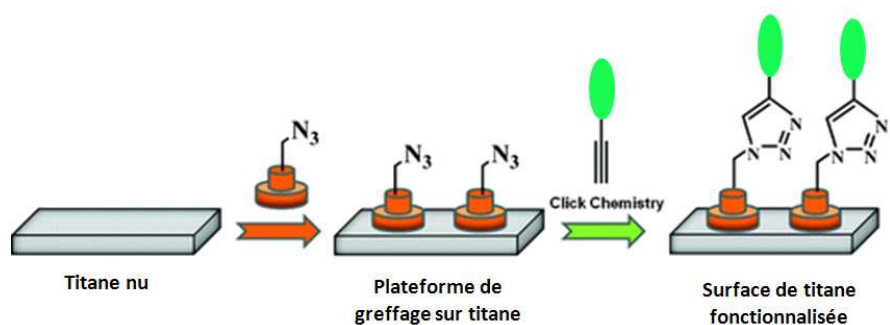


Figure V.12 : Principe générale de la stratégie combinée « graft to » et chimie « click »

### 3.1. Synthèse de l'ancre Dopamine-N<sub>3</sub>

Pour cette approche, nous avons développé une nouvelle ancre chimique à base de catéchol contenant à son extrémité une fonction azoture « clickable ». La synthèse de l'ancre Dopamine-N<sub>3</sub> est reportée dans la Figure V.13. Le 3-azido-propan-1-ol est couplé à l'anhydride glutarique en présence de 4-diméthylaminopyridine (DMAP) pour donner le composé **(1)**. L'acide carboxylique du composé **(1)** est activé par le NHS (Figure V.13. composé **(2)**) puis mise en contact avec à la dopamine pour former l'ancre Dopamine-N<sub>3</sub> **(3)**.

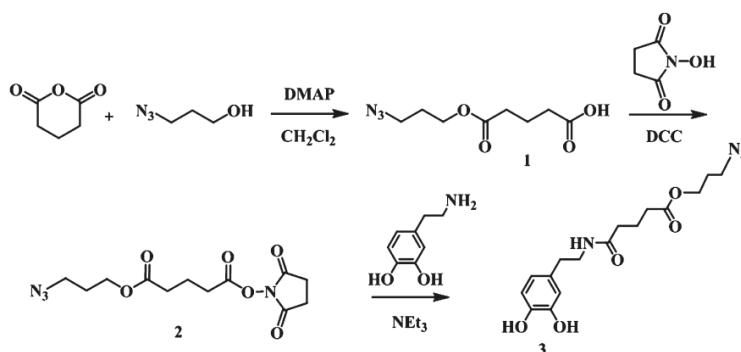
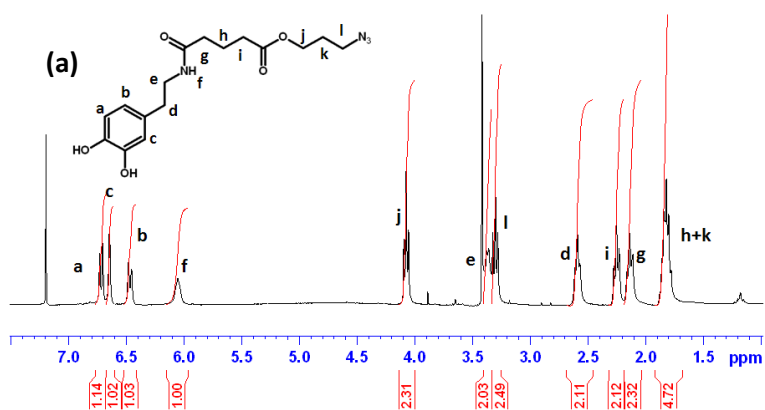


Figure V.13 : Schéma de synthèse de l'ancre Dopamine-N<sub>3</sub>

La structure du composé **3** a été élucidée par RMN <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C.



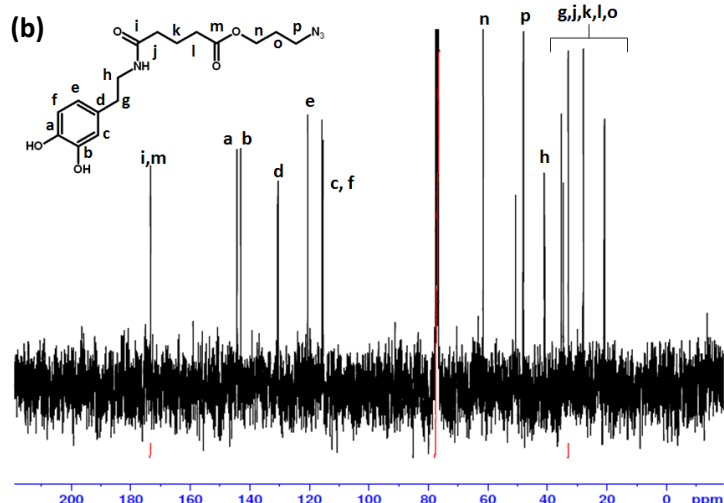


Figure V.14 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  (a) et  $^{13}\text{C}$  (b) de l'ancre Dopamine- $\text{N}_3$  ( $\text{CDCl}_3$ )

Sur le spectre RMN  $^1\text{H}$  (Figure V.14.a), le fragment catéchol est facilement identifiable au travers de la présence des protons aromatiques  $\text{H}_a$ ,  $\text{H}_b$  et  $\text{H}_c$  à  $\delta = 6,5\text{-}6,8$  ppm, tandis que les protons  $\text{H}_j$  et  $\text{H}_l$ , caractéristiques de la chaîne azoture, sont observables à respectivement  $\delta = 4,1$  ppm et  $\delta = 3,3$  ppm. Le spectre  $^{13}\text{C}$  confirme également la structure de la molécule dans la mesure où les signaux caractéristiques du motif catéchol entre 110 et 150 ppm d'une part et ceux de l'ester et de l'amide vers 175 ppm d'autre part sont observés (Figure V.14.b).

### 3.2. Fonctionnalisation du titane par l'ancre Dopamine- $\text{N}_3$

Les surfaces « clickables » sont préparées par simple immersion des échantillons de titane oxydés dans une solution de méthanol contenant l'ancre dopamine- $\text{N}_3$  à une concentration de  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  pendant une nuit et à l'abri de la lumière. Les pièces de titane fonctionnalisées ( $\text{Ti-N}_3$ ) sont ensuite rincées abondamment au méthanol pour éliminer les espèces physisorbées puis séchées sous flux d'azote (Figure V.15).

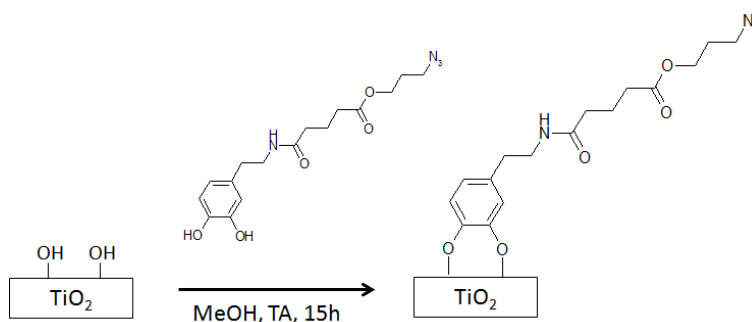


Figure V.15 : Schématisation de la fonctionnalisation du titane par l'ancre dopamine- $\text{N}_3$



Afin de confirmer la présence de l'ancrage sur la surface du titane, des études de voltampérométrie cyclique et de XPS ont été réalisées (Figure V.16).

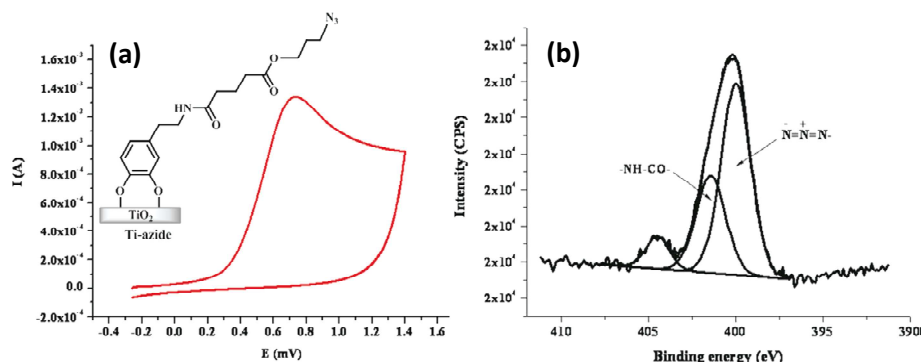


Figure V.16 : Voltampérogramme cyclique obtenu à partir de la surface de titane modifiée par l'ancrage dopamine-N<sub>3</sub> réalisé dans une solution tampon phosphate à pH = 7 (a) et spectre XPS du niveau de cœur de l'azote (N 1s) de la surface Ti-N<sub>3</sub> (b).

Sur le voltampérogramme cyclique (Figure V.16.a) obtenu à partir de la surface Ti-N<sub>3</sub>, on observe la vague caractéristique de l'oxydation du catéchol en quinone ce qui montre que le motif catéchol est présent sur la surface. De plus, le taux de recouvrement en dopamine-N<sub>3</sub> a été estimé à  $\Gamma = 1,5 \cdot 10^{15}$  molécules.cm<sup>-2</sup> par intégration du signal électrochimique (Équation V.2). Ce résultat montre encore une fois qu'une couche compacte et dense a été formée à la surface du titane.

L'analyse XPS réalisée sur le substrat de titane fonctionnalisé par la dopamine-N<sub>3</sub> révèle la présence d'azote vers 400 eV. La déconvolution du niveau de cœur de l'azote (N1s) (Figure V.16.b) montre deux composantes principales à 401,4 eV et 400eV correspondant respectivement aux fonctions amides et azoture.

En conclusion, les études menées par XPS et par voltampérométrie cyclique confirme l'immobilisation de la Dopamine-N<sub>3</sub> sur le titane sous forme d'une couche dense et compacte avec conservation de l'intégrité du groupement azoture après greffage.

### 3.3. Fonctionnalisation de la plateforme par une sonde électrochimique

Dans un premier temps, pour valider la faisabilité de la stratégie d'immobilisation par chimie « click », nous avons procédé à la fonctionnalisation de la surface de titane Ti-N<sub>3</sub> par le motif électroactif ferrocène en utilisant la réaction de cycloaddition [3+2] de Huisgen (Figure V.17). En effet, le ferrocène est très fréquemment utilisé comme sonde électrochimique [8] car cette molécule s'oxyde de façon totalement réversible en ferricinium par un processus à 1

électron (équation :  $Fc \rightleftharpoons Fc^+ + 1e^-$ ). De plus, cette réaction d'oxydation/réduction peut être très facilement suivie par voltampérométrie cyclique.

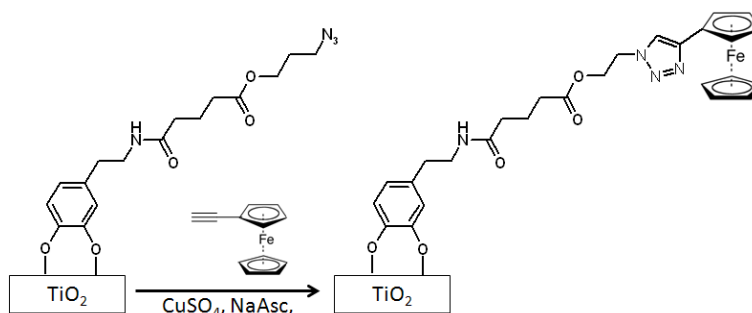


Figure V.17 : Réaction de cycloaddition [3+2] de Huisgen entre le Ferrocène-alcyne et le Ti-N<sub>3</sub>

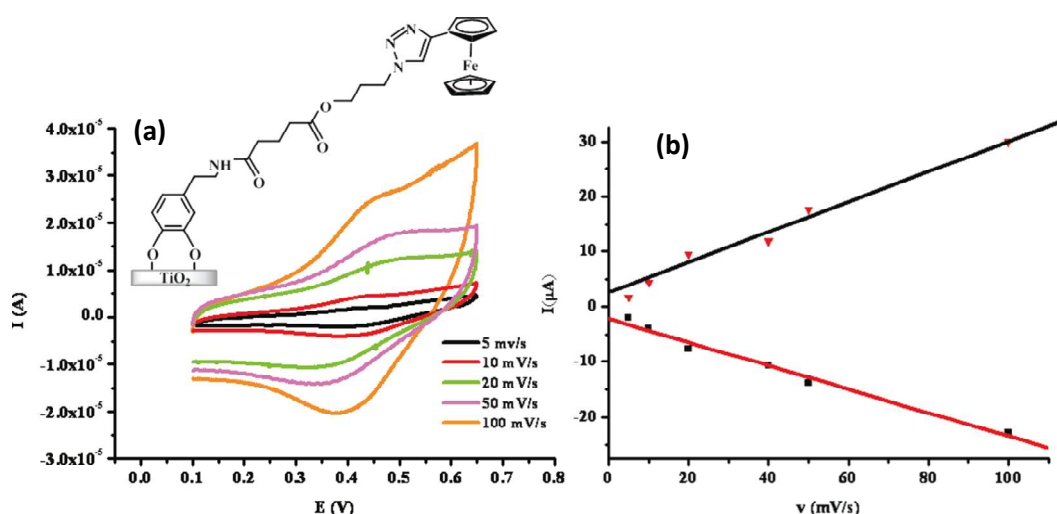


Figure V.18.: Voltampérogrammes cycliques enregistrés à différentes vitesses de balayage à partir d'une surface de titane fonctionnalisée par le ferrocène (a) et évolution de l'intensité des pics d'oxydo/réduction en fonction de la vitesse de balayage (b)

Conditions : tampon phosphate à pH 7, électrode de référence : Ag/AgCl

Les voltampérogrammes du substrat de titane fonctionnalisé par le ferrocène (Figure V.18.a), enregistrés après rinçage, présentent un pic d'oxydation réversible centré sur 0,42V correspondant à l'oxydation réversible du ferrocène en ferricinium, ce qui montre que l'unité ferrocène a été greffée sur la surface du titane. De plus, celui-ci est effectivement immobilisé sur la surface et non adsorbé dans la mesure où l'intensité des pics d'oxydation et de réduction évolue linéairement avec la vitesse de balayage. En effet, ce comportement traduit la présence d'un régime d'oxydo-réduction confiné à l'électrode où l'intensité des pics est proportionnelle à la vitesse de balayage (en régime diffusionnel ( $I=f(v^{1/2})$ )).

Comme précédemment, le taux de recouvrement en unité ferrocène peut être calculé à partir des voltampérogrammes correspondants (Équation V.2) (diamètre=15 mm, n=1).

Celui-ci est estimé à  $\Gamma = 1.10^{14}$  molécules.cm<sup>-2</sup>. Ce résultat est en adéquation avec les densités de greffage classiquement observés dans la littérature [5].

### 3.4. Fonctionnalisation de la plateforme par une sonde fluorée

La combinaison des stratégies « graft to » et chimie « click » permet d'envisager la possibilité de moduler les propriétés physico-chimiques des surfaces de titane par immobilisation de polymères. Notre choix s'est porté sur le Zonyl FSO-100 (DuPont), un oligomère fluoré d'origine commerciale, pouvant rendre la surface de titane anti-adhésive [9] en augmentant l'hydrophobicité du matériau. Cet oligomère est composé d'un bloc fluoré et d'un bloc poly(éthylène glycol) (PEG) (Figure V.19). Cet oligomère, comme indiqué dans la Figure V.19 a dans un premier temps été estérifié par l'acide 4-pentynoïque.

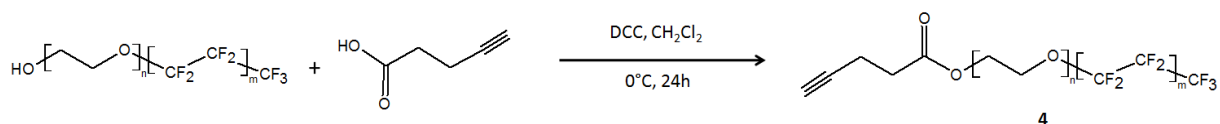


Figure V.19 : Réaction de couplage du Zonyl avec l'acide 4-pentynoïque à l'aide de la DCC

La structure du composé 4 a été confirmée des analyses RMN (partie expérimentale) et infrarouge (Figure V.20) ont été réalisées.

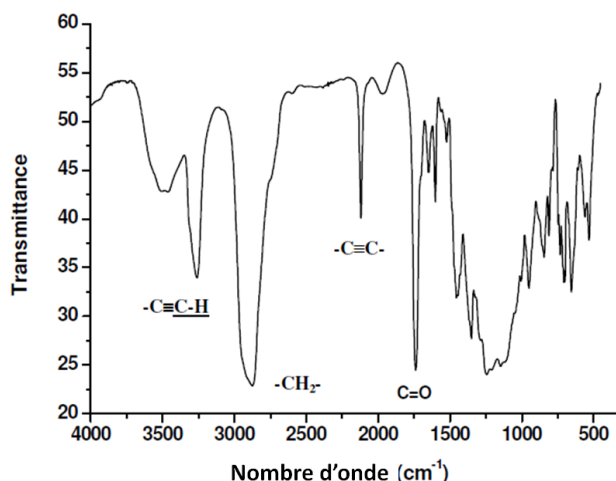


Figure V.20 : Spectre Infrarouge du composé obtenu par couplage entre le Zonyl et l'acide 4-pentynoïque.

L'analyse par spectroscopie infrarouge du composé obtenu montre la présence d'une bande d'élongation de la liaison C=O à 1745 cm<sup>-1</sup> correspondant à l'ester formé, ainsi qu'une bande de vibration à 2150 cm<sup>-1</sup> correspondant à l'élongation C≡C de l'alcyne vrai. La réaction de

cycloaddition [3+2] de Huisgen a été ensuite réalisée sur la plateforme Ti-N<sub>3</sub> selon le protocole décrit dans la Figure V.21.

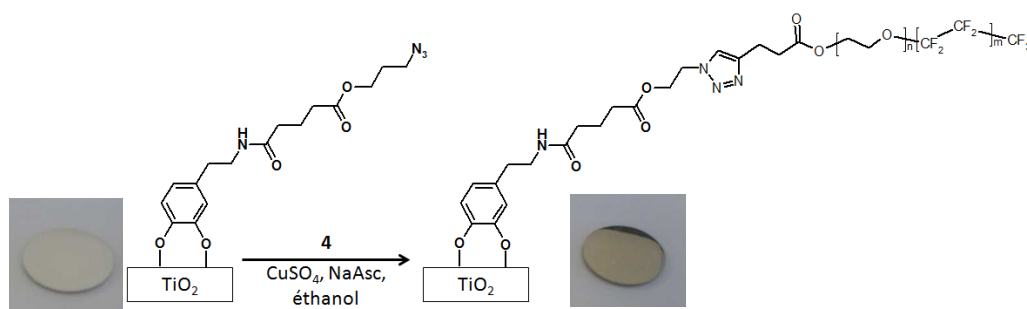


Figure V.21 : Schématisation de la stratégie exploitée pour greffer le sur le la surface Ti-N<sub>3</sub> par cycloaddition [3+2] de Huisgen et photographies des états respectifs des surfaces à chaque étape de la fonctionnalisation.

En fin de réaction, une observation directe de la surface montre la formation d'un revêtement orangé (Figure V.21.) ce qui laisse penser que la réaction de cycloaddition a bien eu lieu.

### 3.4.1. Analyse XPS des surfaces fonctionnalisées

Les échantillons obtenus ont été caractérisés par XPS pour confirmer l'immobilisation de l'oligomère fluoré à la surface du titane.

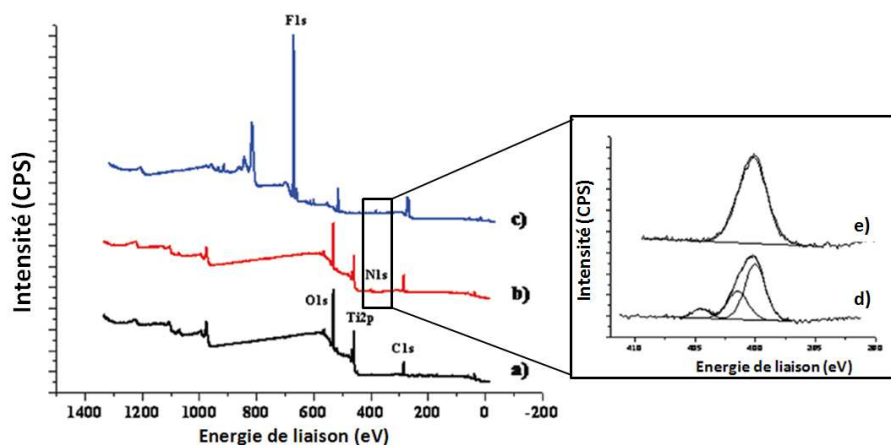


Figure V.22 : Spectres XPS des surfaces de titane non modifiées (a), modifiées par l'ancre Dopamine-N<sub>3</sub> (b) et après fonctionnalisation par le Zonyl FSO-100 modifié (c). En encart, niveaux de cœur N 1s enregistrés pour le titane modifié par l'ancre dopamine N<sub>3</sub> (d) et par l'oligomère (e).

Comme attendu, le spectre du titane non fonctionnalisé (Figure V.22, spectre a) montre la présence de titane et d'oxygène. Des traces de carbone, provenant d'une contamination sont également observées. Sur le spectre XPS de la surface fonctionnalisée par l'ancre, un

signal d'azote N 1s est identifié vers 400 eV et attribué à l'azoture. Après fonctionnalisation de la plateforme par le dérivé du Zonyl, un signal important de fluor F 1s apparaît (Figure V.22, spectre c), ce qui montre la présence de l'oligomère sur la surface. Les niveaux de cœur de l'azote (Figure V.22, encart), montre, comme dans le cas du Ferrocène-alcyne, deux composantes principales à 401,4 eV et 400eV correspondant respectivement aux fonctions amides et azoture (Figure V.22, spectre e), ce qui est en accord avec la formation du cycle triazole [10].

La disparition de la composante Ti 2p après fonctionnalisation par le dérivé du Zonyl (Figure V.22, spectre c) confirme la formation d'une couche épaisse et homogène supérieure à la profondeur de pénétration des photoélectrons, c'est-à-dire 10 nm.

### 3.4.2. Effet du greffage sur les propriétés physico-chimiques des surfaces

Afin de connaître l'influence du greffage sur les propriétés physico-chimiques de surface du titane, l'hydrophobicité du matériau a été évaluée à l'aide d'une mesure d'angle de contact (eau) à chaque étape de la fonctionnalisation.



