



HAL
open science

: Assemblages Hybrides à base de Nanotubes de Carbone : Application à la Catalyse, l'Optique et la Biologie

Nicolas Mackiewicz

► **To cite this version:**

Nicolas Mackiewicz.: Assemblages Hybrides à base de Nanotubes de Carbone: Application à la Catalyse, l'Optique et la Biologie. Chimie. Université Paris Sud - Paris XI, 2007. Français. NNT : . tel-00364276

HAL Id: tel-00364276

<https://theses.hal.science/tel-00364276>

Submitted on 25 Feb 2009

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

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

ORSAY

N° D'ORDRE :

<p>Université de Paris Sud U.F.R. Scientifique d'Orsay</p>
--

THESE de DOCTORAT

Présentée par :

Nicolas Mackiewicz

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY
Discipline : Chimie

*Assemblages Hybrides à base de Nanotubes de Carbone :
Applications à la Catalyse, l'Optique et la Biologie*

Travaux réalisés sous la direction de :
Charles Mioskowski

Soutenue le 28 Novembre 2007 devant la commission d'examen :

Mme Dr Cécile Zakri
MM. Dr Alberto Bianco
Pr Jacques Delaire
Pr Cyrille Kouklovsky
Dr Daniel Bernard
Dr Eric Doris

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

ORSAY

N° D'ORDRE :

<p>Université de Paris Sud U.F.R. Scientifique d'Orsay</p>
--

THESE de DOCTORAT

Présentée par :

Nicolas Mackiewicz

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY
Discipline : Chimie

*Assemblages Hybrides à base de Nanotubes de Carbone :
Applications à la Catalyse, l'Optique et la Biologie*

Travaux réalisés sous la direction de :
Charles Mioskowski

Soutenue le 28 Novembre 2007 devant la commission d'examen :

Mme Dr Cécile Zakri
MM. Dr Alberto Bianco
Pr Jacques Delaire
Pr Cyrille Kouklovsky
Dr Daniel Bernard
Dr Eric Doris

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Å	Angström
A₂P	Absorbeur à deux photons
Ac	Anticorps
AChE	Acétylcholine Esterase
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFC	Alkaline Fuel cell
AFM	Atomic Force Miscroscopy
Ag	Antigène
ARN	Acide Ribonucléique
ASI	Absorbeur Saturable Inverse
ATG	Analyse Thermogravimétrique
ATR-IR	Attenuated Total Reflectance - Infrared
CMC	Critical Micellar Concentration
Coll.	Collaborateur
CTP	Cétyl Pyridinium
Da	Dalton
DBU	1,8-diazabicyclo[5-4-0]undéc-7-ène
DMF	Diméthylformamide
DMFC	Direct Methanol Fuel Cell
DO	Densité Optique
DTNB	5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DTT	Dithiothréitol
E. Coli	Escherichia Coli
EDCI	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride
EDX	Energy Dispersive X-Ray
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
éq.	Equivalent
ESB	Encéphalopathie Spongiforme Bovine
ESI	Electrospray Ionization
E_r^N	Energie de Transistion Electronique
eV	Electron Volt
FET	Field Effect Transistor
HiPCO	High Pressure Carbon Monoxyde
His	Histidine
Hz	Hertz
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry
IgG	Immunoglobuline G
J	Constante de couplage
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MWNT	Multi-Walled Nanotube

Abréviations

NHS	N-Hydrosuccinimide
NIR	Near InfraRed
NP	Nanoparticule
NT	Nanotube
NTA	Nitrilotriacétique
ø	Diamètre
PAC	Pile à Combustible
PCP	Chlorure de 1-Pentacosa-10,12-diynyl-Pyridinium
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Poly(éthylèneimine)
PEMFC	Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cell
poly	Polymérisable
ppm	Partie par million
PrP	Protéine Prion
Pyr	Pyrène
QCM	Quartz Crystal Microbalance
Quant.	Quantitatif
Rdt	Rendement
Réf.	Référence
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RPE	Résonance Paramagnétique Electronique
sat	Saturée
SCE	Saturated Calomel Electrode
scFv	Single Chain Fragment Variable
SM ou MS	Spectrométrie de masse
STM	Scanning Tunnel Microscopy
SWNT	Single-Walled Nanotube
<i>t</i>-Bu	<i>tert</i> -Butyl
THF	Tétrahydrofurane
TPa	Tera Pascal
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultraviolet
δ	Déplacement chimique
ε_r	Permittivité Relative
Φ_F	Rendement Quantique

Sommaire

Introduction Générale.....	13
CHAPITRE I Les nanotubes de carbone.....	17
I. Introduction.....	19
II. Les formes allotropiques du carbone	19
II.1. Du graphite au fullerène.....	19
II.2. Du fullerène au nanotube de carbone	20
II.3. Structure des nanotubes de carbone	21
III. Méthodes de synthèse et de purification des nanotubes	23
III.1. Synthèse par arc électrique.....	23
III.2. Synthèse par ablation laser	24
III.3. Synthèse par décomposition catalytique.....	24
III.4. Méthodes de purification.....	25
IV. Propriétés et applications	26
IV.1. Propriétés mécaniques	26
IV.2. Propriétés électriques.....	27
IV.3. Propriétés thermiques.....	28
IV.4. Propriétés optiques	28
IV.5. Propriétés d'adsorption de gaz	29
IV.6. Propriétés de capillarité.....	29
IV.7. Propriétés de vectorisation.....	30
V. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone	30
V.1. Fonctionnalisation covalente	30
V.1.1. Chimie des défauts de surface des nanotubes de carbone	30
V.1.2. Greffage covalent sur la surface des nanotubes de carbone.....	31
V.2. Fonctionnalisation non covalente.....	34
V.2.1. Adsorption de motifs polyaromatiques	34
V.2.2. Enroulement de polymères et de surfactants	34
V.2.3. Interactions avec des biomolécules.....	35
V.3. Fonctionnalisation endohédrale.....	35
VI. Conclusion	36
VII. Bibliographie	37
CHAPITRE II Conception de nanoobjets pour la catalyse.....	41
I. Introduction et concept	43
I.1. Les piles à combustible	43
I.2. Méthodes existantes de dépôt.....	45
I.2.1. L'auto-assemblage.....	45
I.2.2. L'imprégnation.....	46
I.3. Principe de la déposition de nanoparticules sur un nanotube de carbone.....	48
II. Organisation supramoléculaire de lipides sur les nanotubes de carbone	49
II.1. Interactions de détergents et de molécules lipidiques avec les nanotubes	49
II.2. Synthèse de lipides	50
II.2.1. Présentation générale des réactifs lipidiques	50
II.2.2. Synthèse des lipides NTA.....	51

II.2.3. Synthèse des lipides pyridinium	52
II.3. Adsorption des lipides sur les nanotubes.....	52
II.3.1. Méthode employée pour l'auto-organisation	52
II.3.2. Polymérisation.....	54
III. Interaction de sels métalliques avec les nanotubes et formation de nanoparticules.....	56
III.1. Méthode d'imprégnation.....	56
III.2. Formation et caractérisation des nanoparticules	56
III.2.1. Réduction chimique	56
III.2.2. Réduction par irradiation	57
III.2.3. Caractérisation par ICP-MS.....	59
III.3. Nanoparticules de platine.....	59
III.3.1. Mise au point.....	59
III.3.2. Synthèse et caractérisation des nanohybrides "Nanotube-Pt"	62
III.4. Nanoparticules de palladium.....	65
III.4.1. Synthèse et caractérisation des nanohybrides "Nanotube-Pd".....	65
III.5. Conclusion.....	68
IV. Application des nanohybrides à la catalyse	68
IV.1. Nanocomposites à base de platine	69
IV.1.1. Propriétés électrochimiques du platine.....	69
IV.1.2. Exemple d'application : électrocatalyse de l'oxydation du méthanol.....	70
IV.2. Nanocomposites à base de palladium.....	72
IV.2.1. Propriétés électrochimiques du palladium	72
IV.2.2. Exemple d'application : électrocatalyse de l'oxydation de l'éthanol.....	73
V. Conclusion.....	75
VI. Bibliographie.....	77
CHAPITRE III Premiers pas vers un nanobiosenseur.....	81
I. Préambule.....	83
I.1. Nanotubes de carbone & biosenseurs	84
I.2. Méthodes d'immobilisation de protéines.....	85
I.3. Méthodes de détection existantes.....	86
I.3.1. Microbalance à cristal de quartz.....	86
I.3.2. Transistor à effet de champ (FET).....	87
I.3.3. Méthode électrochimique.....	88
I.4. Stratégie employée.....	88
II. Présentation de la protéine senseur.....	89
II.1. Généralités sur les anticorps.....	89
II.1.1. Structure des anticorps.....	90
II.1.2. Intérêts des scFv.....	91
II.2. Synthèse d'un scFv dirigé contre la protéine Prion	91
III. Synthèse et greffage de molécules hétéro bifonctionnelles	92
III.1. Vers une fonctionnalisation non covalente des nanotubes	93
III.1.1. Nature des groupements chélatants B.....	93
III.1.2. Groupements A permettant l'interaction avec la surface des nanotubes.....	95
III.1.3. Synthèses des réactifs bifonctionnels.....	96
III.1.4. Contrôle du π -stacking sur les nanotubes	97
III.2. Vers une fonctionnalisation covalente.....	99
III.2.1. Couplage peptidique de II-2 via les acides carboxyliques de surface	99
III.2.2. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone par la méthode Billups	100

III.2.3. Contrôle de la fonctionnalisation.....	101
III.3. Détermination du taux de chargement en nickel sur les nanotubes.....	102
IV. Détection d'un anticorps par un hybride "NT-Antigène".....	103
IV.1. Méthode générale.....	103
IV.2. Détection d'Ellman <i>via</i> l'acétylcholinestérase.....	104
IV.3. Mise au point.....	105
IV.3.1. Composition de l'échantillon.....	105
IV.3.2. Effet du tampon.....	106
IV.4. Résultats.....	107
IV.4.1. Accroche du scFv et détection de l'anticorps.....	107
IV.4.2. Optimisation des résultats de détection.....	108
IV.4.3. Contrôles de la spécificité de l'accrochage du scFv sur les nanotubes.....	110
IV.5. Conclusion.....	110
V. Approche pour la détection de la protéine Prion.....	111
VI. Perspectives.....	111
VII. Conclusion.....	112
VIII. Bibliographie.....	113
CHAPITRE IV Agents oxydants de l'ADN et transfert électronique photoinduit.....	116
I. Introduction.....	118
II. Conception d'un agent clivant de l'ADN.....	118
II.1. Intérêt biologique.....	118
II.2. Mécanismes du clivage de l'ADN.....	119
II.2.1. Transfert électronique photoinduit.....	119
II.3. Elaboration d'un agent clivant de l'ADN.....	120
II.3.1. Nature du groupement donneur.....	121
II.3.2. Exemples de systèmes "Acridine-Accepteur" et "Acridinium-Donneur".....	121
II.4. Stratégie suivie.....	122
III. Association covalente de SWNTs avec un dérivé de l'acridine et clivage de l'ADN.....	123
III.1. Synthèse d'un analogue greffable de l'acridine et fonctionnalisation de nanotubes SWNTs.....	123
III.2. Caractérisation des nanotubes fonctionnalisés.....	124
III.2.1. Spectroscopie de diffusion Raman.....	124
III.2.2. Spectroscopie UV-Vis-NIR.....	126
III.2.3. Analyse thermogravimétrique.....	127
III.3. Clivage de l'ADN.....	128
III.3.1. Choix de l'ADN.....	128
III.3.2. Les différentes formes de l'ADN plasmidique.....	128
III.3.3. Résultats.....	129
IV. Fonctionnalisation des nanotubes MWNTS avec les dérivés de l'acridine et clivage de l'ADN.....	131
IV.1. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone et caractérisation.....	131
IV.1.1. <i>Via</i> les acides carboxyliques.....	131
IV.1.2. <i>Via</i> la réaction de Billups.....	132
IV.1.3. <i>Via</i> la fonctionnalisation non-covalente.....	132
IV.1.4. Adsorption des dérivés de l'acridine avec les MWNTS.....	133
IV.2. Clivage de l'ADN.....	133
IV.3. Conclusion.....	134

V. Etudes photophysiques de l'interaction nanotube-acridine et nanotube-acridinium	134
V.1. Systèmes existants.....	135
V.2. Etude de l'hybride "nanotube-acridine".....	136
V.2.1. Absorption UV.....	136
V.2.2. Spectroscopie de fluorescence.....	137
V.2.3. Conclusion.....	142
V.3. Etude de l'hybride "nanotube-acridinium".....	142
V.3.1. Etudes de fluorescence.....	142
V.3.2. Etude du transfert électronique photoinduit par RPE.....	145
VI. Conclusion	148
VII. Bibliographie	149

CHAPITRE V Fonctionnalisation de nanotubes de carbone pour la limitation optique.. 152

I. Introduction	154
II. Limitation optique	154
II.1. Le risque laser.....	154
II.2. Comportement d'un limiteur optique.....	155
II.3. Types de Protection.....	156
II.3.1. Protections passives.....	156
II.3.2. Protections déclenchées.....	156
II.3.3. Protections auto-activées.....	156
III. Nanotubes de carbone et limitation optique	157
III.1. Propriétés optiques des nanotubes de carbone.....	157
III.2. Mécanisme de la limitation optique des nanotubes de carbone.....	157
III.3. Systèmes existants à base de nanotubes pour la limitation optique.....	158
IV. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone avec des motifs décarboxylables	159
IV.1. Stratégies de décarboxylation.....	160
IV.1.1. Photodécarboxylation.....	160
IV.1.2. Décarboxylation thermique.....	160
IV.2. Obtention des nanotubes thermodécarboxylables.....	161
IV.2.1. Synthèse d'un motif β -cétoacide greffable.....	161
IV.2.2. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone et caractérisation.....	162
IV.3. Limitation optique.....	163
IV.4. Expériences pompe-sonde nanoseconde.....	165
IV.4.1. Nanotubes thermodécarboxylables.....	165
IV.4.2. Motif β -cétoacide.....	166
IV.4.3. Mélange en solution des nanotubes solubles avec le β -cétoacide.....	167
IV.5. Conclusion.....	168
V. Association de nanotubes de carbone avec des fullerènes	168
V.1. Propriétés des fullerènes.....	168
V.2. Dérivatisation des nanotubes avec les fullerènes.....	169
V.2.1. Synthèse des fullerènes greffables.....	169
V.2.2. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone et caractérisation.....	170
V.3. Limitation optique.....	171
V.3.1. Nanohydrate "nanotube-fullerène".....	172
V.4. Expériences pompe-sonde picoseconde.....	173
V.5. Conclusion.....	174
VI. Association des nanotubes de carbone avec des nanoparticules d'or	174

VI.1. Propriétés optiques des nanoparticules d'or.....	175
VI.2. Combinaison de nanotubes MWNTs et de nanoparticules d'or.....	175
VI.2.1. Synthèse et caractérisation des hybrides "nanotube-Au".....	176
VI.2.2. Caractérisation par absorption UV-Visible.....	177
VI.3. Limitation optique.....	177
VII. Conclusion.....	179
VIII. Bibliographie.....	180

CHAPITRE VI Nanotubes de carbone et aptamères pour le ciblage de cellules tumorales
182

I. Introduction.....	184
II. Généralités sur les aptamères.....	184
II.1. Principe général de la sélection d'aptamères.....	185
II.2. Principaux avantages des aptamères.....	186
II.3. Aptamère dirigé contre la protéine Ret.....	187
III. Stratégie adoptée.....	188
IV. Association d'aptamères et de nanotubes de carbone.....	189
IV.1. Dérivatisation de nanotubes de carbone MWNTs.....	190
IV.1.1. Synthèse d'une molécule bifonctionnelle.....	190
IV.1.2. Fonctionnalisation des nanotubes MWNTs.....	190
IV.2. Couplage d'aptamères aux nanotubes fonctionnalisés.....	191
V. Résultats.....	191
VI. Conclusion et perspectives.....	193
VII. Bibliographie.....	195
Conclusion Générale.....	198
Partie Expérimentale.....	203
Généralités.....	205
I. Synthèse organique.....	210
I.1. Résultats expérimentaux du chapitre II.....	210
I.2. Résultats expérimentaux du chapitre III.....	219
I.3. Résultats expérimentaux du chapitre IV.....	232
I.4. Résultats expérimentaux du chapitre V.....	243
I.5. Résultats expérimentaux du chapitre VI.....	260
II. Biochimie et biologie moléculaire.....	262
II.1. Expériences sur les protéines recombinantes correspondant au chapitre III.....	262
II.2. Expériences sur les acides nucléiques correspondant au chapitre IV.....	263

Introduction Générale

Avec la découverte des nanotubes de carbone en 1991, le sens du mot nanotechnologie a pris toute son ampleur et connaît depuis une révolution aussi bien dans le monde académique qu'industriel. Définis à l'origine comme des microtubules de carbone graphitique, les nanotubes, en raison de leur structure, possèdent d'extraordinaires propriétés mécaniques et électriques. Ces dernières sont largement exploitées pour des projets et applications de plus en plus éclectiques comme l'ascenseur spatial, les écrans plats ou encore la vectorisation moléculaire et les muscles artificiels.

Nous nous proposons, au cours de ce travail de thèse, de concevoir et synthétiser différents hybrides à base de nanotubes de carbone. Les applications que nous avons envisagées pour ces nanostructures originales sont variées et couvrent les domaines de la catalyse, de l'optique et de la biologie. Cinq thématiques issues de ces domaines de recherche ont plus particulièrement été abordées :

- Support pour la catalyse, application aux piles à combustible

Nous nous trouvons à une époque où il est nécessaire de trouver des solutions alternatives aux sources d'énergies électriques existantes. L'une des voies prometteuses est l'utilisation des piles à combustible. Une condition *sine qua non* pour que cette issue soit envisageable et rentable est que la quantité de catalyseur utilisée soit minimale. Pour ce faire, il faut que le catalyseur soit déposé sur un matériau possédant une grande surface spécifique. C'est dans ce contexte que nous avons développé une nouvelle stratégie pour le dépôt de nanoparticules de platine et de palladium sur les nanotubes *via* un agencement supramoléculaire.

- Elaboration d'un biosenseur

Nous avons également utilisé cette spécificité des nanotubes (grande surface spécifique) alliée à ses propriétés électroniques pour le développement d'un biosenseur. La contribution des nanotubes dans ce domaine est de plus en plus étudiée pour concevoir des outils miniaturisés capables de détecter des pathologies le plus finement possible et pouvoir les traiter au plus vite. Dans ce cadre, nous avons développé plusieurs approches universelles d'ancrage de protéines senseur sur les nanotubes pour la détection d'anticorps et d'antigènes.

- Synthèse d'un agent clivant de l'ADN

Parmi les agents clivants efficaces de l'ADN se trouve les systèmes donneur-accepteur photoactivables. Les propriétés électroniques des nanotubes incitent à les introduire dans de tels systèmes. Ce type d'hybrides a déjà montré ses performances pour, par exemple, des applications en photovoltaïque. Nous avons élaboré différents objets à base de nanotubes de carbone capables de jouer le rôle d'agent clivant et étudié leurs propriétés photophysiques.

- Optimisation des nanotubes pour la limitation optique

Les nanotubes de carbone possèdent des propriétés en limitation optique. Cette caractéristique est d'autant plus intéressante qu'elle est recherchée pour l'élaboration de systèmes performants pour faire face à la multiplication de sources laser intenses. Les nanotubes sont en effet capables de diffuser l'énergie d'un faisceau laser que lorsque sa puissance atteint un seuil pouvant générer des dommages pour l'œil. Néanmoins, une des contraintes à leur utilisation est leur incapacité à former une solution stable. Cela nous a amené à développer différentes stratégies pour optimiser leurs propriétés de limitation optique.

- Conception d'un outil de ciblage de cellules tumorales

Enfin, l'un des champs d'applications récents des nanotubes sur lequel nous avons focalisé notre attention est la délivrance ciblée de médicaments. Aussi, la structure remarquable des nanotubes leur a permis d'être considérés comme vecteurs potentiels de molécules d'intérêt. Cependant, pour que ce système soit efficace, il est nécessaire que la vectorisation soit spécifique des tissus visés. Dans ce but, nous avons mis en œuvre une approche innovante visant à cibler des cellules tumorales grâce à l'utilisation d'aptamères.

Nous commencerons ce manuscrit (chapitre I) par une brève description des nanotubes de carbone ainsi qu'une liste non exhaustive des principales techniques de fonctionnalisation des nanotubes rapportées dans la littérature.

CHAPITRE I

Les nanotubes de carbone

I. Introduction

Les nanotubes de carbone sont parfois considérés comme le matériau du troisième millénaire. Ils connaissent un essor phénoménal et un intérêt toujours croissant de la part de la communauté scientifique. Cela se traduit par un nombre de publications et de brevets qui augmente de façon quasi exponentielle depuis leur découverte en 1991. Cet engouement s'explique notamment par les propriétés extraordinaires des nanotubes et les multiples applications potentielles qui leur sont attribuées.

Ce premier chapitre donne, de manière non exhaustive, une description générale des nanotubes de carbone. Nous détaillerons ainsi leurs structures, leurs méthodes de synthèse, leurs propriétés ainsi que les principales applications. Dans un second temps, nous présenterons les différentes méthodes de fonctionnalisation.

II. Les formes allotropiques du carbone

Le carbone est le sixième élément le plus abondant dans l'univers et le quinzième au niveau de l'abondance terrestre. Il se trouve dans la croûte terrestre à hauteur de 180 ppm sous forme de différents composés et dans l'atmosphère sous forme de CO_2 , CO et méthane. Il y a trois isotopes : ^{12}C (98,89%), ^{13}C (1,11%) et des traces de ^{14}C formés par bombardement de neutrons de ^{14}N présent dans la haute atmosphère. Trois formes allotropiques principales se distinguent pour le carbone élémentaire : le graphite, le diamant et le fullerène.

II.1. Du graphite au fullerène

Le graphite est un solide noir de structure hexagonale (forme cristalline stable) comme représenté sur la Figure I-1. Il est constitué de plans de graphène empilés suivant un mode ABAB avec une distance entre plans de 3,35 Å. Le graphite possède un point de sublimation élevé (3650°C) et est semi-conducteur. Tous les atomes de carbone sont hybridés sp^2 , autorisant ainsi une délocalisation des électrons π et la conduction électrique au sein d'un plan.

Le diamant, quant à lui, ne comporte que des atomes de carbone dans un état d'hybridation sp^3 , ce qui lui confère la dureté la plus élevée parmi les matériaux naturels. La structure cristalline la plus courante est le diamant cubique (Figure I-1). Enfin, il possède une très grande conductivité thermique, c'est un très bon isolant et il est transparent.

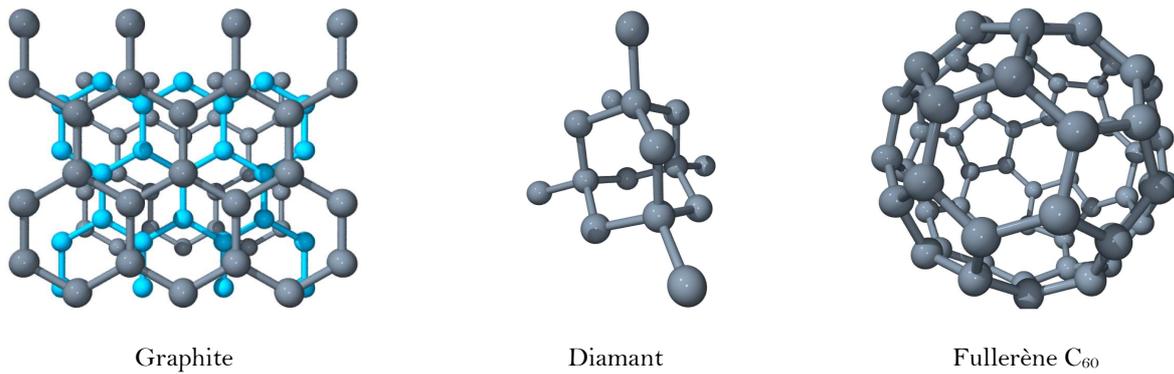


Figure I-1 : Structure des trois principales formes allotropiques du carbone : le graphite, le diamant et le fullerène

Le fullerène a été découvert en 1985 conjointement par Harold Kroto (Université de Sussex, Royaume-Uni), Robert Curl et Richard Smalley (Université de Rice, Etats-Unis) en vaporisant un disque de graphite par ablation laser.¹ Cette découverte leur valut le prix Nobel en 1996. Cette molécule, refermée sur elle-même comme une cage, a la forme d'un icosaèdre tronqué et est donc constituée de douze faces pentagonales, vingt faces hexagonales et soixante atomes de carbone. Elle fut nommée "bukminsterfullerène" ou fullerène par analogie aux dômes géodésiques inventés par l'architecte Richard Bukminster Fuller. D'autres formes de fullerènes ont été synthétisées et isolées depuis, parmi lesquelles le C₇₀,² le C₇₆,³ le C₈₄,³...

II.2. Du fullerène au nanotube de carbone

Les nanotubes de carbone furent découverts en 1991 par un microscopiste japonais de la société NEC Corporation, Sumio Iijima, dans des suies issues d'une synthèse de fullerènes par arc électrique.⁴ Il observa par microscopie électronique des structures tubulaires qui furent baptisées nanotubes de carbone multiparois (MWNT : "Multi-Walled Nanotubes"). Ces nanotubes sont constitués d'un empilement concentrique de feuilles de graphène repliées sur elles-mêmes de manière à former des cylindres (Figure I-2).

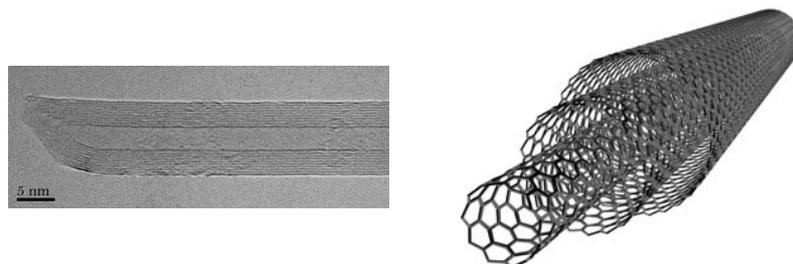


Figure I-2 : Cliché de microscopie haute résolution d'un MWNT et sa représentation schématique

En 1993, les nanotubes monoparois (SWNT : "Single-Walled Nanotubes") furent découverts indépendamment par Iijima et Bethune (IBM).^{5,6} Ils trouvèrent qu'en utilisant le même procédé de synthèse (arc électrique sous atmosphère inerte) mais en mélangeant le

graphite à un catalyseur métallique (Ni et Co), les nanotubes ne possédaient alors plus qu'une seule paroi.

II.3. Structure des nanotubes de carbone

Un nanotube de carbone peut donc être défini comme un feuillet de graphène enroulé et refermé sur lui-même, formant un cylindre creux constitué exclusivement d'atomes de carbone hybridés sp^2 . Dans une représentation idéale, celui-ci peut-être fermé à chaque extrémité par un demi-fullerène (Schéma I-1).

La longueur des nanotubes peut atteindre plusieurs microns alors que leur diamètre est typiquement compris entre 1 et 2 nanomètres pour les SWNTs et jusqu'à une centaine de nanomètres pour les MWNTs.

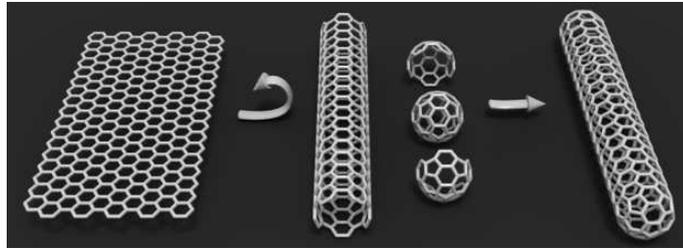


Schéma I-1 : Représentation simplifiée de la composition et de la structure d'un nanotube de carbone

Du point de vue macroscopique, les nanotubes MWNTs ont plutôt tendance à être isolés tandis que les SWNTs se présentent la plupart du temps sous forme de fagots ou "*bundles*" (Figure I-3).

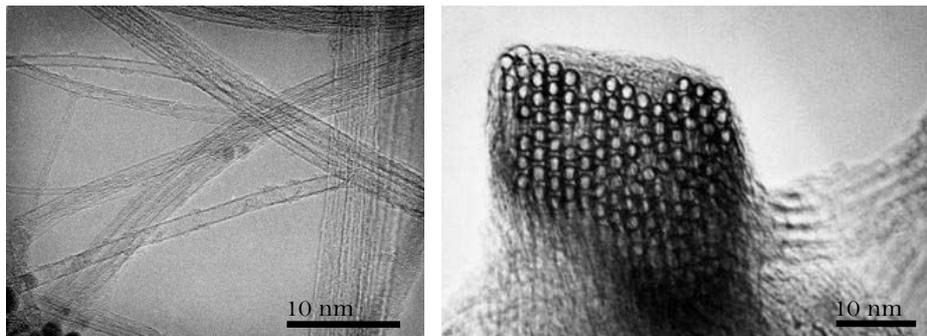


Figure I-3 : Clichés de microscopie de fagots de SWNTs : vue de dessus et en coupe transversale⁷

Si l'on accepte le postulat selon lequel un nanotube peut être représenté par une feuille de graphène roulée sur elle-même, alors la structure et certaines propriétés physiques des nanotubes vont dépendre de l'angle d'enroulement de celle-ci.

Cet angle se définit comme l'hélicité des nanotubes et permet selon sa valeur de classer toutes les configurations possibles en trois catégories. Ainsi, il est possible de former des nanotubes "*armchair*" (chaise) qui possèdent tous un caractère métallique, des nanotubes

zigzag et des nanotubes chiraux (Figure I-4). Parmi ces deux derniers types de tubes, un tiers se caractérise par des propriétés métalliques et deux tiers par des propriétés semi-conductrices.

L'hélicité peut être visualisée par microscopie en utilisant la technique de microscopie à force atomique (AFM). En effet, à haute résolution il est possible de discerner la surface des nanotubes (Figure I-4).

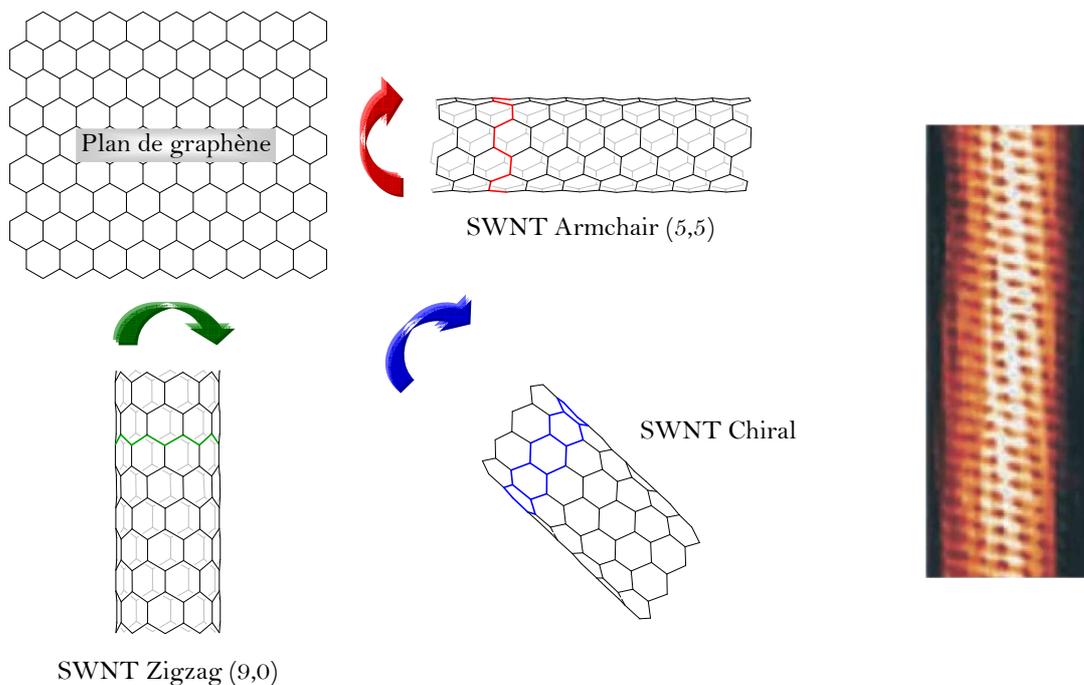


Figure I-4 : Principe de l'enroulement d'un plan de graphène menant à trois nanotubes de structures différentes et cliché de microscopie à force atomique (AFM) d'un nanotube chiral⁸

Lors de la synthèse de nanotubes, la probabilité d'obtenir une paire identique de nanotubes dans un échantillon donné sera très faible. Plusieurs raisons sont invoquées : les nanotubes sont de longueur et de diamètre variables. Il existe une large gamme d'hélicité possible et des défauts apparaissent aussi bien aux extrémités des nanotubes que sur leur parois (Figure I-5).

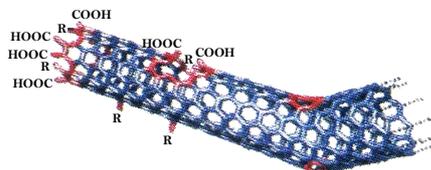


Figure I-5 : Défauts présents dans la structure des nanotubes⁹

Les défauts que l'on retrouve le plus souvent sont dus à la présence :

- de cycles à 5 ou 7 carbones sur le squelette induisant une courbure du nanotube et plus grande fragilité des liaisons carbone-carbone,

- d'atomes de carbone hybridés sp^3 portant un hydrogène ou une fonction alcool,
- de trous dans le squelette, présentant des fonctions acides carboxyliques, dus aux conditions oxydantes lors de purification,
- d'extrémités non fermées et porteuses principalement de fonctions acides carboxyliques. En effet, les extrémités sont généralement terminées par des particules de catalyseur qu'il est souvent nécessaire d'enlever par un traitement oxydant.

III. Méthodes de synthèse et de purification des nanotubes

Les nanostructures de carbone telles que les nanotubes mono- et multiparois ou les fullerènes peuvent être produites par de nombreuses méthodes.¹⁰ Beaucoup d'entre elles sont basées sur la sublimation de carbone sous atmosphère inerte telle que la synthèse par arc électrique, par voie solaire¹¹ ou par ablation laser. Les méthodes chimiques sont aujourd'hui en pleine expansion et notamment la décomposition catalytique de précurseurs carbonés.

Cette variété de méthodes semble aboutir à des systèmes très ressemblants, mais une inspection détaillée de leurs caractéristiques montre de subtiles différences. Leur origine n'est cependant pas très bien connue. Elles se retrouvent au niveau de la nature et la quantité des impuretés, de la distribution des longueurs et des diamètres des nanotubes, de la cristallinité des parois, etc.

Nous ne présenterons que les trois méthodes usuellement utilisées pour la synthèse des nanotubes, à savoir : la technique de l'arc électrique, de l'ablation laser et de la décomposition catalytique.

III.1. Synthèse par arc électrique

Cette technique est celle qui a permis de synthétiser les fullerènes en grosse quantité et de produire les premiers nanotubes MWNTs découverts par Iijima.²

Elle est basée sur la sublimation du graphite par un arc électrique, amorcé entre deux électrodes en graphite (Figure I-6). Un plasma chaud (environ 6000 K) est formé et maintenu entre ces deux électrodes, l'anode étant progressivement sublimée. Les espèces carbonées sublimées dans le plasma vont se recombinaer à l'extérieur, et les produits formés se déposent sur les parois du réacteur. Les conditions de température à l'intérieur de l'enceinte sont très importantes pour la qualité et la quantité des nanotubes formés.

Pour obtenir des SWNTs il faut que l'anode soit dopée avec un catalyseur métallique (Fe, Co, Ni, Y ou Mo).^{5,6,12}

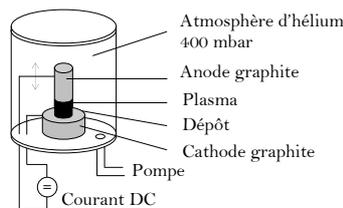


Figure I-6 : Schéma simplifié d'un réacteur de synthèse de nanotubes par arc électrique

Les nanotubes MWNTs que nous avons utilisés au cours de ce travail ont été synthétisés suivant cette méthode et proviennent de la société n-Tec (Norvège). Ils possèdent un diamètre moyen de 25 nm.

III.2. Synthèse par ablation laser

Une seconde technique performante pour la synthèse de nanotubes monoparois est l'ablation laser. Rappelons qu'elle fut historiquement la première méthode pour générer des fullerènes en phase gazeuse. La sublimation du carbone est provoquée par un laser pulsé et focalisé à la surface d'un disque de graphite sous un flux de gaz inerte.¹³ La cible de graphite est placée au centre d'un four permettant de contrôler la température autour de 1200°C. Les vapeurs de carbone sublimé sont entraînées jusqu'à un collecteur où elles se condensent (Figure I-7).

Bien qu'elle soit plus onéreuse, cette technique permet d'obtenir des nanotubes de meilleure qualité avec un meilleur rendement que par la synthèse par arc électrique.

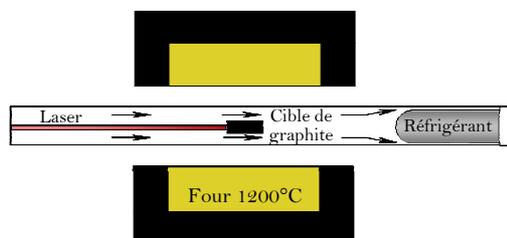


Figure I-7 : Schéma de principe de la méthode de synthèse par ablation laser

III.3. Synthèse par décomposition catalytique

Cette voie de synthèse fonctionne à température modérée et résulte d'une adaptation des méthodes catalytiques ou pyrolytiques traditionnellement utilisées pour la synthèse des fibres de carbone. Le principe consiste à décomposer un gaz carboné (monoxyde de carbone pour le procédé HiPCO (*High Pressure dismutation of Carbon Oxyde*), acétylène, méthane...) à la surface d'un catalyseur métallique (ferrocène pour le procédé HiPCO, cf Figure I-8, nickel ou cobalt) dans un four porté à une température comprise entre 500°C et 1200°C selon la nature du gaz.¹⁴ Le carbone libéré par la décomposition du gaz précipite à la surface des

particules de catalyseur. Cette condensation aboutit à la croissance de structures tubulaires graphitisées.

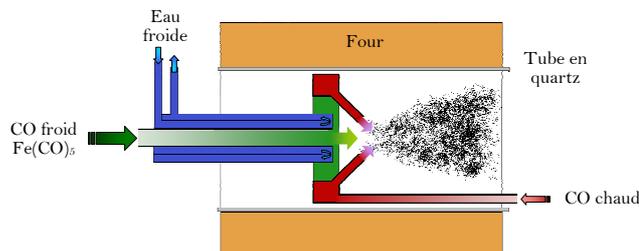


Figure I-8 : Coupe schématique d'un réacteur utilisant le procédé HiPCO

Les nanotubes obtenus par cette méthode présentent souvent une qualité de graphitisation nettement moins bonne qu'avec les voies à haute température. En revanche, les caractéristiques géométriques (longueur, diamètre) sont beaucoup plus uniformes. Il est de plus possible d'orienter la croissance des nanotubes en les synthétisant sur des plots de catalyseurs disposés sur un support selon une géométrie prédéfinie.

Les nanotubes monofeuillet que nous avons utilisés ont été synthétisés par la méthode HiPCO et proviennent de la société *Carbon Nanotechnologies Incorporated* (Houston, Texas). Ils présentent un diamètre compris entre 0,7 et 1,4 nm.

III.4. Méthodes de purification

La synthèse de nanotubes produit souvent une importante quantité d'impuretés composées principalement de carbone amorphe, de fullerènes, de particules de catalyseur et de nanoparticules carbonées. Les nanotubes étant insolubles dans la plupart des solvants organiques, il est donc difficile d'envisager les techniques classiques de chimie pour les purifier. Cependant plusieurs procédés ont été développés pour obtenir des échantillons purifiés de nanotubes. Ils combinent généralement une succession de processus chimiques et physiques. Nous détaillerons les principales techniques utilisées.

Une des premières méthodes rapportée repose sur l'oxydation des nanotubes par voie gazeuse en chauffant les nanotubes en présence d'oxygène ou de dioxyde de carbone.¹⁵⁻¹⁸ Elle permet d'oxyder aussi bien le carbone amorphe que les particules métalliques qui s'oxydent plus vite que les nanotubes et de les éliminer par filtration,¹⁹⁻²¹ centrifugation et/ou sonication.²² L'étape d'oxydation peut aussi être effectuée en solution en présence d'un mélange d'acides (nitrique, sulfurique, chlorhydrique).^{23,24}

Chimiquement, un autre moyen de les purifier est de les rendre solubles en les fonctionnalisant de manière covalente.²⁵ Une fois mis en solution en milieu organique, les impuretés précipitent et les nanotubes peuvent être purifiés. Ensuite, les groupes

fonctionnels greffés sont éliminés par un traitement thermique et des nanotubes natifs et purs sont récupérés.

Il est également possible de les rendre solubles en présence d'un surfactant ou d'un polymère. Par cette méthode, il a été montré que les nanotubes peuvent être ensuite purifiés par chromatographie.²⁶ Les méthodes chromatographiques développées dans ce but sont nombreuses et ont permis, en outre, de purifier les nanotubes selon leur taille.²⁷ Nous pouvons citer la chromatographie sur silice,²⁸ sur gel,²⁹ d'exclusion stérique^{26,30-32} et l'électrophorèse capillaire.²⁷

Enfin, une dernière méthode revient à purifier les nanotubes en détruisant sélectivement les particules métalliques par des irradiations microondes.^{33,34}

IV. Propriétés et applications

Les propriétés des nanotubes proviennent principalement de leur analogie structurale avec le graphite.³⁵ Le caractère planaire et dirigé des liaisons chimiques fait du graphite un solide très stable chimiquement et très anisotrope. L'essentiel des propriétés du graphite est contenu dans le plan hexagonal et ce dernier sert précisément de squelette au nanotube. Les nombreuses propriétés des nanotubes en font un matériau exceptionnel trouvant des applications très diverses.³⁶

IV.1. Propriétés mécaniques

La force des liaisons carbone-carbone confère aux nanotubes des propriétés mécaniques exceptionnelles. En effet, des mesures effectuées par microscopie à force atomique ont permis de déterminer un module d'Young (mesure de la résistance à la déformation) de 1,3 TPa pour des MWNTs³⁷ et de 1 TPa pour des SWNTs.³⁸ Pour comparaison, l'acier possède une résistance d'environ 0,2 TPa. Aussi, grâce à la grande flexibilité du feuillet de graphène, les nanotubes peuvent être déformés ou comprimés et retrouver leur forme d'origine sans dommage apparent.³⁹ De plus, les nanotubes ont une densité très faible ($1,4 \text{ g.cm}^{-3}$).

Une des premières applications des nanotubes de carbone au vu de ses propriétés mécaniques est de les utiliser comme fibre de renfort pour les matériaux composites. Des sociétés comme Arkema ou Nanoleedge les utilisent déjà dans des matrices polymères et ainsi renforcer les propriétés mécaniques des résines finales. L'équipe de Poulin a d'ailleurs montré qu'il était possible de former des fibres contenant des nanotubes alignés dans une matrice d'alcool polyvinylique (de poly-(alcool vinylique)) donnant ainsi accès à des rubans de nanotubes macroscopiques possédant un très grande résistance à la déformation.⁴⁰⁻⁴²

Une seconde application concerne la possibilité pour les nanotubes de transformer leur énergie mécanique en énergie électrique et *vice versa*. Ils peuvent être ainsi assimilés à des actionneurs et servir à la réalisation de muscles artificiels.^{43,44} En effet, par injonction de charge, les nanotubes peuvent se déformer 40 fois plus qu'un muscle et le carbone est beaucoup mieux accepté par l'organisme que n'importe quel métal.

Enfin, la grande élasticité et la forme effilée des nanotubes en ont fait de bonnes pointes pour la microscopie à champ proche (AFM (Figure I-9) et STM, *Scanning Tunneling Microscopy*).⁴⁵⁻⁴⁸ Ces caractéristiques permettent principalement d'accroître la résolution des appareils ainsi que le durée de vie des pointes.

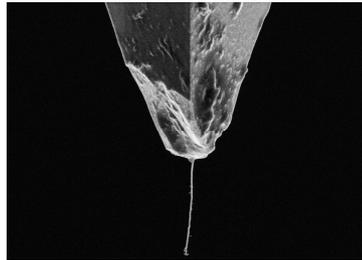


Figure I-9 : Pointe d'AFM terminée par un nanotube de carbone⁴⁹

IV.2. Propriétés électriques

Le graphite est un semi-conducteur. Cependant, ses capacités de transport électrique sont très sensibles aux perturbations géométriques ou chimiques telles que les distorsions ou le dopage. Pour le nanotube, la perturbation électronique vient de l'effet de courbure. Il en résulte que, selon son hélicité, un nanotube peut être conducteur ou semi-conducteur.⁵⁰

A titre de comparaison, le silicium a une conductivité 70 fois inférieure à celle d'un nanotube. En théorie, les nanotubes qui conduisent l'électricité peuvent avoir une densité de courant électrique 1000 fois plus forte que celles de métaux tels que l'argent ou le cuivre sans qu'il n'y ait d'échauffement.^{51,52} Aussi, à basse température, les nanotubes présentent des propriétés de supraconductivité.^{53,54}

Grâce à leurs propriétés électroniques, ils furent, dans un premier temps, utilisés dans des composants électroniques, la recherche de la miniaturisation étant dans ce domaine un souci primordial. Ainsi les nanotubes monofeuillet paraissent de bons candidats en tant que conducteurs unidimensionnels intégrés à de futurs composants électroniques de taille nanométrique. Il a été montré qu'il était possible de construire des transistors à effet de champ⁵⁵ (Figure I-10) ou encore d'effectuer une jonction entre un nanotube métallique et un semi-conducteur pour l'élaboration de diodes.⁵⁶

Les nanotubes utilisés comme émetteurs d'électrons semblent être les candidats idéaux pour la nouvelle génération d'écrans plats à effet de champ.⁵⁷ En effet les nanotubes

peuvent avoir des qualités émissives exceptionnelles (jusqu'à 1 A.cm^{-2}) sous un faible champ électrique.⁵⁸ L'image de la Figure I-10 représente un prototype d'écran plat à base de nanotubes développé par la société Motorola.

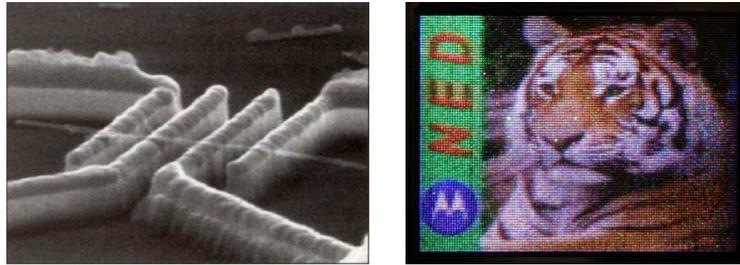


Figure I-10 : Nanotube de carbone disposé sur des électrodes et écran plat (*Nanotube Emission Display*, Motorola)

Nous avons évoqué que les capacités de transport électrique des nanotubes étaient très sensibles à leur environnement. En effet, il a été montré que la résistance électrique des nanotubes de carbone variait fortement après exposition à des gaz⁵⁹⁻⁶² ou des biomolécules.⁶³⁻⁶⁵ Cette particularité est de plus en plus exploitée pour la réalisation de senseurs chimique et biologique.

IV.3. Propriétés thermiques

Le diamant et le graphite sont les matériaux présentant les plus hautes conductivités thermiques mesurées à température ambiante ($\sim 2500 \text{ W.m}^{-1}\text{.K}^{-1}$ pour le diamant). Les nanotubes possèdent également cette caractéristique.⁶⁶ En effet, les premières mesures aboutirent à des valeurs pouvant atteindre $6000 \text{ W.m}^{-1}\text{.K}^{-1}$ pour un fagot isolé et à température ambiante.⁶⁷ Des valeurs aussi élevées sont imputées à un libre parcours moyen, au sein du nanotube, particulièrement élevé pour les phonons (de l'ordre de 100 nm). Cependant cette propriété est relativement peu explorée et exploitée. Sachant que les matériaux carbonés et les fibres de graphite sont utilisés industriellement pour améliorer la conductivité thermique de certains composites, les nanotubes pourraient les remplacer et faire, en outre, bénéficier les matériaux obtenus de leurs propriétés mécaniques.