Figure V.23 : Evolution de l'angle de contact (eau) d'une surface de titane oxydée (a), fonctionnalisée par l'ancre Dopamine-N<sub>3</sub> (b) et après la réaction de chimie « click » avec le dérivé du Zonyl (c)

Les analyses montrent que la fonctionnalisation du titane par l'ancre Dopamine-N<sub>3</sub> augmente l'hydrophobicité du matériau (70°) en accord avec le greffage de l'ancre chimique sur la surface. Cette hydrophobicité est exacerbée après réaction de « chimie click » avec l'oligomère fluoré dérivé du Zonyl. En effet, l'angle de contact atteint la valeur de 125° après réaction (Figure V.23) ce qui confirme l'efficacité de la fonctionnalisation de la surface de titane par le Zonyl.

Il est à noter qu'en l'absence de catalyseur Cu(I), l'angle de contact n'évolue pas, ce qui met en évidence de nouveau le rôle clé joué par le cuivre dans la réaction de « chimie click » et que l'oligomère ne se physisorbe pas en surface.

### 3.5. Conclusion

En conclusion, la stratégie « graft to » combinée à la réaction de cycloaddition [3+2] de Huisgen, développée au sein de notre laboratoire [11] s'est avérée être une solution efficace et prometteuse pour la fonctionnalisation en conditions douces de surfaces de titane par des oligomères, des polymères ou encore des molécules bioactives. Comme démontré ci-dessus, cette stratégie permet également de moduler les propriétés physiques et chimiques des surfaces de titane par l'emploi d'un panel de (macro)molécules de structures et de longueurs variées. Ainsi, cette plateforme de fonctionnalisation pourra être utilisée à l'avenir pour la conception de nouveaux biomatériaux hybrides à base de titane.

## 4. Application de la stratégie « graft from » à la fonctionnalisation des surfaces de titane

Après avoir étudié l'approche « graft to », qui a permis l'accroche sur le titane de polymères fonctionnels parfaitement définis, nous nous sommes également intéressés à l'approche « graft from ». Cette stratégie est couramment utilisée pour modifier les propriétés physico-chimiques de substrats métalliques et présente l'avantage de générer en général à la surface du matériau des polymères avec une densité de greffage très élevée.

Pour mettre en œuvre cette stratégie, des échantillons de titane ont été fonctionnalisés par l'agent de transfert **CTA3** (agent porteur d'un groupement catéchol). Pour ce faire, les échantillons de titane sont immergés dans une solution à  $1 \text{ mg.ml}^{-1}$  ( $2,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ ) de **CTA3** dans le méthanol à l'abri de la lumière pendant une nuit. Les échantillons de titane fonctionnalisés (Ti-CTA3) sont ensuite soumis à l'étape de polymérisation d'une durée de 24h avec différents monomères (NIPAM, tBA, styrène et NAS) en présence d'AIBN mais également de l'agent de transfert **CTA3** en solution. En effet, dans le cadre de notre étude sur des surfaces planes, la quantité de matière des polymères sur la surface est extrêmement faible, ce qui rend très difficile la caractérisation des polymères, après dégreffage, par les techniques usuelles (RMN, GPC). Ainsi, plusieurs études bibliographiques ont démontré que l'ajout d'agent de transfert soluble dans le milieu réactionnel pouvait contribuer à améliorer le contrôle de la polymérisation mais permettait également la formation de polymères solubles [12-13]. Ainsi, ce polymère soluble peut être isolé et

caractérisé par les techniques standards et plusieurs équipes de recherche ont démontré que les propriétés de ce polymère soluble pouvaient être proches des propriétés des polymères greffés sur le support [12]. Les conditions opératoires utilisées ont été optimisées et sont détaillées dans le Tableau V.5.

Tableau V.5 : Conditions de polymérisation RAFT utilisées pour la stratégie « graft from » à partir des surfaces Ti-CTA3

Monomère	Solvant	[M]/[CTA3]/[AIBN]	Température
NIPAM	DMF	200/1/0,1	75°C
tBA	Toluène	200/1/0,05	75°C
Styrène	Toluène	300/1/0,3	80°C
NAS	DMF	100/1/0,05	80°C

Après l'étape de polymérisation, les pièces de titane sont abondamment rincées, séchées puis conservées sous azote. Le polymère formé en solution grâce à l'ajout de l'agent CTA3 est isolé par précipitation et analysé afin de déterminer ses caractéristiques (Tableau V.6).

Tableau V.6 : Résultats des analyses GPC obtenus à partir des polymères solubles en fin de polymérisation

Polymère	Mn <sub>GPC</sub> (g.mol <sup>-1</sup> ) <sup>a)</sup>	I <sub>p</sub> <sup>a)</sup>
PNIPAM <sup>a)</sup>	27 500	1,22
PtBA <sup>a)</sup>	33 000	1,37
PS <sup>a)</sup>	5 900	1,13
PNAS <sup>b)</sup>	16 900	1,27

a) déterminés par GPC THF (équivalent PS) b) déterminés par GPC DMF (équivalent PMMA)

D'après les résultats répertoriés dans le Tableau V.6, les indices I<sub>p</sub> des polymères sont faibles (1,37 pour le PtBA, 1,22 pour le PNIPAM, 1,13 pour le PS, 1,27 pour le PNAS). On peut toutefois noter que ces indices I<sub>p</sub> obtenus lors de la stratégie « graft from » sont légèrement supérieurs aux indices I<sub>p</sub> des polymères obtenus lors de la stratégie « graft to ». Par ailleurs, les échantillons de titane modifiés par cette stratégie présentent une coloration marquée (Figure V.24), ce qui tend à prouver que la polymérisation a bien eu lieu.

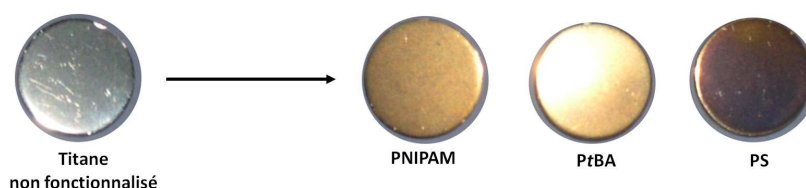


Figure V.24 : Photographies des échantillons de titane avant et après fonctionnalisation par les différents polymères à l'aide de la stratégie « graft from ».

#### 4.1. Caractérisations des surfaces de titane obtenues par la stratégie « graft from » par spectroscopie infrarouge ATR

Afin de vérifier si ce changement de coloration des échantillons de titane est imputable à la présence des polymères sur les substrats traités par l'approche « graft from », nous avons procédé à l'analyse des surfaces par spectroscopie infrarouge ATR.

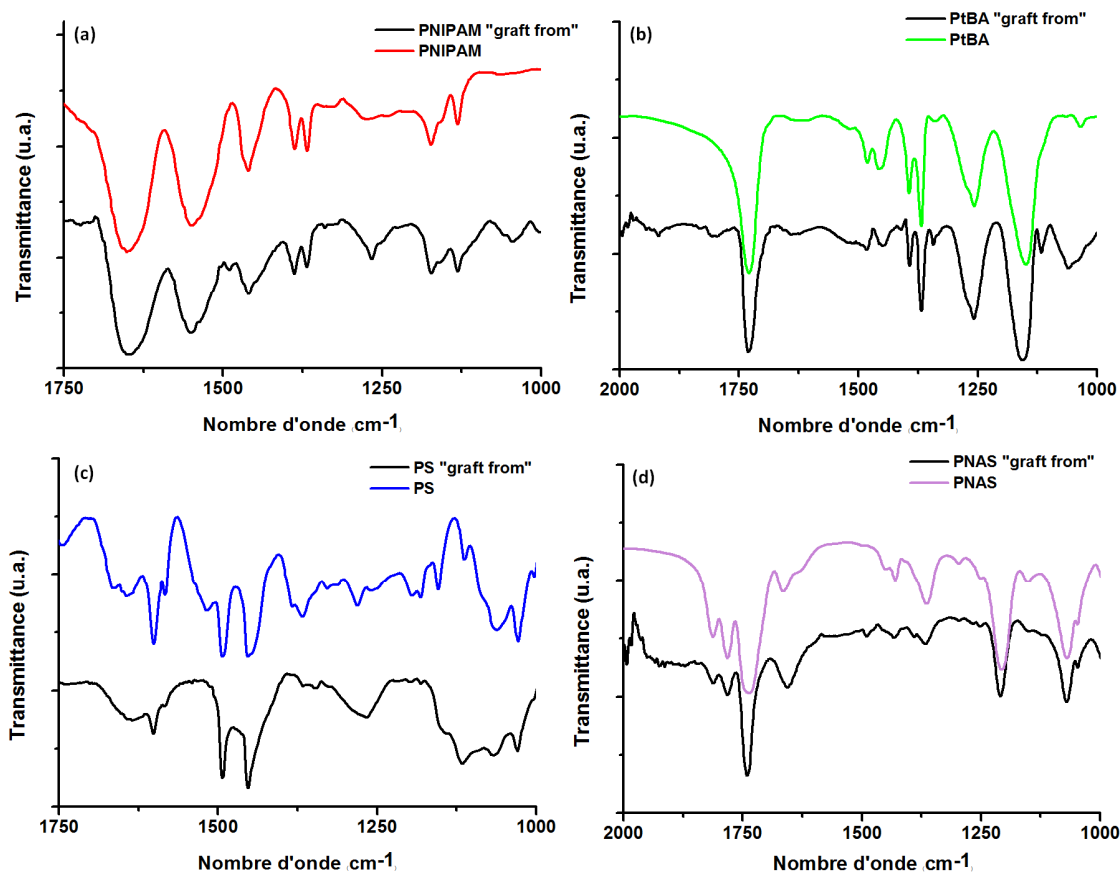


Figure V.25 : Spectres IR des polymères fonctionnalisés (en couleur) et spectres ATR (en noir) des échantillons de titane modifiés par les polymères de NIPAM (a) tBA (b), styrène (c) et NAS (d).

Pour chaque surface de titane fonctionnalisée par les polymères, nous retrouvons les bandes de vibrations caractéristiques de ces polymères. En effet, l'analyse ATR de l'échantillon de titane modifié par le **PNIPAM** révèle la présence des bandes d'élongation de la liaison C=O et de déformation des liaisons N-H respectivement à 1650 et 1546 cm<sup>-1</sup>, caractéristiques de ce polymère (Figure V.25.a). Le spectre IR-ATR de la surface modifiée par le **PtBA** (Figure V.25.b) présente la bande d'élongation de la liaison C=O à 1725 cm<sup>-1</sup> attribuable à l'ester et l'échantillon de titane traitée par le **PS** (Figure V.25.c) présente les bandes d'élongation des liaisons C=C à 1450, 1490 et 1600 cm<sup>-1</sup> du styrène. Par ailleurs, l'étude IR-ATR de la surface



modifiée par le **PNAS** (Figure V.25.d) montre la présence des bandes caractéristiques d'élongations des liaisons C=O (1740, 1784 et 1810  $\text{cm}^{-1}$ ) du polymère **CTA3-PNAS**.

#### 4.2. Etude du greffage selon la stratégie « graft to » par électrochimie

Compte tenu de l'électroactivité du motif catéchol, nous avons vérifié la présence de ce motif sur le titane lors des deux étapes de fonctionnalisation (greffage du CTA3 et du polymère) impliquées dans la stratégie « graft from » par électrochimie.

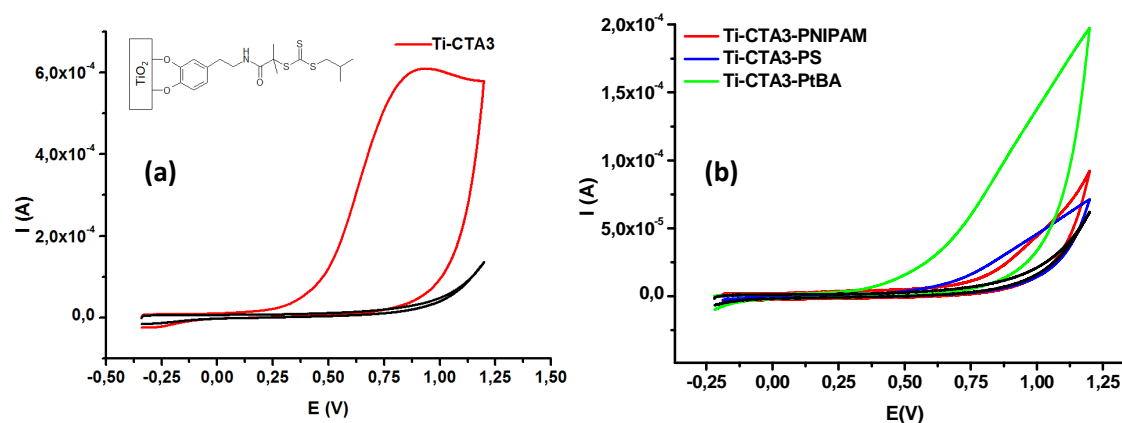


Figure V.26 : Voltampérommes cycliques enregistrés à partir de surfaces de titane modifiées par l'agent de transfert **CTA3** (a) et après étape de polymérisation selon la stratégie « graft from » (b). Sur chaque graphique figure en noir un voltamogramme cyclique enregistré à partir de titane non fonctionnalisé.

Conditions : électrode de référence Ag/AgCl, vitesse de balayage  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ , solution électrolyte : tampon phosphate pH = 7

D'après ces voltampérommes, il apparaît clairement que la surface de titane a bien été fonctionnalisée par l'agent de transfert **CTA3**, (Figure V.26.a), dans la mesure où une vague d'oxydation correspondant à l'oxydation du groupement catéchol en quinone est observée. Le taux de recouvrement a été estimé à  $1,7 \cdot 10^{15} \text{ molécules.cm}^{-2}$ , soit un taux de recouvrement s'approchant des valeurs calculées pour les polymères immobilisés selon la stratégie « graft to ». Les voltampérommes des surfaces fonctionnalisées par la polymérisation de type « graft from » (Figure V.26.b) montrent également une vague d'oxydation attribuable à la présence du catéchol sur la surface mais le signal est beaucoup moins intense que pour le **CTA3**. Ce phénomène s'explique par le recouvrement de la surface par une couche de polymère dense et compacte isolante qui limite la diffusion des espèces au voisinage de l'électrode.

### 4.3. Etude de la morphologie des films de polymères greffés obtenus par la stratégie « graft from » par microscopie à force atomique (AFM)

Des analyses de microscopie AFM ont été réalisées pour observer l'aspect de surface des échantillons de titane au cours des différentes étapes de la fonctionnalisation conduisant à la formation du film de **PNIPAM**.

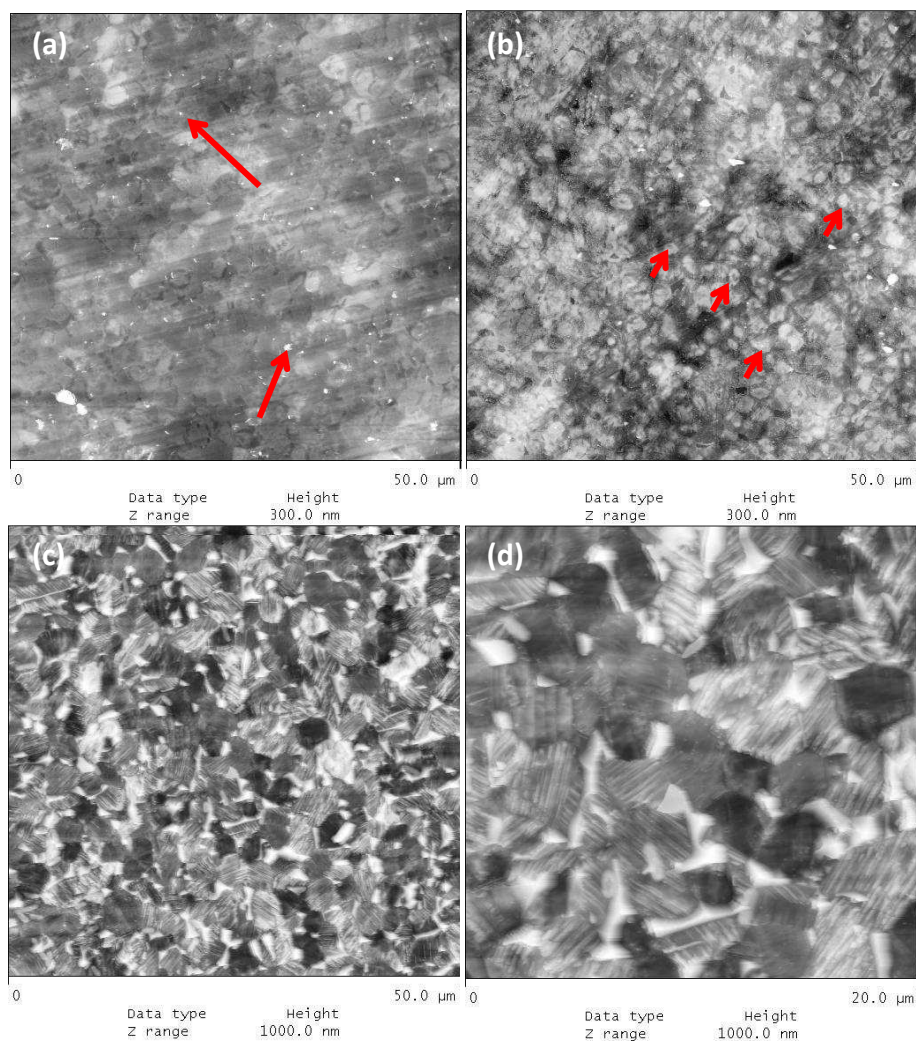


Figure V.27 : Images AFM des surfaces de titane polie (a) fonctionnalisées par le **CTA3** (b) et le **PNIPAM** (c,d)

Comme évoqué précédemment, le titane poli miroir (Figure V.27.a) possède des rayures régulières provenant du polissage. Ces rayures disparaissent partiellement après immobilisation sur la surface de l'agent de transfert **CTA3** (Figure V.27.b) et des îlots (flèches rouges, Figure V.27.b), attribuables à l'agent de transfert, recouvrent les grains du titane. Après la polymérisation (Figure V.27.c), cette compartimentation s'accroît avec l'apparition d'une structure finement striée au sein de chaque grain (Figure V.27.d). Ces

stries proviennent d'une organisation structurale propre au polymère et le recouvrement de la surface en polymère semble total.

#### 4.4. Modification des propriétés physico-chimiques des surfaces de titane fonctionnalisées

Après avoir caractérisé la présence des brosses de polymères à la surface des échantillons de titane, nous avons étudié l'impact du greffage sur la balance hydrophobe/hydrophile des substrats de titane. Pour cela, à chaque étape de fonctionnalisation, une mesure d'angle de contact a été effectuée (Tableau V.7).

Tableau V.7. : Angles de contact (eau) observés pour les surfaces modifiées par de la stratégie « graft from » (moyenne effectuée sur 6 mesures)

Echantillon	Angle de contact (eau) (°)
Titane	47±2
Titane piranha	24±2
Titane + CTA3	94±2
Titane "graft from" PNIPAM	73±2
Titane "graft from" PtBA	102±2
Titane "graft from" PS	120±2
Titane "graft from" PNAS	30±2

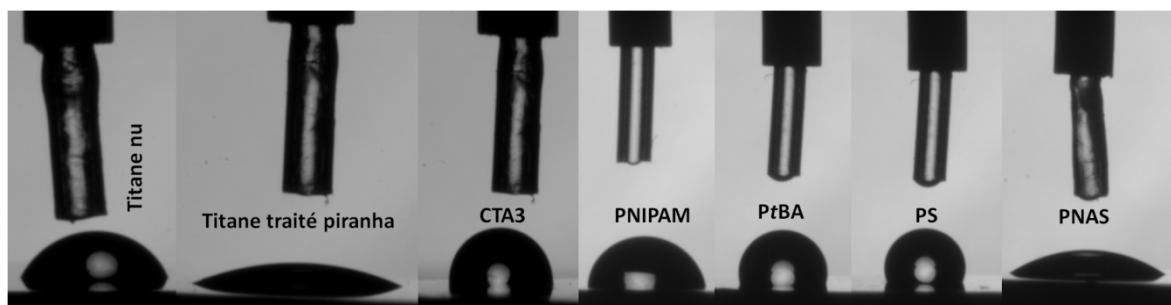


Figure V.28 : Angle de contact (eau) des différentes surfaces modifiées par l'approche « graft from »

Dans un premier temps, on observe que le traitement piranha augmente l'hydrophilie (24°) de la surface par rapport au titane poli miroir (47°). Cette diminution d'angle de contact provient principalement de l'accroissement de la densité de fonctions hydroxyles à la surface de l'échantillon. L'angle de contact devient nettement plus important après la fonctionnalisation de la surface de titane par l'agent de transfert **CTA3** (94°, Figure V.28), dont la partie trithiocarbonate est hydrophobe.

Après l'étape de polymérisation, les angles de contact mesurés s'approchent des résultats observés avec la stratégie « graft to ». Si pour le **PNIPAM** l'angle de contact est identique entre les deux stratégies (74° pour le **PNIPAM** « graft to », 73° pour le **PNIPAM** « graft from »), la valeur de l'angle de contact pour le **PtBA** (102°) et pour le **PS** (120°) « graft from » est légèrement supérieure à leurs homologues « graft to » (90° pour le **PtBA**, 110° pour le **PS**). Cette différence peut s'expliquer par une densité de fonctionnalisation plus importante avec la stratégie « graft from ».

Par ailleurs, le greffage de polymères d'esters activés tels que le **PNAS** à la surface du titane se relève d'un grand intérêt, car il pourrait servir de plateforme pour l'immobilisation de biomolécules, telles que des protéines. Pour démontrer le potentiel de cette stratégie de post-fonctionnalisation, les échantillons de titane fonctionnalisés par le **PNAS** ont été immergés dans une solution de glucosamine à 2 mg.ml<sup>-1</sup> en présence de 2,6-lutidine (base).

Après rinçage, un angle de contact de 15° est observé (Figure V.29) ce qui montre que la fonctionnalisation de la surface par la glucosamine a bien eu lieu et l'angle observé est en parfait accord avec la forte affinité des polymères de glucosamine avec l'eau.

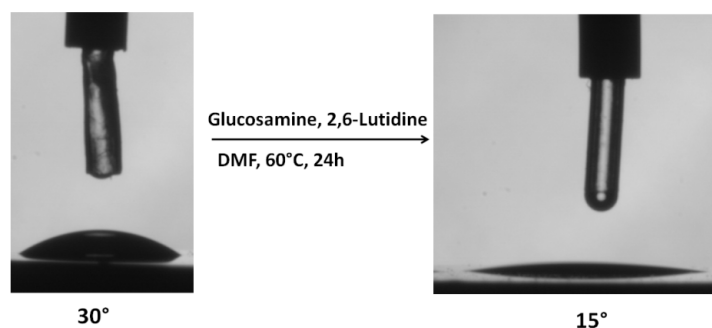


Figure V.29 : Evolution de l'angle de contact (eau) observé à partir d'une surface de titane fonctionnalisée avec le **PNAS** puis post-fonctionnalisée par la glucosamine.