IV.4. Propriétés optiques

Les propriétés optiques des nanotubes de carbone sont moins mises en avant que leurs propriétés électroniques ou mécaniques, mais se révèlent tout aussi intéressantes. Il est possible, à partir d'un spectre d'absorption, de remonter, *via* l'existence de singularités de van Hove, au type de nanotube visualisé ainsi qu'au diamètre en utilisant le diagramme de Kataura.⁶⁸⁻⁷⁰ Les nanotubes présentent également des propriétés de fluorescence, lorsqu'ils sont isolés, qui ont été mise en évidence par O'Connel en 2002.⁷¹

Les nanotubes ont montré des propriétés en limitation optique dans une large gamme de longueur d'onde sans gêner la vision.⁷² Ils peuvent donc être utilisés pour la protection de la vue ou dans des systèmes d'observation permettant de lutter contre des agressions laser. Ces propriétés seront plus amplement détaillées dans le chapitre V qui concerne l'optimisation de systèmes à base de nanotubes.

IV.5. Propriétés d'adsorption de gaz

Les études d'adsorption de gaz sur les nanotubes ont concerné essentiellement H₂. En effet, l'intérêt croissant porté aux piles à combustibles pose le problème en amont du stockage de l'hydrogène. L'utilisation potentielle de nanotubes pour stocker H₂ a fait l'objet de nombreuses études à partir du moment où des capacités d'adsorption étonnamment élevées ont été publiées.^{73,74} Smalley et *coll.* mirent en évidence, à 80 K et 100 bars, une capacité massique de stockage de 8% en H₂.⁷⁵ Cependant, l'annonce de résultats non reproductibles a plongé peu à peu les équipes dans le scepticisme quant à la possibilité d'atteindre des capacités de stockage économiquement rentables.⁷⁶

IV.6. Propriétés de capillarité

De 1992 à 2007, plus d'une centaine d'articles ont été publiés sur le thème du remplissage des nanotubes de carbone par des éléments solides pour constituer des nanofils encapsulés. La liste des compositions des nanofils synthétisés est longue : éléments purs, oxydes, carbures, sulfures, chlorures, nitrures, alliages.^{15,77-83} Le concept de base pour le remplissage est l'écoulement d'une phase liquide par capillarité à une température donnée, suivi d'une solidification lors du refroidissement. Ce concept est mis en oeuvre dans deux types d'approches différentes : celle où un liquide est inséré dans un nanotube existant, et celle où le nanotube et son contenu croissent simultanément.

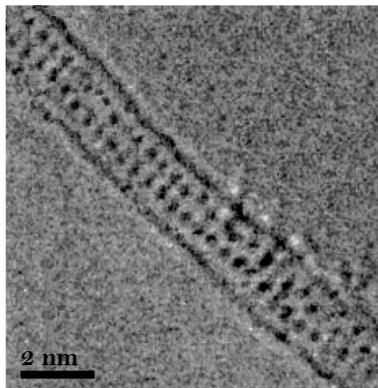


Figure I-11 : Image MET (microscopie électronique à transmission) d'un cristal de KI au sein d'un SWNT⁸¹

Les nanofils sont peu utilisés mais pourraient trouver des applications dans l'électronique moléculaire pour remplacer notamment les fils de cuivre.

IV.7. Propriétés de vectorisation

Les nanotubes de carbone sont de plus en plus envisagés comme agents de vectorisation pour transporter des molécules biologiquement actives.⁸⁴⁻⁸⁶

Ils ont montré qu'ils avaient la capacité, une fois fonctionnalisés, de pouvoir rentrer dans les cellules tout en les préservant.⁸⁷ Ainsi les nanotubes ont été utilisés aussi bien pour la vectorisation de gènes,⁸⁸ de xénobiotiques,⁸⁹⁻⁹¹ ou de protéines.⁹²

Cependant, bien que les nanotubes fonctionnalisés semblent peu toxiques, l'étude de leur toxicité à l'état natif reste un sujet d'actualité.⁹³⁻⁹⁵

Les nanotubes de carbone semblent être de très bons candidats pour de nombreuses applications. Néanmoins, l'insolubilité des nanotubes dans la plupart des solvants organiques et en phase aqueuse provoque une limitation importante quant à leur utilisation. Il a été montré que la fonctionnalisation des nanotubes permettait une meilleure manipulation de ces derniers.

V. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone

La fonctionnalisation permet d'améliorer considérablement la solubilité et la réactivité chimique des nanotubes et donne la possibilité de fournir des sites d'ancrage de molécules chimiques ou biologiques.

Parmi les méthodes de fonctionnalisation, trois catégories se distinguent :

- Le greffage covalent de molécules pouvant réagir sur le squelette conjugué du nanotube ou sur au niveau de ses défauts,
- L'adsorption non covalente de molécules polyaromatiques, polymères, protéines ou lipides *via* des interactions hydrophobes, de van der Waals ou de type π -stacking.
- La fonctionnalisation endohédrale de la cavité intérieure du nanotube.

V.1. Fonctionnalisation covalente

V.1.1. Chimie des défauts de surface des nanotubes de carbone

La plupart des procédés de synthèse de nanotubes de carbone génère des impuretés qui sont principalement enlevées par traitement oxydant. Ceci induit majoritairement la présence de fonctions acide carboxylique aux extrémités des nanotubes ainsi que sur la surface au niveau des défauts.⁹⁶

L'équipe de Chen a montré qu'il était possible d'utiliser ces fonctions pour fonctionnaliser les nanotubes avec des groupements amines ou alcools.⁹⁷ Dans un premier temps, les acides carboxyliques sont activés avec du chlorure de thionyle ou avec un agent activant carbodiimide. Puis le couplage avec des groupements alcools ou amines conduit respectivement à la formation d'esters ou d'amides. Selon la nature et la longueur de la chaîne accrochée, les nanotubes voient leur solubilité accrue soit dans les solvants organiques soit en milieu aqueux.

Les acides carboxyliques de surface ont ainsi été largement utilisés pour dériver les nanotubes avec des porphyrines,⁹⁸ des dendrimères,⁹⁹ des motifs polyaromatique,¹⁰⁰⁻¹⁰² des éthers couronnes¹⁰³ ou encore de la taurine¹⁰⁴ ou du glucose.¹⁰⁵

V.1.2. Greffage covalent sur la surface des nanotubes de carbone

V.1.2.a. Halogénéation

Les premiers travaux reportés sur la fonctionnalisation covalente par halogénéation des nanotubes de carbone reposent sur le traitement des nanotubes en présence de fluor élémentaire à des températures comprises entre 150 et 400°C (Schéma I-2, voie **a**).¹⁰⁶ Il a été observé que les nanotubes ainsi fonctionnalisés étaient relativement solubles dans différents alcools¹⁰⁷ et qu'ils devenaient isolants. En effet, le taux de greffage atteint peut être élevé (1 atome de carbone sur 2 fonctionnalisés) et ainsi détruire la structure graphitique du nanotube. Les nanotubes natifs peuvent être régénérés en présence d'hydrazine (voie **b**).

Les nanotubes fluorés ont été utilisés pour greffer différents groupes fonctionnels.¹⁰⁸ Les atomes de fluor peuvent être substitués par des nucléophiles tels que des réactifs de Grignard (voie **c**),¹⁰⁹ des organolithiens (voie **c**),¹¹⁰ des alcoolates (voie **d**)¹¹¹ ou des diamines (voie **e**).¹¹²

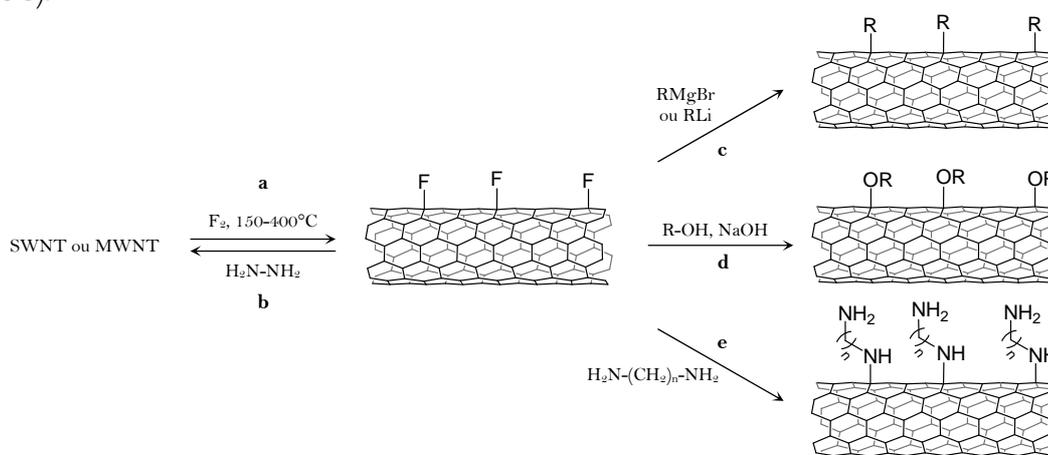


Schéma I-2 : Réaction de fluoration des nanotubes (**a**) suivie de diverses possibilités de dérivatisation (**c**, **d**, **e**)

V.1.2.b. Réactions de cycloaddition

Les réactions de cycloaddition sont couramment utilisées pour fonctionnaliser les nanotubes. Les cycloadditions $[2+1]$ de carbène (Schéma I-3, voie **a**) sur les nanotubes ont été décrites par l'équipe de Haddon en 1998.⁹⁷ Dans ce cas, l'espèce dichlorocarbène est générée *in situ* à partir d'un réactif mercurique.^{113,114} Le diéthylbromomalonate a également été utilisé comme précurseur de carbène *via* la réaction de Bingel (Schéma I-3, voie **b**).¹¹⁵ Enfin, l'addition de motifs aziridines peut aussi être effectuée *via* la formation de nitrènes *in situ* par extrusion thermique de N_2 de composés azidocarbonates (Schéma I-3, voie **c**).^{9,116-118}

Un second exemple de cycloaddition est la cycloaddition 1,3-dipolaire. Deux espèces ont été décrites pour cette réaction : les ylures d'azométhine (voie **d**)^{119,120} et les nitriles imines (voie **e**).¹²¹ Dans le premier cas, l'espèce réactive est formée *in situ* à 130°C par décarboxylation de sels d'iminium issus de la condensation d'aldéhyde et de glycine *N*-substituée. Les groupements R et R' sont habituellement utilisés pour conférer une plus grande solubilité aux nanotubes et pour permettre l'accroche de molécules d'intérêt.^{84,122}

Enfin, il est possible d'effectuer des réactions de Diels-Alder sur la surface des nanotubes. Cependant, cette réaction nécessite des conditions particulières de réaction : une fonctionnalisation préalable des nanotubes avec du fluor pour les rendre plus électrophiles,¹²³ l'utilisation de microondes¹²⁴ ou encore l'activation des nanotubes par un complexe de chrome et sous haute pression (voie **f**).¹²⁵

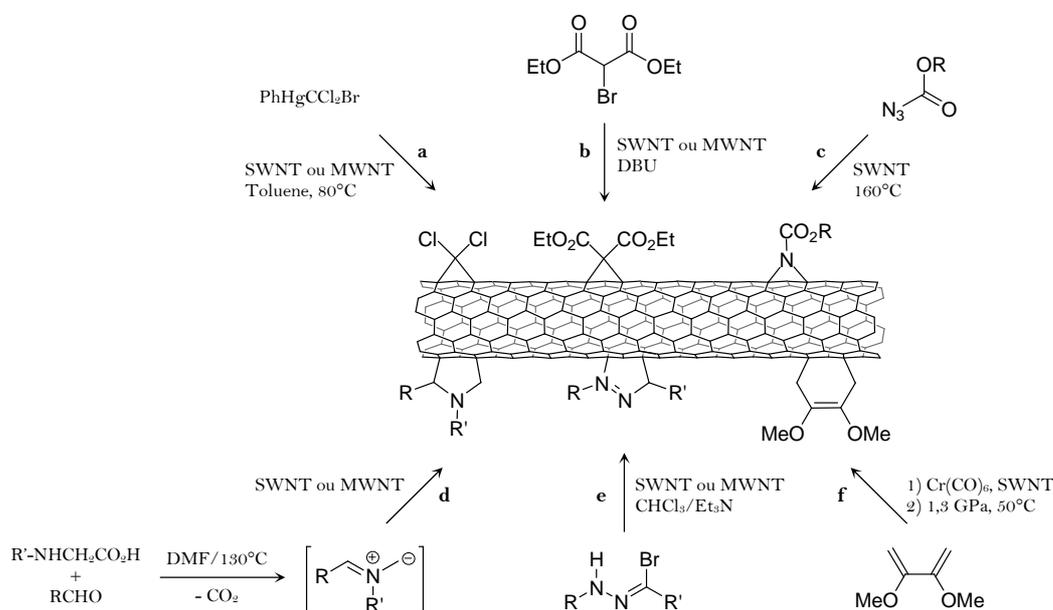


Schéma I-3 : Réactions de cycloaddition de type $[2+1]$ (**a**, **b** et **c**), 1,3 dipolaire (**d**, **e**) et Diels-Alder (**f**)

V.1.2.c. Réactions radicalaires

La fonctionnalisation des nanotubes de carbone par l'utilisation de sels d'aryldiazonium est une méthode efficace et très employée. Elle a été développée par l'équipe de Tour en 2001 avec la réduction électrochimique d'aryldiazonium.¹²⁶ Des radicaux aryles sont formés par élimination de N_2 et s'additionnent sur la surface des nanotubes (Schéma I-4, voie **d**). Par la suite, les mêmes auteurs ont montré que cette réaction était réalisable dans des conditions très différentes. Le sel de diazonium peut, par exemple, être généré *in situ* en présence de nitrite d'isoamyle en milieux organique (Schéma I-4, voie **a**).^{127,128} Récemment, Tour et *coll.* ont montré que cette réaction pouvait également être réalisée dans l'eau (voie **b**).¹²⁹ En évoluant directement à partir du sel de diazonium, des conditions plus douces sont suffisantes d'autant plus si les nanotubes sont préalablement individualisés par une solution aqueuse de SDS¹³⁰ (voie **c**) ou dans un liquide ionique (voie **e**).¹³¹

Récemment, l'équipe de Tour a montré que ce type de fonctionnalisation pouvait être utilisé pour bi-fonctionnaliser des nanotubes de carbone : par deux réactions successives avec deux différents sels de diazonium ou par combinaison d'un traitement oxydant des nanotubes suivi de la réaction d'un sel de diazonium.¹³²

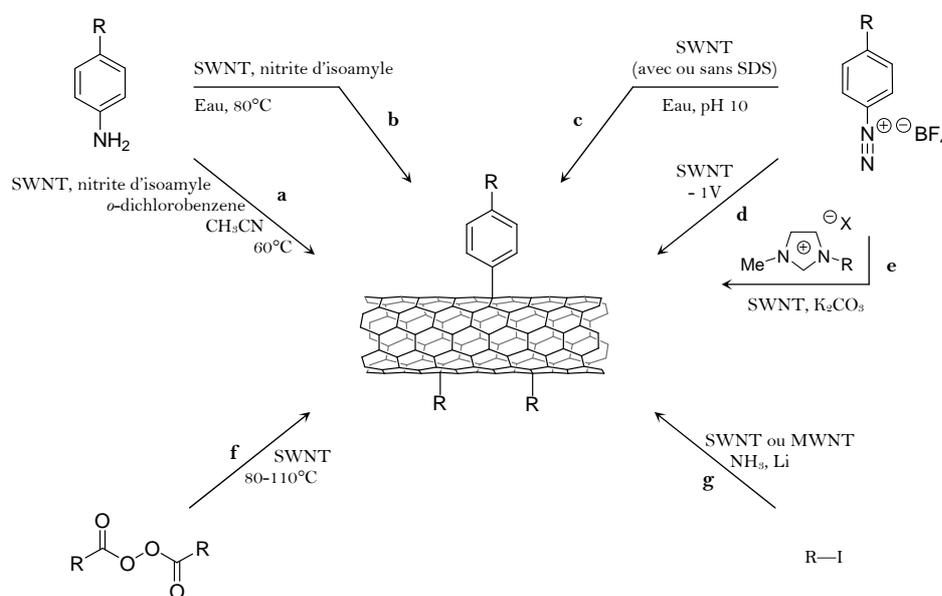


Schéma I-4 : Réaction par voie radicalaire avec les sels de diazonium (**a-e**), les peroxydes (**f**) et les halogénures d'alkyle ou d'aryle (**g**)

Les nanotubes peuvent également être modifiés par décomposition thermique de peroxydes (voie **f**).^{133,134} Le même type de fonctionnalisation peut être obtenu par réduction des nanotubes en présence de lithium dans l'ammoniaque (liquide) (voie **g**)^{135,136} ou dans un solvant aprotique polaire¹³⁷ suivi de l'addition d'un halogénure d'alkyle ou d'aryle.

La fonctionnalisation covalente des nanotubes est un moyen sûr d'ancrer des molécules d'intérêt à la surface des nanotubes. Cependant, ces méthodes présentent souvent l'inconvénient de s'opérer dans des conditions drastiques. Cela engendre une détérioration du réseau graphitique des nanotubes et par conséquent de leurs propriétés. Une alternative à cette méthode est la fonctionnalisation non covalente qui sera détaillée dans la section suivante.

V.2. Fonctionnalisation non covalente

Un procédé simple à mettre en œuvre pour individualiser les nanotubes est de les fonctionnaliser de manière non covalente. Cette méthode est particulièrement attractive puisqu'elle permet de fonctionnaliser les nanotubes sans introduire de défaut à leur surface.

V.2.1. Adsorption de motifs polyaromatiques

La fixation de motifs polyaromatiques à la surface des nanotubes est une méthode largement décrite pour ancrer des molécules d'intérêt à la surface des nanotubes. Les dérivés aromatiques restent accrochés de manière très forte à leur surface des nanotubes par des interactions de π -stacking.

Tomonari et *coll.* ont cependant montré qu'il y avait une taille minimale pour que la fixation soit quasiment irréversible.¹³⁸ En effet, un bicyclic de type naphthalène va interagir moins fortement qu'un dérivé pyrène. Ils ont également montré que si ces dérivés étaient substitués par des groupements ammonium alors cela permettait d'améliorer la solubilité des nanotubes en solution aqueuse.

L'utilisation de ces entités polyaromatiques, et principalement du pyrène, a été décrite aussi bien pour le greffage de nanoparticules d'or¹³⁹ à la surface des nanotubes que d'enzymes¹⁴⁰ ou de porphyrines.¹⁴¹

V.2.2. Enroulement de polymères et de surfactants

Comme nous l'avons évoqué, les nanotubes sont considérés comme le matériau idéal pour le renforcement de fibres composites et ont donc de nombreuses applications potentielles.¹⁴² Il a été remarqué que les polymères ainsi que les surfactants ont tendance à s'enrouler autour des nanotubes et à interagir avec la surface des nanotubes par des interactions de van der Waals.

Tang et *coll.* furent les premiers à mélanger un polymère, le poly(phénylacétylène) avec des nanotubes.¹⁴³ Dans ce cas, le composite a été préparé par la polymérisation *in situ* du phénylacétylène conduisant à un enroulement hélicoïdal et à la solubilité des nanotubes dans les solvants organiques. De nombreux autres polymères ayant aussi bien des propriétés

intrinsèques de conductivité,¹⁴⁴ de luminescence¹⁴⁵ ou mécanique^{41,42,146,147} ont été mis en mélange avec des nanotubes.

Les nanotubes peuvent aussi être rendu solubles en présence de surfactant.⁷¹ Celui-ci agit en quelque sorte par encapsulation des nanotubes et induit donc leur solubilité en milieu aqueux.^{148,149} Il a également été montré au laboratoire que certains surfactants s'organisaient en formes d'anneaux autour des tubes.¹⁵⁰ Ce type d'organisation sera détaillé dans le deuxième chapitre dans le cadre de nos travaux sur la déposition de nanoparticules à la surface des nanotubes de carbone.

V.2.3. Interactions avec des biomolécules

La grande surface spécifique des nanotubes est idéale pour immobiliser des protéines ou de l'ADN *via* des interactions hydrophobes ou de π -*stacking*.

Il a été montré que l'ADN simple brin s'organisait à la surface des nanotubes et permettait leur individualisation et leur dispersion dans l'eau.¹⁵¹ La même équipe a rapporté qu'en utilisant une séquence d'ADN spécifique, il était possible de séparer les nanotubes selon leur diamètre et propriétés électroniques.¹⁵² Récemment, l'utilisation du complexe SWNT-ADN a été utilisé pour la réduction d'ion Ag^+ par irradiation lumineuse¹⁵³ ainsi que pour l'organisation de nanoparticules d'or à la surface des nanotubes.¹⁵⁴

L'adsorption de protéine à la surface des nanotubes a aussi été largement décrite. Nous détaillerons plus amplement cette partie dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

V.3. Fonctionnalisation endohédrale

Les nanotubes de carbone possèdent une cavité interne creuse qu'il est possible de remplir. L'incorporation d'objets peut être effectué soit pendant la croissance des nanotubes soit par capillarité après leur synthèse. De cette manière, des fullerènes ont pu être encapsulés dans les nanotubes.¹⁵⁵ Cette nouvelle classe de nanostructures a été dénommée *peapods* (cosse de poids). Egalement, comme nous l'avons évoqué pour la formation de nanofils, (Figure I-11) plusieurs composés inorganiques ont été introduits dans les nanotubes.⁸¹

De la même manière, de petites protéines comme la lactamase peuvent être internalisées dans le nanotube.¹⁵⁶ Il a d'ailleurs été montré que cette dernière restait active vis-à-vis de l'hydrolyse de la pénicilline.

VI. Conclusion

Les nanotubes de carbone sont au centre d'études de plus en plus nombreuses dans des domaines de plus en plus variés. Cependant, les nanotubes ne sont jamais utilisés directement après leur synthèse, leur manipulation étant alors très difficile. Aussi, la fonctionnalisation des nanotubes de carbone est un passage obligatoire pour pouvoir exploiter pleinement leurs propriétés et ainsi élaborer de nouveaux matériaux hybrides. Bien que le nombre de méthodes de fonctionnalisation covalente soit restreint, en particulier par comparaison avec la chimie des fullerènes, il existe aujourd'hui plusieurs procédés efficaces. Ce type de fonctionnalisation est enrichi par la possibilité d'effectuer des assemblages supramoléculaires à la surface des nanotubes.

L'objectif de ce travail de thèse est la conception de nanoobjets pour des applications biologiques et physiques qui repose sur la fonctionnalisation covalente et non covalente des nanotubes de carbone. Nous montrerons que le greffage de molécules d'intérêt sur la surface des nanotubes permet d'améliorer et de diversifier leurs propriétés intrinsèques.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des nanotubes comme support catalytique pour la construction de piles à combustibles. Par la suite, nous détaillerons les différentes études que nous avons conduit : l'élaboration d'un biosenseur, la synthèse d'un agent clivant de l'ADN, l'optimisation des nanotubes pour la limitation optique et enfin l'utilisation des nanotubes pour le ciblage de cellules tumorales.

VII. Bibliographie

- ¹ Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* **1985**, *318*, 162.
- ² Kratschmer, W.; Lamb, L. D.; Fostiropoulos, K.; Huffman, D. R. *Nature* **1990**, *347*, 354.
- ³ Diederich, F.; Ettl, R.; Rubin, Y.; Whetten, R. L.; Beck, R.; Alvarez, M.; Anz, S.; Sensharma, D.; Wudl, F.; Khemani, K. C.; Koch, A. *Science* **1991**, *252*, 548.
- ⁴ Iijima, S. *Nature* **1991**, *354*, 56.
- ⁵ Bethune, D. S.; Klang, C. H.; de Vries, M. S.; Gorman, G.; Savoy, R.; Vazquez, J.; Beyers, R. *Nature* **1993**, *363*, 605.
- ⁶ Iijima, S.; Ichihashi, T. *Nature* **1993**, *363*, 603.
- ⁷ Thess, A.; Lee, R.; Nikolaev, P.; Dai, H.; Petit, P.; Robert, J.; Xu, C.; Lee, Y. H.; Kim, S. G.; Rinzler, A. G.; Colbert, D. T.; Scuseria, G. E.; Tománek, D.; Fischer, J. E.; Smalley, R. E. *Science* **1996**, *273*, 483.
- ⁸ Wilder, J. W. G.; Venema, L. C.; Rinzler, A. G.; Smalley, R. E.; Dekker, C. *Nature* **1998**, *391*, 59.
- ⁹ Hirsch, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 1853.
- ¹⁰ Journet, C.; Bernier, P. *Appl. Phys. A* **1998**, *67*, 1.
- ¹¹ Laplaze, D.; Bernier, P.; Mazer, W. K.; Flamand, G.; Guillard, T.; Loiseau, A. *Carbon* **1998**, *36*, 685.
- ¹² Journet, C.; Maser, W. K.; Bernier, P.; Loiseau, A.; Lamy de la Chapelle, M.; Lefrant, S.; Deniard, P.; Lee, R.; Fischer, J. E. *Nature* **1997**, *388*, 756.
- ¹³ Guo, T.; Nikolaev, P.; Thess, A.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, *243*, 49.
- ¹⁴ Jose-Yacamán, M.; Miki-Yoshida, M.; Rendon, L.; Santiesteban, J. G. *Appl. Phys. Lett.* **1993**, *62*, 202.
- ¹⁵ Ajayan, P. M.; Ebbesen, T. W.; Ichihashi, T.; Iijima, S.; Tanigaki, K.; Hiura, H. *Nature* **1993**, *362*, 522.
- ¹⁶ Zimmerman, J. L.; Bradley, R. K.; Huffman, C. B.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L. *Chem. Mater.* **2000**, *12*, 1361.
- ¹⁷ Chiang, I. W.; Brinson, B. E.; Smalley, R. E.; Margrave, J. L.; Hauge, R. H. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 1157.
- ¹⁸ Tobias, G.; Shao, L.; Salzmann, C. G.; Huh, Y.; Green, M. L. H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 22318.
- ¹⁹ Kim, Y.; Luzzi, D. E. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16636.
- ²⁰ Bandow, S.; Rao, A. M.; Williams, K. A.; Thess, A.; Smalley, R. E.; Eklund, P. C. *J. Phys. Chem. B* **1997**, *101*, 8839.
- ²¹ Shelimov, K. B.; Esenaliev, R. O.; Rinzler, A. R.; Huffman, C. B.; Smalley, R. E. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *282*, 429.
- ²² Bonard, J.-M.; Stora, T.; Salvétat, J.-P.; Maier, F.; Stöckli, T.; Duschl, C.; Forró, L.; de Heer, W. A.; Châtelain, A. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 827.
- ²³ Hiura, H.; Ebbesen, T. W.; Tanigaki, K. *Adv. Mater.* **1995**, *7*, 275.
- ²⁴ Wang, Y. H.; Shan, H.; Hauge, R. H.; Pasquali, M.; Smalley, R. E. *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 1249.
- ²⁵ Georgakilas, V.; Voulgaris, D.; Vazquez, E.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Kukovecz, A.; Kuzmany, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14318.
- ²⁶ Duesberg, G. S.; Burghard, M.; Philipp, G.; Roth, S. *Chem. Commun.* **1998**, 435.
- ²⁷ Doorn, S. K.; Fields, R. E.; Hu, H.; Hamon, M. A.; Haddon, R. C.; Selegue, J. P.; Majidi, V. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3169.
- ²⁸ Dyke, C. A.; Stewart, M. P.; Tour, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4497.
- ²⁹ Holzinger, M.; Hirsch, A.; Bernier, P.; Duesberg, G. S.; Burghard, M. *Appl. Phys. A* **2000**, *70*, 599.
- ³⁰ Niyogi, S.; Hu, H.; Hamon, M. A.; Bhowmik, P.; Zhao, B.; Rozenzhak, S. M.; Chen, J.; Itkis, M. E.; Meier, M. S.; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 733.
- ³¹ Zhao, B.; Hu, H.; Niyogi, S.; Itkis, M. E.; Hamon, M. A.; Bhowmik, P.; Meier, M. S.; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 11673.
- ³² Huang, X.; McLean, R. S.; Zheng, M. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6225.
- ³³ Harutyunyan, A. R.; Pradhan, B. K.; Chang, J.; Chen, G.; Eklund, P. C. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 8671.
- ³⁴ Vázquez, E.; Georgakilas, V.; Prato, M. *Chem. Commun.* **2002**, *20*, 2308.
- ³⁵ Sun, Y. P.; Fu, K.; Lin, Y.; Huang, W. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 1096.
- ³⁶ Baughman, R. H.; Zakhidov, A. A.; de Heer, W. A. *Science* **2002**, *297*, 787.
- ³⁷ Treacy, M. M. J.; Ebbesen, T. W.; Gibson, J. M. *Nature* **1996**, *381*, 678.
- ³⁸ Yu, M.-F.; Files, B. S.; Arepalli, S.; Ruoff, R. S. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 5552.
- ³⁹ Buongiorno Nardelli, M.; Yakobson, B. I.; Bernholc, J. *Phys. Rev. B* **1998**, *57*, R4277.
- ⁴⁰ Vigolo, B.; Coulon, C.; Maugey, M.; Zakri, C.; Poulin, P. *Science* **2005**, *309*, 920.
- ⁴¹ Vigolo, B.; Penicaud, A.; Coulon, C.; Sauder, C.; Paillet, R.; Journet, C.; Bernier, P.; Poulin, P. *Science* **2000**, *290*, 1331.
- ⁴² Pénicaud, A.; Valat, L.; Derré, A.; Poulin, P.; Zakri, C.; Roubeau, O.; Maugey, M.; Miaudet, P.; Anglaret, E.; Petit, P.; Loiseau, A.; Enouz, S. *Composites Sci. Technol.* **2007**, *67*, 795.
- ⁴³ Baughman, R. H.; Cui, C.; Zakhidov, A. A.; Iqbal, Z.; Barisci, J. N.; Spinks, G. M.; Wallace, G. G.; Mazzoldi, A.; De Rossi, D.; Rinzler, A. G.; Jaszinski, O.; Roth, S.; Kertesz, M. *Science* **1999**, *284*, 1340.

- ⁴⁴ Inganäs, O.; Lundström, I. *Science* **1999**, *284*, 1281.
- ⁴⁵ Wong, S. S.; Harper, J. D.; Lansbury, P. T.; Lieber, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 603.
- ⁴⁶ Hafner, J. H.; Cheung, C. L.; Lieber, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 9750.
- ⁴⁷ Hafner, J. H.; Cheung, C. L.; Lieber, C. M. *Nature* **1999**, *398*, 761.
- ⁴⁸ Dai, H.; Hafner, J. H.; Rinzler, A. G.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. *Nature* **1996**, *384*, 147.
- ⁴⁹ Strus, M. C.; Raman, A.; Han, C. S.; Nguyen, C. V. *Nanotechnology* **2005**, *16*, 2482.
- ⁵⁰ Hamada, N.; Sawada, S.-i.; Oshiyama, A. *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *68*, 1579.
- ⁵¹ Frank, S.; Poncharal, P.; Wang, Z. L.; de Heer, W. A. *Science* **1998**, *280*, 1744.
- ⁵² Wei, B. Q.; Vajtai, R.; Ajayan, P. M. *Appl. Phys. Lett.* **2001**, *79*, 1172.
- ⁵³ Kociak, M.; Kasumov, A. Y.; Gueron, S.; Reulet, B.; Khodos, I.; Gorbatov, Y. B.; Volkov, V. T.; Vaccarini, L.; Bouchiat, H. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 2416.
- ⁵⁴ Kim, P.; Shi, L.; Majumdar, A.; McEuen, P. L. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *87*, 215502.
- ⁵⁵ Tans, S. J.; Devoret, M. H.; Dai, H.; Thess, A.; Smalley, R. E.; Geerligs, L. J.; Dekker, C. *Nature* **1997**, *386*, 474.
- ⁵⁶ Collins, P. G.; Zettl, A.; Bando, H.; Thess, A.; Smalley, R. E. *Science* **1997**, *278*, 100.
- ⁵⁷ Choi, W. B.; Chung, D. S.; Kang, J. H.; Kim, H. Y.; Jin, Y. W.; Han, I. T.; Lee, Y. H.; Jung, J. E.; Lee, N. S.; Park, G. S.; Kim, J. M. *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *75*, 3129.
- ⁵⁸ de Heer, W. A.; Châtelain, A.; Ugarte, D. *Science* **1995**, *270*, 1179.
- ⁵⁹ Li, J.; Lu, Y.; Ye, Q.; Cinke, M.; Han, J.; Meyyappan, M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 929.
- ⁶⁰ Bekyarova, E.; Davis, M.; Burch, T.; Itkis, M. E.; Zhao, B.; Sunshine, S.; Haddon, R. C. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 19717.
- ⁶¹ Staii, C.; Johnson, A. T.; Chen, M.; Gelperin, A. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 1774.
- ⁶² Bekyarova, E.; Kalinina, I.; Itkis, M. E.; Beer, L.; Cabrera, N.; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10700.
- ⁶³ Chen, R. J.; Bangsaruntip, S.; Drouvalakis, K. A.; Kam, N. W. S.; Shim, M.; Li, Y.; Kim, W.; Utz, P. J.; Dai, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 4984.
- ⁶⁴ Star, A.; Tu, E.; Niemann, J.; Gabriel, J. C. P.; Joiner, C. S.; Valcke, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 921.
- ⁶⁵ Veetil, J. V.; Ye, K. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 517.
- ⁶⁶ Berber, S.; Kwon, Y.-K.; Tománek, D. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 4613.
- ⁶⁷ Hone, J.; Whitney, M.; Piskoti, C.; Zettl, A. *Phys. Rev. B* **1999**, *59*, R2514.
- ⁶⁸ Richter, E.; Subbaswamy, K. R. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, *79*, 2738.
- ⁶⁹ Saito, R.; Fujita, M.; Dresselhaus, G.; Dresselhaus, M. S. *Appl. Phys. Lett.* **1992**, *60*, 2204.
- ⁷⁰ Kataura, H.; Kumazawa, Y.; Maniwa, Y.; Umez, I.; Suzuki, S.; Ohtsuka, Y.; Achiba, Y. *Synth. Met.* **1999**, *103*, 2555.
- ⁷¹ O'Connell, M. J.; Bachilo, S. M.; Huffman, C. B.; Moore, V. C.; Strano, M. S.; Haroz, E. H.; Rialon, K. L.; Boul, P. J.; Noon, W. H.; Kittrell, C.; Ma, J.; Hauge, R. H.; Weisman, B. R.; Smalley, R. E. *Science* **2002**, *297*, 593.
- ⁷² Vivien, L.; Anglaret, E.; Riehl, D.; Bacou, F.; Journet, C.; Goze, C.; Andrieux, M.; Brunet, M.; Lafonta, F.; Bernier, P. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *307*, 317.
- ⁷³ Dillon, A. C.; Jones, K. M.; Bekkedahl, T. A.; Kiang, C. H.; Bethune, D. S.; Heben, M. J. *Nature* **1997**, *386*, 377.
- ⁷⁴ Liu, C.; Fan, Y. Y.; Liu, M.; Cong, H. T.; Cheng, H. M.; Dresselhaus, M. S. *Science* **1999**, *286*, 1127.
- ⁷⁵ Ye, Y.; Ahn, C. C.; Witham, C.; Fultz, B.; Liu, J.; Rinzler, A. G.; Colbert, D.; Smith, K. A.; Smalley, R. E. *Appl. Phys. Lett.* **1999**, *74*, 2307.
- ⁷⁶ Hirscher, M.; Becher, M.; Haluska, M.; Dettlaff-Weglikowska, U.; Quintel, A.; Duesberg, G. S.; Choi, Y. M.; Downes, P.; Hulman, M.; Roth, S.; Stepanek, I.; Bernier, P. *Appl. Phys. A* **2001**, *72*, 129.
- ⁷⁷ Ajayan, P. M.; Iijima, S. *Nature* **1993**, *361*, 333.
- ⁷⁸ Ajayan, P. M.; Stephan, O.; Redlich, P.; Colliex, C. *Nature* **1995**, *375*, 564.
- ⁷⁹ Ugarte, D.; Chatelain, A.; de Heer, W. A. *Science* **1996**, *274*, 1897.
- ⁸⁰ Meyer, R. R.; Sloan, J.; Dunin-Borkowski, R. E.; Kirkland, A. I.; Novotny, M. C.; Bailey, S. R.; Hutchison, J. L.; Green, M. L. H. *Science* **2000**, *289*, 1324.
- ⁸¹ Sloan, J.; Novotny, M. C.; Bailey, S. R.; Brown, G.; Xu, C.; Williams, V. C.; Friedrichs, S.; Flahaut, E.; Callender, R. L.; York, A. P. E. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *329*, 61.
- ⁸² Han, W.; Fan, S.; Li, Q.; Gu, B.; Zhang, X.; Yu, D. *Appl. Phys. Lett.* **1997**, *71*, 2271.
- ⁸³ Satishkumar, B. C.; Govindaraj, A.; Nath, M.; Rao, C. N. R. *J. Mater. Chem.* **2000**, *10*, 2115.
- ⁸⁴ Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*.
- ⁸⁵ Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 674.
- ⁸⁶ Bianco, A.; Kostarelos, K.; Partidos, C. D.; Prato, M. *Chem. Commun.* **2005**, 571, 571.
- ⁸⁷ Dumortier, H.; Lacotte, S.; Pastorin, G.; Marega, R.; Wu, W.; Bonifazi, D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Muller, S.; Bianco, A. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1522.

- ⁸⁸ Pantarotto, D.; Singh, R.; McCarthy, D.; Erhardt, M.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5242.
- ⁸⁹ Liu, Z.; Cai, W.; He, L.; Nakayama, N.; Chen, K.; Sun, X.; Chen, X.; Dai, H. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 47.
- ⁹⁰ Wu, W.; Wieckowski, S.; Pastorin, G.; Benincasa, M.; Klumpp, C.; Briand, J.-P.; Gennaro, R.; Prato, M.; Bianco, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6358.
- ⁹¹ Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H. *ACS Nano* **2007**, *1*, 50.
- ⁹² Kam, N. W. S.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6021.
- ⁹³ Nel, A.; Xia, T.; Madler, L.; Li, N. *Science* **2006**, *311*, 622.
- ⁹⁴ Wang, H.; Wang, J.; Deng, X.; Sun, H.; Shi, Z.; Gu, Z.; Liu, Y.; Zhaoc, Y. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2004**, *4*, 1019.
- ⁹⁵ Yang, S. T.; Guo, W.; Lin, Y.; Deng, X. Y.; Wang, H. F.; Sun, H. F.; Liu, Y. F.; Wang, X.; Wang, W.; Chen, M.; Huang, Y. P.; Sun, Y. P. *J. Phys. Chem. C* **2007**.
- ⁹⁶ Liu, J.; Rinzler, A. G.; Dai, H.; Hafner, J. H.; Bradley, R. K.; Boul, P. J.; Lu, A.; Iverson, T.; Shelimov, K.; Huffman, C. B.; Rodriguez-Macias, F.; Shon, Y.-S.; Lee, T. R.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. *Science* **1998**, *280*, 1253.
- ⁹⁷ Chen, J.; Hamon, M. A.; Hu, H.; Chen, Y.; Rao, A. M.; Eklund, P. C.; Haddon, R. C. *Science* **1998**, *282*, 95.
- ⁹⁸ Baskaran, D.; Mays, J. W.; Zhang, X. P.; Bratcher, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6916.
- ⁹⁹ Sun, Y. P.; Huang, W.; Lin, Y.; Fu, K.; Kitaygorodskiy, A.; Riddle, L. A.; Yu, Y. J.; Carroll, D. L. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 2864.
- ¹⁰⁰ D'Este, M.; Nardi, M. D.; Menna, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 2517.
- ¹⁰¹ Herranz, M. Á.; Martín, N.; Campidelli, S.; Prato, M.; Brehm, G.; Guldi, D. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4478.
- ¹⁰² Li, H.; Kose, M. E.; Qu, L.; Lin, Y.; Martin, R. B.; Zhou, B.; Harruff, B. A.; Allard, L. F.; Sun, Y.-P. *J. Photochem. Photobiol. A* **2007**, *185*, 94.
- ¹⁰³ Feng, L.; Li, H.; Li, F.; Shi, Z.; Gu, Z. *Carbon* **2003**, *41*, 2385.
- ¹⁰⁴ Li, B.; Shi, Z.; Lian, Y.; Gu, Z. *Chem. Lett.* **2001**, *30*, 598.
- ¹⁰⁵ Pompeo, F.; Resasco, D. E. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 369.
- ¹⁰⁶ Mickelson, E. T.; Huffman, C. B.; Rinzler, A. G.; Smalley, R. E.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *296*, 188.
- ¹⁰⁷ Mickelson, E. T.; Chiang, I. W.; Zimmerman, J. L.; Boul, P. J.; Lozano, J.; Liu, J.; Smalley, R. E.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4318.
- ¹⁰⁸ Khabashesku, V. N.; Billups, W. E.; Margrave, J. L. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 1087.
- ¹⁰⁹ Boul, P. J.; Liu, J.; Mickelson, E. T.; Huffman, C. B.; Ericson, L. M.; Chiang, I. W.; Smith, K. A.; Colbert, D. T.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, *310*, 367.
- ¹¹⁰ Saini, R. K.; Chiang, I. W.; Peng, H.; Smalley, R. E.; Billups, W. E.; Hauge, R. H.; Margrave, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3617.
- ¹¹¹ Zhang, L.; Kiny, V. U.; Peng, H.; Zhu, J.; Lobo, R. F. M.; Margrave, J. L.; Khabashesku, V. N. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 2055.
- ¹¹² Stevens, J. L.; Huang, A. Y.; Peng, H.; Chiang, I. W.; Khabashesku, V. N.; Margrave, J. L. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 331.
- ¹¹³ Hu, H.; Zhao, B.; Hamon, M. A.; Kamaras, K.; Itkis, M. E.; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14893.
- ¹¹⁴ Kamaras, K.; Itkis, M. E.; Hu, H.; Zhao, B.; Haddon, R. C. *Science* **2003**, *301*, 1501.
- ¹¹⁵ Coleman, K. S.; Bailey, S. R.; Fogden, S.; Green, M. L. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8722.
- ¹¹⁶ Hirsch, A.; Vostrowsky, O. *Top. Curr. Chem.* **2005**, *245*, 193.
- ¹¹⁷ Holzinger, M.; Abraham, J.; Whelan, P.; Graupner, R.; Ley, L.; Hennrich, F.; Kappes, M.; Hirsch, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8566.
- ¹¹⁸ Holzinger, M.; Vostrowsky, O.; Hirsch, A.; Hennrich, F.; Kappes, M.; Weiss, R.; Jellen, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4002.
- ¹¹⁹ Georgakilas, V.; Kordatos, K.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Holzinger, M.; Hirsch, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 760.
- ¹²⁰ Tagmatarchis, N.; Prato, M. *J. Mater. Chem.* **2004**, *4*, 437.
- ¹²¹ Alvaro, M.; Atienzar, P.; de la Cruz, P.; Delgado, J. L.; Garcia, H.; Langa, F. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 12691.
- ¹²² Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 1105.
- ¹²³ Zhang, L.; Yang, J.; Edwards, C. L.; Alemany, L. B.; Khabashesku, V. N.; Barron, A. R. *Chem. Commun.* **2005**, *26*, 3265.
- ¹²⁴ Delgado, J. L.; de la Cruz, P.; Langa, F.; Urbina, A.; Casado, J.; Navarrete, J. T. L. *Chem. Commun.* **2004**, *15*, 1734.
- ¹²⁵ Ménard-Moyon, C.; Dumas, F.; Doris, E.; Mioskowski, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14764.
- ¹²⁶ Bahr, J. L.; Yang, J.; Kosynkin, D. V.; Bronikowski, M. J.; Smalley, R. E.; Tour, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6536.

- ¹²⁷ Bahr, J. L.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* **2001**, *13*, 3823.
- ¹²⁸ Dyke, C. A.; Tour, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1156.
- ¹²⁹ Price, B. K.; Tour, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12899.
- ¹³⁰ Dyke, C. A.; Tour, J. M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1215.
- ¹³¹ Price, B. K.; Hudson, J. L.; Tour, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14867.
- ¹³² Stephenson, J. J.; Hudson, J. L.; Leonard, A. D.; Price, B. K.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 3491.
- ¹³³ Umek, P.; Seo, J. W.; Hernadi, K.; Mrzel, A.; Pechy, P.; Mihailovic, D. D.; Forro, L. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 4751.
- ¹³⁴ Peng, H.; Reverdy, P.; Khabashesku, V. N.; Margrave, J. L. *Chem. Commun.* **2003**, *3*, 362.
- ¹³⁵ Liang, F.; Sadana, A. K.; Peera, A.; Chattopadhyay, J.; Gu, Z.; Hauge, R. H.; Billups, W. E. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1257.
- ¹³⁶ Stephenson, J. J.; Sadana, A. K.; Higginbotham, A. L.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4658.
- ¹³⁷ Penicaud, A.; Poulin, P.; Derre, A.; Anglaret, E.; Petit, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8.
- ¹³⁸ Tomonari, Y.; Murakami, H.; Nakashima, N. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 4027.
- ¹³⁹ Ou, Y. Y.; Huang, M. H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2031.
- ¹⁴⁰ Guldi, D. M.; Rahman, G. M. A.; Jux, N.; Balbinot, D.; Hartnagel, U.; Tagmatarchis, N.; Prato, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9830.
- ¹⁴¹ Ehli, C.; Rahman, G. M. A.; Jux, N.; Balbinot, D.; Guldi, D. M.; Paolucci, F.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Melle-Franco, M.; Zerbetto, F.; Campidelli, S.; Prato, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11222.
- ¹⁴² Calvert, P. *Nature* **1999**, *399*, 210.
- ¹⁴³ Tang, B. Z.; Xu, H. *Macromolecules* **1999**, *32*, 2569.
- ¹⁴⁴ Chen, J.; Liu, H.; Weimer, W. A.; Halls, M. D.; Waldeck, D. H.; Walker, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9034.
- ¹⁴⁵ Star, A.; Stoddart, J. F.; Steuerman, D.; Diehl, M.; Boukai, A.; Wong, E. W.; Yang, X.; Chung, S.-W.; Choi, H.; Heath, J. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 1721.
- ¹⁴⁶ Gao, J.; Zhao, B.; Itkis, M. E.; Bekyarova, E.; Hu, H.; Kranak, V.; Yu, A.; Haddon, R. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7492.
- ¹⁴⁷ Miaudet, P.; Badaire, S.; Maugey, M.; Derre, A.; Pichot, V.; Launois, P.; Poulin, P.; Zakri, C. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2212.
- ¹⁴⁸ Zhou, X.; Moran-Mirabal, J. M.; Craighead, H. G.; McEuen, P. L. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 185.
- ¹⁴⁹ Zhang, M.; Su, L.; Mao, L. *Carbon* **2006**, *44*, 276.
- ¹⁵⁰ Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Science* **2003**, *300*, 775.
- ¹⁵¹ Zheng, M.; Jagota, A.; Semke, E. D.; Diner, B. A.; Mclean, R. S.; Lustig, S. R.; Richardson, R. E.; Tassi, N. G. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 338.
- ¹⁵² Zheng, M.; Jagota, A.; Strano, M. S.; Santos, A. P.; Barone, P.; Chou, S. G.; Diner, B. A.; Dresselhaus, M. S.; McLean, R. S.; Onoa, G. B.; Samsonidze, G. G.; Semke, E. D.; Usrey, M.; Walls, D. J. *Science* **2003**, *302*, 1545.
- ¹⁵³ Zheng, M.; Rostovtsev, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7702.
- ¹⁵⁴ Han, X.; Li, Y.; Deng, Z. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1518.
- ¹⁵⁵ Smith, B. W.; Monthieux, M.; Luzzi, D. E. *Nature* **1998**, *396*, 323.
- ¹⁵⁶ Tsang, S. C.; Davis, J. J.; Green, M. L. H.; Hill, H. A. O.; Leung, Y. C.; Sadler, P. J. *Chem. Commun.* **1995**, *17*, 1803.

CHAPITRE II

Conception de nanoobjets pour la catalyse

I. Introduction et concept

I.1. Les piles à combustible

Pour satisfaire des besoins toujours croissants en énergie et prendre en compte les problèmes environnementaux, il est nécessaire de rechercher des sources alternatives afin de remplacer les combustibles conventionnels de types pétrole et gaz. Les piles à combustible (PAC), qui fournissent une nouvelle voie pour le stockage et la distribution d'énergie, ont attiré l'attention comme source d'énergie "verte" pour l'automobile et surtout pour les appareils électroniques portables.^{1,2} Ces sources alternatives font partie des plus prometteuses en raison de la haute densité d'énergie qu'elles peuvent fournir ainsi que de leur basse température de fonctionnement pour produire de l'électricité.