Cette même réaction a été suivie par spectroscopie IR ATR et les spectres obtenus pour chacune des deux surfaces avant et après post-fonctionnalisation sont présentés sur la Figure V.30.

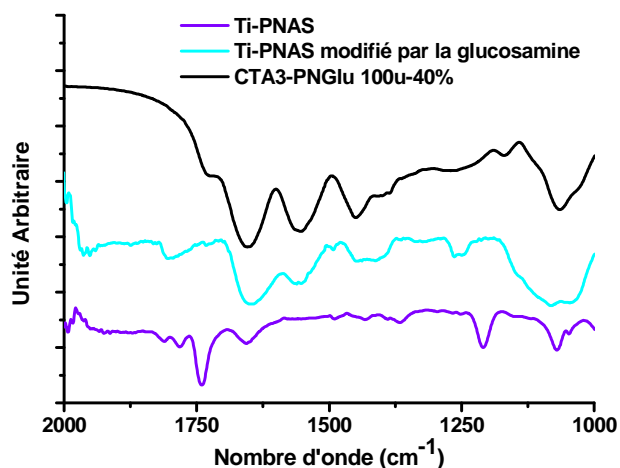


Figure V.30 : Spectres ATR obtenus à partir de surfaces de titane fonctionnalisées par le **PNAS** (violet) et après post-fonctionnalisation par la glucosamine (bleu). En noir, le spectre IR d'un polymère de glucosamine.

Sur le spectre ATR de la surface post-fonctionnalisée par la glucosamine (Figure V.30, bleu), les bandes d'élongation des liaisons C=O (1740, 1784 et 1810  $\text{cm}^{-1}$ ) caractéristiques du **PNAS** (Figure V.30, violet) ont disparues et une bande de vibration à 1640  $\text{cm}^{-1}$  caractéristique de l'élongation d'une liaison C=O d'amide est observée. Cette bande se retrouve également dans le spectre IR des polymères de glucosamine (Figure V.30, noir) obtenus dans le chapitre IV.

En conclusion, nous avons démontré que le greffage de polymères de différentes natures à partir de surfaces de titane fonctionnalisées par l'ancre **CTA3** peut être réalisé en utilisant la stratégie « graft from ». Les études de caractérisation de ces surfaces montrent que la densité de greffage observée est relativement importante. En particulier, le greffage de polymères d'esters activés (**PNAS**) sur le titane permet l'élaboration d'une plateforme polymère post-fonctionnalisable autorisant l'immobilisation ultérieure d'unité glucosidiques. Toutefois, la quantité de matière greffée au cours de la post-fonctionnalisation reste difficile à déterminer.

## 5. Conclusion

Trois stratégies de greffage de polymères sur des surfaces de titane présentant des taux de fonctionnalisation importants ont été mises au point.

La stratégie « graft to » permet d'immobiliser à la surface du titane des polymères parfaitement définis de natures variés obtenus par polymérisation de type RAFT à partir d'une ancre chimique à base de dopamine et intégrant le groupement trithiocarbonate. Le greffage de ces polymères sur le titane se fait en conditions douces et les taux de fonctionnalisation obtenus sont importants.

Parallèlement, nous avons mis au point une méthode de fonctionnalisation qui emploie une stratégie « graft to », conjuguée à la réaction de cycloaddition [3+2] de Huisgen. Cette méthode permet la génération d'une plateforme de fonctionnalisation à base de titane dite « clickable » qui conduit à l'immobilisation en conditions douces d'un large panel de molécules fonctionnalisés par un alcyne avec une forte densité de greffage.

Enfin, la dernière stratégie, fondée sur la stratégie « graft from », fait intervenir une pré-fonctionnalisation de la surface de titane par l'ancre dopamine **CTA3** intégrant un groupement trithiocarbonate. La polymérisation est ensuite générée à partir de la surface et conduit à des films denses, d'une épaisseur suffisante pour être visible à l'œil nu. Cependant, il est difficile de connaître avec précision les caractéristiques des polymères formés en surface (masse molaires moyennes en nombre, indices de polymolécularité) et la densité de greffage.

Finalement, ces trois stratégies ont montré que les propriétés physico-chimiques des surfaces de titane modifiées sont modulées par le greffage, en particulier la balance hydrophile/hydrophobe du titane.

En conclusion, ces trois stratégies pourront donc être utilisées dans des travaux ultérieurs pour l'immobilisation à la surface de titane de molécules bioactives afin de générer de nouveaux biomatériaux hybrides à usage thérapeutique. Le chapitre VI sera consacré aux évaluations biologiques des surfaces modifiées par des polymères de glucosamine au moyen de la stratégie « graft to ».

## Références bibliographiques

- [1] C. Viorner, Y. Chevolot, D. Léonard, B.-O. Aronsson, P. Péchy, H. J. Mathieu, P. Descouts et M. Grätzel, *Surface modification of titanium with phosphonic acid to improve bone bonding: Characterization by xps and tof-sims*. *Langmuir* **2002**, *18* (7), 2582-2589.
- [2] A. Nanci, J. D. Wuest, L. Peru, P. Brunet, V. Sharma, S. Zalzal et M. D. McKee, *Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules*. *Journal of Biomedical Materials Research* **1998**, *40* (2), 324-335.
- [3] A. Laforgue, T. Addou et D. Bélanger, *Characterization of the deposition of organic molecules at the surface of gold by the electrochemical reduction of aryldiazonium cations*. *Langmuir* **2005**, *21* (15), 6855-6865.
- [4] J. A. De Feijter, J. Benjamins et F. A. Veer, *Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air–water interface*. *Biopolymers* **1978**, *17* (7), 1759-1772.
- [5] H. M. Zareie, C. Boyer, V. Bulmus, E. Nateghi et T. P. Davis, *Temperature-responsive self-assembled monolayers of oligo(ethylene glycol): Control of biomolecular recognition*. *ACS Nano* **2008**, *2* (4), 757-765.
- [6] E. S. Gawalt, M. J. Avaltroni, M. P. Danahy, B. M. Silverman, E. L. Hanson, K. S. Midwood, J. E. Schwarzbauer et J. Schwartz, *Bonding organics to ti alloys: Facilitating human osteoblast attachment and spreading on surgical implant materials*. *Langmuir* **2002**, *19* (1), 200-204.
- [7] R. Liu et B. R. Saunders, *Thermoresponsive surfaces prepared using adsorption of a cationic graft copolymer: A versatile method for triggered particle capture*. *J. Colloid Interface Sci.* **2009**, *338* (1), 40-47.
- [8] G. Valincius, G. Niaura, B. Kazakevičiene, Z. Talaiyte, M. Kažemekaite, E. Butkus et V. Razumas, *Anion effect on mediated electron transfer through ferrocene-terminated self-assembled monolayers*. *Langmuir* **2004**, *20* (16), 6631-6638.
- [9] C. Cho, R. Wallace et L. Files-Sesler, *Patterning and etching of amorphous teflon films*. *J. Electron. Mater.* **1994**, *23* (8), 827-830.
- [10] N. K. Devaraj, P. H. Dinolfo, C. E. D. Chidsey et J. P. Collman, *Selective functionalization of independently addressed microelectrodes by electrochemical activation and deactivation of a coupling catalyst*. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (6), 1794-1795.
- [11] M. A. Watson, J. I. Lyskawa, C. d. Zobrist, D. Fournier, M. Jimenez, M. Traisnel, L. Gengembre et P. Woisel, *A “clickable” titanium surface platform*. *Langmuir* **2010**, *26* (20), 15920-15924.
- [12] Y. Tsujii, M. Ejaz, K. Sato, A. Goto et T. Fukuda, *Mechanism and kinetics of raft-mediated graft polymerization of styrene on a solid surface. 1. Experimental evidence of surface radical migration*. *Macromolecules* **2001**, *34* (26), 8872-8878.
- [13] M. H. Stenzel, L. Zhang et W. T. S. Huck, *Temperature-responsive glycopolymer brushes synthesized via raft polymerization using the z-group approach*. *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, *27* (14), 1121-1126.





# **Chapitre VI**

## **Evaluations biologiques**



## INTRODUCTION

L'objectif ultime du projet est de parvenir à fonctionnaliser des surfaces à base de titane pour favoriser la croissance des cellules endothéliales.

Cette partie a pour but d'étudier l'impact des polymères intégrant des motifs glucosamines sur les propriétés biologiques du titane. Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes plus particulièrement focalisés sur la viabilité cellulaire, la vitalité et la prolifération de différentes souches de cellules. Ces différents tests biologiques seront réalisés sur les surfaces nues, les polymères avant et après greffage.

Les évaluations de nos échantillons ont été effectuées au GRB (INSERM U 1008, Université de Lille 2) selon la norme ISO 10993-5 [1].

### **1. Evaluation des propriétés biologiques des surfaces de titane non fonctionnalisées**

Avant de procéder aux tests sur les pièces de titane fonctionnalisées par des polymères de glucosamine, il est nécessaire de s'intéresser de plus près aux substrats eux-mêmes. En effet, différentes méthodes existent pour augmenter le taux de fonctions hydroxyles en surface, et ainsi accroître la capacité d'interaction entre l'ancre du polymère et la surface. Parmi ces différentes méthodes, décrites dans l'étude bibliographique, trois ont été retenues :

- 1) l'attaque à l'acide nitrique, dépolluant la surface
- 2) l'immersion dans un mélange 1 : 1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) et H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (communément appelée « solution piranha »), formant une fine couche d'hydroxyde de titane
- 3) l'action combinée d'un mélange 1 : 1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) et de HCl dilué (0,1 mol.l<sup>-1</sup>) et d'ultrasons, conçue pour former une couche épaisse d'oxyde de titane

De plus, les groupements catéchols se greffant indifféremment sur les phases rutile et anatase, il nous a semblé intéressant d'évaluer l'impact de la phase cristalline de l'oxyde de titane sur les propriétés biologiques et notamment sur les propriétés d'adhésion cellulaire. Ainsi, lors de cette étude, les traitements chimiques 2 et 3 ont été combinés à trois types de traitements thermiques : sans recuit, recuit à 500 °C (formation de la structure anatase) et recuit à 800 °C (formation de la structure rutile).

Ces surfaces, une fois rincées dans des bains d'eau ultrapure sous ultrasons ont été soumises aux tests de vitalité cellulaire et de prolifération cellulaire. Le premier test consiste à quantifier la vitalité des cellules présentes sur le support par dosage fluorométrique, à l'aide du Bleu d'Alamar. Ce réactif, non toxique, devient fluorescent en réponse à sa réduction chimique par les enzymes intracellulaires. Cette fluorescence peut être engendrée uniquement par les cellules vivantes, et son intensité est directement proportionnelle à l'activité métabolique cellulaire [2].

Le test de prolifération consiste en la détermination *in vitro* de la croissance cellulaire en contact direct avec un support dont on veut évaluer sa cytocompatibilité. Pour ce faire, les cellules sont cultivées sur les supports à tester sur une période de 4 et 6 jours puis sont détachées des substrats avant d'être dénombrées à l'aide d'un compteur de cellule (Coulter Z1). Un descriptif complet des tests de vitalité et de prolifération figure en partie expérimentale.

Ces tests nécessitent des cellules cibles provenant de préférence du site d'implantation. Dans le cas présent, les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 (origine murine) ont été testées. Ces cellules sont fréquemment employées pour évaluer les surfaces de titane, dans le cadre par exemple des implants orthopédiques. La période de culture est de 4 et 6 jours dans un incubateur CO<sub>2</sub> sans changement de milieu. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (fond du puits en polystyrène pour la culture cellulaire: TCPS)

Les tests de vitalité (Figure VI.1.a) montrent une réponse quasi identique des cellules vis-à-vis des différents traitements chimiques. Toutefois, le titane décapé à l'acide nitrique et le titane attaqué au piranha présentent une meilleure cytocompatibilité à court terme. A l'opposé, le titane « piranha » recuit à 500°C offre les moins bons résultats sur toute la durée de l'expérience.

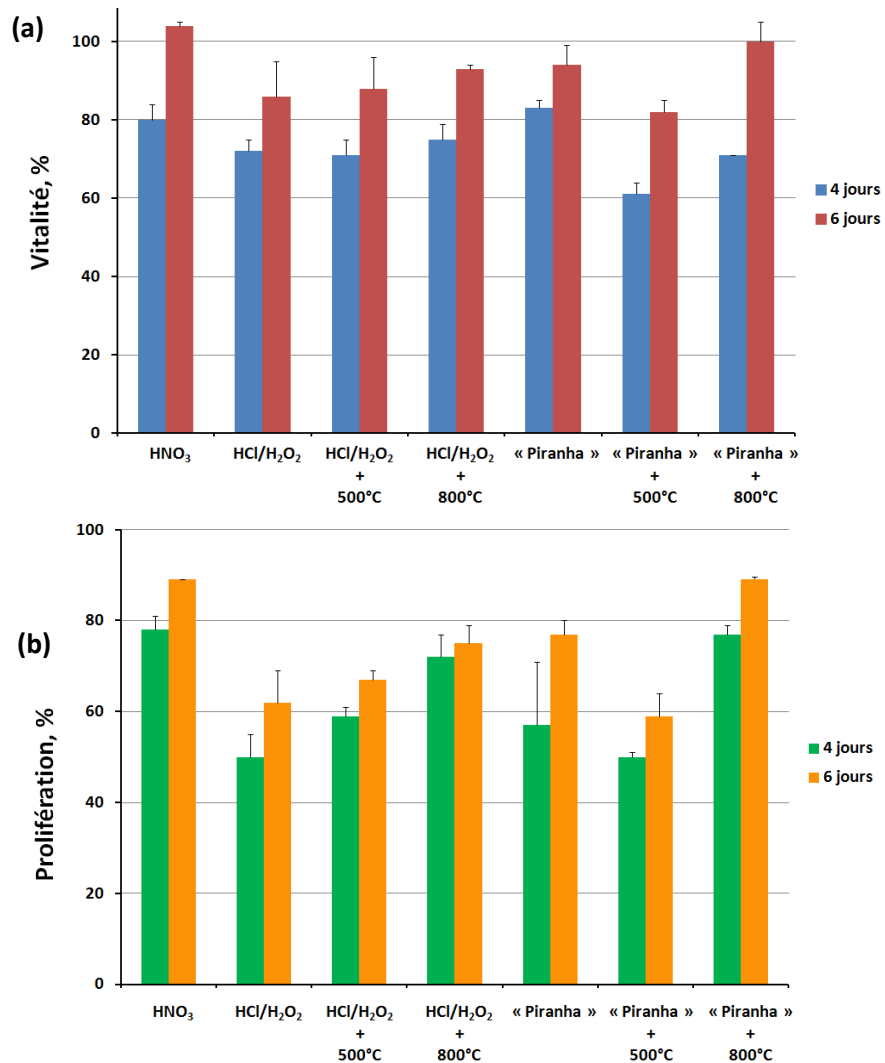


Figure VI.1 : Impact des différents traitements thermiques (recuits à 500°C et 800°C) et chimiques (« piranha » et HCl/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) servant à la formation de couches de TiO<sub>2</sub> sur la vitalité **(a)** et la prolifération **(b)** des cellules MC3T3-E1

La prolifération des cellules MC3T3 (Figure VI.1.b) est plus importante pour les cellules exposées au titane oxydé sous forme rutile et sur le titane nettoyé par HNO<sub>3</sub>. Toutefois, le titane « piranha » sans traitement thermique semble offrir des résultats satisfaisants. En effet, la prolifération est de 78 % après 6 jours, ce qui est sensiblement supérieur à la prolifération sur les pièces traitées HCl/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (62% sans traitement thermique, 67% recuit à 500°C) et traitées par solution « piranha » avec un recuit à 500°C (59%).

D'un point de vue pratique, la suite des mesures s'est focalisée sur des pièces de titane traitées par de l'acide nitrique et par une solution « piranha » sans traitement thermique. Techniquement, l'objectif final étant de fonctionnaliser des stents, un traitement thermique à 800°C pourrait avoir des effets néfastes sur les stents à mémoire de forme en NiTiNOL. Ce

recuit a par contre un intérêt en termes de compatibilité biologique s'il est appliqué dans le cadre de conception d'implants orthopédiques ou de visserie chirurgicale.

## **2. Evaluation des propriétés biologiques des polymères de glucosamine**

Avant d'évaluer les propriétés biologiques des surfaces fonctionnalisées, nous avons étudié la toxicité de l'agent de transfert CTA3 et des différents polymères de glucosamine. Pour cela, une étude détaillée a été menée sur ces polymères, pour connaître l'impact du taux de fonctionnalisation, du nombre d'unités de répétition et du motif catéchol présent en extrémité de chaîne sur la viabilité cellulaire.

Les tests de viabilité cellulaire permettent de caractériser la survie des cellules en présence des matériaux à l'état de poudre (granulométrie : 50  $\mu\text{m}$ ) ou des substances solubles. Ce test permet de déterminer la concentration létale (LC50), c'est-à-dire la concentration de poudre pour laquelle 50% des cellules meurent après 9 jours de culture dans un incubateur  $\text{CO}_2$  sans changement de milieu. Ce test requiert l'utilisation de cellules formant des clones : pour cela, notre choix s'est porté sur les cellules épithéliales L132 (ATCC-CCL5) d'origine humaine qui sont les plus couramment utilisées, car elles possèdent une bonne reproductibilité de résultat et un fort taux de clonage (37%) [3]. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (milieu de culture sans poudre).

### **2.1. Cytotoxicité l'agent de transfert CTA3**

Les tests de vitalité réalisés à pH physiologique (7,4) sur le CTA3 montrent très clairement que ce dernier présente une toxicité pour des concentrations supérieures à 25  $\text{mg.l}^{-1}$  (Figure VI.2). La dopamine présente également une toxicité pour des concentrations supérieures à 25  $\text{mg.l}^{-1}$ .

Afin de déterminer si cette toxicité est imputable au motif catéchol, les mêmes tests biologiques ont été effectués sur un dérivé de dopamine équipé d'une fonction alcyne vrai et sur un dérivé pyrrolique (connu pour sa non toxicité) également doté de la triple liaison carbone-carbone.

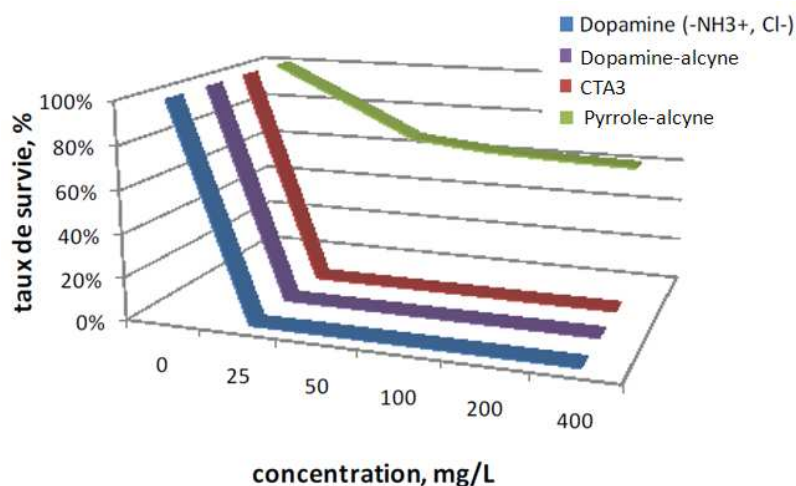


Figure VI.2 : Viabilité des cellules épithéliales L132 en présence de concentrations croissantes de poudre à base de dopamine (dopamine ammonium, dopamine-alcyne, et CTA3) et de pyrrole-alcyne

Les résultats ont été reportés dans la Figure VI.2 et semblent confirmer la toxicité du motif catéchol à des concentrations supérieures à 25 mg.l<sup>-1</sup>.

Cependant, la toxicité du catéchol n'est pas un obstacle à la poursuite de notre étude. Tout d'abord, la quantité de matière greffée sur les surfaces est de l'ordre de quelques nmol.cm<sup>-2</sup>, soit quelques dixièmes de mg.cm<sup>-2</sup>. De plus, la partie catéchol sert à immobiliser les polymères sur les surfaces de titane, elle n'est donc pas accessible aux cellules dans le produit final. Néanmoins, sa toxicité est à prendre en compte pour les études de viabilité sur les polymères non greffés.

## 2.2. Cytotoxicité des polymères de glucosamine (CTA3-PNGlu et CTA4-PNGlu)

Les polymères de glucosamine ont été testés en solution avant d'être fixés sur les substrats à base de titane. Six différents polymères ont été évalués, ils se différencient par leur longueur de chaîne (50 et 100 unités monomères) et leur taux de fonctionnalisation (10, 20 et 40% de glucosamine). Pour rappel, la dénomination suivante a été appliquée : Agent de transfert-PNGlu Nombre d'unités-pourcentage de glucosamine. Ainsi un polymère comportant 10% de glucosamine, d'une longueur de 50 unités, provenant de la post-fonctionnalisation du polymère **CTA3-PNAS** s'écrira **CTA3-PNGlu 50u-10%**.

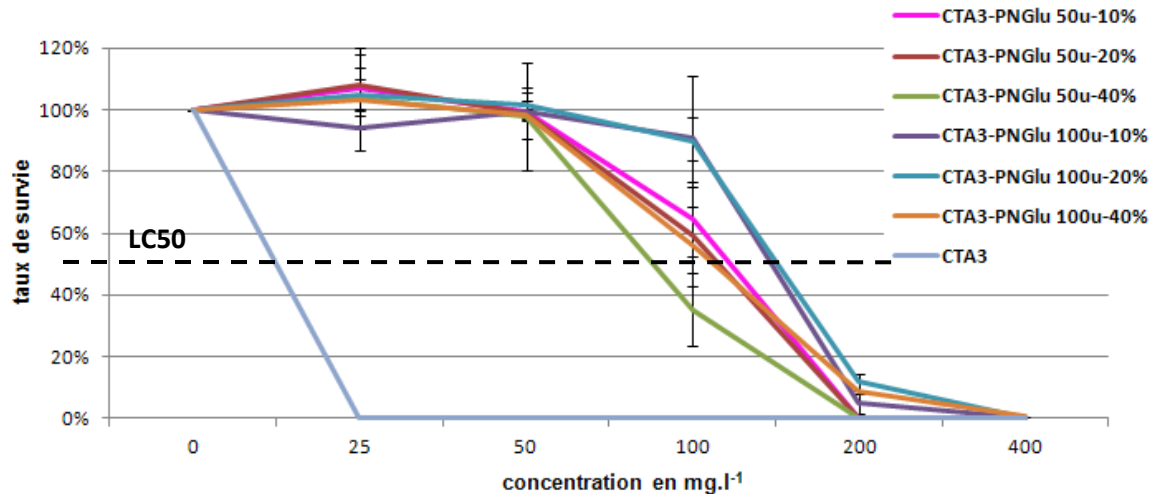


Figure VI.3 : Viabilité des cellules épithéliales L132 en présence de concentrations croissantes de polymères de glucosamine (n=2)

Les différents polymères ne sont pas toxiques jusqu'à la concentration de 100 mg.l<sup>-1</sup>, contrairement à l'agent **CTA3** (Figure VI.3). L'analyse des courbes montre en premier lieu que le taux de fonctionnalisation en glucosamine des chaînes a une influence sur la viabilité cellulaire. Les polymères fonctionnalisés à 40 % (Figure VI.3, courbes orange et verte) par la glucosamine présentent une concentration létale LC50 plus basse que les autres polymères, quelque soit la longueur de chaîne. Ils n'ont donc pas été retenus pour la suite de l'étude.