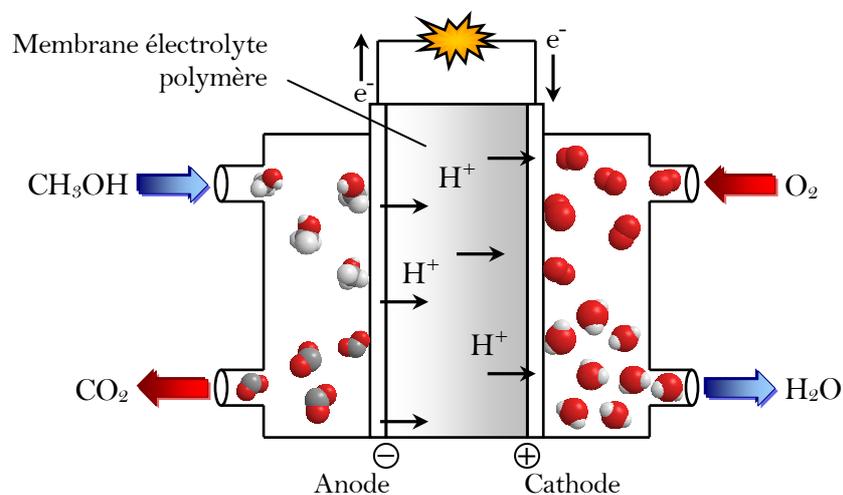
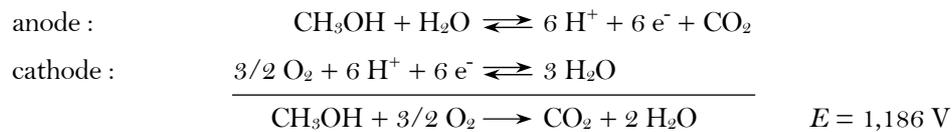


Figure II-1 : Principe d'une pile à combustible à utilisation directe de méthanol (DMFC)

Il existe cinq grandes classes de piles à combustible parmi lesquelles, les PACs alcalines (AFC : *Alkaline Fuel Cell*) et les PACs à membranes électrolytes en polymère (PEMFC : *Polymer Electrolyte Membrane Fuel Cell*). Les piles AFC ont été les premières à avoir été développées, dans le cadre des missions spatiales Apollo. Elles présentent cependant l'inconvénient de ne pouvoir fonctionner qu'avec de l'hydrogène et de l'oxygène purs. Ce problème a pu être contourné par l'utilisation des PEMFCs dont le principe repose sur l'utilisation d'un électrolyte liquide immobilisé dans une matrice polymère. L'efficacité de ce type de pile est due à la faible permittivité de la membrane vis-à-vis des deux carburants (H_2 et O_2). Cependant, l'utilisation de l'hydrogène comme principal carburant reste un handicap. Afin d'y remédier, des PACs à utilisation directe de méthanol (DMFC : *Direct Methanol Fuel Cell*) ont été développées. Ces dernières sont élaborées sur le même principe que les PEMFCs mais utilisent le méthanol comme carburant, plus facilement stockable et transportable (Figure II-1).

Dans cette cellule électrochimique, le méthanol est directement transformé en dioxyde de carbone et en eau pour produire de l'électricité selon les équations suivantes :



Ces transformations nécessitent l'utilisation d'un catalyseur pour accélérer la cinétique d'oxydation du méthanol. Aujourd'hui, les matériaux catalytiques les plus attrayants sont des catalyseurs à base de platine.³ Il est connu que l'activité électrocatalytique du catalyseur est fortement liée à sa taille et à son support.⁴ Une forte dispersion de nanoparticules (NPs) ayant un petit diamètre et une faible distribution en taille sont ainsi des conditions idéales pour obtenir une haute activité électrochimique en raison d'un ratio surface/volume très grand.

Les nanoparticules de platine ou les alliages de platine sur noir de charbon sont les catalyseurs les plus répandus pour les PACs. Cependant, une des barrières les plus significatives à leur mise sur le marché est le coût du catalyseur. Il est donc important de réduire la quantité de métal. Une des voies envisagées est l'usage de supports carbonés présentant une grande surface spécifique pour augmenter la dispersion des NPs et ainsi diminuer la masse utile de catalyseur. Dans cette optique, une des dernières innovations, en matière de support catalytique, est le noir de charbon VULCAN XC-72R.⁵⁻⁸ Ce matériau a l'avantage de présenter, en plus d'une grande surface spécifique (254 m²/g), une très bonne conductivité pour un faible chargement et d'être facilement dispersable par rapport à ses concurrents directs.

Avec la découverte des nanotubes de carbone, le domaine de la catalyse a trouvé un remplaçant de choix au noir de charbon. En effet, les nanotubes exhibent, entre autres, des caractéristiques mécaniques supérieures (une surface spécifique pouvant atteindre 1000 m²/g couplée à une résistance élevée à la traction) ainsi qu'une grande conductivité électronique et thermique.^{6,8-26} De plus, les nanoparticules de platine à la surface des nanotubes de carbone étant plus accessibles que celles piégées dans les pores du noir de charbon de l'électrode, elles pourront entrer en contact plus facilement avec les réactifs. Les travaux reportés dans la littérature sur les "NT-NPs", les classent parmi les meilleurs composites pour des applications en catalyse. Cependant, la distribution uniforme de nanoparticules sur la surface des nanotubes (Figure II-2) reste un défi en raison des parois chimiquement inertes des nanotubes.

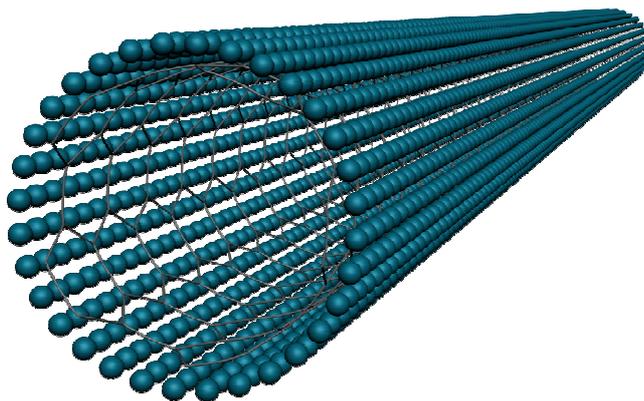


Figure II-2 : Distribution uniforme de nanoparticules sur nanotube de carbone

I.2. Méthodes existantes de déposition

Plusieurs méthodes ont été développées pour déposer des nanoparticules métalliques sur les nanotubes de carbone.²⁷ Parmi les différents procédés employés, on peut citer l'auto-assemblage,^{10,20,28-42} l'imprégnation,^{7,8,11,12,19,43-56} la déposition auto-catalytique,^{22,57-59} l'électrodéposition^{9,60-66} et la déposition chimique par voie gazeuse.⁶⁷⁻⁶⁹

Nous ne détaillerons ci-après que les deux méthodes les plus utilisées : l'auto-assemblage et l'imprégnation.

I.2.1. L'auto-assemblage

L'auto-assemblage consiste à synthétiser les nanoparticules séparément du futur support (nanotubes) puis de les mettre en contact avec ce dernier. Leur préparation implique la réduction d'un sel métallique en présence d'un agent stabilisateur permettant l'encapsulation des nanoparticules et facilitant leur ancrage sur les nanotubes. Enfin, les nanoparticules sont mises en contact avec les nanotubes de carbone qui peuvent être eux-mêmes fonctionnalisés^{10,28-31,33,34,38,41,70-72} ou non.^{20,32,39,42}

Les travaux les plus nombreux de la littérature reposent essentiellement sur la fonctionnalisation non covalente des nanotubes à l'aide de polymères, de motifs polyaromatiques ou encore d'ADN.

Kamat et *coll.* ont rapporté l'utilisation de poly(styrène-4-sulfonate de sodium) comme moyen pour disperser et casser les fagots de nanotubes et ainsi augmenter la surface spécifique accessible des nanotubes. Les fonctions sulfonate servent également de point d'ancrage aux nanoparticules provenant d'une solution colloïdale de platine.¹⁰

Huang et *coll.* ont, quant à eux, utilisé une fonction amine portée par un motif pyrène pouvant interagir par π -stacking avec la surface des nanotubes. Dans ce cas, l'amine joue le rôle de site de fixation pour des nanoparticules d'or.³⁴

Un dernier exemple, apporté par l'équipe de Deng, décrit l'emploi d'ADN portant des fonctions thiols comme méthode de solubilisation des nanotubes et d'assemblage de nanoparticules d'or sur leur surface.⁷²

I.2.2. L'imprégnation

L'imprégnation consiste à générer des nanoparticules par réduction d'un sel métallique en mélange avec des nanotubes de carbone. Le challenge pour cette méthode est de minimiser l'agrégation des nanoparticules en solution et d'obtenir un dépôt spécifique et homogène sur les nanotubes. Pour cela, il faut fonctionnaliser les nanotubes afin de créer des sites de coordination pour les ions métalliques. Ces sites vont permettre la nucléation des agrégats métalliques à la surface des nanotubes. Trois types de fonctionnalisation sont couramment utilisés : le traitement oxydant, la méthode covalente et la méthode non covalente.

I.2.2.a. Fonctionnalisation par traitement oxydant

La méthode la plus répandue pour fonctionnaliser les nanotubes est le traitement oxydant fort^{8,12,22,32,43,46,49,50,54,56} (à reflux dans un mélange $\text{HNO}_3 - \text{H}_2\text{SO}_4$) qui crée à la surface des nanotubes des fonctions oxygénées. Une telle fonctionnalisation de surface offre aux précurseurs de métaux des sites de liaison^{43,54} (Schéma II-1) et permet une déposition rapide des métaux sur les nanotubes.

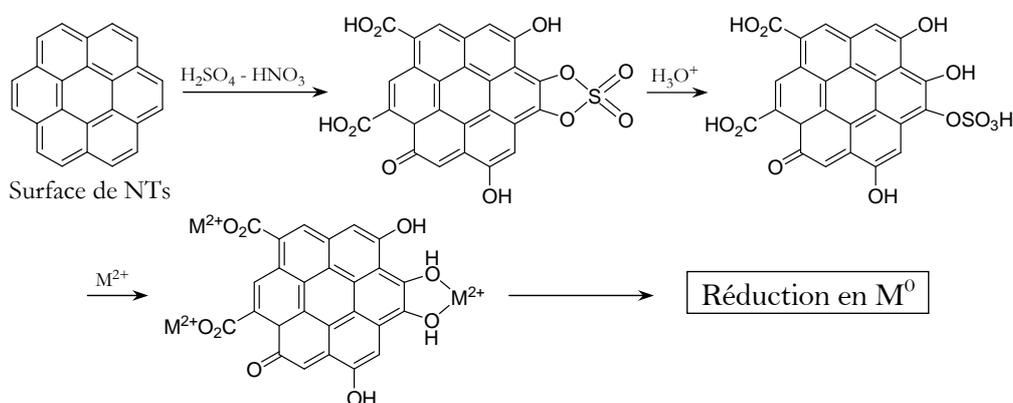


Schéma II-1 : Représentation de la fixation de nanoparticules métalliques sur des nanotubes oxydés

Bien que cette méthode soit efficace, le contrôle de l'homogénéité n'est pas encore effectif. En effet, ce procédé permet de fonctionnaliser les nanotubes principalement aux extrémités, où se situe un maximum de défauts, ainsi que de manière aléatoire sur leur surface. Un des moyens de contourner ce problème est de greffer uniformément à la surface des nanotubes des molécules qui vont servir de point d'ancrage aux nanoparticules métalliques.

1.2.2.b. Fonctionnalisation covalente

Le principe de cette approche repose sur l'immobilisation à la surface du nanotube de fonctions chargées pouvant interagir avec le sel métallique avant que ce dernier ne soit réduit.

Dans cette optique, Guo et *coll.* ont étudié la fixation de nanoparticules de palladium par des fonctions ammonium greffées par électrochimie sur des MWNTs.⁷³ Cette même méthode a été utilisée par Waje et *coll.* pour attacher des fonctions acide sulfonique permettant l'adhésion d'un sel de platine.¹¹

Plus récemment, l'équipe de Haddleton a rapporté la synthèse d'une structure dendritique portant des fonctions carboxylate à la surface de nanotubes. Ils ont utilisé ce nanohybride pour ancrer, dans la matrice dendritique, des nanoparticules d'argent.⁴⁵ D'autre part, Kim et *coll.* ont dérivé des nanotubes avec des fonctions thiol et thiophénol pour permettre la rétention de nanoparticules de platine.^{47,74} Ils ont aussi montré que la taille de ces dernières, allant du simple atome au cluster, pouvait être contrôlée par la température.

L'inconvénient majeur de la fonctionnalisation covalente est la destruction partielle du réseau graphitique. Son altération diminue fortement les propriétés de conduction des nanotubes. C'est pourquoi plusieurs équipes se sont intéressées à la fonctionnalisation non covalente.

1.2.2.c. Fonctionnalisation non covalente

Deux méthodes principales ont été utilisées pour l'accrochage de nanoparticules sur les nanotubes.

La première repose sur l'utilisation de polymères anioniques qui s'organisent autour des nanotubes par enrobage et permettent l'interaction d'un sel métallique avec la surface habillée du nanotube. Dans le cadre de la méthode d'imprégnation, seule l'équipe de Chen a initié ce type d'étude. Elle a fonctionnalisé des SWNTs avec de l'acide poly(styrène-*alt*-maléique).⁴⁴ En milieu basique l'anhydride maléique va s'ouvrir pour former deux entités carboxylates. Ainsi, le nanotube va aussi bien être rendu hydrosoluble qu'offrir des sites de fixation aux nanoparticules métalliques.

La seconde méthode consiste en l'utilisation de surfactants. Ces derniers ont surtout été utilisés pour stabiliser les nanoparticules créées. Leur rôle comme lien entre les nanoparticules et le nanotube n'a jamais été mis en avant. Dès 1994, l'équipe de Bernier a mis en œuvre cette méthode pour fixer du ruthénium sur des nanotubes.⁵⁵ Par la suite, d'autres équipes ont procédé de la même manière pour fixer du platine.^{8,51,53}

Plus récemment, Geckeler et *coll.* ont décrit l'utilisation du Tween 80 comme agent hydrophobe pour solubiliser les nanotubes avant d'y accrocher des nanoparticules d'or.⁵⁶

Si l'utilisation des surfactants pour fixer des nanoparticules à la surface des nanotubes semble se généraliser, leur rôle précis n'est, à ce jour, pas encore clairement défini. En se basant sur des travaux récents au laboratoire sur l'auto-organisation des lipides à la surface des nanotubes de carbone, nous avons souhaité étudier plus en détail l'utilisation de structures amphiphiles pour la fixation de nanoparticules sur les nanotubes de carbone.

I.3. Principe de la déposition de nanoparticules sur un nanotube de carbone

La stratégie que nous avons choisie de suivre pour la déposition de nanoparticules métalliques sur la surface extérieure de nanotubes de carbone est représentée sur le Schéma II-2. Elle repose sur l'utilisation de lipides bifonctionnels constitués d'une chaîne hydrophobe pouvant interagir avec le nanotube de carbone, et d'un groupement hydrophile ayant une affinité particulière pour des nanoparticules métalliques. Ces lipides ont la propriété de s'auto-organiser à la surface des nanotubes de carbone (*cf* partie II).

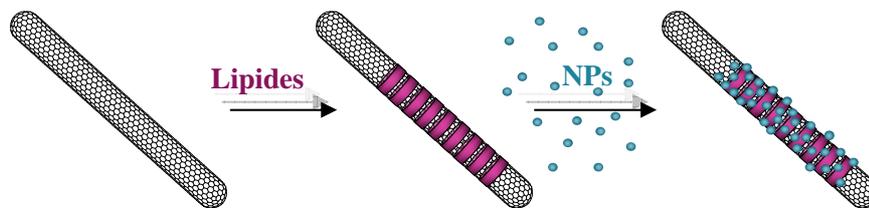


Schéma II-2 : Principe de déposition de NPs sur les nanotubes de carbone

Dans une première étape, les nanotubes de carbone sont mis en présence des lipides bifonctionnels. Les parties hydrophobes interagissent fortement avec les feuillets de graphite si bien que les nanotubes sont alors décorés sur toute leur longueur et se retrouvent ainsi hydrosolubles. Dans un deuxième temps, un sel métallique est ajouté au milieu. L'affinité de la tête polaire pour le sel va induire une diffusion de ce dernier vers le nanotube puis sa fixation à la surface du nanotube. Enfin, par réduction du sel et si des interactions favorables ont été établies, le système pourra évoluer vers une nucléation des nanoparticules métalliques autour du nanotube.

Pour développer ces nanoobjets, nous avons choisi d'utiliser des MWNTs synthétisés selon la méthode de l'arc électrique par la société n-Tec. Ce choix nous a paru judicieux car ils présentent une surface plane sans défaut, une surface spécifique très grande, une absence de catalyseur métallique (utilisé dans les synthèses de SWNTs) et de meilleures propriétés physico-chimiques en électrocatalyse que le noir de charbon ou le charbon actif.^{75,76}

II. Organisation supramoléculaire de lipides sur les nanotubes de carbone

II.1. Interactions de détergents et de molécules lipidiques avec les nanotubes

Les nanotubes de carbone sont insolubles aussi bien en milieu organique qu'en milieu aqueux. Il a été mis en évidence par l'équipe de Bonard en 1997 que les nanotubes pouvaient être solubilisés par ultrasonication en milieu aqueux en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) à hauteur de 1% en masse.⁷⁷ L'adsorption de molécules de SDS à la surface des nanotubes crée une distribution de charges négatives qui empêche leur agrégation sous forme de fagots et permet ainsi la formation d'une suspension stable.

Au laboratoire, une étude par microscopie électronique a été menée afin de comprendre comment l'interaction du SDS avec les nanotubes permettait leur solubilisation.⁷⁸ Il a été observé que l'addition de SDS sur les nanotubes engendrait la formation de stries sur leur surface (Figure II-3, B). La présence de ces striations met en évidence que le SDS s'adsorbe sur les nanotubes et qu'il s'organise spontanément sur leur surface. Ces observations sont à rapprocher de celles faites par Aksay et *coll.* en 1996.⁷⁹ La visualisation d'images similaires a, en effet, conduit cette équipe à rapporter que le SDS pouvait s'organiser en demi-micelle à la surface d'un plan de graphite (Figure II-3, A).

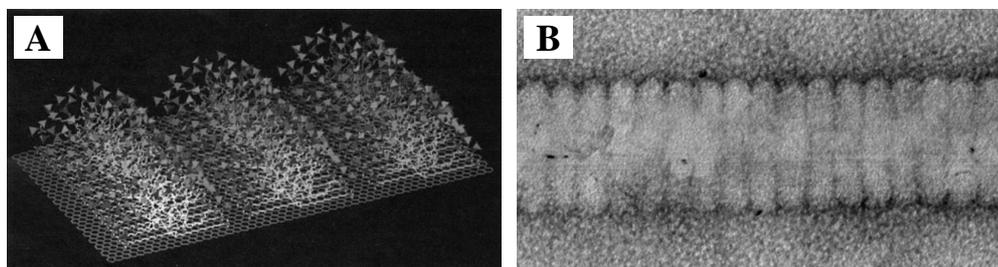


Figure II-3 : Comparaison entre un modèle d'interaction du SDS avec le graphite (A) et un cliché de microscopie de l'organisation du SDS sur un nanotube (B)

La formation de structures tubulaires en forme de demi-cylindres a été interprétée comme un phénomène d'auto-organisation sur la surface de graphite. Cet arrangement est dû aux interactions de type van der Waals entre la partie hydrophobe du SDS et le réseau graphitique. Or, les nanotubes de carbone peuvent être considéré comme résultant de l'enroulement d'un feuillet de graphite enroulé sur lui-même. Par conséquent, il est probable que les stries observées sur les nanotubes soient des structures demi-cylindriques, constitués de SDS, formant ainsi des anneaux héli-micellaires autour des nanotubes.

Il a également été montré qu'une concentration en détergent supérieure à la concentration micellaire critique ($CMC = 0,2\%$ en masse pour le SDS) est nécessaire pour obtenir la formation de stries sur les nanotubes. Cela suggère que le mécanisme de

structuration des anneaux passe par la génération de micelles de SDS en solution qui se réorganisent en anneaux héli-micellaires au contact des nanotubes. Ces anneaux peuvent être apparentés visuellement à des bagues empilées sur le nanotube (Schéma II-3).

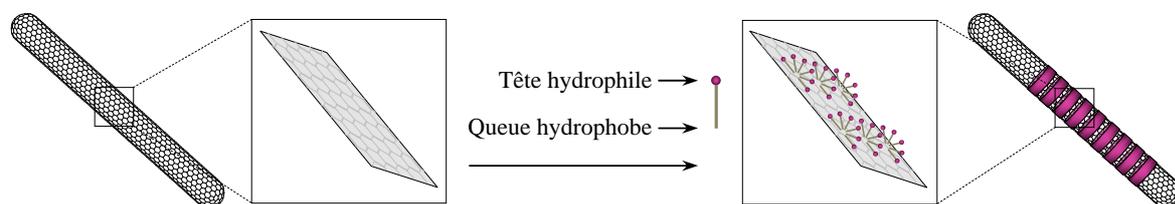


Schéma II-3 : Auto-organisation d'un détergent sur un nanotube de carbone

Des études de dialyse ont montré que l'interaction entre le feuillet de graphite du nanotube et les chaînes carbonées en C_{12} du SDS est faible. En effet, les striations disparaissent après lavage et dialyse des nanotubes. Afin d'améliorer et de renforcer les interactions avec les nanotubes de carbone, différents lipides ont été synthétisés pour déterminer le bon équilibre entre la longueur de la chaîne lipophile et la polarité de la tête hydrophile. Il a ainsi été mis en évidence que la longueur de chaîne minimale pour que l'organisation supramoléculaire soit préservée est de 16 atomes de carbone.

Nous avons envisagé d'utiliser cette auto-organisation de structures amphiphiles à la surface des nanotubes de carbone pour la construction d'hybrides "NT-Lipides-NPs".

II.2. Synthèse de lipides

II.2.1. Présentation générale des réactifs lipidiques

Nous avons choisi de synthétiser différents lipides amphiphiles dont les têtes polaires sont constituées soit d'un motif acide nitrilotriacétique (NTA) portant trois fonctions acide soit d'un motif pyridinium. En effet, les pyridiniums sont connus pour interagir avec des atomes métalliques et former des complexes stables⁸⁰ faisant intervenir les orbitales π et π^* du cycle aromatique et les orbitales d du métal.⁸¹

Pour chacune de ces deux têtes hydrophiles, nous avons étudié l'impact de la rigidité des bagues sur l'organisation des nanoparticules métalliques. Pour cela, nous avons utilisé d'une part, une chaîne carbonée simple et d'autre part, une chaîne carbonée portant un motif diacétylénique. Ce dernier permettra la rigidification de la bague *via* sa polymérisation autour des nanotubes. De plus, pour s'assurer de la solidité de l'édifice lors de l'assemblage, il nous a paru important de choisir des molécules portant des chaînes carbonées suffisamment longues (allant de 16 à 25 carbones) pour obtenir des interactions hydrophobes assez fortes avec la surface des nanotubes.

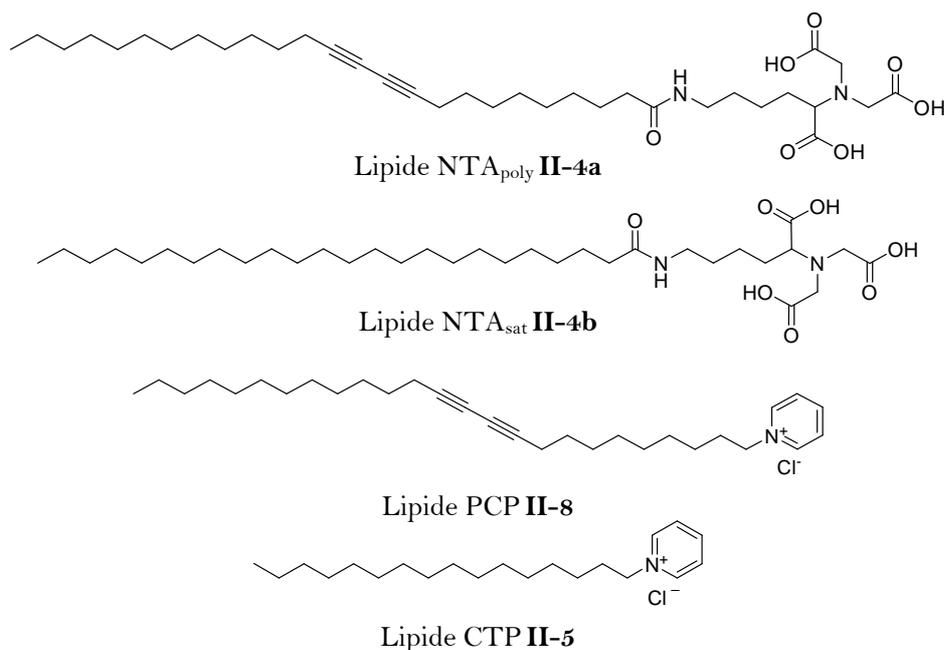


Figure II-4 : Lipides adsorbés sur les nanotubes

II.2.2. Synthèse des lipides NTA

La synthèse des lipides NTA a été effectuée en deux étapes avec la préparation, dans un premier temps, de la tête polaire (Schéma II-4) qui est obtenue en suivant le protocole décrit par Hochüli pour l'élaboration de résines d'Agarose-NTA.⁸² La *N*-benzyloxycarbonyl-L-lysine a été alkylée dans la soude avec un excès d'acide bromoacétique pour donner le composé **II-1**. Le groupement protecteur benzyloxycarbonyle a ensuite été enlevé par hydrogénolyse dans le méthanol pour obtenir le produit désiré **II-2** ou NTA.

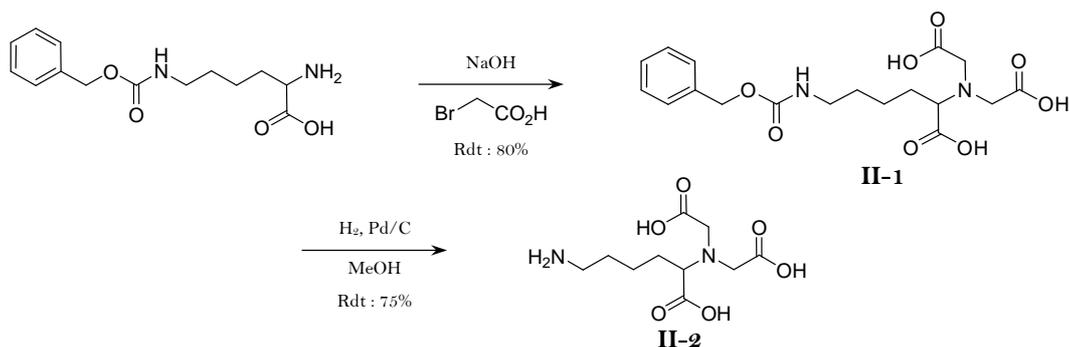


Schéma II-4 : Synthèse de la tête polaire NTA

La suite de la synthèse consiste à réaliser un couplage peptidique entre le motif NTA **II-2**, décrit précédemment et un acide gras activé (Schéma II-5). Deux acides ont été utilisés : l'acide pentacosanoïque et l'acide tétracosanoïque. L'activation des fonctions acide carboxylique a été effectuée par ajout de *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en présence d'EDCI dans le dichlorométhane pour obtenir quantitativement les produits **II-3a** et **II-3b**. Le

couplage a été réalisé dans un mélange DMF/eau en présence de triéthylamine. Les lipides **II-4a** et **II-4b** ont été purifiés par précipitation avec une solution aqueuse d'HCl 0,1 N.

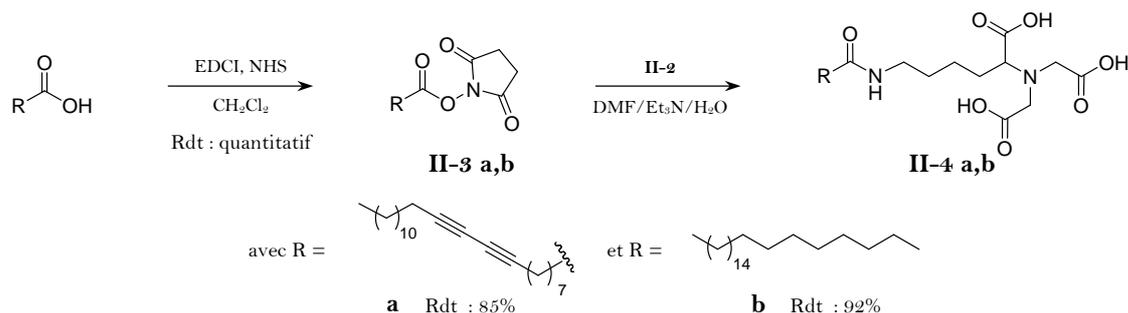


Schéma II-5 : Synthèse des lipides NTA saturé et polymérisable

II.2.3. Synthèse des lipides pyridinium

Deux lipides à tête pyridinium ont été utilisés dans le cadre de cette étude. Un lipide commercialement disponible : le chlorure de cétylpyridinium **II-5** et un lipide polymérisable obtenu en trois étapes à partir de l'acide gras correspondant (Schéma II-6).

Dans une première étape, l'acide pentacos-10,12-diynoïque a été réduit en l'alcool **II-6** par LiAlH_4 à 0°C dans l'éther. Ensuite, l'alcool **II-6** obtenu a été transformé en son dérivé chloré **II-7** par halogénéation en présence de chlorure de thionyle et de pyridine. Enfin, le lipide désiré **II-8** a été obtenu par alkylation de la pyridine à reflux.

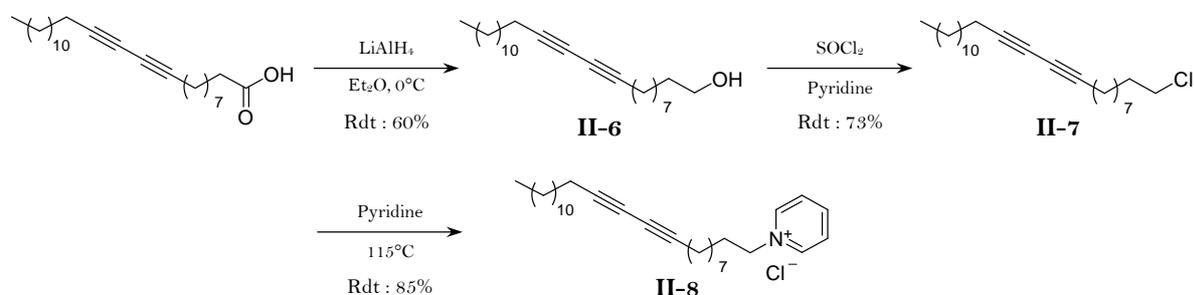


Schéma II-6 : Synthèse du lipide pyridinium polymérisable

II.3. Adsorption des lipides sur les nanotubes

II.3.1. Méthode employée pour l'auto-organisation

Pour l'organisation des lipides autour des nanotubes de carbone, nous avons choisi d'utiliser des nanotubes multiparois n-Tec dont le seul contaminant est du carbone amorphe. Cette impureté n'étant pas soluble, elle est en partie éliminée au fur à mesure que les nanotubes sont solubilisés et lavés.

La méthode classique pour adsorber et organiser les lipides autour des nanotubes consiste, dans un premier temps, à passer les lipides aux ultrasons dans un tampon Tris 0,1M à pH 8 pour favoriser la formation de micelles (Schéma II-7).

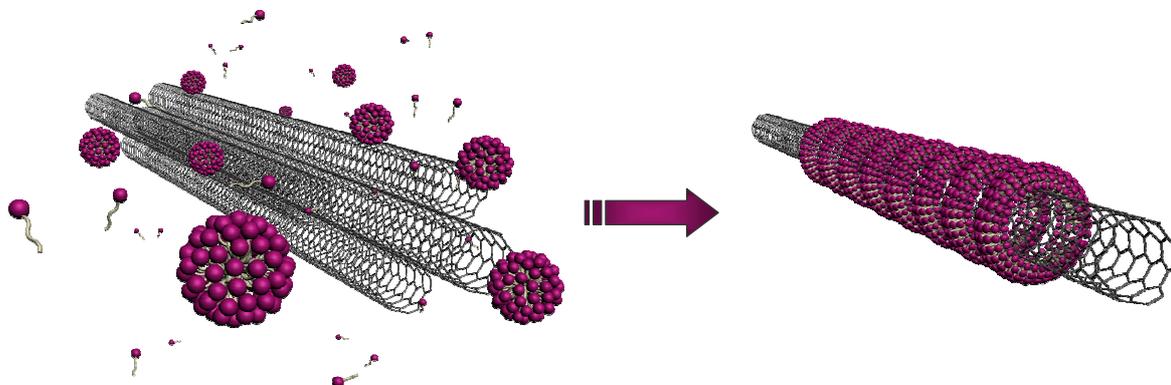


Schéma II-7 : Principe de solubilisation des nanotubes en présence de lipides amphiphiles

Une concentration suffisamment élevée (1 mg/mL) est choisie pour se situer au-dessus de la concentration micellaire critique du lipide (CMC = 0,012% en masse pour le lipide NTA_{poly} **II-4a**). Les nanotubes (5 mg pour 1 mg de lipide) sont alors ajoutés et l'ensemble est soniqué pendant 10 minutes.

Les nanotubes sont ensuite laissés reposer pendant une heure pour permettre au carbone amorphe de se déposer par décantation. Le surnageant contenant les nanotubes solubles est alors prélevé et centrifugé à 15000 G pendant 20 minutes afin de pouvoir retirer le lipide en excès. Les nanotubes sont enfin lavés deux fois avec du tampon Tris, chaque lavage étant suivi des étapes de centrifugation et de retrait du surnageant.

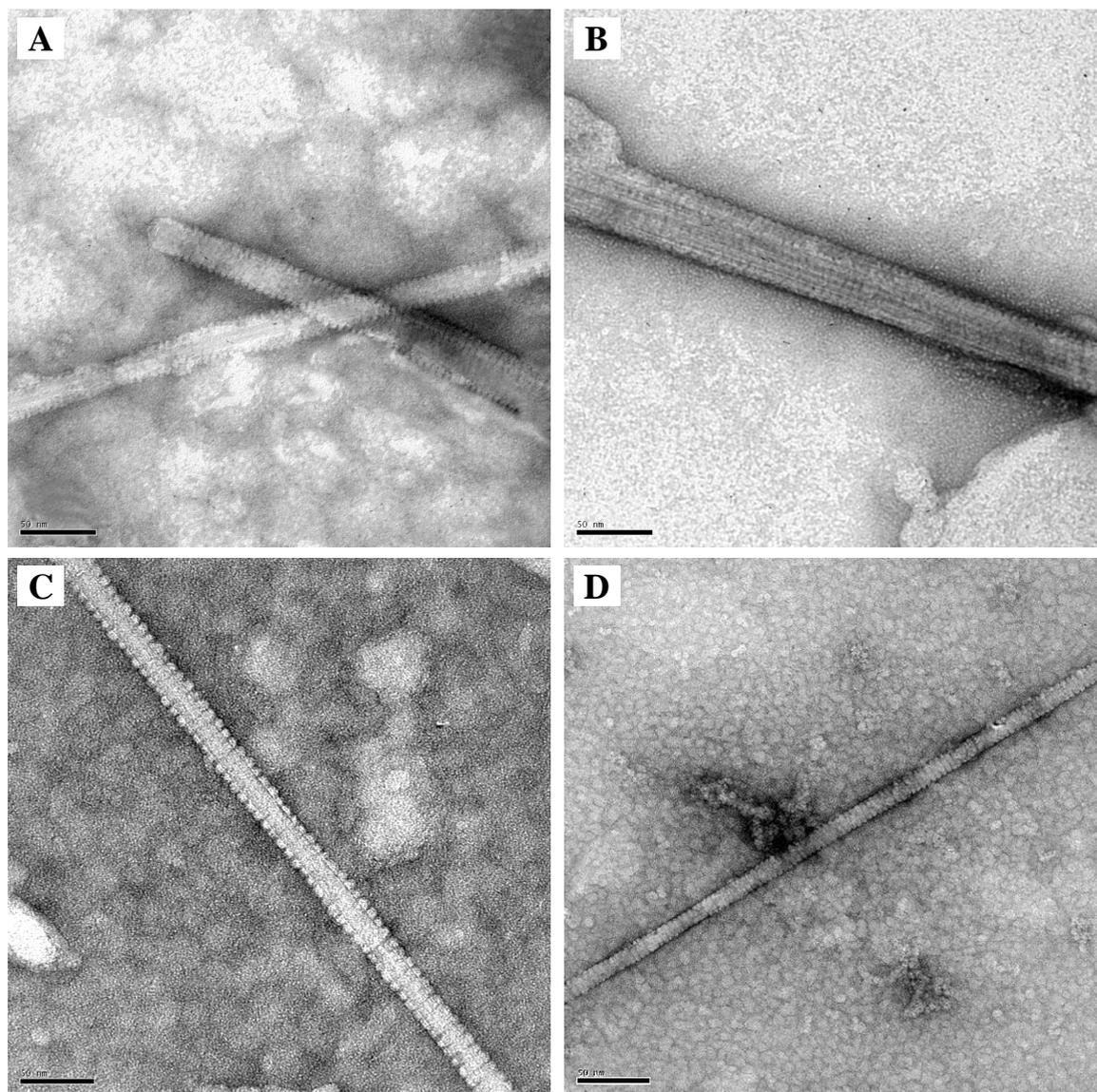
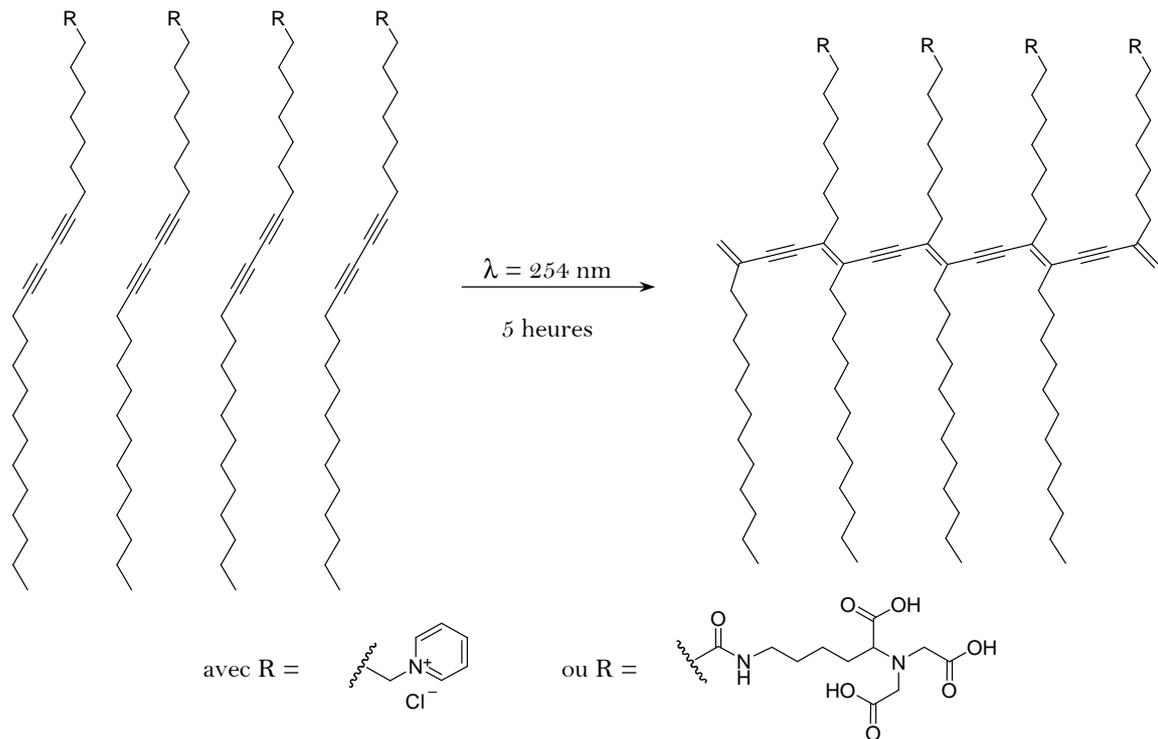


Figure II-5 : MWNTs entourés des différents lipides avant polymérisation ; A : CTP **II-5** ; B : PCP **II-8** ; C : NTA_{sat} **II-4b** ; D : NTA_{poly} **II-4a** ; Echelle = 50 nm

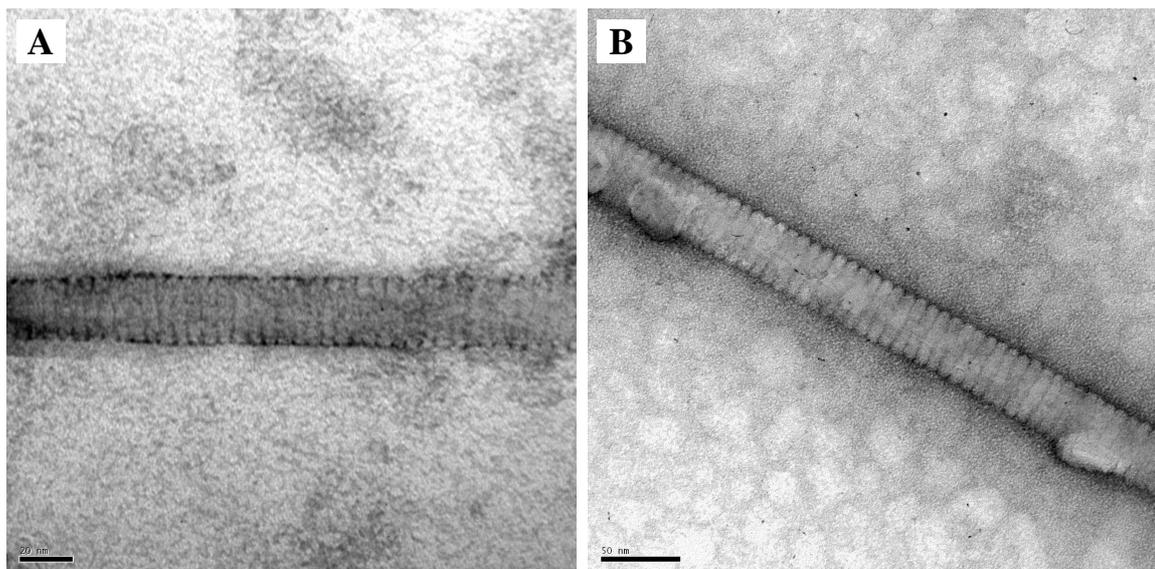
La Figure II-5 représente les clichés MET de nanotubes recouverts des différents lipides de la famille pyridinium (photos A et B) et NTA (photos C et D). Ces photos attestent de l'organisation des lipides autour des nanotubes.

II.3.2. Polymérisation

Suite aux étapes d'auto-organisation des lipides sur les nanotubes de carbone et aux étapes de lavages, il reste à polymériser les structures qui incorporent deux motifs acétyléniques contigus (**II-4a** et **II-8**). L'étape clé de la polymérisation se fait par irradiation à 254 nm.⁸³ La réaction s'opère en absence d'amorce chimique qui pourrait contaminer le milieu.

Schéma II-8 : Principe de la polymérisation des lipides PCP et NTA_{poly}

La polymérisation entre des motifs diacétyléniques est linéaire. Chaque lipide peut polymériser avec deux molécules voisines. Par conséquent, la polymérisation forme un lien plus ou moins continu entre les lipides auto-assemblés, induisant une rigidification de l'intérieur de la nanobague. Par la suite, l'intégrité des échantillons est vérifié par MET. Les clichés de microscopie (Figure II-6) montrent que la polymérisation n'induit pas de changement de structure des stries à la surface des nanotubes.

Figure II-6 : MWNTs entourés des lipides polymérisables après irradiation ; A : PCP ; B : NTA_{poly} ; Echelle = 20 et 50 nm (A et B)

L'étape suivante repose sur l'imprégnation du sel métallique pour former les nanoparticules à la surface des nanotubes.

III. Interaction de sels métalliques avec les nanotubes et formation de nanoparticules

III.1. Méthode d'imprégnation

Pour la première étape de déposition de nanoparticules sur les nanotubes de carbone, nous avons choisi d'utiliser la méthode d'imprégnation (*cf* Introduction). Ce système a l'avantage de ne pas perturber les propriétés catalytiques du métal, contrairement aux systèmes faisant intervenir une encapsulation dans une matrice organique.^{84,85}

Typiquement, les nanotubes fonctionnalisés et le sel métallique sont mélangés avec des concentrations massiques équivalentes (0,2 mg/mL) dans de l'eau. Pour notre étude, plusieurs sels ont été utilisés : H_2PtCl_6 , $Pt(NH_3)_4Cl_2$, $Pd(NH_3)_4Cl_2$ et $Pd(CH_3CN)_2Cl_2$. Le milieu est agité pendant une journée afin de forcer l'interaction des ions métalliques avec les fonctions carboxylate ou pyridinium recouvrant la surface des nanotubes.

L'étape suivante consiste à réduire les sels métalliques pour former les nanoparticules correspondantes sur la surface des nanotubes.

III.2. Formation et caractérisation des nanoparticules

Il existe plusieurs voies d'obtention de nanoparticules métalliques par réduction des sels correspondants. La plus répandue est la réduction par un agent chimique car elle est la plus accessible et la moins coûteuse. Le procédé par irradiation^{7,12,86,87} est moins employé mais présente cependant plusieurs avantages. Il permet un meilleur contrôle de la réduction des ions métalliques, sans ajout d'agents réducteurs qui pourraient donner des produits secondaires non désirés. De plus, la réaction est rapide et ajustable car il existe une corrélation entre le nombre d'équivalents d'espèces réductrices produites et le temps d'irradiation. Un autre avantage est l'obtention d'espèces réduites réparties uniformément dans la solution.

Les deux approches ont été abordées en parallèle. Les expériences de réduction par irradiation ont été menées en collaboration avec Hynd Remita du Laboratoire de Chimie Physique de l'Université Paris XI.

III.2.1. Réduction chimique

Cette méthode présente l'avantage de pouvoir être effectuée de manière relativement simple. Dans la littérature, de nombreuses équipes utilisent ce procédé en association avec la méthode d'imprégnation. Les principaux agents réducteurs utilisés sont $NaBH_4$ et N_2H_4 .^{8,19,22,42,44-47,88}

L'homogénéité des nanoparticules créées peut varier en fonction de plusieurs paramètres comme le pH ou la température,^{32,42,49,53,56,89} mais aussi l'introduction éventuelle d'un gaz (H_2 ^{11,39,43,50,55,90} ou CO ⁸⁰). Quelles que soient la méthode et les conditions utilisées, il ne semble pas exister de paramètres précis conditionnant l'obtention de petites nanoparticules avec une fine distribution en taille.

Dans nos expériences de mise au point, nous avons fait varier les conditions en jouant simplement sur la nature de l'agent réducteur ($NaBH_4$ ou N_2H_4) au contact d'une solution de nanotubes fonctionnalisés et incubés au préalable avec un sel de platine ($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$).

A l'issue de l'étape de réduction, les clichés de microscopie (Figure II-7) montrent bien la formation de nanoparticules. Ces dernières, de petite taille, ont un diamètre moyen de 1,3 nm, mais ont tendance à s'agglomérer sous forme de clusters. De plus, une partie non négligeable ne s'accroche pas sur les nanotubes et reste en solution. Ces résultats étant peu satisfaisants, nous avons concentré notre étude sur la formation de nanoparticules par irradiation.

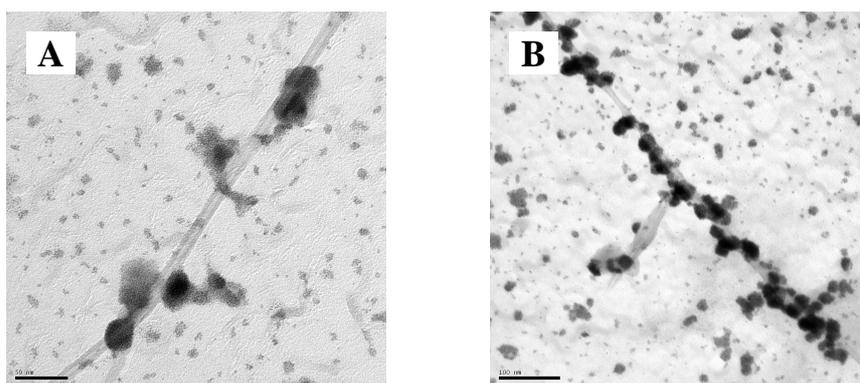


Figure II-7 : Réduction d' H_2PtCl_6 par N_2H_4 sur des nanotubes recouverts du lipide CTP, NT-CTP (A) et du lipide PCP, NT-PCP (B) (Echelle=50 nm)

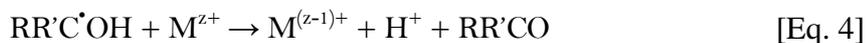
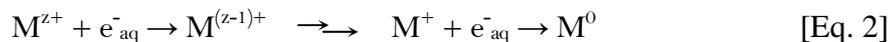
III.2.2. Réduction par irradiation

La radiolyse permet de réduire *in situ* une solution aqueuse d'ions métalliques seule^{91,92} ou imprégnée sur différents supports^{93,94} (dont les nanotubes de carbone^{7,86}) sans addition d'un autre réactif. Les ions métalliques réagissent avec les espèces primaires créées (Eq. 1) lors de la radiolyse du milieu aqueux^{95,96} :



Ce sont principalement les électrons solvatés (e_{aq}^-) qui, par une succession de réactions (Eq. 2), réduisent les cations métalliques M^{z+} jusqu'à M^0 . Afin d'éviter l'oxydation concomitante des nanoparticules créées par les radicaux HO^\bullet , un agent intercepteur de radicaux est ajouté avant irradiation. Un choix judicieux d'intercepteur (l'isopropanol par

exemple) conduit à la formation de radicaux secondaires (Eq. 3) eux-mêmes réducteurs des sels métalliques (Eq. 4).