Le second effet visible est l'influence de la longueur de chaîne sur la viabilité cellulaire. En effet, Les polymères de 50 unités semblent plus toxiques que ceux de 100 unités. Cet écart de toxicité peut être lié aux extrémités de chaînes des polymères. De fait, à concentration massique et à taux de fonctionnalisation égaux, une solution de polymère de 50 unités contient deux fois plus de catéchols (dont la toxicité a été précédemment démontrée) qu'une solution de polymère de 100 unités.

Pour ces raisons, le polymère **CTA3-PNGlu 100u-20%** a servi de référence pour la suite des évaluations biologiques.

Afin d'étudier l'influence des extrémités de chaînes, un test de viabilité a été réalisé sur deux polymères de glucosamine, chacun possédant 100 unités de répétition et fonctionnalisés à 20% par la glucosamine, l'un synthétisé avec l'agent de transfert **CTA3** (dopamine), l'autre à l'aide de l'agent de transfert **CTA4** (benzyle).



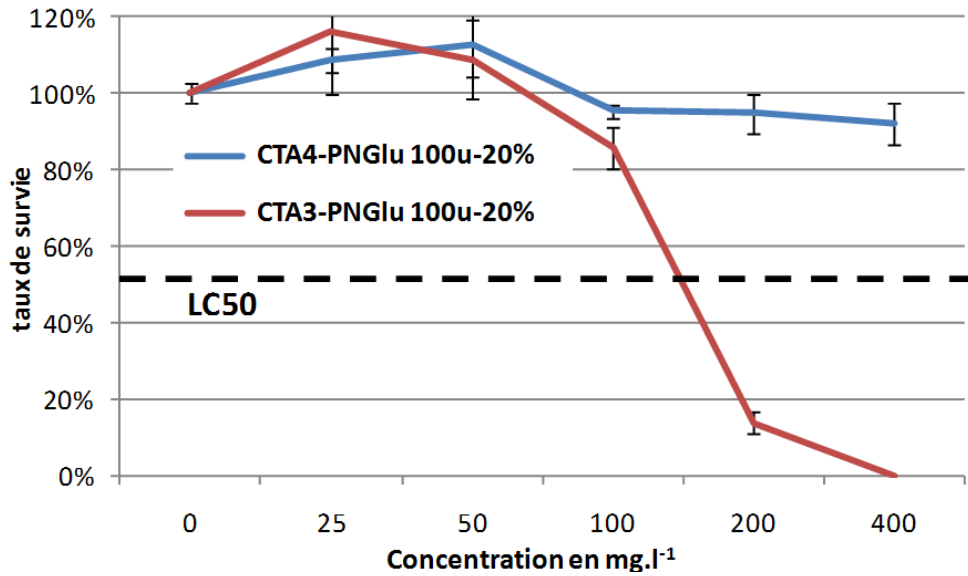


Figure IV.4 : Influence du fragment catéchol sur la cytotoxicité du polymère de glucosamine (n=2)

Les résultats (Figure IV.4) montrent l'innocuité du polymère de glucosamine lorsque celui-ci ne comporte pas de groupement catéchol (Figure IV.4, courbe bleue), alors que le polymère qui possède l'ancre est toxique pour des concentrations supérieures à 100 mg.l<sup>-1</sup> (Figure IV.4, courbe rouge). La toxicité est donc liée pour ces polymères uniquement au fragment catéchol, et non au groupement trithiocarbonate, ni à la chaîne polymère.

### 3. Evaluation des propriétés biologiques des surfaces fonctionnalisées

#### 3.1. Cytocompatibilité des surfaces fonctionnalisées

Après avoir étudié les surfaces de titane nues et les polymères de glucosamine seuls, afin de sélectionner les candidats les plus cytocompatibles, les surfaces fonctionnalisées par ces polymères ont été évaluées en termes de vitalité et de prolifération cellulaire.

Pour immobiliser les polymères de glucosamine à la surface des échantillons de titane, les substrats ont été immergés dans une solution aqueuse de **CTA3-PNGlu 100u-20%** à 10 mg.ml<sup>-1</sup>. L'efficacité du greffage a été contrôlée par voltampérométrie cyclique (Figure VI.5).

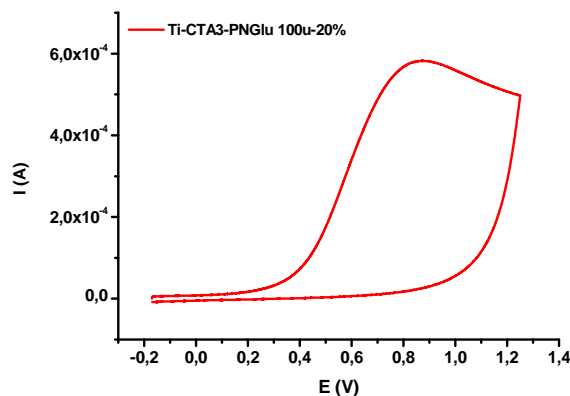


Figure VI.5 : Voltampérométrie cyclique sur une surface de titane fonctionnalisée par le polymère **CTA3-PNGlu 100u-20%**.

Conditions : électrode de référence Ag/AgCl, vitesse de balayage  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ , solution de travail : tampon phosphate pH = 7.

Le voltampérométrie présente la signature caractéristique du fragment catéchol. La densité de fonctionnalisation, calculée à partir de la vague d'oxydation et de l'Equation V.2, donne une concentration de  $16 \text{ nmol.cm}^{-2}$ .

Une première série de tests de vitalité cellulaire a été réalisée avec des cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 (Figure VI.6). Une vitalité de près de 95% est observée après 3 jours sur les surfaces fonctionnalisées (Figure VI.6, histogramme bleu). Comparativement, la vitalité observée sur le titane nu est 10% inférieure. Ces premiers résultats montrent donc un léger effet bénéfique des surfaces fonctionnalisées par les polymères de glucosamine sur la vitalité cellulaire.

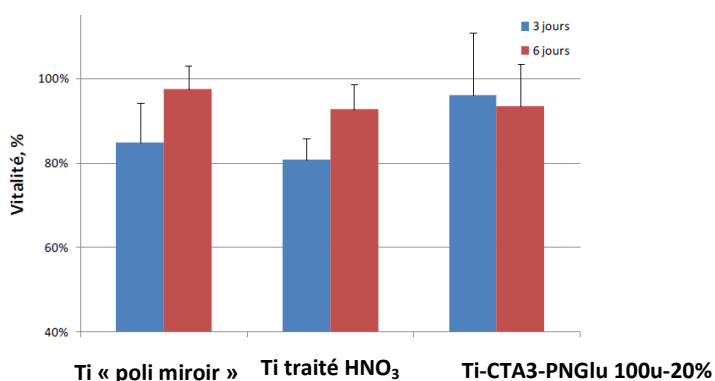


Figure VI.6 : Vitalité des cellules MC3T3-E1 après 3 et 6 jours de prolifération sur les pastilles de titane fonctionnalisées (n= 2)

En parallèle d'autres tests ont été menés sur les cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines (HPMEC, pour Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells) (Figure VI.7), une lignée immortalisée de cellules employée dans les évaluations biologiques [4-5].

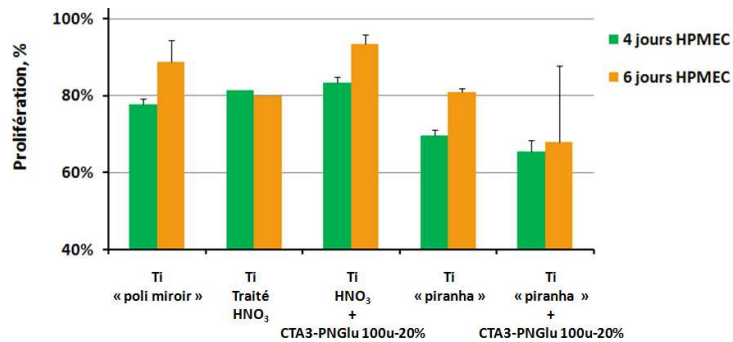


Figure VI.7. : Prolifération des cellules HPMEC après 4 et 6 jours sur des échantillons de titane fonctionnalisés. (n=2)

Il est à noter que dans le cas du Ti traité « piranha » fonctionnalisé par le **CTA3-PNGlu 100u-20%** à 6 jours, un fort écart a été observé entre les deux échantillons testés, d'où l'erreur importante. D'après ces résultats préliminaires, les cellules HPMEC prolifèrent moins sur les surfaces traitées au « piranha », que sur les autres substrats. Ce phénomène peut être lié à la présence de sulfates résiduels sur le substrat après le traitement « piranha ».

Toutefois, dans le cas du titane traité par l'acide nitrique, la prolifération des cellules HPMEC (Figure VI.7) est améliorée par la fonctionnalisation de la surface. En effet, les résultats à 6 jours de la surface fonctionnalisée indiquent un taux de prolifération de 12% supérieur à la surface non traitée. Cette lignée de cellule endothéliale réagit donc positivement à la fonctionnalisation de surface par le polymère de glucosamine.

### 3.2. Essais d'hémocompatibilité sur les surfaces fonctionnalisées

En dernier lieu, un test d'hémolyse a été effectué sur différentes surfaces (titane poli miroir, traité piranha et par le polymère **CTA3-PNGlu 100u-20%**), afin de vérifier si ces dernières ne détruisent pas les globules rouges. Un caractère hémolytique des surfaces serait fortement préjudiciable pour des applications de stent.

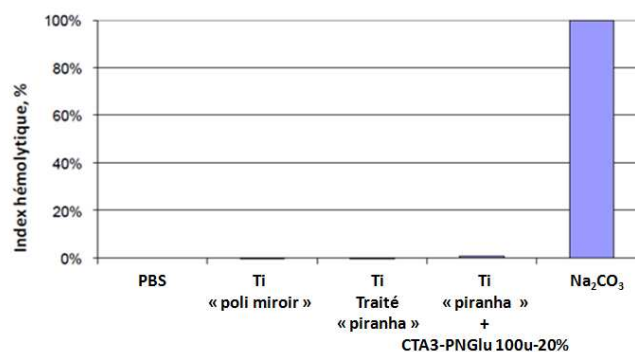


Figure VI.8 : Index hémolytique des différents échantillons à base de titane

Le protocole des tests d'hémolyses est détaillé dans la partie expérimentale. En résumé, le test consiste à mettre du sang au contact des échantillons pendant 1h puis de quantifier par dosage UV la quantité d'hémoglobine présente en solution, provenant de la destruction des globules rouges. Le PBS sert de témoin négatif (pas d'hémolyse) et une solution de carbonate de sodium de témoin positif (tous les globules rouges ont été détruits). Dans le cas des surfaces fonctionnalisées et non fonctionnalisées, l'absence d'hémoglobine en solution après le test démontre que les surfaces testées ne présentent pas de caractère hémolytique (Figure VI.8).

#### **4. Conclusion**

L'objectif de cette partie était d'évaluer les réponses biologiques induites par les surfaces échafaudées à partir du substrat de titane et des polymères de glucosamine élaborés dans le chapitre IV. Les résultats préliminaires de cette étude sont très encourageants.

Tout d'abord, les polymères de glucosamine ne montrent pas de toxicité importante, les seuls effets cytotoxiques observés sont attribuables à l'ancre catéchol qui ne sera donc pas biodisponible puisqu'immobilisée sur la surface.

Cette étude a également permis de révéler l'importance du traitement de surface de départ et son rôle sur la prolifération des cellules avant et après le greffage des polymères. L'attaque à la solution « piranha » favorise la croissance de la couche d'oxyde et augmente le nombre de fonctions hydroxyles en surface, mais les espèces résiduelles après traitement inhibent la prolifération des cellules. Au contraire, un décapage des surfaces à l'acide nitrique favorise la croissance des cellules et la fonctionnalisation de ces surfaces par des polymères de glucosamine et améliore la cytocompatibilité des surfaces.

La réaction des lignées de cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 et endothéliales HPMEC aux surfaces fonctionnalisées par les polymères de glucosamine est très encourageante. Il est à noter que la glucosamine a servi de molécule-test pour cette étude. L'exploitation de la plateforme de polymère activé par des fonctions NHS devrait nous permettre d'immobiliser des composés bioactifs plus spécifiques (peptides, glucosaminoglycanes...)

## Références Bibliographiques

- [1] Norme ISO/EN-10993-5, *Biological evaluation of medical devices—part 5 tests for cytotoxicity, in vitro methods: 8.2 tests on extracts*.
- [2] Y. A. Petrenko, N. A. Gorokova et E. N. Tkachova, *The reduction of alamar blue by peripheral blood lymphocytes and isolated mitochondria*. Ukr. Biochem. J. **2005**, 77 (5), 100-105.
- [3] P. B. van Wachem, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J. P. Detmers et W. G. van Aken, *Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities*. Biomaterials **1985**, 6 (6), 403-408.
- [4] M. I. Santos, S. Fuchs, M. E. Gomes, R. E. Unger, R. L. Reis et C. J. Kirkpatrick, *Response of micro- and macrovascular endothelial cells to starch-based fiber meshes for bone tissue engineering*. Biomaterials **2007**, 28 (2), 240-248.
- [5] N. Blanchemain, Y. Karrout, N. Tabary, C. Neut, M. Bria, J. Siepmann, H. F. Hildebrand et B. Martel, *Methyl- $\beta$ -cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media*. Acta Biomaterialia **2011**, 7 (1), 304-314.



# **Chapitre VII**

**Elaboration de films de polymères aminés  
sur des surfaces de titane par plasma froid**





## INTRODUCTION

Au cours des parties précédentes, des techniques de modifications de surfaces par des polymères ont été mises au point à partir de l'axiome selon lequel la surface de titane est riche d'un type de fonctions, les fonctions hydroxyles. Le but du présent chapitre est de mettre en valeur une autre méthode de fonctionnalisation des surfaces de titane, en passant par une étape de préfonctionnalisation pour générer des amines en surface des substrats (Figure VII.1). En plus d'offrir une nouvelle réactivité, la formation d'un film aminé augmenterait la biocompatibilité du substrat, comme plusieurs études l'ont montré [1-2]. Une voie intéressante pour parvenir à déposer des fonctions amines sur les surfaces de titane est le plasma froid basse pression. Parmi les différentes technologies employant des plasmas froids basses pressions le plasma microondes pulsé a été employé.

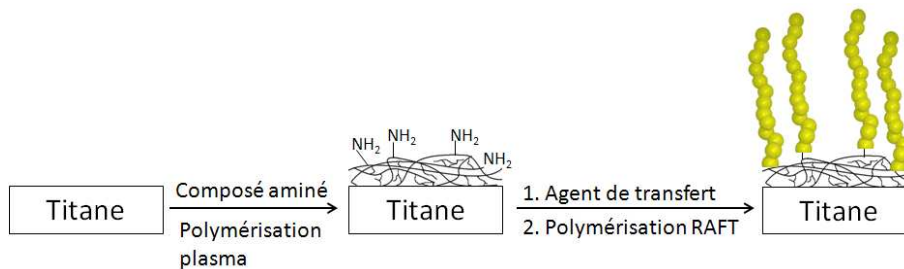


Figure VII.1 : Formation de brosses de polymères sur le titane au moyen de la stratégie « graft from » par l'intermédiaire de la formation d'un film aminé

## 1. Rappels bibliographiques

### 1.1. Généralités

Les plasmas froids basse pression, aussi appelés plasmas hors équilibre, sont obtenus par injection et excitation d'un gaz dans une chambre sous vide. Le stimulus d'excitation, en général radiatif, va décomposer en faible partie le gaz, fournissant des électrons, des ions, ainsi que des espèces radicalaires très réactives [3]. Toutefois, la majorité des molécules présentes ne sont pas décomposées et le gaz dans son ensemble est électriquement neutre. Le terme « froid » est employé pour ces plasmas car la majeure partie de l'énergie d'excitation est fournie aux électrons et la température macroscopique du système est de l'ordre de l'ambiante [4]. L'emploi du plasma froid basse pression pour la fonctionnalisation de surface s'étend à de nombreux domaines : textile [5], microélectronique [6], métallurgie [7] et dans celui des biomatériaux [8].

## 1.2. Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma

Une des méthodes les plus employées pour déposer une couche mince sur un substrat est le dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma ou PECVD (pour Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition). Cette technique consiste à engendrer une réaction chimique entre différentes espèces actives à l'intérieur d'un plasma, qui produisent au contact de la surface à fonctionnaliser un film solide. La PECVD permet d'obtenir des revêtements déposés à des températures peu élevées, entre 20 et 350°C, et l'épaisseur des dépôts peut être cinétiquement contrôlée [9].

Cette technique comporte plusieurs étapes synthétiques élémentaires [10] :

- création d'espèces réactives dans la décharge
- transport des espèces réactives de la source au substrat
- adsorption des réactifs sur la surface
- réaction et croissance du film
- désorption et évacuation des produits de réaction

Cette stratégie a permis de mettre au point un grand nombre de revêtements fins comportant des amines. A notre connaissance, les monomères employés pour former ces films ont été l'allylamine [11-12], la *n*-butylamine [13-14], la *n*-propylamine [15], la propargylamine [15], la *n*-heptylamine [16-17], la diisopropylamine [18], la diaminopropane [19], l'aniline [20], l'éthylènediamine [21-22], le diaminocyclohexane [11] et la perfluorotributylamine [23].

La synthèse de ces différents films aminés peut être effectuée soit dans un plasma de décharge, soit dans un plasma de post-décharge. De fait, un gaz en écoulement subissant une excitation forme en premier lieu un plasma de décharge, qui évolue en s'éloignant de la zone de stimulation en un plasma dit de « post-décharge », majoritairement non ionique.

Il est intéressant de réaliser la polymérisation des composés aminés au sein du plasma de post-décharge, car il comporte moins d'espèces réactives que le plasma de décharge, ce qui permet d'améliorer le contrôle du dépôt. Pour ce faire, les échantillons à fonctionnaliser sont placés dans la zone de post-décharge du gaz vecteur dans laquelle est injecté, en amont

du substrat, un monomère suffisamment volatil pour passer sous forme gazeuse à pression de travail.

Dans le cas des amines primaires aliphatiques, le gaz vecteur le plus employé dans la littérature est l'argon. Des études exploitant la courte post-décharge de ce gaz ont été réalisées pour créer un film aminé sur le substrat à partir de l'allylamine [24].

### **1.3. Avantages, Inconvénients et limitations**

L'utilisation du plasma pour la fonctionnalisation de substrats comporte un grand nombre d'avantages :

- possibilité de travailler de façon homogène sur des pièces tridimensionnelles
- la modification se produit en extrême surface, sur une dizaine de nanomètres, sans détériorer les propriétés mécaniques intrinsèques du matériau traité
- les paramètres peuvent être ajustés pour former des films plus ou moins épais
- les quantités de matières employées sont moindres que dans un traitement chimique classique
- les espèces radicalaires et ioniques du plasma peuvent permettre une dépollution de surface et aseptiser la pièce traitée

Le plasma est par conséquent une technique de choix pour le traitement de surface de pièces à géométrie complexe servant dans des applications biologiques, comme les stents. Cependant, il convient d'admettre que l'exploitation de cette technique se heurte à quelques difficultés :

- les procédés réactionnels au sein de l'enceinte sont très complexes et le réglage des paramètres optimaux est délicat
- à cause du point évoqué ci-dessus, il est très difficile de transférer les paramètres d'une enceinte plasma à une autre, et *a fortiori* à plus grande échelle
- le procédé en lui-même, par batch, est peu adapté aux contraintes industrielles

## 2. Polymérisation assistée par plasma

### 2.1. Conception de l'enceinte plasma microonde pulsée

#### 2.1.1. Choix du monomère

Les composés aminés pouvant être polymérisés par la technique de polymérisation assisté par plasma froid microonde pulsé sont nombreux, c'est pourquoi un cahier des charges a été établi pour choisir ce composé le plus judicieusement parmi tous les dérivés disponibles. Il faut que ce composé soit à la fois suffisamment volatil à pression réduite et le moins toxique possible. Parmi les amines primaires aliphatiques, le composé correspondant le mieux à ces critères est la *n*-butylamine (Tableau VII.1).

Tableau VII.1 : Caractéristiques physiques de différentes amines primaires aliphatiques

	Point d'ébullition (°C)	Pression de vapeur saturante à 20 °C (mbar)
<i>n</i> -éthylamine	16,6	1210
<i>n</i> -propylamine	48	339
<i>n</i> -butylamine	78	109
<i>n</i> -heptylamine	156	4

Il est à noter que l'allylamine, fréquemment employée dans le cadre de polymérisation assistées par plasma a été exclue pour des raisons de toxicité [25].

#### 2.1.2. Elaboration d'une enceinte plasma

La technologie permettant la polymérisation de composés aminés par plasma en décharge ou post-décharge n'existant pas au laboratoire, il a fallu mettre au point une enceinte plasma. L'appareil final qui a été conçu (Figure VII.2) s'appuie sur le modèle d'une autre enceinte se trouvant au laboratoire, qui sert à la polymérisation en post-décharge du tétraméthyle disiloxane (TMDS).