Il existe plusieurs types de rayonnements permettant de générer des radicaux pour la réduction d'ions métalliques. Ceux-ci dépendent de la source d'irradiation utilisée. Nous avons effectué la réduction des sels métalliques avec deux sources différentes, l'une émettant des rayons γ et l'autre, un faisceau d'électrons. La première, utilisée pour obtenir une irradiation en continu, conduit à des concentrations cumulées croissantes d'espèces réactives tandis que leurs concentrations instantanées restent faibles. La seconde produit une irradiation pendant une durée très courte, générant des espèces réactives en concentrations relativement élevées.

III.2.2.a. Irradiation à faible débit de dose

La source que nous avons utilisée est une source panoramique de cobalt ^{60}Co . Son débit maximal est de 2,7 kGy.h⁻¹. Celui-ci diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la source. Cette source émet un rayonnement ionisant γ qui permet la réduction des ions métalliques.

III.2.2.b. Irradiation à haut débit de dose

Les irradiations à haut débit de dose sont effectuées par un accélérateur d'électrons industriel de la société IONISOS. Cet accélérateur délivre des électrons très énergétiques (10 MeV) dans un train d'impulsions avec un débit de dose de l'ordre de 8 MGy.h⁻¹. Dans ce cas, la réduction ne nécessite que quelques secondes alors qu'elle demande plusieurs minutes avec une irradiation par les rayonnements γ de la source au ^{60}Co . Les échantillons balayés par le faisceau d'électrons sont irradiés de façon homogène sur une épaisseur de 2 cm.

Après la réduction des sels métalliques, les nanocomposites à bases de nanotubes de carbone sont caractérisés. Nous avons choisi l'ICP-MS (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*) qui présente l'avantage de pouvoir, à la fois, déterminer les différents éléments présents dans un échantillon ainsi que les quantifier finement. Ces mesures ont été effectuées en collaboration avec Agnès Hagège du Laboratoire de Chimie Analytique et Minérale de l'Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien à Strasbourg.

III.2.3. Caractérisation par ICP-MS

L'ICP-MS consiste en un couplage entre deux dispositifs : une torche à plasma qui permet de vaporiser, atomiser et ioniser complètement la plupart des éléments et un spectromètre de masse pour séparer et détecter ces ions.

Cette technique permet par conséquent la différenciation des isotopes d'un même noyau ainsi que la quantification de ces derniers par rapport à un échantillon de référence externe. Il sera ainsi possible de déterminer, pour un lot de nanotubes fonctionnalisés donné, quel métal se trouve sur leur surface et en quelle quantité.

Les échantillons sont préparés par dissolution dans un mélange d'acides ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$) à 180°C pendant 24 heures et sont ensuite dilués par ajout d'eau ultra pure (Milli-Q) avant d'être injectés dans l'appareil par l'intermédiaire d'un nébuliseur pneumatique concentrique ($1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$).

La quantification des métaux a été réalisée par étalonnage externe. Les gammes d'étalonnage réalisées sont $50 - 300 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans le cas du platine et $5 - 80 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ dans le cas du palladium. Les données ont été acquises sur un ion spécifique par sélection de l'isotope le plus abondant pour chaque métal, *i.e.* ^{195}Pt et ^{106}Pd .

Les spectres obtenus reflètent l'abondance isotopique naturelle des différents métaux utilisés :

- Pt : 190 : 0,01% ; 192 : 0,79% ; 194 : 32,9% ; 195 : 33,8% ; 196 : 25,3% ; 198 : 7,2%
- Pd : 102 : 1,02% ; 104 : 11,14% ; 105 : 22,33% ; 106 : 27,33% ; 108 : 26,46% ; 110 : 11,72%

Nous présenterons nos travaux en fonction des différents sels métalliques étudiés : ceux de platine puis ceux de palladium. La mise au point de la méthode générale de croissance des nanoparticules a été effectuée sur un sel de platine.

III.3. Nanoparticules de platine

Le platine est un catalyseur de choix pour les piles à combustibles. Nous avons en premier lieu utilisé ce métal pour évaluer sa capacité à s'organiser sur les nanotubes fonctionnalisés.

III.3.1. Mise au point

Dans un premier temps, nous avons dû déterminer quelles étaient les conditions optimales pour obtenir un agencement de nanoparticules permettant de concevoir un nano-objet catalytique efficace. Une bonne efficacité nécessite des nanoparticules de petit diamètre avec une distribution fine en taille et réparties de façon homogène sur les nanotubes.

La concentration, la nature du sel, la dose, la source d'irradiation ainsi que la préparation de l'échantillon font partie des paramètres sur lesquels il est possible d'agir pour optimiser la déposition.

Nous avons donc mené cette première étude en parallèle sur deux sels de platine ($\text{H}_2\text{PtCl}_6, 6\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$) en interaction avec les nanotubes fonctionnalisés de la famille pyridinium (**II-5** et **II-8**) et utilisé la source d'irradiation γ comme moyen de réduction.

Les travaux antérieurs effectués sur la déposition de nanoparticules sur les nanotubes mettent en évidence que le temps d'incubation entre le sel métallique et les nanotubes est important pour forcer les interactions entre les ions et les groupes fonctionnels à la surface des nanotubes.⁴⁴ Pour le reste de notre étude, un temps d'incubation supérieur à 12 heures a été fixé. L'étape d'irradiation, quant à elle, a été effectuée en présence d'isopropanol (capteur de radicaux) à une concentration de 0,01 M et après dégazage à l'argon pendant 20 minutes.

Dans le but d'ajuster la quantité de sel introduite, nous avons effectué une gamme de concentration en sel pour une concentration fixe en nanotubes fonctionnalisés. Cette concentration a été déterminée par spectroscopie d'absorption.

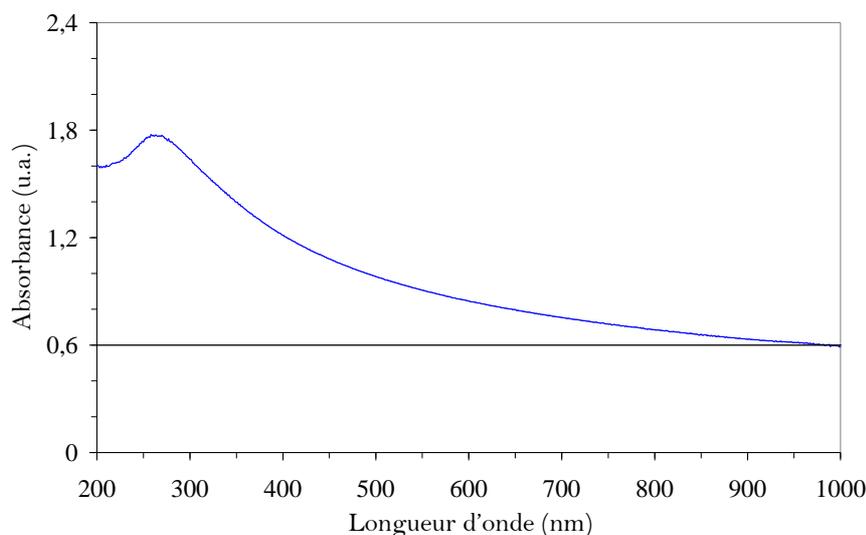


Figure II-8 : Spectre UV-Vis de MWNT-PCP

Les nanotubes fonctionnalisés étant solubles en milieu aqueux, leur concentration peut être reliée à leur absorbance par la loi de Beer-Lambert. Étant donné que seuls les nanotubes absorbent dans le proche infrarouge nous nous sommes placés à une longueur d'onde de 1000 nm pour calibrer les concentrations des différentes solutions. Nous avons fixé comme valeur de référence une absorbance de 0,6 (Figure II-8). Cette valeur correspond à une concentration massique moyenne de $0,2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ en nanotubes fonctionnalisés.

Lors de ces expériences préliminaires, une dose d'irradiation approximative a été fixée pour chaque concentration massique en sel de platine. Suite à l'irradiation, les 12 échantillons préparés ont été visualisés en microscopie électronique à transmission. Les observations générales sur le recouvrement des nanotubes par les nanoparticules sont résumées dans le Tableau II-1.

Sels	$\text{H}_2\text{PtCl}_6, 6\text{H}_2\text{O}$ (518 g.mol^{-1})			$\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$ (352 g.mol^{-1})		
Conc (mg/mL)	0,01	0,10	1,0	0,01	0,10	1,0
Dose (kGy)	0,10	1,0	10	0,10	1,0	10
NT-CTP, II-5	Faible	Agrégation	Agrégation	Faible	Bon	Bon, mais sel en excès en solution
NT-PCP, II-8	Faible	Agrégation	Agrégation	Faible	Bon	Bon, mais sel en excès en solution

Tableau II-1 : Etude du recouvrement en fonction des différents paramètres influençant l'assemblage des nanoparticules

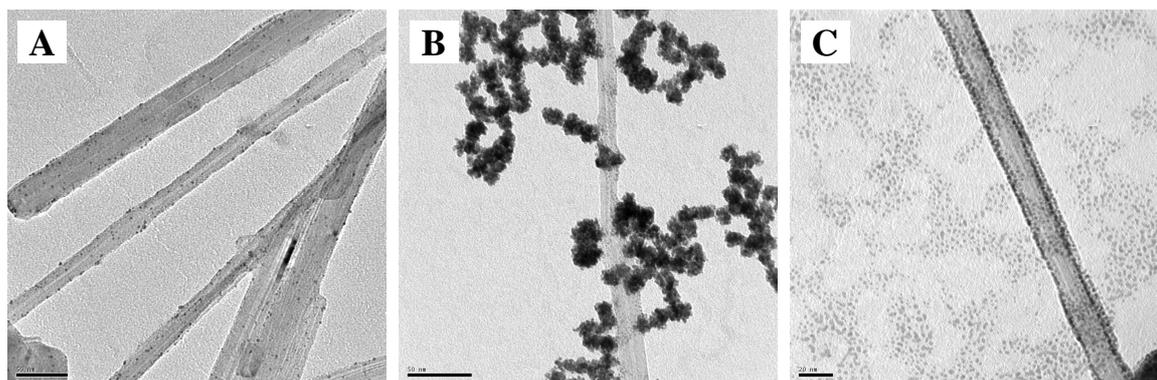


Figure II-9 : Clichés de MET des différents types d'assemblages non désirés ; A : faible ; B : agrégation ; C : bon mais sel en excès en solution.

Nous pouvons remarquer que, pour le sel $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$, seul un effet de concentration est observé, *i.e.* à faible concentration, un faible recouvrement est obtenu, tandis qu'à forte concentration un bon recouvrement est observé mais avec un excès de nanoparticules en solution. Pour le second sel ($\text{H}_2\text{PtCl}_6, 6\text{H}_2\text{O}$), un effet supplémentaire est constaté : pour des concentrations massiques en sel de platine équivalentes au cas précédent ($0,1$ et 1 mg.mL^{-1}) une agrégation des nanoparticules est observée. Ce phénomène peut s'expliquer par une dose d'irradiation trop forte.

La dose D nécessaire à la réduction totale d'une concentration C (mol.L^{-1}) d'un sel métallique de degré d'oxydation z peut être déterminé si le rendement radiolytique G est connu. Ce rendement est défini comme étant le nombre d'espèces formées ou consommées pour 100eV d'énergie déposée dans le milieu. La valeur maximale de la dose est évaluée pour

une solution contenant de l'isopropanol et pour un rendement maximal constant de 6,05 espèces pour 100 eV.⁹⁷

La dose D se définit comme :

$$D(\text{Gy}) = 1,6 \cdot 10^{-17} \times z \times \mathcal{N}a \times \frac{C}{G} \quad [\text{Eq. 5}]$$

Où $\mathcal{N}a$ désigne le nombre d'Avogadro ($6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

En conséquence, pour une concentration massique de $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, la dose théorique minimale devrait être de 615 Gy pour le sel $\text{H}_2\text{PtCl}_6, 6\text{H}_2\text{O}$ et de 905 Gy pour le sel $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$. Or, une dose de 1000 Gy a été utilisée. C'est ce large excès d'espèces réductrices générées qui engendre la formation d'agrégats pour le sel $\text{H}_2\text{PtCl}_6, 6\text{H}_2\text{O}$ (Photo B, Figure II-9).

A l'issue des premières expériences réalisées, nous avons entrepris une étude comparative des différents nanotubes fonctionnalisés avec le sel de platine $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$ à une concentration de $0,23 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ pour une dose d'irradiation de 2 kGy. En effet, il est intéressant, pour un même sel, d'observer l'influence de la présence du lipide et de sa nature sur le taux de recouvrement et l'auto-organisation des nanoparticules sur la surface des nanotubes. Pour plus de clarté, nous ne détaillerons ci-après que les résultats obtenus lors de réduction par faisceau d'électrons.

III.3.2. Synthèse et caractérisation des nanohybrides "Nanotube-Pt"

Les principaux essais de déposition de nanoparticules sur les nanotubes sont récapitulés dans le Tableau II-2.

Pour caractériser les différents échantillons, la microscopie électronique à transmission a été utilisée. Cette technique permet, sans ajout d'agent de contraste, une visualisation directe de l'échantillon. Ce dernier est centrifugé après irradiation pour enlever le surnageant, puis le culot est resuspendu dans de l'eau pure avant d'être déposé sur une grille de microscopie. A partir des clichés obtenus, il est possible d'évaluer l'organisation des nanoparticules à la surface des nanotubes. En analysant ces photos, nous avons aussi effectué une étude statistique afin de déterminer la distribution en taille des nanoparticules observées.

Seuls quelques nanocomposites seront testés en catalyse. Ces derniers seront analysés par ICP-MS qui permet d'analyser et de quantifier le métal présent. La quantité de métal présente sur l'échantillon est présentée comme un pourcentage de métal en masse par rapport à la masse de l'hybride "NT-(lipide)-NPs".

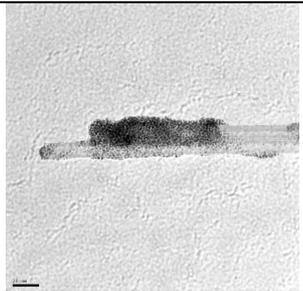
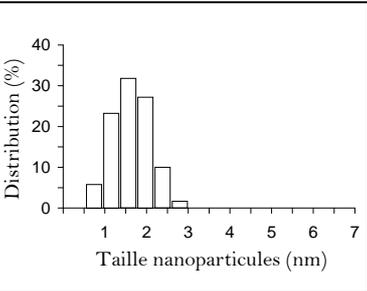
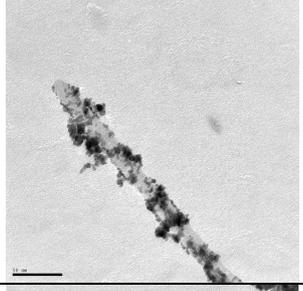
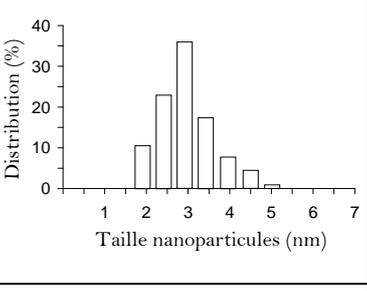
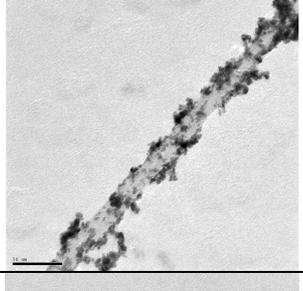
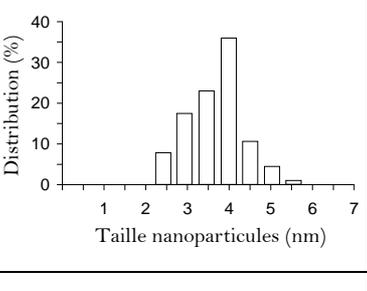
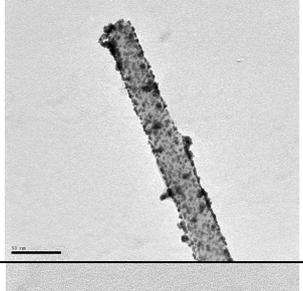
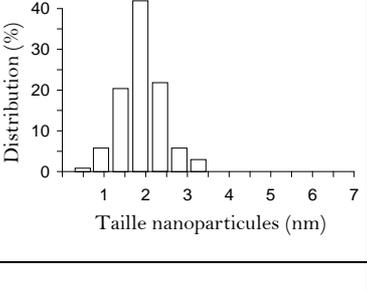
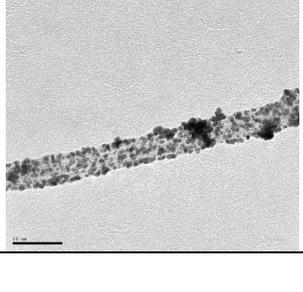
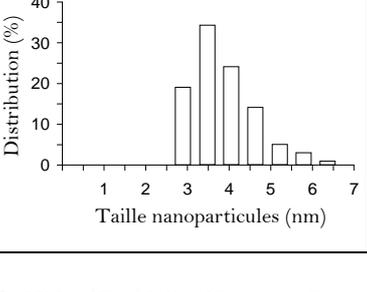
Analyse Echantillon	Image MET	Taille & Distribution (nm)	Recouvrement & Organisation
MWNT Natif + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$			Recouvrement faible avec 9,8% de Pt, dû à un décrochage partiel pendant le lavage et sans organisation.
MWNT-NTA _{sat} (II-4b) + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$			Recouvrement total avec 25,2% de Pt et une organisation peu homogène.
MWNT-NTA _{poly} (II-4a) + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$			Recouvrement total (ratio non mesuré) et une organisation peu homogène.
MWNT-CTP (II-5) + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$			Recouvrement total (ratio non mesuré) et une organisation homogène.
MWNT-PCP (II-8) + $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$			Recouvrement total avec 27,3% de Pt et une organisation homogène.

Tableau II-2 : Analyse des échantillons avec le sel $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$ réduit par faisceau d'électrons avec une dose de 2 kGy

Lorsque les nanotubes natifs sont mis en présence du sel de platine, une forte concentration de nanoparticules métalliques est observée à la surface des nanotubes après irradiation. Une explication à cet effet est la possibilité pour les nanoparticules d'interagir avec le système π de la surface de graphène constitutive de la paroi des nanotubes de

carbone. Cependant, cette interaction n'est pas assez forte pour résister à un lavage. En effet, si ces derniers sont centrifugés puis lavés, alors une diminution de la densité et de la répartition des nanoparticules est observée. L'analyse par ICP-MS confirme la présence de platine à la surface des nanotubes natifs (Figure II-10).

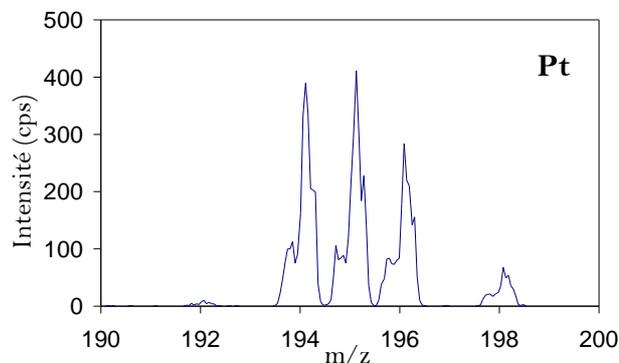


Figure II-10 : Spectre ICP-MS des MWNTs natifs en présence de nanoparticules de platine. Il représente les différents pics correspondant à la distribution isotopique du platine.

L'utilisation d'une référence externe a permis de déterminer que la quantité de platine représente environ 10% de la masse totale du nanohybride "MWNT Natif-NP". Dans ce cas précis, le platine ne recouvre pas de façon homogène la surface des nanotubes.

Par contre, une amélioration est notée quand les nanotubes sont recouverts des différents ligands. L'analyse par ICP-MS nous confirme en effet un taux de chargement en platine de 25% et 27% pour les nanotubes recouverts des lipides **II-4a** et **II-8** respectivement. Lorsque ces nanotubes habillés de nanoparticules sont lavés, la quantité de platine résiduelle est bien supérieure à celle correspondant aux nanotubes natifs. Cette différence de comportement suggère que les lipides sont impliqués dans la stabilisation des nanoparticules à la surface des nanotubes.

Du point de vue de l'homogénéité du recouvrement, les nanoparticules paraissent nettement moins organisées pour les nanotubes fonctionnalisés avec les lipides **II-4a** et **II-4b**. Il semblerait donc que la nature du lipide influe sur la manière dont les nanoparticules recouvrent la surface des nanotubes de carbone.

Quel que soit l'échantillon, la distribution en taille est relativement étroite. Par exemple, les nanotubes entourés du lipide **II-5** présentent une majorité de nanoparticules ayant un diamètre compris entre 1,4 et 2,3 nm. Dans le cas du lipide **II-4a**, une grande partie des nanoparticules possède un diamètre allant de 2,8 à 4,5 nm.

Dans un deuxième temps, les mêmes échantillons ont été réduits en utilisant la source d'irradiation γ . L'échantillon contenant les nanotubes natifs présente un comportement analogue à celui irradié par faisceau d'électrons. Par contre, une forte homogénéité de taille de nanoparticules apparaît quelle que soit la nature du lipide utilisé.

Une distribution fine est toujours observée mais le diamètre médian des nanoparticules semble plus faible avec une valeur de 1,9 nm pour les quatre lots de nanotubes.

Bien qu'aucune analyse par ICP-MS n'ait été effectuée, la comparaison des clichés avec les expériences précédentes permet de supposer un taux de chargement du même ordre de grandeur.

Nous avons poursuivi notre étude avec la déposition de nanoparticules de palladium. L'utilisation d'un autre métal noble est intéressante, aussi bien d'un point de vue catalytique que pour approfondir notre étude sur l'influence des paramètres mis en jeu lors de la croissance de nanoparticules sur les nanotubes.

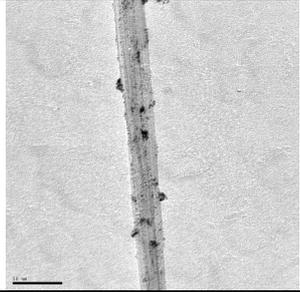
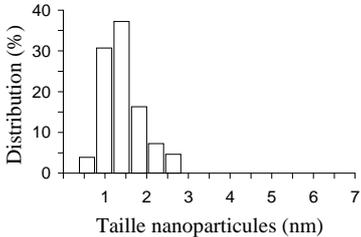
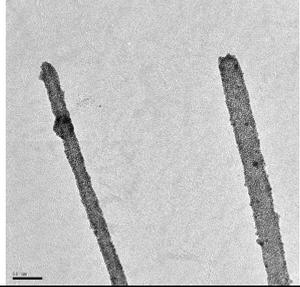
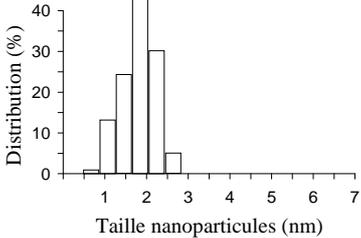
III.4. Nanoparticules de palladium

Le palladium est un métal de plus en plus étudié comme catalyseur pour les PACs. Bien que ses performances soient en général inférieures à celles du platine, il a l'avantage de ne pas être empoisonné par le CO et d'avoir un coût quatre fois moins élevé : il est en effet cinquante fois plus abondant que le platine. Il n'y a que peu d'articles qui décrivent l'organisation de palladium sur les nanotubes pour les PACs.^{73,98-101}

Nous avons mené cette étude en suivant le même principe que précédemment. Afin de vérifier l'influence de la nature du sel utilisé, des expériences ont été effectuées sur les deux sels de palladium suivants : $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$ et $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2, \text{H}_2\text{O}$.