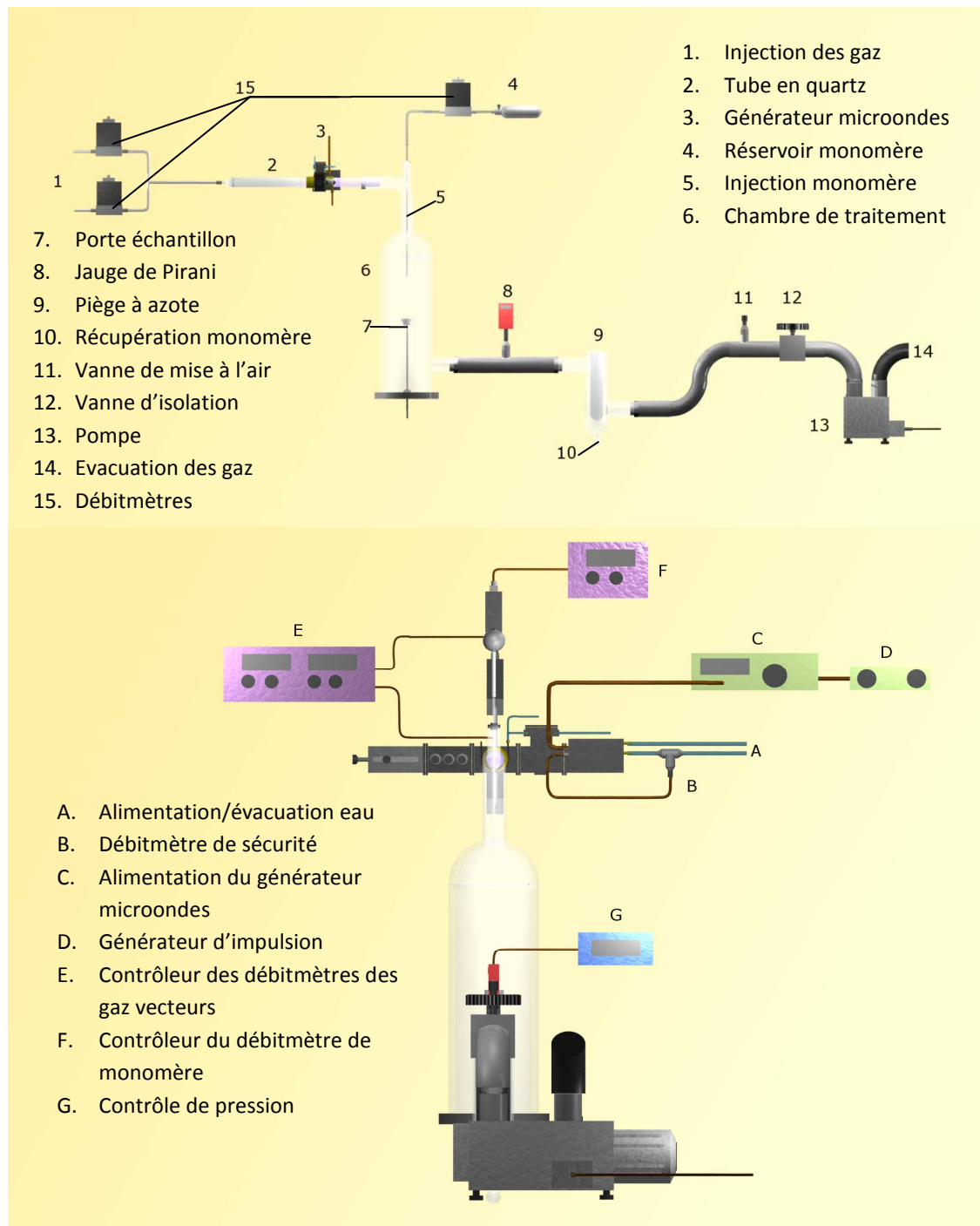


Figure VII.2 : Descriptif de face et de profil de l'enceinte plasma basse pression à générateur microondes pulsées pour polymériser des dérivés aminés

Dans un premier temps, la chambre de traitement **(6)** en verre est placée sous pression réduite par la pompe à palette Edwards 28 E2M28 **(13)** d'un débit nominal de  $32 \text{ m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$  pour atteindre  $5 \cdot 10^{-2} \text{ mbar}$ . La pression est vérifiée par la jauge de Pirani **(9)**. Les gaz vecteurs (argon, oxygène, azote) sont injectés dans le tube en quartz **(2)** servant de milieu diélectrique. Le générateur microonde Sairem GMP20 KED-B **(3)** travaillant à une fréquence de 2,45 GHz crée une décharge dans le tube qui génère un plasma. Le monomère est injecté

en post-décharge **(5)**, dans la chambre de traitement pour fonctionnaliser le substrat déposé sur le porte échantillon **(7)**. L'excédent de monomère est condensé et récupéré à l'aide d'un piège à azote liquide **(9)**. Le circuit peut être isolé de la pompe **(12)** et ramené à pression atmosphérique en fin d'expérience par une vanne de mise à l'air **(11)**.

Le débit des gaz et du monomère sont contrôlés par des débitmètres **(15)** pouvant être réglés par des panneaux de commande **(E, F)**. Le générateur microonde est alimenté par un générateur de puissance Sairem Microwave Generator, lui-même couplé un générateur de signaux alternatifs **(D)**. La pression du système est vérifiée en permanence par un contrôleur **(G)** connecté à la jauge de Pirani. L'installation finale est présentée sur la Figure VII.3.



Figure VII.3 : Vue de l'enceinte plasma finalisée.

## 2.2. Expérimentations

### 2.2.1. Phase de test

Le gaz vecteur employé couramment pour la polymérisation des dérivés aminés est l'argon. Celui-ci ne possède qu'une très faible zone de post-décharge : les radicaux d'argon, très réactifs, se recombinaient rapidement. Dans la littérature, il n'est employé de cette manière qu'en microonde pulsée, pour polymériser l'allylamine [26].

Avant de tenter de fonctionnaliser des substrats par des polymères aminés, il faut vérifier que la *n*-butylamine interagisse bien avec le plasma d'argon.

Au moment de l'injection du monomère, la post-décharge violet clair de l'argon disparaît et laisse place à un plasma blanc très léger ne dépassant pas le coude d'accès à la chambre de traitement. Il est à noter qu'un plasma de décharge blanc-bleu vif se forme à la sortie du tube en quartz. La *n*-butylamine, très volatile, doit former une zone de reflux allant jusqu'à la limite du tube en quartz, dans lequel elle réagit par un plasma de décharge. Hors du tube en quartz la coloration blanche doit provenir de l'interaction entre la *n*-butylamine et les radicaux d'argon du plasma post-décharge.

Pour ces raisons, il s'est avéré plus simple de placer les échantillons dans la partie supérieure de la chambre, directement dans le coude avant l'injection. Avec ce montage il est possible de fonctionnaliser le titane par la *n*-butylamine soit en décharge classique (en plaçant les échantillons dans le tube en quartz), soit en post-décharge (en les disposant en aval). L'inconvénient majeur d'un tel système est que la surface à fonctionnaliser se trouve dans une configuration longitudinale au plasma, et non orthogonale, ce qui peut rendre le traitement de surface inhomogène.

### 2.2.2. Optimisation des paramètres

Notre objectif est ici d'optimiser les paramètres du plasma pour obtenir les surfaces de titane comportant une densité maximale de fonctions amines. Pour ce faire, nous avons fait varier différents paramètres lors des essais préliminaires de polymérisation plasma puis dosé les fonctions amines à l'aide du 4-(2-hydroxy-1-naphthylazo)benzenesulfonate de sodium, appelé plus couramment Acide Orange 7 (Figure VII.7).

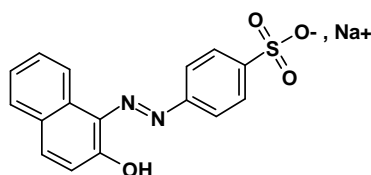


Figure VII.4 : Structure de l'Acide Orange 7

#### Durée du traitement :

Le premier paramètre à avoir été optimisé est la durée du traitement. Pour des raisons pratiques les autres paramètres de l'enceinte plasma ont été fixés comme suivant : débit

d'argon :  $1,2 \text{ l.min}^{-1}$ , débit de monomère :  $0,3 \text{ l.min}^{-1}$ , fréquence de la décharge plasma : 50 Hz.

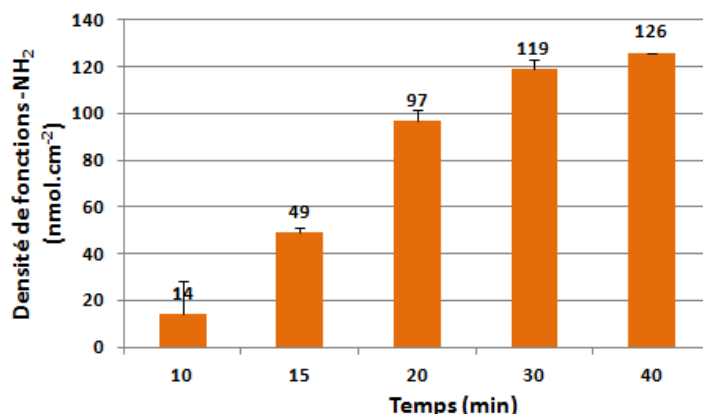


Figure VII.5 : Dosage des fonctions amines par l'Acide Orange 7 en fonction du temps d'exposition des échantillons au plasma

La concentration en amine sur la surface des échantillons est croissante avec le temps d'exposition et semble suivre une tendance asymptotique (Figure VII.5.). La durée optimale du traitement a été fixée pour la suite à 30 minutes.

#### Fréquence des impulsions :

Un des paramètres essentiels de la polymérisation par plasma microonde pulsé est la fréquence des impulsions. En effet, celle-ci a un impact direct non seulement sur la polymérisation, mais également sur la dégradation des amines au cours du traitement [27-28]. Pour l'optimisation, un balayage en fréquence de 10 à 60 Hz a été réalisé (Figure VII.6).

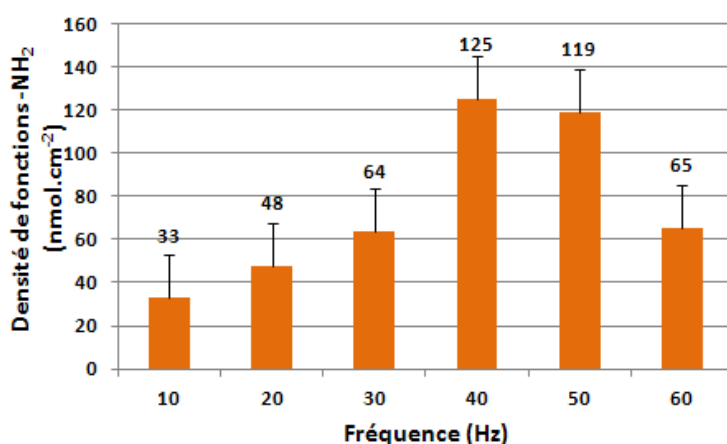


Figure VII.6 : Dosage des fonctions amines par l'Acide Orange 7 en fonction de la fréquence d'impulsion du plasma.



La concentration en amine croit dans un premier temps avec la fréquence pour atteindre un maximum à 40 Hz. La décroissance de la densité de fonction au-delà de cette fréquence peut provenir d'un temps trop court entre deux impulsions pour permettre aux gaz de se relaxer, engendrant ainsi non pas un plasma pulsé, mais continu.

#### Débit d'argon :

Le dernier paramètre à avoir été optimisé est le débit d'argon, qui influe sur le ratio argon/monomère du plasma et sur la pression interne de l'enceinte.

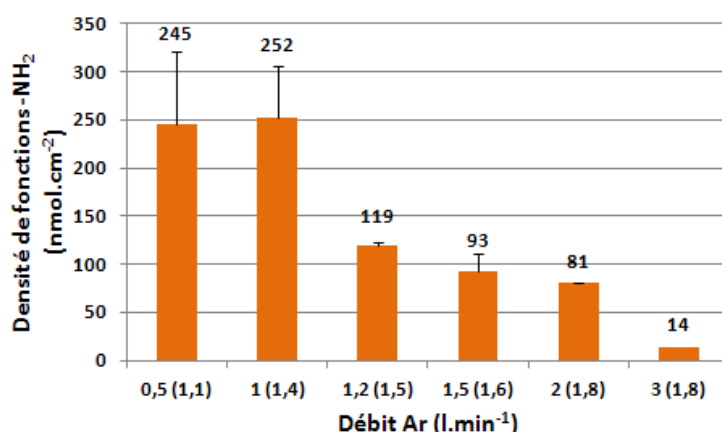


Figure VII.7 : Evolution de la concentration en amine sur la surface des échantillons de titane en fonction du débit du gaz vecteur. Entre parenthèses, la pression de l'enceinte en mbar

Les taux de fonctionnalisation en amine, stables sur les deux premières séries, vont en décroissant lorsque le débit en argon augmente (Figure VII.7). Deux débits semblent plus intéressants que les autres : 0,5 et 1,0 l.min<sup>-1</sup>, avec des concentrations en amine atteignant 250 nmol.cm<sup>-2</sup>. Cependant, les films aminés produits avec un débit de 0,5 l.min<sup>-1</sup> se décrochent de la surface du titane au cours du dosage. La tenue des films étant primordiale pour la fonctionnalisation, ce débit a donc été écarté. Le paramètre choisi est donc : Débit Argon : 1,0 l.min<sup>-1</sup>.

Les conditions permettant d'obtenir la plus grande densité de fonctions amines sont résumées dans le Tableau VII.2

Tableau VII.2 : Paramètres optimisés pour la fonctionnalisation des échantillons de titane par plasma microonde pulsé.

Paramètre	Valeur
Durée	30 min
Fréquence	40 Hz
Débit Ar	1,0 l.min <sup>-1</sup>
Débit Mono	0,3 l.min <sup>-1</sup>

### 2.2.3. Réactivité du film de polymères aminés : immobilisation d'un agent de transfert RAFT et polymérisation du NAS

L'objectif est ici d'exploiter la présence des fonctions amines en surface afin d'immobiliser efficacement un agent de transfert RAFT capable de contrôler la polymérisation du NAS par la procédure « grafting from ».

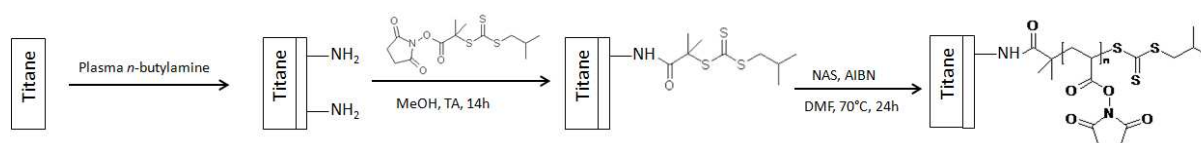


Figure VII.8 : Procédure générale de la polymérisation du monomère NAS par la stratégie « graft from » à partir de surfaces aminées

Pour ce faire, les pièces de titane fonctionnalisées par plasma sont placées dans une solution d'agent de transfert **CTA2** à  $1.10^{-4}$  mol.l<sup>-1</sup> pendant une nuit sur banc d'agitation à l'abri de la lumière.

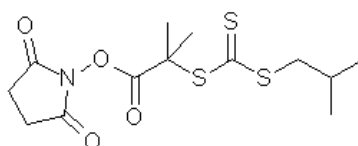


Figure VII.9 : structure de l'agent de transfert **CTA2**

Les mesures d'angle de contact sur les échantillons rincés et séchés (Figure VII.10) montrent un accroissement de l'angle de contact à l'eau qui évolue de 13° à 73° en présence de **CTA2**. Cette augmentation de l'hydrophobicité peut être attribuée au motif isobutyle porté par l'agent de transfert **CTA2**.

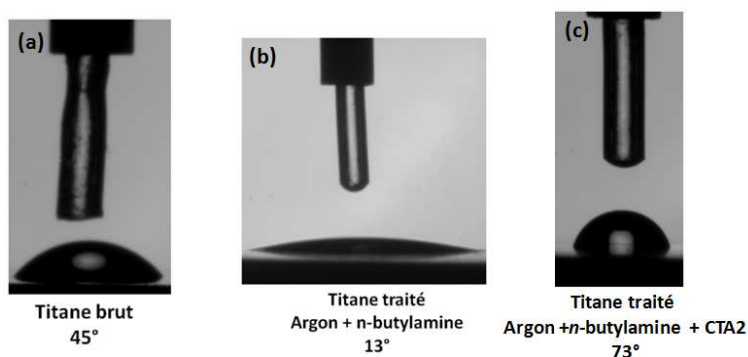


Figure VII.10 : Angle de contact (eau) du titane brut (a), traité au plasma (b), puis modifié par l'agent de transfert **CTA2** (c)

Après avoir greffé l'agent de transfert sur la surface, nous avons tenté de faire croître un homopolymère activé comportant des fonctions NHS. Pour parvenir à ce résultat, la surface de titane fonctionnalisée avec par le **CTA2** est immergée dans une solution de DMF contenant du NAS, du **CTA2** (en tant qu'agent de transfert sacrificiel) et de l'AIBN, dans des proportions [NAS] : [CTA2] : [AIBN] = 200 : 10 : 1.

En fin de polymérisation, l'échantillon est lavé et séché. L'angle de contact à l'eau sur cette surface est de 30°, ce qui correspond aux valeurs observées à partir d'une polymérisation similaire réalisée à l'aide de l'agent de transfert **CTA3** (30°, chapitre V). Le nouveau film a été caractérisé par spectrométrie infrarouge ATR (Figure VII.11).

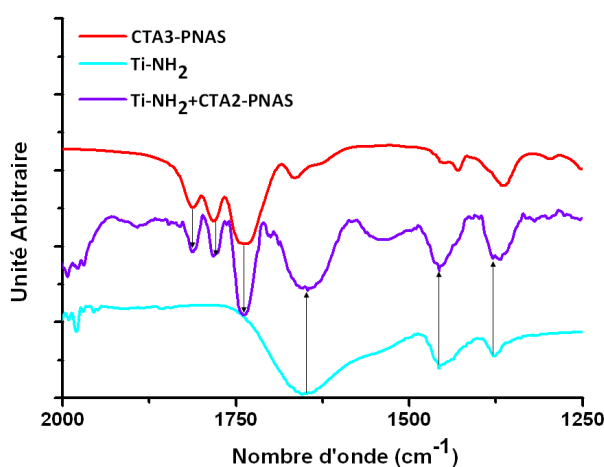


Figure VII.11. : Spectres Infrarouge ATR d'un échantillon fonctionnalisé par un plasma de *n*-butylamine avant (bleu) et après polymérisation « graft from » du NAS (violet). En comparaison, un spectre FTIR du polymère **CTA3-PNAS** (rouge).

Sur le spectre de la surface fonctionnalisée par le PNAS (Figure VII.11, en violet), les bandes d'élongation de la liaison C=O à 1740, 1784 et 1810 cm<sup>-1</sup> provenant du NAS (Figure VII.11, spectre rouge) apparaissent très clairement et confirment la présence du polymère en surface.

### 3. Conclusion

Le but de cette étude était de modifier le titane par des amines pour proposer un système de fonctionnalisation ne s'appuyant pas uniquement sur les hydroxyles de surfaces de TiO<sub>2</sub>. Au bilan, cette étude s'avère des plus prometteuses. En effet, nous sommes parvenus, grâce à la conception d'une nouvelle enceinte de polymérisation par plasma froid et l'optimisation des différents paramètres, à immobiliser un film de polymère polyaminé à la surface de

substrats en titane. Le dosage des fonctions amines par l'Acide Orange 7 témoigne d'une forte densité de greffage. Ce film a ensuite été traité par l'agent de transfert activé CTA2 afin de générer une surface capable de contrôler des polymérisations de type RAFT. Dans le cadre de cette étude, nous avons fait croître un homopolymère de type PNAS. Les premières analyses par infrarouge semblent confirmer d'un point de vue qualitatif la présence du polymère activé sur la surface. Des études par XPS, AFM et ellipsométrie sont en cours afin de mieux caractériser les différentes surfaces élaborées.

## Références bibliographiques

- [1] P. Hamerli, T. Weigel, T. Groth et D. Paul, *Enhanced tissue-compatibility of polyethyleneterephthalat membranes by plasma aminofunctionalisation*. Surf. Coat. Technol. **174-175** (0), 574-578.
- [2] Z. Yang, J. Wang, R. Luo, X. Li, S. Chen, H. Sun et N. Huang, *Improved hemocompatibility guided by pulsed plasma tailoring the surface amino functionalities of tio<sub>2</sub> coating for covalent immobilization of heparin*. Plasma Processes Polym. **2011**, 8 (9), 850-858.
- [3] M. Venogupalan, *Reaction under cold plasma conditions*. J. Wiley & sons: New York, **1971**.
- [4] M. J. Shenton et G. C. Stevens, *Surface modification of polymer surfaces: Atmospheric plasma versus vacuum plasma treatments*. J. Phys. D: Appl. Phys. **2001**, 34 (18), 2761-2768.
- [5] X. J. Dai, J. d. Plessis, I. L. Kyratzis, G. Maurdev, M. G. Huson et C. Coombs, *Controlled amine functionalization and hydrophilicity of a poly(lactic acid) fabric*. Plasma Processes Polym. **2009**, 6 (8), 490-497.
- [6] T.-Y. Chen, H.-I. Chen, C.-C. Huang, C.-S. Hsu, P.-S. Chiu, P.-C. Chou et W.-C. Liu, *Improved hydrogen-sensing performance of a pd/gan schottky diode with a surface plasma treatment approach*. Sens. Actuators, B **2011**, 159 (1), 159-162.
- [7] O. Durst, J. Ellermeier et C. Berger, *Influence of plasma-nitriding and surface roughness on the wear and corrosion resistance of thin films (pvd/pecvd)*. Surf. Coat. Technol. **2008**, 203 (5-7), 848-854.
- [8] P. K. Chu, *Enhancement of surface properties of biomaterials using plasma-based technologies*. Surf. Coat. Technol. **2007**, 201 (19-20), 8076-8082.
- [9] L. Chu, W. Knoll et R. Förch, *Biologically multifunctional surfaces using plasma polymerization methods*. Plasma Processes Polym. **2006**, 3 (6-7), 498-505.
- [10] R. C. F. Powell, J. H. Oxley et J. M. Blocher, *Vapor deposition*. J. Wiley & sons : New York, **1992**.
- [11] M. Müller et C. Oehr, *Plasma aminofunctionalisation of pvdf microfiltration membranes: Comparison of the in plasma modifications with a grafting method using esca and an amino-selective fluorescent probe*. Surf. Coat. Technol. **1999**, 116-119 (0), 802-807.
- [12] D. A. Puleo, R. A. Kissling et M. S. Sheu, *A technique to immobilize bioactive proteins, including bone morphogenetic protein-4 (bmp-4), on titanium alloy*. Biomaterials **2002**, 23 (9), 2079-2087.
- [13] M. Yamamoto, J. Sakata et M. Hirai, *Plasma polymerized membranes and gas permeability. I*. J. Appl. Polym. Sci. **1984**, 29 (10), 2981-2987.
- [14] S. Sarghini, S. Paulussen et H. Terryn, *Atmospheric pressure plasma technology: A straightforward deposition of antibacterial coatings*. Plasma Processes Polym. **2011**, 8 (1), 59-69.

- [15] F. Fally, C. Doneux, J. Riga et J. J. Verbist, *Quantification of the functional groups present at the surface of plasma polymers deposited from propylamine, allylamine, and propargylamine*. J. Appl. Polym. Sci. **1995**, 56 (5), 597-614.
- [16] K. M. McLean, G. Johnson, R. C. Chatelier, G. J. Beumer, J. G. Steele et H. J. Griesser, *Method of immobilization of carboxymethyl-dextran affects resistance to tissue and cell colonization*. Colloids Surf., B **2000**, 18 (3-4), 221-234.
- [17] J. H. Zhao, W. P. Michalski, C. Williams, L. Li, H.-S. Xu, P. R. Lamb, S. Jones, Y. M. Zhou et X. J. Dai, *Controlling cell growth on titanium by surface functionalization of heptylamine using a novel combined plasma polymerization mode*. J. Biomed. Mater. Res., Part A **2011**, 97A (2), 127-134.
- [18] H. Matsuyama, K. Hirai et M. Teramoto, *Selective permeation of carbon dioxide through plasma polymerized membrane from diisopropylamine*. J. Membr. Sci. **1994**, 92 (3), 257-265.
- [19] S. Alvarez-Blanco, S. Manolache et F. Denes, *A novel plasma-enhanced way for surface-functionalization of polymeric substrates*. Polym. Bull. **2001**, 47 (3), 329-336.
- [20] T. Mérian, D. Debarnot et F. Poncin-Epaillard, *Effect of fluorine substitution of aniline ring on pulsed plasma polymer growth and structure*. Plasma Processes Polym. **2011**, 8 (8), 763-772.
- [21] A. Vogelsang, A. Ohl, R. Foest, K. Schröder et K.-D. Weltmann, *Deposition of thin films from amino group containing precursors with an atmospheric pressure microplasma jet*. Plasma Processes Polym. **2011**, 8 (1), 77-84.
- [22] B. Finke, F. Hempel, H. Testrich, A. Artemenko, H. Rebl, O. Kylián, J. Meichsner, H. Biederman, B. Nebe, K. D. Weltmann et K. Schröder, *Plasma processes for cell-adhesive titanium surfaces based on nitrogen-containing coatings*. Surf. Coat. Technol. **2011**, 205, Supplement 2, S520-S524.
- [23] M.-R. Yang, K.-S. Chen et J.-L. He, *The interaction between blood and the surface characteristics of plasma polymerized films*. Mater. Chem. Phys. **1997**, 48 (1), 71-75.
- [24] T. B. Ren, T. Weigel, T. Groth et A. Lendlein, *Microwave plasma surface modification of silicone elastomer with allylamine for improvement of biocompatibility*. J. Biomed. Mater. Res., Part A **2008**, 86A (1), 209-219.
- [25] B. Paul J, *Allylamine cardiovascular toxicity: V. Tissue distribution and toxicokinetics after oral administration*. Toxicology **1985**, 35 (3), 167-177.
- [26] B. Finke, K. Schröder et A. Ohl, *Structure retention and water stability of microwave plasma polymerized films from allylamine and acrylic acid*. Plasma Processes Polym. **2009**, 6 (SUPPL. 1), S70-S74.
- [27] J. Friedrich, *Mechanisms of plasma polymerization – reviewed from a chemical point of view*. Plasma Processes Polym. **2011**, 8 (9), 783-802.
- [28] J. Friedrich, R. Mix, G. Kühn, I. Retzko, A. Schönhals et W. Unger, *Plasma-based introduction of monosort functional groups of different type and density onto polymer surfaces. Part 2: Pulsed plasma polymerization*. Compos interfaces **2003**, 10 (2-3), 173-223.

# **TROISIEME PARTIE**

**PARTIE**

**EXPERIMENTALE**





# **Chapitre VIII**

## **Matériels et méthodes**



## 1. Généralités

Les réactifs employés au cours des synthèses organiques proviennent des fournisseurs Sigma-Aldrich, Acros, Alfa Aesar et Fluka. Les solvants sont distillés avant emploi.

Les spectres RMN ( $^1\text{H}$  et du  $^{13}\text{C}$ ) ont été effectués sur un spectromètre Bruker Advance 300 en utilisant le tétraméthylsilane comme référence interne.

Les mesures GPC ont été menées sur deux chaînes GPC Waters, l'un utilisant comme phase mobile du THF à 40°C à un débit de 1 ml.min<sup>-1</sup> (phase fixe : 2 colonnes HR4), l'autre la DMF à 50°C au débit de 0,3 ml.min<sup>-1</sup> (phase fixe : 2 colonnes HT3). Les masses molaires et les indices de polymolécularité des différents polymères analysés proviennent de la mesure de l'indice de réfraction, dont la courbe de calibration a été réalisée à partir de standards en polystyrène (Polymer Standard Service) pour la chaîne GPC THF et en PMMA (Sigma-Aldrich) pour la chaîne GPC DMF.

Les études de spectroscopies UV/vis ont été menées à l'aide d'un spectrophotomètre Varian Cary 50 Scan équipé d'un contrôleur de température par effet Peltier.

Les spectres infrarouges ont été réalisés à l'aide d'un appareil Spectrum One (Perkin-Elmer), fournissant des spectres entre 4000 et 400 cm<sup>-1</sup> avec un pas de 0,5 cm<sup>-1</sup>. Les polymères synthétisés ont été analysés en transmission. Les échantillons de titane ont été analysés par réflexion totale atténuée (ATR).

Les mesures d'angle de contact (eau) ont été réalisées à l'aide d'un goniomètre Digidrop (GBX Scientific Instruments). Les images numérisées sont traitées par le logiciel Windrop++.

Les spectres XPS ont été obtenus au moyen d'un Kratos Axis Ultra DLD (Kratos Analytical) utilisant un rayon monochromatique Al K $\alpha$  ( $h\nu = 1486,6$  eV).

Les études AFM ont été menées à l'aide d'un microscope Nanoscope III multimode de Digital Instruments, sous pression atmosphérique et à température ambiante. Les pointes AFM employées sont en silicium avec un rayon de courbure de 2 nm et les cantilevers utilisés (type SSS) ont une fréquence propre d'environ 160 kHz. Les mesures sont réalisées en mode tapping (non contact).

Les études de voltampérométrie cyclique ont été réalisées au moyen d'un potentiostat Autolab PGSTAT 30. La cellule d'électrolyse est ici composée de trois électrodes : une électrode de travail en platine ou en titane, une électrode auxiliaire (fil de platine) et une électrode de référence (Ag/AgCl ou un fil d'argent).

Les images optiques ont été prises à l'aide d'un microscope optique Olympus BX41 (grossissements x5, x20 et x50).

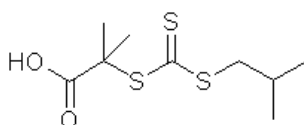
Les études de résonance plasmonique de surface (SPR) ont été menées avec un appareil Autolab Springle muni d'une cellule à canal unique (Eco Chemie, Pays-Bas). Le modèle employé au cours de cette thèse est un dispositif de Kretschmann [1]

## 2. Synthèses et caractérisations des agents de transfert et du

### ***N*-acryloyloxysuccinimide (NAS)**

#### 2.1. Synthèse et caractérisation de l'acide 2-(1-isobutyl)

#### **sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionique (CTA1) [2]**



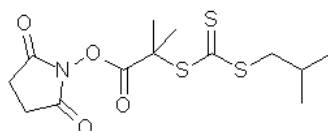
Une solution aqueuse de soude NaOH à 50% en masse (8,0 ml , 100 mmol) est ajoutée goutte-à-goutte à une solution de 2-méthyl-1propanethiol (9,6 ml, 88 mmol), d'acétone (56 ml, 760 mmol), de chlorure de tricaprilméthylammonium (1,6 ml, 9 mmol) maintenue sous atmosphère inerte (N<sub>2</sub>) à 5°C dans un bain de glace. Lorsque l'addition est terminée, le mélange est vigoureusement agité pendant 20 min. Un mélange de sulfure de carbone (5,6 ml, 88 mmol) et d'acétone (16 ml, 217 mmol) est ensuite introduit goutte-à-goutte au milieu réactionnel. La solution jaune résultante est agitée pendant 30 min, puis du chloroforme est ajouté (11,2 ml, 134 mmol). Une solution de soude à 50% en masse (26 ml, 326 mmol) est ajoutée goutte-à-goutte et le mélange est agité pendant une nuit à température ambiante. Ensuite, de l'eau est ajoutée (130 ml) puis de l'acide chlorhydrique concentré (66 ml) pour amener la solution à un pH entre 1 et 2. L'acétone restant dans le milieu est éliminé par bullage à fort débit d'azote. Le solide jaune-orange est collecté par filtration sur fritté et lavé

à l'eau distillée. Le solide est finalement recristallisé cinq fois dans un mélange acétone/hexanes (1 : 20). Rendement : 15,0 g (67%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm/TMS) : 0,94 (d,  $J = 6,7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,64 (s, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,92 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3,15 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $\text{S-CH}_2\text{-CH}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 22,1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 25,4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 27,8 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 45,2 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}$ ), 56,0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 172,9 ( $\text{C=O}$ ), 221,5 ( $\text{C=S}$ ).

## 2.2. Synthèse et caractérisation du 2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionoxysuccinimide (CTA2)

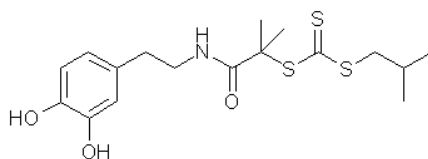


Une suspension de *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 3,3g, 29,7 mmol) dans du  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  sec (100 ml) est introduite lentement dans une solution de **CTA1** (5,0 g, 19,8 mmol) et de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (6,5g, 29,7 mmol) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 ml) sous atmosphère d'azote dans un bain glace-sel à  $-10^\circ\text{C}$ . Après 12 heures d'agitation, le solvant est éliminé sous pression réduite et le résidu purifié sur une colonne de silice en utilisant comme éluant un mélange acétate d'éthyle - éther de pétrole (3/1). Les fractions contenant le **CTA2** sont réunies et évaporées sous pression réduite pour donner un solide jaune clair. Rendement: 5,9 g (85%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm/TMS) : 0,94 (d,  $J = 6,7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,80 (s, 6H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,92 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 2,75 (s, 4H,  $(\text{C=O})\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-(C=O)}$ ), 3,15 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $\text{S-CH}_2\text{-CH}$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  : (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 22,1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 25,8 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 27,8 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 34,5 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ ), 41,8 ( $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$ ), 45,5 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}$ ), 57,0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 115,2, 115,4, 120,7 ( $\text{C}_{\text{aryl}}\text{-H}$ ), 130,6 ( $\text{C}_{\text{aryl}}\text{-CH}_2$ ), 142,9, 144,2 ( $\text{C}_{\text{aryl}}\text{-OH}$ ), 173,5 ( $\text{C=O}$ ), 220,1 ( $\text{C=S}$ ).

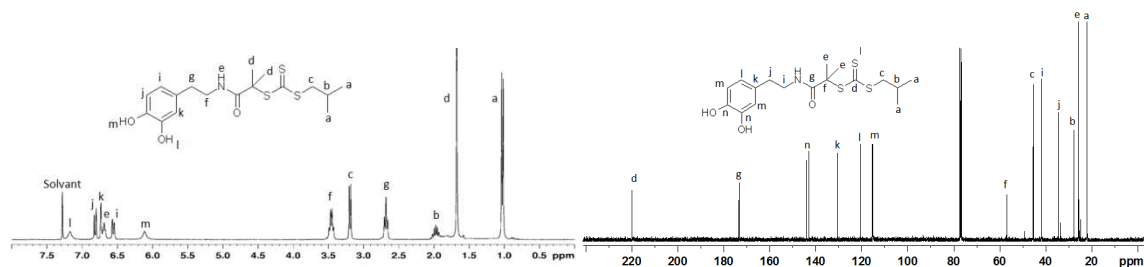
### 2.3. Synthèse et caractérisation du *N*-(3,4-dihydroxyphényléthyl)-2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionamide (CTA3)



L'agent de transfert **CTA2** (5,0 g, 14,3 mmol) et le chlorhydrate de dopamine (3,0 g, 15,8 mmol) sont dissous dans du méthanol (150 ml) à température ambiante sous atmosphère d'azote. Au bout de 20 min, de la triéthylamine (2,4 ml, 17,2 mmol) est ajoutée progressivement et la solution est agitée pendant 48h dans le noir. Le solvant est évaporé pour donner une huile orange. Ce produit brut est dissous dans l'éther diéthylique (50 ml) puis lavé avec une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub> (5x20 ml). La solution lavée est séchée sur MgSO<sub>4</sub>. Après filtration, la solution est évaporée. Le produit est finalement précipité dans l'hexane sous agitation vigoureuse pour donner un solide jaune orangé. Rendement: 3,9 g (70%).

RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm/TMS) : 0,94 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,58 (s, 6H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1,89 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 2,6 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Aryl), 3,10 (d, *J* = 6,9 Hz, 2H, S-CH<sub>2</sub>-CH), 3,37 (q, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>), 6,1 (bs, 1H, Aryl-OH), 6,47 (dd, 1H Aryl-H<sub>a</sub>), 6,62 (t, 1H, CO-NH-CH<sub>2</sub>), 6,73 (d, 1H, Aryl-H<sub>b</sub>), 6,65 (s, 1H, Aryl-H<sub>c</sub>), 7,15 (bs, 1H, Aryl-OH).

RMN <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 22,1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 25,8 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 27,8 (CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 34,5 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 41,8 (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH), 45,5 (S-CH<sub>2</sub>-CH), 57,0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 115,2, 115,4, 120,7 (C<sub>aryl</sub>-H), 130,6 (C<sub>aryl</sub>-CH<sub>2</sub>), 142,9, 144,2 (C<sub>aryl</sub>-OH), 173,5 (C=O), 220,1 (C=S).



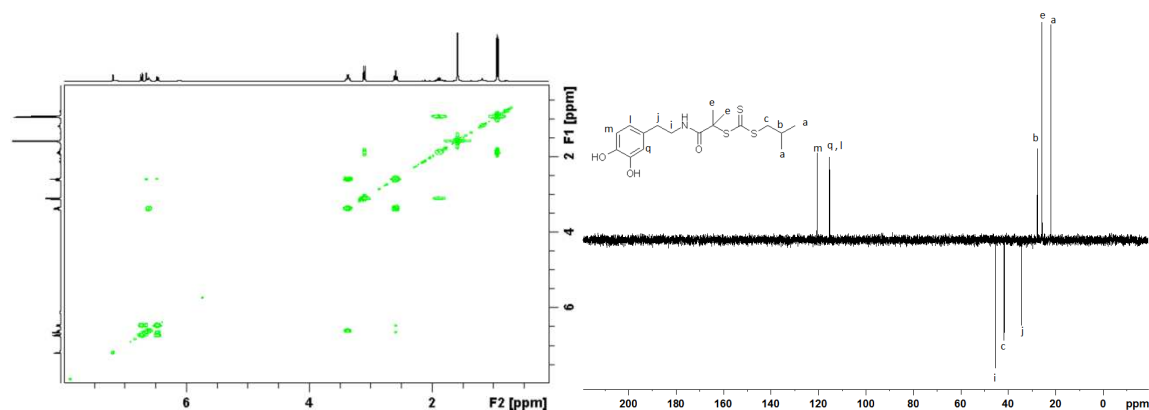
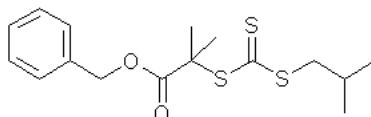


Figure VIII.1 : Spectres RMN  $^1\text{H}$ , COSY RMN  $^{13}\text{C}$  et  $^{13}\text{C}$  DEPT135 de l'agent de transfert **CTA3**

#### 2.4. Synthèse et caractérisation du 2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionate de benzyle (**CTA4**)



Une solution d'alcool benzylique (1,57 g, 14,4 mmol) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50ml) est ajoutée lentement, à température ambiante et sous atmosphère d'azote, dans une solution de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (200ml) contenant l'agent de transfert **CTA1** (3,0 g, 12 mmol), le DCC (3,0 g, 14,5 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (DMAP, 1,5 g, 12,0 mmol). Le mélange est agité pendant une nuit. Après filtration, la solution est lavée à l'eau distillée (3x50ml), et séchée sur  $\text{MgSO}_4$ . Le solvant est évaporé et le résidu est purifié sur une colonne de silice ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  : éther de pétrole 1 : 1). Rendement : 3g, (70%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$ (ppm/TMS) : 0,92 (d,  $J = 6,7$  Hz, 6H,  $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,64 (s, 6H  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 1,88 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 3,10 (d,  $J = 6,9$  Hz, 2H,  $\text{S-CH}_2\text{-CH}$ ), 5,05 (s, 2H,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 7,26 (m, 5H,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$ ).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 22,1 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 25,4 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 27,8 ( $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ), 45,2 ( $\text{S-CH}_2\text{-CH}$ ), 56,0 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_2$ ), 67,7 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 128,1, 128,5, 135,6 ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2$ ), 172,9 ( $\text{C=O}$ ), 221,5 ( $\text{C=S}$ ).

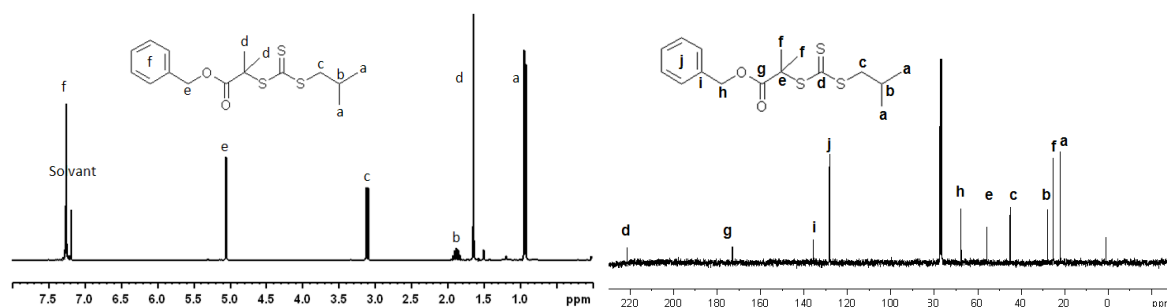


Figure VIII.2: Spectres RMN  $^1\text{H}$  et RMN  $^{13}\text{C}$  de l'agent de transfert CTA4

## 2.5. Synthèse et caractérisation du *N*-acryloyloxysuccinimide (NAS) [3]

Une solution de NHS (17,25 g, 15 mmol) et de triéthylamine (24,6 ml, 18 mmol) dans du chloroforme ( $\text{CHCl}_3$ , 240 ml) est placée sous atmosphère d'azote à  $0^\circ\text{C}$ . Le chlorure d'acryloyle (14,7 ml, 18 mmol) est alors ajouté goutte-à-goutte et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 4h à  $0^\circ\text{C}$ . La solution organique est lavée par une solution saturée de  $\text{NaHCO}_3$  (3x50ml) puis séchée sur  $\text{MgSO}_4$ . Le  $\text{CHCl}_3$  est évaporé et le produit est recristallisé dans un mélange éther diéthylique/hexanes (1 / 1) pour donner un solide blanc. Rendement 21 g (82%).

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  (ppm/TMS) : 2,79 (s, 4H, (C=O)- $\text{CH}_2$ - $\text{CH}_2$ -(C=O)), 6,3-6,8 (m, 3H,  $\text{CH}_2=\text{CH}$ ).

## 2.6. Synthèses et caractérisations des (co)polymères

### 2.6.1. Homopolymérisations RAFT : procédure générale

Dans un tube Schlenk sont introduits l'agent de transfert, l'AIBN, le monomère et le solvant. Après dissolution des composés, la solution est purgée à l'azote pendant 30 min dans un bain de glace. Le tube Schlenk est ensuite placé dans un bain d'huile à température de polymérisation, sous agitation. Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers pour déterminer le taux de conversion par RMN  $^1\text{H}$ , la masse molaire moyenne en nombre  $M_n$  et l'indice  $I_p$  par CES. En fin de réaction, le polymère est précipité dans un non-solvant sous forte agitation.

Ce protocole est identique pour les toutes les polymérisations RAFT en présence des agents de transfert synthétisés. Les différents paramètres propres à chaque polymérisation sont répertoriés dans le Tableau VIII.1.



Tableau VIII.1 : Paramètres de polymérisation RAFT et de précipitation pour les différents monomères

Monomère	Solvant	T (°C)	$[M]_0/[CTA]_0/[A]_0$	Monomère/Solvant	Non-Solvant
				(%v)	
NIPAM	DMF	75	100/1/0,1	25/75	Ether diéthylique
tBA	Toluène	75	100/1/0,05	20/80	Méthanol
Styrène	Toluène	80	100/1/0,3	50/50	Ethanol
NAS	DMF	75	100/1/0,05	15/85	Méthanol
			50/1/0,05		

$[M]_0$ ,  $[CTA]_0$ ,  $[A]_0$  : concentration initiale respectivement du monomère, de l'agent de transfert et de l'amorceur. Le rapport Monomère/Solvant est exprimé en pourcentage volumique.

### 2.6.2. Purification des polymères

Les polymères PNIPAM, PS et PtBA sont dissous dans un minimum de tétrahydrofurane (THF), puis reprécipités dans leur non-solvant respectif, filtrés et séchés sous vide. Le cycle est répété trois fois pour obtenir les polymères exempts de solvant.

Les polymères d'esters activés (PNAS) ont été purifiés en deux étapes. Les polymères sont dans un premier temps agités dans du chloroforme, solvant du monomère, pendant 1h puis filtrés. Les polymères sont dans un deuxième temps triturés dans de l'éther diéthylique, filtrés à nouveau et séchés sous vide.

### 2.6.3. Post-fonctionnalisation des polymères PNAS par la glucosamine

Les PNAS et le chlorhydrate de glucosamine NGLuHCl ( $[NGLuHCl]_0/[NAS]_0 = 10, 20$  ou  $40\%$ ) sont dissous dans la DMF à l'aide de 2,6-lutidine ( $[lutidine]/[NGLuHCl] : 2/1$ ). La solution, purgée sous azote, est portée à  $60^\circ\text{C}$  pendant une nuit avec agitation. La solution jaune claire est ramenée à température ambiante, puis de l'éthanolamine est ajoutée en excès en une fois et laissée à réagir 1h. La solution est filtrée et précipitée dans l'acétone. La poudre obtenue est séchée sous pression réduite dans une étuve à  $50^\circ\text{C}$  pendant 24h.

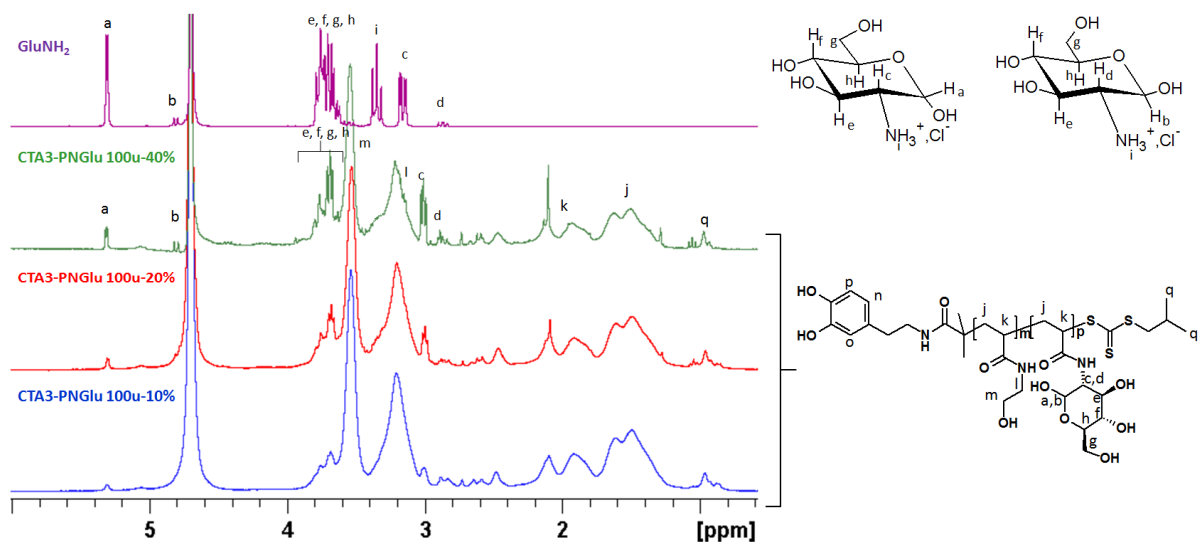
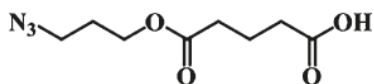


Figure VIII.3 : Spectres RMN  $^1\text{H}$  du chlorhydrate de glucosamine et des polymères comportants différentes quantités de glucosamine

## 2.7. Synthèse et caractérisation de l'ancre Dopamine- $\text{N}_3$ 5-(3,4-dihydroxyphénéthyl)carbamoylepentanoate de 3-azidopropyle

### 2.7.1. Synthèse et caractérisation de l'acide 5-(3-azidopropyl)-5-oxocarbonylpentanoïque

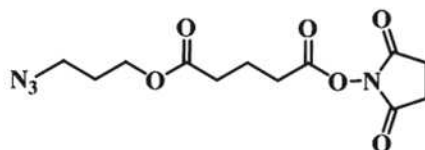


Une solution de 3-azidopropanol (3g, 29 mmol), d'anhydride glutarique (3,38 g, 29 mmol) et de DMAP (0,272 g, 2,2 mmol) dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre (50 ml) est agitée pendant douze heures à température ambiante. De l'acide chlorhydrique (0,5 mol.l $^{-1}$ , 30ml) et une solution de saumure (15ml) sont ensuite ajoutés au milieu réactionnel et la phase organique est isolée par décantation. Après avoir été séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , la phase organique est concentrée sous pression réduite et le résidu est purifié sur colonne de silice (éluant : acétate d'éthyle éther de pétrole 2 : 3) pour donner une huile incolore. Rendement 80%.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 1,84 (m, 4H, 2 C- $\text{CH}_2$ -C), 2,35-2,37 (m, 4H, 2 C- $\text{CH}_2$ -C=O), 3,33 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ - $\text{N}_3$ ), 4,11 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ -O-CO-), 9,67 (s, 1H, COOH).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) : 179,0, 172,8 (C=O); 61,4 ( $\text{CH}_2$ -O); 48,2 ( $\text{CH}_2$ - $\text{N}_3$ ); 33,0, 32,9, 28,1, 19,7 (C- $\text{CH}_2$ -C).

### 2.7.2. Synthèse du 5-(3-azidopropyl)oxocarbonylpentanoate de succinimidyle

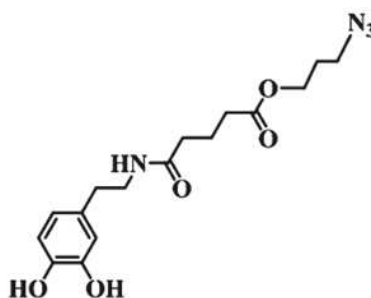


L'acide 5-(3-azidopropyl)-5-oxocarbonylpentanoïque et le NHS (2,7g, 23 mmol) sont dissous dans 50 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre à -5°C. Une solution de DCC (2,7g, 23 mmol) dans le CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhydre est ajoutée goutte-à-goutte au mélange et l'ensemble est laissé quelques minutes à basse température. La réaction, ramenée à température ambiante, est ensuite agitée pendant douze heures. En fin de réaction, la solution est filtrée et le filtrat est évaporé. Une huile incolore est obtenue avec un rendement de 90%.

RMN <sup>1</sup>H (300MHz CDCl<sub>3</sub>) : 1,85 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 2,00 (m, 2H, CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO), 2,42 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CO-O), 2,65 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CO-O-N), 2,78 (s, 4H, CH<sub>2</sub>(NHS)), 3,34 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 4,11 (t, 2H, CH<sub>2</sub>-O-CO-).

RMN <sup>13</sup>C (75MHz, CDCl<sub>3</sub>) : 178,6, 172,9 (C=O), 61,6 (CH<sub>2</sub>-O), 48,3 (CH<sub>2</sub>-N<sub>3</sub>), 32,9, 33,0 (CH<sub>2</sub>-C=O), 28,0, 19,8 (C-CH<sub>2</sub>-C).

### 2.7.3. Synthèse du 5-(3,4-dihydroxyphényl)carbamoylepentanoate de 3-azidopropyle (Ancre Dopamine-N<sub>3</sub>)



Le chlorhydrate de dopamine (2,35 g, 0,015 mol) est dissous dans une solution de méthanol (50 ml) contenant de la triéthylamine (1,55 g, 0,015 mol). Une solution de 5-(3-azidopropyl)oxocarbonylpentanoate de succinimidyle dans le méthanol (20 ml) est ajoutée goutte-à-goutte à la première solution. Le mélange réactionnel est agité pendant 48h, puis le solvant est éliminé sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissous dans 100 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La phase organique est ensuite lavée par une solution d'HCl (0,5 mol.l<sup>-1</sup>, 20 ml) puis séchée sur Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Après filtration, le solvant est évaporé et le produit brut est purifié sur



Sur une solution de Zonyl FSO-100 ( $M_w = 725 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $(\text{CF}_2)_x$ ,  $x \approx 8$ ,  $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_x$ ,  $x \approx 8$ ) (2g, 2,76 mmol), d'acide 4-pentynoïque (0,297g 3,034 mmol) et de DMAP (0,025 g, 0,207 mmol) dans le  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhydre (20 ml) est ajoutée goutte-à-goutte à  $0^\circ\text{C}$  une solution de DCC (0,85g, 4,14 mmol) dans  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 ml). Après quelques minutes, la solution est ramenée à température ambiante et agitée pendant douze heures. La solution est ensuite filtrée et le solvant évaporé. Le résidu est dissous dans 100 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  et la phase organique est lavée à l'eau distillée (10 ml), séchée sur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  et filtrée. Une huile marron claire est finalement obtenue, après évaporation du solvant, avec un rendement de 94 %.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) : 2,01 (t, 1H, -CCH), 2,37-2,7 (m, 6H,  $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CCH}$  et  $\text{CH}_2\text{-CF}_2$ -), 3,57-3,85 (m,  $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$ ), 4,27 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{-O-CO-}$ ).

### 3. Préparation des échantillons de titane

#### 3.1. Titane

Le titane employé est de grade 4 (pureté = 98,5% GoodFellow). Commercialisé sous forme de barres de section circulaire (Diam. 16mm) de 2m de long, le titane est tourné puis débité pour fournir des pièces de 15 x 3mm. Pour parvenir à ces dimensions, les barres de titane sont, dans un premier temps, tournées pour réduire leur diamètre à 15 mm. Les barres sont ensuite débitées en tronçons de 45 mm de long à l'aide d'une tronçonneuse Accutom-50 (Struers) avec un disque de découpe en SiC (20S25, Struers), puis découpées en échantillons d'épaisseur 3 mm avec un disque de découpe en SiC AO150 (Presi) monté sur une microtronçonneuse Secotom-10.

Le polissage des surfaces de titane a été réalisé à l'aide d'une polisseuse automatique Buehler Phoenix 4000, capable de traiter 6 échantillons en même temps. Pour adapter les échantillons à polir sur le porte-échantillon, des pièces en résine d'enrobage usinées ont été conçues (Figure VIII.5).

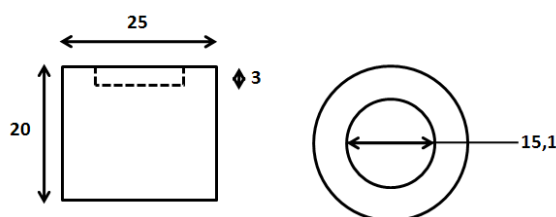


Figure VIII.5 : Schéma technique des supports en résine pour les échantillons de titane

Les échantillons sont maintenus dans les empreintes du support par de l'adhésif double face. Le porte-échantillon choisi pour le polissage comporte six ouvertures en poire pouvant s'adapter à de nombreux diamètres et permettant un bon maintien de nos pièces par serrage. La pression sur les différents disques de polissage est modulable et est appliquée par le centre du porte-échantillon. Le sens de rotation du porte-échantillon sélectionné est dans le même sens que la rotation du plateau, ce qui permet d'obtenir une meilleure finition.

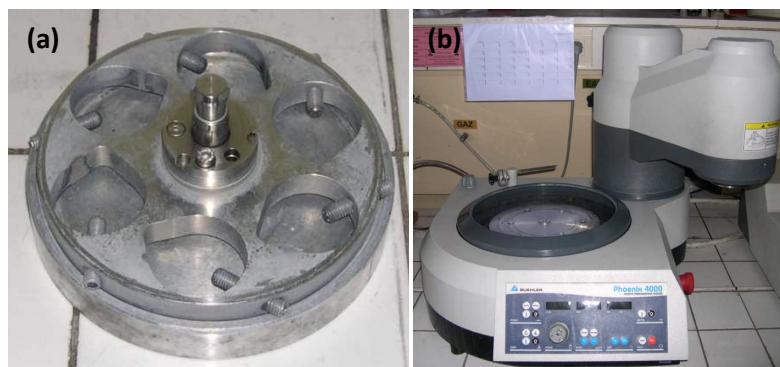


Figure VIII.6 : Porte-échantillon Buehler à forme poire (a) et polisseuse automatique Buehler Phoenix 4000 (b)

Après plusieurs essais (non décrits dans cette thèse), les paramètres de polissages optimaux, permettant à la fois un bon polissage de nos surfaces et une durée de vie prolongée pour les disques, ont été compilés dans le tableau pour être utilisés comme protocole de polissage de référence. La pression appliquée est basse au démarrage puis augmentée après 15s pour atteindre le seuil indiqué en pression finale. Cette action permet d'éviter le déchirement du disque de polissage au moment de la mise en route.

Tableau VIII.2 : Protocole de polissage

Disque	P. Début (lbs)	P. Fin (lbs)	Rotation (tr.min <sup>-1</sup> )	Lubrifiant	Durée
600	20	50	100	Eau	5min
1200	20	50	100	Eau	3min
2400	20	50	150	Eau	5min
Supra 5	25	100	200	SPM	5min

Avant polissage, les pièces sont ébavurées et chanfreinées. Les disques 600/1200/2400 ont pour abrasif SiC et sont lubrifiés lors du polissage par jet d'eau. Cette lubrification permet de limiter l'échauffement et d'évacuer les particules de titane abrasées. Dans le cas du feutre

supra 5, une solution de silice colloïdale diluée fait office de lubrifiant et d'abrasif (taille des particules inférieures à 0,1  $\mu\text{m}$ ).

Dès la fin du polissage, les échantillons sont rincés vigoureusement à l'eau pour éliminer le colloïde présent en surface. Les échantillons de titane sont ensuite rincés deux fois dans des bains d'eau distillée, d'éthanol et d'acétone pendant 15 min sous ultrasons.

## **3.2. Traitements de surface**

### **3.2.1. Oxydation des surfaces**

Après polissage, deux techniques ont été employées pour oxyder la surface du titane.

La première est un décapage à l'acide nitrique : les échantillons de titane poli sont placés dans une solution d'acide nitrique concentré à 10%v dans un bain à ultrason pendant 1h. Ils sont ensuite rincés dans 5 bains d'eau distillée sous ultrasons (durée d'un bain : 20 min). Les échantillons sont séchés sous flux d'azote et stockés dans des piluliers sous azote avant leur utilisation.

La seconde méthode utilisée est l'attaque de la surface par une solution « piranha », fraîchement préparée, pendant 120 s. En fin de traitement, les échantillons sont plongés dans un premier bain d'eau distillée de rinçage, puis nettoyés dans des bains d'eau distillée (5x30min) sous ultrasons.

Les pièces de titane sont finalement séchées sous courant d'azote et stockées dans des piluliers sous azote

### **3.2.2. Traitement thermique**

Les traitements d'oxydation précités donnent des couches d'oxydes ou d'hydrogels majoritairement composés d'oxyde de titane amorphe et de microcristaux d'anatase. La méthode la plus courante pour obtenir des surfaces cristallines est d'opérer un recuit.



Figure VIII.7 : Four de recuit Nabertherm LT24/11

Les recuits sur les échantillons de titane ont été réalisés dans un four LT24/11 de Nabertherm, programmable en température. Pour ce faire, le four contenant les échantillons de titane est porté en 15 minutes à 500°C ou 800°C pour obtenir respectivement les phases anastase ou rutile. La température de recuit est maintenue pendant 1h, puis les échantillons sont sortis du four et mis à refroidir à l'air libre pendant 30 min. Ils sont ensuite stockés dans des piluliers sous azote jusqu'à fonctionnalisation.

#### 4. Tests biologiques

##### 4.1. Lignées Cellulaires employées

Cellules L132 : Les cellules L132 sont une lignée de cellules embryonnaires humaines. Ces cellules, de type épithélial, seront utilisées dans les différents tests biologiques, elles ont les caractéristiques de lignées cellulaires immortalisées et elles ont la particularité de former des colonies ou clones avec un taux de clonage de 37 à 40%.

Cellules MC3T3-E1 : Les cellules MC3T3-E1 (pour Mouse Calvarian), commercialisées par ATCG, sont des cellules ostéoblastiques immortalisées. Elles sont mises en culture dans un milieu dépourvu d'acide ascorbique de type Eagle (MEM) enrichi de 10% de sérum de veau foetal et d'antibiotiques. Le renouvellement du milieu se fait tous les 2 à 3 jours.

Cellules HPMEC : Les cellules HPMEC (pour Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells) sont des cellules endothéliales humaines. Elles sont mises en culture dans un milieu de



croissance spécifique aux cellules endothéliales : Endothelial Cells Growth Medium MV (Promocell) 80% et 20% de sérum de veau.

#### **4.2. Viabilité cellulaire par la méthode du clonage**

Le test de viabilité consiste à établir l'effet relatif de clonage (ERC) et par conséquent la concentration létale 50% (LC50) en utilisant la méthode de formation de colonies avec des cellules épithéliales humaines en culture : lignée L132 (ATCC-CCL5) avec un coefficient de clonage élevé (37-40%). Ce test mesure quantitativement un seul critère de toxicité qui est la mort cellulaire ou survie cellulaire et est par conséquent spécifique, fiable et facilement reproductible. Il permet d'établir un rang de cytotoxicité pour toute substance chimique par la comparaison de leur LC50.

Les cellules sont préalablement ensemencées dans des boîtes de culture 48 heures avant le test afin que les cellules se trouvent dans une phase exponentielle de prolifération pour la manipulation. Elles sont ensuite ensemencées dans des boîtes de Pétri (diamètre 50 mm, 60 Costar) à la densité initiale de 200 à 300 cellules par boîte pour obtenir environ 200 colonies par boîte de culture. Le milieu de culture est le MEM de Eagle (Eurobio), supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau foetal (Eurobio). Le milieu contient de la vancomycine et de la fungizone. Les cellules sont exposées en continu dans 5 ml de milieu à des concentrations croissantes de poudre : 0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; et 400 µg/ml.

Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> pendant 9 jours.

En fin d'exposition, les boîtes sont colorées avec le cristal violet (Figure VIII.8). Après séchage, les clones sont comptés en aveugle tout en écartant les clones contenant moins de 25-30 cellules. L'effet relatif de clonage (ERC) est calculé et exprimé en % par rapport à la culture contrôle (concentration = 0 µg/ml).

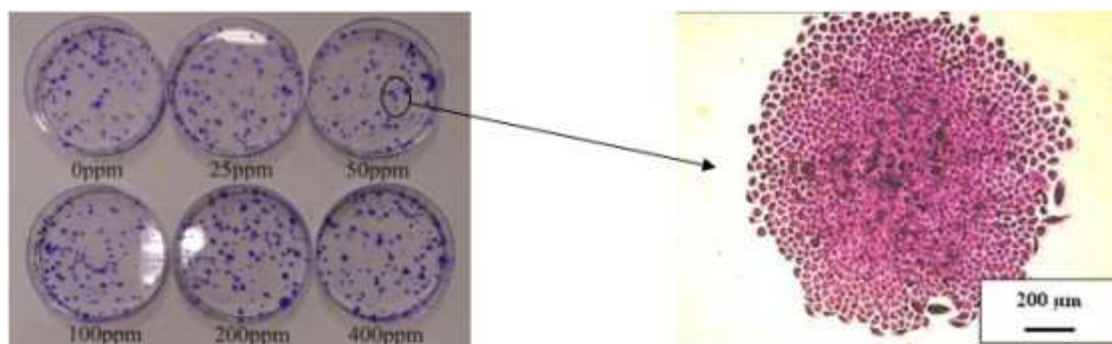


Figure VIII.8 : Boîte de clones et vue microscopique d'un clone après 9 jours d'incubation et coloration sur une poudre non toxique

### 4.3. Vitalité cellulaire

Ce test de fonction cellulaire consiste à quantifier la vitalité des cellules présentes sur le support à caractériser par dosage fluorométrique. Le réactif Bleu Alamar incorpore un indicateur de croissance colorimétrique et fluorescent fondé sur la détection de l'activité métabolique cellulaire. Le système comprend un indicateur d'oxydation / réduction qui devient fluorescent et change de couleur en réponse à la réduction chimique du milieu de culture. Cette transformation n'est possible que par des cellules vivantes. L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité cellulaire.

L'indicateur du taux d'oxydo-réduction relatif au métabolisme cellulaire indique des changements clairs et stables. De plus, ce test a la particularité de ne pas être destructif puisque le réactif ne présente aucune toxicité, ce qui permet entre autres de poursuivre la culture après l'expérience. La vitalité relative est exprimée en pourcentage  $\pm$  écart type de la culture témoin. Deux échantillons pour chaque période d'exposition seront testés.

Pour connaître le nombre de cellules à ensemercer dans chaque puits, un étalonnage préalable est réalisé. Cela montre que pour rester en phase de croissance exponentielle, nous déposerons pour ce test  $7 \times 10^3$  cellules par puits pour les essais avec les cellules MC3T3-E1 et  $10 \times 10^3$  cellules par puits avec les HUVEC.

Ce résultat est similaire à celui trouvé pour la prolifération cellulaire. Ainsi, ce test pourra être réalisé en simultané avec le test de la prolifération.

Les pastilles de Titane testées ont été préalablement rincées à l'eau distillée dans un bain à ultrasons 2 fois 3 minutes puis immergées au moins 5 minutes dans l'éthanol sous la hotte avant d'être séchées durant au moins 1 heure sous la hotte.

Les cellules sontensemencées dans des plaques multipuits (24 puits de 15 mm de diamètre, Costar) contenant les pastilles.

Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO<sub>2</sub> pendant 3 et 6 jours. A la fin des périodes d'incubation des cellules (3 (ou 4) et 6 jours), le milieu est prélevé, et 500 µl d'une solution à 10% en volume de Bleu Alamar sont ajoutés. La boîte est placée dans l'étuve à 37°C pendant 3 heures. A la fin de cette période, 150 µL de chaque puits sont prélevés et placés dans une boîte NUNC 96 puits à fond noir (boîte NUNC 96 puits à fond noir, Figure VIII.9.a) en prenant soin de préserver de la lumière. La fluorescence est mesurée à 560 nm (Twinkle LB 970 – Berthold, Figure VIII.9.b).

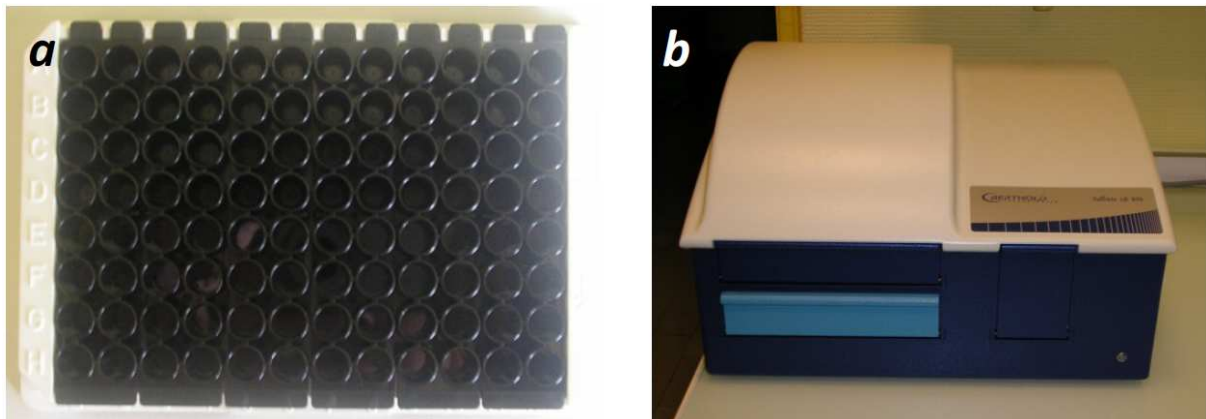


Figure VIII.9 : Boîte NUNC 96 puits à fond noir(a), Fluorimètre Twinkle LB 970 (Berthold) (b)

#### Préparation du Bleu Alamar

Une solution de tampon phosphate (pH = 7,4) est ajoutée à 1,2 ml de solution mère de Bleu Alamar (Interchim Réf. : UP669413) pour obtenir un volume total de 30 ml. La solution finale est filtrée avec un filtre 0,22 µm, est répartie dans des tubes à un volume d'environ 3 ml et l'ensemble est conservé au congélateur.

#### **4.4. Prolifération cellulaire**

Le test de prolifération cellulaire consiste en la détermination de la croissance cellulaire *in vitro* sur un support dont on veut évaluer la biocompatibilité. Le test est effectué sur des

lignées cellulaires animales ou humaines provenant de préférence du site d'implantation (concept de cellules cibles) : ostéoblastes, fibroblastes, macrophages, cellules épithéliales, endothéliales, etc. Les cellules sont cultivées dans des plaques à 24 puits sur les pastilles d'une épaisseur de 3 mm et d'un diamètre de 14,9 mm (Figure X). La période de culture est de 3 et 6 jours sans changement de milieu. Les cellules sont détachées de leur support par trypsination et comptées dans un compteur de cellules Coulter Z1 (Figure VIII.10). Le taux de prolifération relatif est exprimé en pourcentage  $\pm$  écart type de la culture témoin. Six expériences séparées seront effectuées sur 2 ou 3 échantillons pour chaque période d'exposition. Pour connaître le nombre de cellules à ensemercer dans chaque puits, un étalonnage préalable est réalisé. Nous déposerons, pour ces deux types cellulaires,  $7 \times 10^3$  cellules par puits pour les essais de prolifération cellulaire avec les cellules MC3T3-E1 et  $10 \times 10^3$  cellules par puits avec les HUVEC.

Les pastilles de titane testées ont été préalablement rincées à l'eau distillée dans un bain à ultrasons 2 fois 3 minutes puis immergées au moins 5 minutes dans l'éthanol sous la hotte avant d'être séchées durant au moins 1 heure sous la hotte.

Les cellules sont ensemençées dans des plaques multipuits (24 puits de 15 mm de diamètre, Costar, Annexe Figure 7) contenant les échantillons.

A la fin des périodes d'incubation (3 et 6 jours) les cellules sont détachées des échantillons avec 0,3 ml de trypsine (0,1% (p/v) dans la solution Hank's sans Calcium et sans Magnésium) et une incubation de 10 minutes.

Les échantillons sont douchés à l'aide de 7,7 ml d'EDTA pour bien détacher les cellules du matériau. La suspension de 10 ml ainsi obtenue est bien homogénéisée à l'aide d'une pipette Pasteur par aspirations-rejets répétés.

La suspension cellulaire obtenue est comptée à l'aide d'un compteur cellulaire Coulter Z1 (Coultronics, Figure VIII.11). Chaque suspension cellulaire est comptée 2 fois.



Figure VIII.10 : Boîte de prolifération COSTAR®



Figure VIII.11 : Compteur de Cellules (ZI Coulter)

#### **4.5. Hémocompatibilité**

Les tests réalisés en hémocompatibilité permettent de montrer les interactions entre la prothèse et le sang. Il est réalisé avec du sang humain sous 2 conditions de centrifugation (150G et 300G). Les manipulations sont réalisées avec du sang mélangé à du citrate pour inhiber la coagulation spontanée. Dans notre étude, pour l'instant, seul un test d'hémolyse a été réalisé. Il constitue un des éléments constituant des normes ISO 10993-3 et ISO 10993-4 pour l'applicabilité d'un matériau à l'homme.

#### 4.5.1. Protocole : test d'activité hémolytique d'échantillons

##### Préparation des échantillons

Une surface de contact de 800mm<sup>2</sup> environ est nécessaire par échantillon. Un nombre suffisant d'échantillons de titane à tester est placé dans une plaque 6 puits (Iwaki®), pour obtenir la surface de contact désirée.

4ml de tampon phosphate (PBS) filtré sont ajoutés dans chaque puits avec les échantillons à tester, et dans un puits vide (Témoin négatif de l'hémolyse), puis 4ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sont placés dans un dernier puits vide (Témoin positif de l'hémolyse). L'ensemble est mis à incuber à 37°C, sous une agitation de 80 tr.min<sup>-1</sup> pendant 15 minutes, pour conditionner les échantillons.

Une quantité de sang suffisante pour le test est prélevé dans un tube hépariné et 60 µl est ajouté dans chaque puits. Les échantillons sont mis à incuber à 37°C sous une agitation de 80 tr.min<sup>-1</sup> pendant 1h. Le milieu de chaque puits est collecté dans des tubes à hémolyse, les puits sont ensuite rincés avec 2 ml de PBS (pour ceux contenant du PBS) et 2ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pour celui contenant Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) en prenant soin de détacher toute tache de sang. Ces liquides de rinçage sont ajoutés à leurs tubes respectifs. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3250 tr.min<sup>-1</sup> pendant 10 min et l'absorbance des liquides résultants est mesurée à 541 nm.

## Références bibliographiques

- [1] R. J. Green, R. A. Frazier, K. M. Shakesheff, M. C. Davies, C. J. Roberts et S. J. B. Tandler, *Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials*. *Biomaterials* **2000**, 21 (18), 1823-1835.
- [2] X.-P. Qiu, F. Tanaka et F. M. Winnik, *Temperature-induced phase transition of well-defined cyclic poly(*n*-isopropylacrylamide)s in aqueous solution*. *Macromolecules* **2007**, 40 (20), 7069-7071.
- [3] Z. Hu, Y. Liu, C. Hong et C. Pan, *Synthesis of well-defined glycoconjugate polyacrylamides via preactivated polymers prepared by atp*. *J. Appl. Polym. Sci.* **2005**, 98 (1), 189-194.





# **Conclusion générale et** **perspectives**



## Conclusion générale et perspectives

Ce travail de thèse avait pour objectif de développer de nouvelles stratégies de greffage de brosses de polymères sur des surfaces de titane en vue d'applications médicales. En particulier, ces polymères devaient incorporer des agents thérapeutiques ciblant la problématique de thrombose et de resténose en vue d'élaborer des stents actifs de nouvelle génération.

Pour atteindre cet objectif, nous avons développé de nouvelles ancrures chimiques construites autour du motif catéchol qui présente la propriété de se greffer sur de nombreuses surfaces dont le titane. Ainsi, un nouvel agent de transfert intégrant une ancre catéchol et un groupement trithiocarbonate a été synthétisé, ainsi qu'une ancre chimique équipée d'un groupement azoture (permettant de réaliser la « chimie click ») a été élaborée. Ces ancrures chimiques ont permis de développer plusieurs stratégies de fonctionnalisation du titane:

i) Dans un premier temps, nous avons échafaudé des polymères parfaitement définis par polymérisation radicalaire contrôlée en utilisant l'agent de transfert RAFT intégrant à la fois le motif catéchol autorisant le greffage et le groupement trithiocarbonate permettant la croissance du polymère. Ainsi, nous avons élaboré des polymères de NIPAM, *t*BA, et styrène de masses molaires maîtrisées et d'indices de polymolécularité faibles comportant en extrémité de chaîne un motif catéchol. Ces polymères ont été immobilisés sur les surfaces de titane pour former des brosses de polymères (stratégie « graft to »). Les analyses physico-chimiques réalisées sur les surfaces fonctionnalisées ont mis en évidence la formation des brosses de polymère sur le titane ainsi que le rôle clé joué par l'ancre catéchol dans l'immobilisation des polymères. Par ailleurs, des taux de recouvrement en polymère relativement importants ont été obtenus grâce à cette première stratégie.

Celle-ci a été mise à profit pour concevoir des brosses de polymères fonctionnalisées par la glucosamine à partir d'un polymère de poly(*N*-acryloyloxysuccinimide) comportant en extrémité de chaîne un motif catéchol. Les évaluations biologiques réalisées sur les surfaces de titane modifiées par ces polymères montrent la parfaite biocompatibilité des nouveaux matériaux hybrides élaborés mais l'efficacité de la molécule de glucosamine dans la problématique de stenting n'a pu être démontrée. A la suite de ce travail, une collaboration avec cardiologues du CHR de Lille a été initiée afin de définir la molécule thérapeutique la plus pertinente pour la problématique de stenting.

ii) Par ailleurs, une plateforme de fonctionnalisation fondée sur la chimie « click » a été développée à partir de l'ancre chimique à base de catéchol et intégrant la fonction azoture. La fonctionnalisation de cette plateforme avec des molécules sondes a permis de montrer l'adaptabilité et l'efficacité de cette stratégie sur le titane.

iii) En tirant profit de l'immobilisation de l'ancre chimique contenant le groupement trithiocarbonate sur le titane, nous avons initié des polymérisations radicalaires contrôlées de type RAFT à partir de la surface (stratégie graft from). Les analyses physicochimiques réalisées sur les surfaces modifiées ont montré la présence des polymères brosses sur le titane avec des taux de greffage très importants mais les caractérisations physico-chimiques des polymères greffés ainsi que la quantification du taux de recouvrement en polymère doivent être complétées par des analyses plus poussées.

### **Perspectives**

La suite logique de ce travail consistera à exploiter les stratégies développées au cours de cette thèse pour développer de nouveaux polymères parfaitement définis et stimulables incorporant des molécules dont l'efficacité thérapeutique vis-à-vis de la problématique de stenting aura été démontrée. Un candidat potentiel a été clairement identifié et son incorporation au sein des chaînes polymères est en cours en collaboration étroite le service cardiologique du CHR de Lille.

Parallèlement à ce travail, une enceinte de polymérisation par plasma froid microonde pulsé a été construite et optimisée. Celle-ci permet de produire des échantillons de titane fonctionnalisés avec des polymères aminés. Cette nouvelle plateforme de fonctionnalisation pourra être également exploitée pour l'élaboration de biomatériaux hybrides intelligents de nouvelle génération.

# **ANNEXES**



## ANNEXE 1 : Electrochimie

### 1. Principe

La voltampérométrie cyclique consiste à enregistrer les courbes intensité-potential  $i=f(E)$  donnant l'intensité du courant d'électrolyse  $i$  en fonction du potentiel  $E$  appliqué à une électrode de travail fixe inattaquable (en général en platine). La cellule d'électrolyse est ici composée de trois électrodes :

- L'électrode de travail, un disque de platine ou de titane de dimensions connues, sur laquelle se produisent les réactions d'oxydation et de réduction.
- L'électrode auxiliaire, constituée d'un fil de platine, fermant le circuit d'électrolyse.
- L'électrode de référence, soit de type Ag/AgCl soit un fil d'argent, qui sert à mesurer le potentiel de l'électrode de travail.

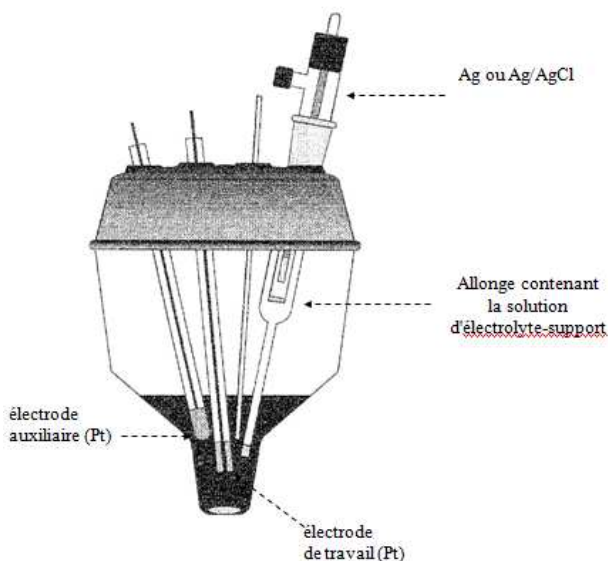


Figure A1.1 : schéma d'une cellule d'électrochimie

Le composé à analyser est dissous à  $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$  dans un solvant contenant un électrolyte-support de grande pureté à  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ . Il sert à conduire le courant au sein de la solution électrolytique. Le solvant doit être capable de dissoudre à la fois le composé à analyser et l'électrolyte.

Après un dégazage minutieux de la solution à l'argon ou à l'azote, la courbe  $i = f(E)$  est enregistrée. Le balayage des potentiels est effectué à l'aller entre une tension initiale  $E_i$  et une tension finale  $E_f$  et au retour entre  $E_f$  et  $E_i$ .

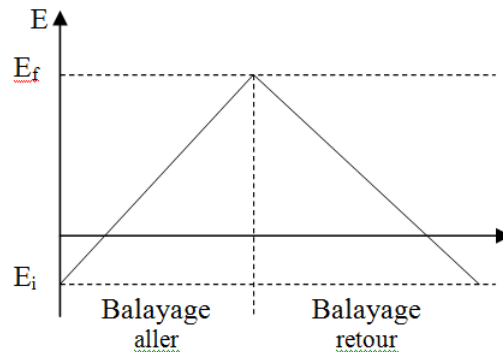


Figure A1.2 : Evolution de la tension appliquée en fonction du temps lors d'un cycle de voltampérométrie

L'électrode de travail est fixe et aucune agitation n'a lieu dans la cellule. Par conséquent, l'apport des espèces électroactives vers l'électrode de travail se fait uniquement par diffusion. Dans ces conditions, la courbe  $i=f(E)$  présente un pic de courant dû au fait que l'état stationnaire n'est pas atteint immédiatement à l'électrode.

## 2. Régimes de voltampérométrie cyclique

En **régime de diffusion** (cas standard), la valeur du courant de pic ( $i_p$ ) est donnée par l'équation de Sevcik-Randles (*Equation 1*).

$$i_p = (2.69 \cdot 10^5) \cdot A \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2}$$

Avec

$i_p$  : courant de pic

$A$  : surface de l'électrode

$n$  : nombre d'électrons échangés dans la réaction d'électrode

$D$  : coefficient de diffusion de l'espèce électroactive

$C$  : concentration de l'espèce électroactive

$v$  : vitesse de balayage

Donc, pour une électrode et une espèce électroactive à une concentration donnée :

$$i_p = k \cdot v^{1/2}$$



En **régime de couche mince**, la valeur du courant  $i_p$  est donnée par l'Equation 2 :

$$i_p = (9.39 \cdot 10^5) \cdot n^2 \cdot V \cdot C \cdot v$$

avec

$i_p$  : courant de pic

$n$  : nombre d'électrons échangés dans la réaction d'électrode

$V$  : volume de la couche

$C$  : concentration de l'espèce électroactive

$v$  : vitesse de balayage

Donc, dans ce cas, on a :

$$i_p = k \cdot v$$

## ANNEXE 2 : Résonance plasmonique de surface

### 1. Principe

La technique d'analyse par résonance de plasmons de surface (SPR) consiste à mesurer le déplacement d'un angle spécifique d'excitation en fonction du temps. Le modèle employé au cours de cette thèse est le dispositif de Kretschmann :

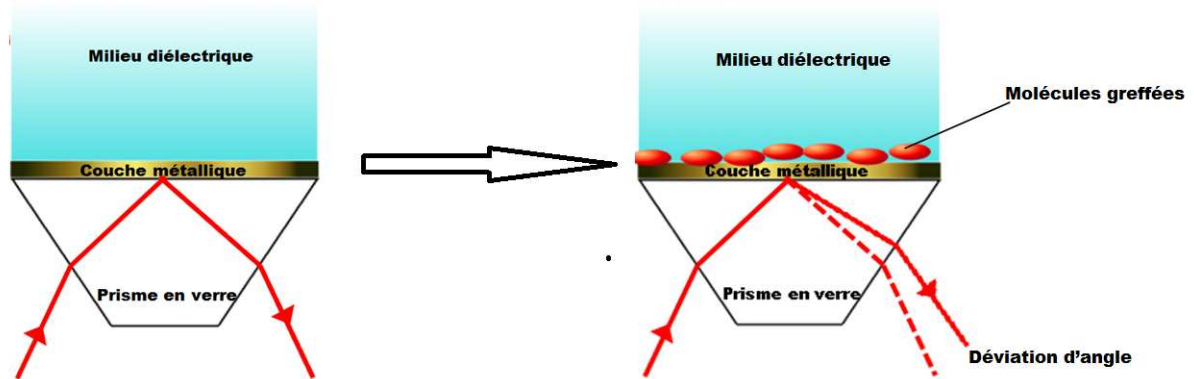


Figure A1.3: schéma de principe de la mesure SPR sur un dispositif de Kretschmann

Un laser vient se réfléchir *via* un prisme en verre d'indice  $n_g$  sur une couche d'or épaisse de quelques dizaines de nanomètres (constante diélectrique  $\epsilon_m$ ), elle-même en contact avec un milieu diélectrique d'indice  $n_s$ , de l'eau ou de l'acétonitrile pour les expériences de cette thèse.

Dans cette configuration, bien qu'il y ait réflexion totale du laser, une partie de la lumière polarisée est dispersée sous forme d'une onde évanescente, traversant la couche métallique et le milieu diélectrique sur une distance d'une longueur d'onde. Le vecteur de cette onde évanescente peut s'exprimer selon :

$$K_{ev} = \frac{\omega_0}{c} n_g \sin\theta$$

Avec

$K_{ev}$  vecteur de l'onde évanescente

$\omega_0$  fréquence de l'onde incidente

$c$  vitesse de la lumière dans le vide

$n_g$  indice de réfraction du verre

$\theta$  angle d'incidence

D'autre part, en extrême surface de la couche métallique, le nuage électronique vibre. Cette vibration, aussi appelée plasmons, a pour vecteur d'onde :

$$K_{sp} = \frac{w_0}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m n_s^2}{\epsilon_m + n_s^2}}$$

Avec

$K_{sp}$  vecteur d'onde des plasmons de surface

$w_0$  fréquence de vibration du champs électronique

$c$  vitesse de la lumière dans le vide

$\epsilon_m$  constante diélectrique de l'or

$n_s$  indice de réfraction du milieu diélectrique

En se plaçant à un angle  $\theta$  précis tel que  $K_{sp} = K_{ev}$  le plasmon rentre en résonance

$$\sin \theta = \frac{1}{n_g} \sqrt{\frac{\epsilon_m n_s^2}{\epsilon_m + n_s^2}}$$

Si des molécules viennent se greffer à la surface de la couche métallique, cela entraîne une variation de  $n_s$  et par conséquent, l'angle permettant la résonance varie.

## 2. Protocole et analyse

L'appareil utilisé pour les mesures SPR est un Autolab de chez Springer Instrument, monocanal et employé sous forme statique, c'est-à-dire sans circulation de fluide. La plaque SPR, fournie par Eco Chemie, comportant un film d'or de 50nm recouvert de  $TiO_2$  sur 10nm est posée sur le prisme. La plaque est plusieurs fois rincée avec le solvant utilisé jusqu'à atteindre la stabilisation du signal SPR et de la température. La mesure est alors démarrée. A  $t_i=150s$ , 50 $\mu$ l d'une solution d'un polymère de concentration connue est injectée sur la plaque SPR. La déviation d'angle est alors enregistrée. Au bout d'un temps  $t_r$  (fixé en général dans les manipulations à 3000s) la plaque est rincée par 500 $\mu$ l de solvant, puis l'enregistrement est poursuivi. La différence d'angle entre le signal avant  $t_i$  et le signal après  $t_r$  permet d'estimer la fonctionnalisation.

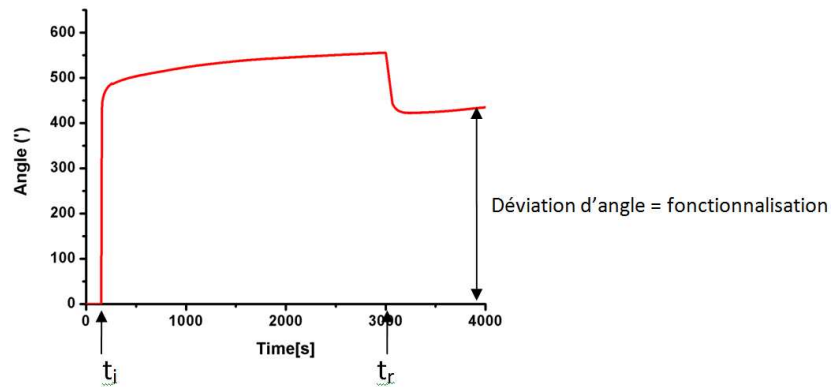


Figure A2.4 : sensogramme de la déviation d'angle SPR en fonction du temps.  $t_i$  est le moment de l'injection du produit étudié,  $t_r$  le point de rinçage.

En employant l'équation de De Feijter, il est possible de déterminer la densité de molécules greffées.

$$\gamma = \frac{d(n_f - n_s)}{dn/dc} = \frac{\Delta\theta(n_f - n_s)}{(d\theta/dd)(dn/dc)}$$

Avec

$\gamma$  densité de molécules

$d$  épaisseur du film de polymère

$n_f$  indice de réfraction du film de polymère

$n_s$  indice de réfraction du solvant

$dn/dc$  variation de l'indice de réfraction du solvant en fonction de la concentration en polymère

$\Delta\theta$  variation de l'angle SPR

$d\theta/dd$  variation de l'angle SPR en fonction de l'épaisseur du film de polymère greffé.

$d\theta/dd$  est une donnée fournie par le constructeur.  $dn/dc$  est soit cherché dans la littérature (pour les polymères usuels), soit calculés par GPC. Les  $n_f$  employés lors des calculs proviennent de la littérature.

## RESUME :

L'athérosclérose est une maladie vasculaire dont les complications sont la première cause de mortalité dans les pays développés. Pour soigner cette pathologie, une des méthodes les plus employées est l'angioplastie couplée au stenting. Ce geste occasionne cependant de forts risques de complications postopératoires, dont la plus répandue est la resténose. Pour réfreiner ce phénomène, différentes stratégies peuvent être exploitées, l'une d'elles consiste à immobiliser sur la surface du stent des composés bioactifs pour en faciliter l'acceptation par l'organisme.

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude. L'idée première est de fonctionnaliser le titane, métal couramment utilisé dans le domaine médical, par des polymères pouvant être modifiés en quantité désirée par des molécules bioactives.

Pour atteindre cet objectif, nous avons employé la polymérisation radicalaire contrôlée. Cet outil de choix permet d'obtenir des polymères parfaitement définis comportant une fonctionnalité en extrémité de chaîne. Dans notre cas, nous avons choisi d'y fixer une ancre catéchol, molécule naturelle ayant une forte affinité avec le titane.

Différents polymères ont été conçus et, après caractérisation, ont été immobilisés sur le titane pour former des brosses. Les surfaces ainsi obtenues ont été caractérisées en termes de composition et de densité de fonctionnalisation.

Enfin nous avons employé une molécule test, la glucosamine, pour modifier en différentes quantités une plateforme polymère, puis évalué biologiquement ces polymères (en solution et immobilisés sur le titane) afin d'en étudier l'influence sur plusieurs lignées de cellules.

**Mots clés : Polymérisation Radicalaire Contrôlée – Titane – Biomatériaux – Dopamine – Traitement de surfaces**

## ABSTRACT

Atherosclerosis is a vascular disease, whose complications are the first cause of death in developed countries. In order to cure this pathology, angioplasty, coordinated with stenting, is nowadays one of the most used treatments. However, postsurgical complications can often occur with this surgery technique. The frequency of restenosis, the most common complication, could be decreased thanks to different strategies. One of these strategies is to graft on stent surface bioactive molecules that enhance biocompatibility.

In this context we have endeavored to functionalize titanium, commonly used in medical applications, with polymers that can bear bioactive molecules. In order to reach this goal, we used controlled radical polymerization, which can provide end-functionalized, well-defined polymers. In our case, we have chosen to craft polymers with a catechol at the chain end, a natural anchor which has good affinity with titanium.

During this study, different kinds of polymers have been built and analyzed. Then, they were grafted to titanium substrates to create polymer brushes. Grafting densities and surface compositions were characterized thanks to different techniques.

Finally, we tried to modify a polymeric platform with different quantities of glucosamine, a test molecule. These polymers were then biologically evaluated alone and grafted to titanium with different cell lines.

**Keywords : Controlled Radical Polymerization – Titanium – Biomaterials – Dopamine – Surface treatments**