Pour plus de clarté, nous ne détaillerons, dans le Tableau II-3 ci-après, que les résultats obtenus pour le sel de palladium ($\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$) réduit par faisceau d'électrons.

III.4.1. Synthèse et caractérisation des nanohybrides "Nanotube-Pd"

Analyse Echantillon	Image MET	Taille & Distribution (nm)	Recouvrement & Organisation
MWNT Natif + $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$			Recouvrement faible avec 4,1% de Pd et sans organisation.
MWNT-NTA _{sat} (II-4b) + $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$			Recouvrement total avec 11,35% de Pd et une organisation très homogène.

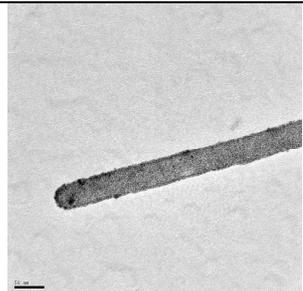
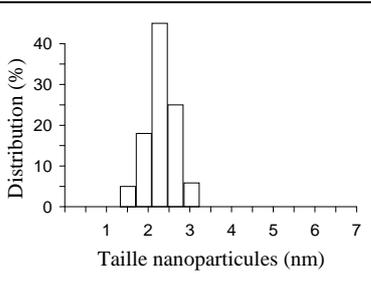
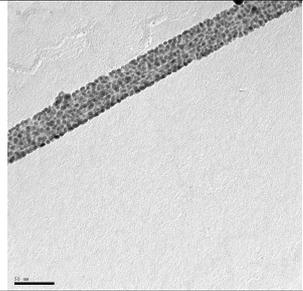
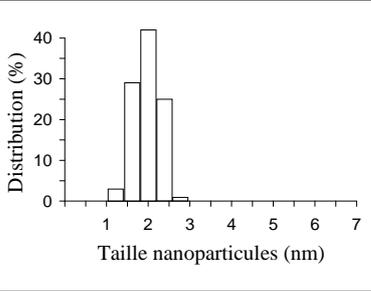
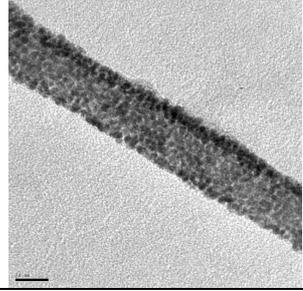
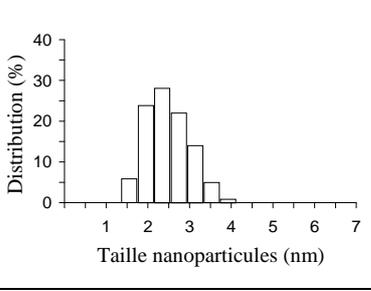
Analyse Echantillon	Image MET	Taille & Distribution (nm)	Recouvrement & Organisation
MWNT-NTA _{poly} (II-4a) + Pd(CH ₃ CN) ₂ Cl ₂			Recouvrement total (ratio non mesuré) et une organisation très homogène.
MWNT-CTP (II-5) + Pd(CH ₃ CN) ₂ Cl ₂			Recouvrement total (ratio non mesuré) et une organisation très homogène.
MWNT-PCP (II-8) + Pd(CH ₃ CN) ₂ Cl ₂			Recouvrement total avec 17,36% de Pd et une organisation très homogène.

Tableau II-3 : Analyse des échantillons avec le sel Pd(CH₃CN)₂Cl₂ réduit par faisceau d'électrons avec une dose d'irradiation de 2 kGy

La première observation qui peut être faite est que le palladium ne se fixe que très faiblement et de manière aléatoire sur la surface des nanotubes de carbone natifs. L'analyse par ICP-MS atteste de la présence de palladium (Figure II-11) ainsi que d'un faible taux de chargement, avec seulement 4% de palladium en masse par rapport aux nanotubes.

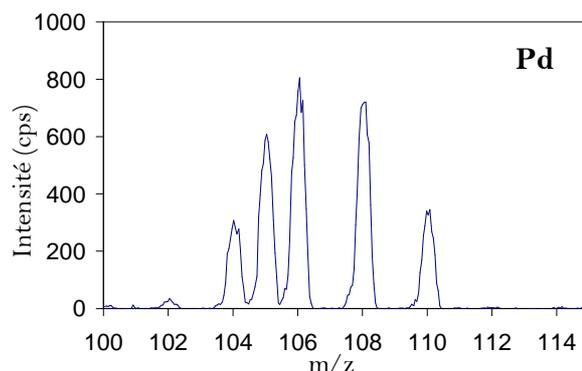


Figure II-11 : Spectre ICP-MS des MWNTs natifs en présence de nanoparticules de palladium. Il représente les différents pics correspondant à la distribution isotopique du palladium

Comme nous pouvons le remarquer dans le Tableau II-3, la présence des lipides comme habillage de surface des nanotubes induit un recouvrement fort et homogène de ces derniers par des nanoparticules de palladium. Très peu de différences sont observées entre les différents lipides, que ce soit du point de vue de la distribution en taille, du diamètre des nanoparticules ou du taux de chargement. En effet, la taille moyenne des nanoparticules est de 2,1 nm avec une déviation standard d'environ 0,6 nm. Des taux de chargement de 11,4% et 17,4% ont été mesurés pour les nanotubes fonctionnalisés respectivement avec les lipides **II-4b** et **II-8**.

Les mêmes tendances ont été observées pour les échantillons de nanotubes fonctionnalisés en présence du sel $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$ réduit cette fois par irradiation γ . Une légère différence intervient au niveau de la taille des nanoparticules avec un diamètre moyen légèrement supérieur de $2,7 \text{ nm} \pm 0,7 \text{ nm}$. Du point de vue du taux de chargement, des valeurs de 13% et 23% ont été mesurées pour les nanotubes habillés respectivement avec les lipides **II-4b** et **II-8**. Il a été noté qu'un taux de chargement du même ordre de grandeur (17%) a été mesuré pour les nanotubes nus. Il est difficile de donner une interprétation à cette valeur anormalement haute, cependant, les clichés de microscopie montrent que le recouvrement n'est pas homogène (existence d'agrégats).

Enfin, les mêmes expériences de réduction par irradiation γ ont été effectuées en utilisant le sel de palladium $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$, H_2O . Que ce soit pour les nanotubes natifs ou fonctionnalisés un recouvrement de la surface des nanotubes a pu être observé. Néanmoins, une différence apparaît entre les deux familles de lipides utilisées. Lorsque les nanoparticules sont formées sur les nanotubes recouverts des lipides pyridinium (**II-5** et **II-8**), ces dernières ne s'organisent pas de manière structurée à la surface des nanotubes (Figure II-12, Photo A). Au contraire, les nanotubes fonctionnalisés par les lipides NTA (**II-4a** et **II-4b**) induisent une répartition homogène et bien structurée des nanoparticules de palladium à la surface des nanotubes (Figure II-12, Photo B).

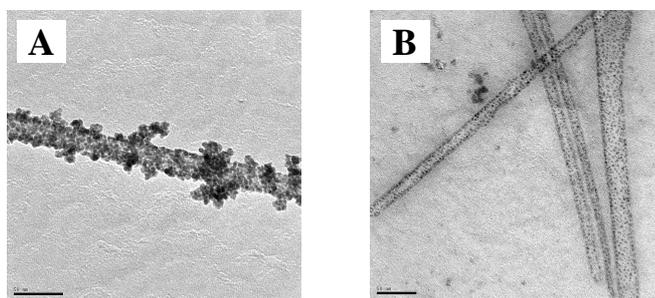


Figure II-12 : Exemples de clichés de microscopie d'échantillons résultant de l'interaction du sel $\text{Pd}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$, H_2O avec les nanotubes fonctionnalisés par les lipides **II-5** (A) et **II-4a** (B)

Nous avons également remarqué que la taille des nanoparticules est plus grosse pour les nanotubes portant des motifs pyridinium ($3,2 \pm 1 \text{ nm}$ en moyenne) que pour les

nanotubes portant des motifs NTA ($2 \pm 0,7$ nm en moyenne). Par ailleurs, bien qu'aucune analyse ICP-MS n'ait été effectuée, les clichés de microscopie permettent de supposer un taux de chargement du même ordre de grandeur que celui qui a déjà été mesuré pour les échantillons précédents.

III.5. Conclusion

L'approche initiale visée repose sur la déposition homogène de fines nanoparticules à la surface de nanotubes fonctionnalisés avec un lipide pouvant servir de lien entre les deux.

A travers les différentes expériences menées sur la déposition de nanoparticules métalliques (Pt et Pd), nous nous sommes aperçu qu'il n'y avait pas un facteur prédominant pour obtenir un fort taux de chargement en nanoparticules de taille contrôlée et une distribution en taille la plus petite possible. L'ensemble des facteurs a en effet une grande importance. Ainsi, aussi bien le type et la concentration du sel employé que la manière dont il est réduit ou encore la famille de lipide utilisé, interviennent pour parvenir à une bonne auto-organisation du métal. De ce fait, la principale différence entre les nanoparticules de platine et de palladium se trouve au niveau de l'homogénéité de leur organisation à la surface des nanotubes. La qualité de l'agencement de ces dernières est supérieure dans le cas du palladium.

Les meilleurs résultats ont été obtenus pour les nanotubes fonctionnalisés (NTA et pyridinium) avec des nanoparticules de palladium ayant comme précurseur le sel $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$ réduit par faisceau d'électrons.

De même, dans le cas du platine, nous avons réussi à obtenir, avec une bonne combinaison des différents éléments impliqués, des résultats tout à fait satisfaisants.

Dans le but de tester nos objets pour une application potentielle pour les piles à combustible, nous avons collaboré avec l'équipe de Bineta Keita et Louis Nadjo du Laboratoire de Chimie Physique de l'Université d'Orsay sur des expériences de catalyse pour l'oxydation du méthanol et de l'éthanol. L'étude par voltammétrie cyclique sera développée dans la section suivante.

IV. Application des nanohybrides à la catalyse

Les études électrochimiques sont conduites essentiellement par voltammétrie cyclique dans une cellule à trois compartiments, à température ambiante. La voltammétrie cyclique est une technique électroanalytique performante pour l'étude d'entités électroactives. Cette méthode permet d'enregistrer, au cours d'une seule expérience, la courbe d'intensité du courant en fonction du potentiel, sachant que le potentiel est lié au

temps par une relation linéaire. Toutes les mesures ont été réalisées avec une cellule électrochimique reliée à un générateur de tension et à un potentiostat. La cellule est composée de trois électrodes : l'électrode de travail sur laquelle est déposé l'échantillon, l'électrode de référence qui est au calomel saturé en KCl (SCE en anglais) et la contre-électrode qui est un disque de platine. L'électrode de référence et la contre-électrode sont séparées de la solution à étudier par un fritté de porosité variable.

IV.1. Nanocomposites à base de platine

Les essais d'électrocatalyse pour le platine ont été effectués sur les trois échantillons de nanotubes modifiés analysés par ICP-MS et décrits dans le Tableau II-2 (p. 63). Nous les appellerons par la suite **Natif-Pt**, **NTA_{sat}-Pt** et **PCP-Pt**. Pour ces assemblages, les nanoparticules ont été formées à partir de $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$, H_2O en utilisant le faisceau d'électrons comme source de réduction. Dans un premier temps, nous avons contrôlé le comportement du platine sur les nanotubes par rapport au platine seul.

IV.1.1. Propriétés électrochimiques du platine

La Figure II-13 montre un voltammogramme cyclique enregistré avec les nanotubes **NTA_{sat}-Pt** en présence de Nafion® à la surface de l'électrode de mesure dans H_2SO_4 0,5 M à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. La courbe aller (balayage initial dans le sens des potentiels négatifs, de + 0,200 V à - 0,280 V) comprend trois vagues de réduction (I, II et III) relativement proches dont les pics sont situés entre + 0,200 V et - 0,200 V, juste avant la réduction des protons en H_2 libre. Elles sont attribuées à l'adsorption d'atomes d'hydrogène sur les nanoparticules de platine à l'électrode. La courbe enregistrée au cours du balayage retour représente, successivement, la désorption de l'hydrogène (vagues III', II' et I') suivie de la formation d'oxydes de Pt (entre + 0,5 V et 1,2 V) juste avant l'oxydation de l'eau (non représentée sur la Figure II-13). La réduction de ces oxydes de platine (vague située à + 0,5 V), a lieu au cours du balayage permettant de ramener le potentiel à sa valeur initiale de + 0,200 V.

Les voltammogrammes enregistrés avec les nanotubes **PCP-Pt** et **Natif-Pt** montrent essentiellement les caractéristiques du platine, avec de petites différences au niveau des vagues d'adsorption ou de désorption d'atomes d'hydrogène. Notons que le nombre et les caractéristiques de ces vagues dépendent de la structure des faces cristallines qui composent les nanoparticules de platine. Par conséquent, cela signifie que le platine adsorbé à la surface des nanotubes conserve ses propriétés et est toujours actif en catalyse.

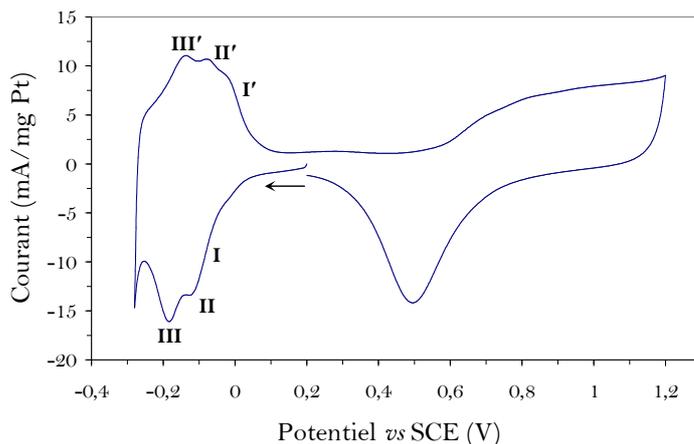
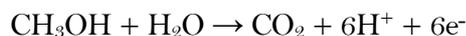
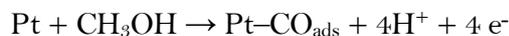


Figure II-13 : Voltammogramme cyclique des nanotubes fonctionnalisés avec le lipide NTA_{sat} **II-4b** et recouverts avec des nanoparticules de Pt (sel $\text{Pt}(\text{NH}_3)_4\text{Cl}_2$, H_2O réduit par faisceau d'électrons) dans une solution de H_2SO_4 (0,5 M) à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

IV.1.2. Exemple d'application : électrocatalyse de l'oxydation du méthanol

La Figure II-14 représente un voltammogramme cyclique enregistré, à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, avec les nanotubes $\text{NTA}_{\text{sat}}\text{-Pt}$ dans une solution aqueuse à 0,5 M en H_2SO_4 et à 0,5 M en méthanol. Il a l'allure classique des voltammogrammes représentant l'oxydation du méthanol. En effet, il est admis que l'oxydation du méthanol sur platine comporte les étapes suivantes :

Pic I :



Pic II :

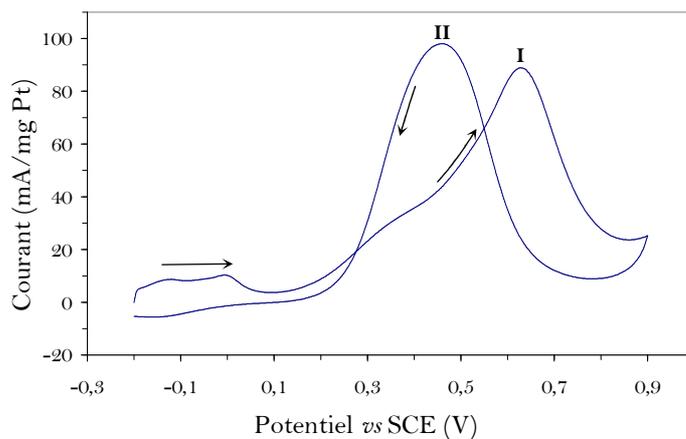


Figure II-14 : Voltammogramme cyclique de l'oxydation du méthanol par les nanotubes $\text{NTA}_{\text{sat}}\text{-Pt}$ dans une solution aqueuse d' H_2SO_4 (0,5 M) et de méthanol (0,5 M) à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

La vague I (courbe aller) est attribuée à l'oxydation du méthanol en CO_2 . Mais au cours de cette réaction, il se forme des espèces intermédiaires telles que CO qui s'adsorbent sur le platine (il est admis que CO est l'espèce majoritaire). L'oxydation de ces produits a lieu au cours du balayage retour (vague II). Pour évaluer l'efficacité de l'électrode vis-à-vis de l'oxydation du méthanol, les principaux paramètres suivants sont utilisés :

- la valeur du potentiel E_{onset} . C'est le potentiel nécessaire au démarrage de l'oxydation du méthanol (vague I) : plus ce potentiel est faible, plus l'oxydation se fait facilement.
- les potentiels E_f et E_b . Ils correspondent respectivement aux courants d'oxydation maximum des vagues aller et retour (potentiels des vagues I et II).
- les courants I_f et I_b . Ils correspondent respectivement aux courants d'oxydation maximum des vagues aller et retour (courants des vagues I et II).
- le rapport I_f/I_b . Les conditions optimales correspondent à un courant maximum obtenu à un potentiel le plus faible possible. Le rapport I_f/I_b mesure le taux de conversion du méthanol en CO_2 au cours du balayage aller (vague I) puisque nous avons vu plus haut que les espèces intermédiaires sont oxydées au cours du balayage retour (vague II). Par conséquent, le rapport optimal est celui qui est le plus élevé.

Le Tableau II-4 rassemble ces différents paramètres pour les trois types de nanotubes **NTA_{sat}-Pt**, **PCP-Pt**, **Natif-Pt** et quelques valeurs clés de la littérature pour des systèmes comparables.^{20,98,102,103} En résumé, on constate que les potentiels (E_{onset} , E_f et E_b) des trois échantillons sont en général plus faible que ceux rapportés dans la littérature. Cela signifie que dans notre étude, les cycles catalytiques requièrent moins d'énergie pour être effectués. De plus, les courants I_f générés, pour une même vitesse de balayage et par milligramme de platine, sont plus importants ou du même ordre de grandeur que ceux de la littérature. A notre connaissance, dans des conditions expérimentales proches des nôtres, seule l'équipe de Yuen et *coll.* a rapporté une valeur de I_f/I_b plus favorable vis-à-vis de la quantité de CO produite.⁹⁸

Enfin, un paramètre important à prendre en compte est la stabilité des matériaux. Elle a été étudiée en observant la stabilité du courant au cours de multiples cycles effectués en continu. Parmi les trois échantillons, les nanotubes **Natif-Pt** se sont révélés les moins stables. Cependant, malgré une bonne tenue pendant une centaine de cycles, tous ces matériaux présentent un empoisonnement progressif. Ceci est caractéristique des catalyseurs à base de Pt seul.

Electrode	^a E _{onset} , mV / SCE	^a E _f , mV / SCE	^a E _b , mV / SCE	^a I _f , mA / mg de Pt	^a I _f / ^a I _b	Réf.
Natif-Pt	162	647	490	284	0,89	Ce travail
NTA_{sat}-Pt	120	628	462	85	0,89	Ce travail
PCP-Pt	140	647	450	29	0,90	Ce travail
MWNT-Pt	204	644	nd	96 (24) ^b	1,42	98
MWNT-Pt	> 200	660	420	253 (80) ^{b, c}	1,22	103 ^d
MWNT-Pt	> 200	740	530	253 (50) ^b	0,88	20
MWNT-Pt	> 400	800	600	156 (78) ^b	0,85	102

^a E_{onset} : potentiel nécessaire au courant de démarrage du courant faradique ; E_f : potentiel du pic de la vague aller ; E_b : potentiel du pic de la vague retour ; I_f : intensité du courant du pic de la vague aller ; I_b : intensité du courant du pic de la vague retour

^b Les valeurs entre parenthèses résultent de la réévaluation de celles qui les précèdent pour une concentration en MeOH égale à 0,5 M

^c Cette expérience a été réalisée avec H₂SO₄ 1 M

^d Une revue récente considère ce résultat comme le meilleur rapporté dans la littérature

Tableau II-4 : Caractéristiques voltammétriques de l'oxydation du méthanol (0,5 M) dans une solution de H₂SO₄ (0,5 M) à 50 mV.s⁻¹ et comparaison avec la littérature

IV.2. Nanocomposites à base de palladium

Les essais d'électrocatalyse pour le palladium ont été effectués sur six échantillons de nanotubes modifiés analysés par ICP-MS et utilisant le sel Pd(CH₃CN)₂Cl₂. Nous avons choisi de comparer dans cette étude les deux modes de réduction utilisés : le rayonnement γ (Tableau II-3, p. 65) et le faisceau d'électrons. Les échantillons de nanotubes seront par la suite dénommés **Natif-Pd- γ** , **NTA_{sat}-Pd- γ** , **PCP-Pd- γ** , **Natif-Pd-e**, **NTA_{sat}-Pd-e** et **PCP-Pd-e**. Dans ce cas aussi, nous avons vérifié, dans un premier temps, les propriétés des nanoparticules de palladium sur les nanotubes par rapport au palladium seul.

IV.2.1. Propriétés électrochimiques du palladium

Le voltammogramme (Figure II-15) réalisé avec les nanotubes **NTA_{sat}-Pd- γ** dans une solution de KOH (1 M) à 50 mV.s⁻¹ permet d'observer les vagues caractéristiques d'une électrode de palladium. Comme dans le cas du platine, la courbe aller (balayage initial dans le sens des potentiels négatifs de - 0,600 V à - 1,200 V) présente les vagues attribuées à l'adsorption de l'hydrogène. La courbe enregistrée au cours du balayage retour représente, successivement, la désorption de l'hydrogène suivie de la formation d'oxydes de palladium (vague mal définie et large entre - 0,4 V et 0,5 V), juste avant l'oxydation de l'eau. La réduction de ces oxydes (vague située à - 0,463 V) a lieu au cours du balayage permettant de ramener le potentiel à sa valeur initiale de - 0,600 V.

Les caractéristiques des électrodes, quels que soient les échantillons, sont relativement similaires aux caractéristiques du palladium seul et peuvent donc être utilisées pour des expériences de catalyse.

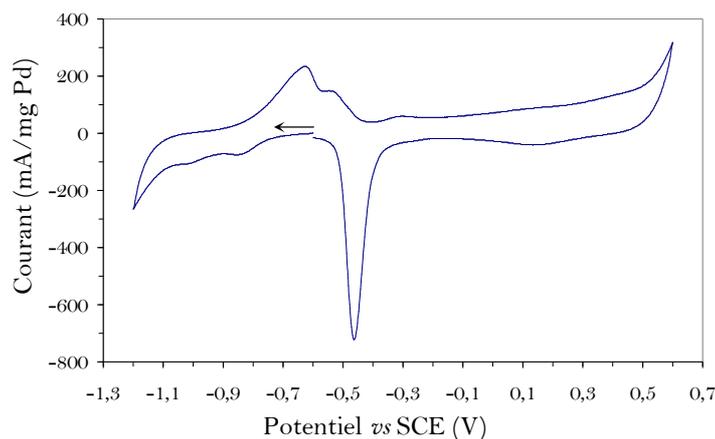


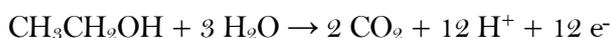
Figure II-15 : Voltammogramme cyclique des nanotubes fonctionnalisés avec le lipide NTA_{sat} **II-4b** et recouvert avec des nanoparticules de Pd (sel $\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})_2\text{Cl}_2$ réduit par faisceau d'électrons) dans une solution de KOH (1 M) à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$

IV.2.2. Exemple d'application : électrocatalyse de l'oxydation de l'éthanol

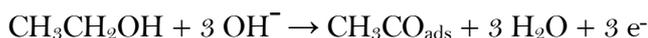
Le palladium a été testé pour l'oxydation de l'éthanol, car il n'est pas actif pour celle du méthanol en milieu acide. Par ailleurs, il a été démontré que les électrodes modifiées **Carbone-Pd** sont nettement plus efficaces que les électrodes **Carbone-Pt** pour l'oxydation de l'éthanol en milieu alcalin⁹⁹. L'oxydation de l'éthanol par le palladium en milieu alcalin présente plusieurs avantages par rapport à celle du méthanol sur platine. En effet, l'éthanol n'est pas toxique, peut être synthétisé en grosses quantités par fermentation de matières premières (contenant des sucres) et enfin, contient une plus forte densité d'énergie ($8,01 \text{ kWh}\cdot\text{kg}^{-1}$) que le méthanol. Quant au palladium, il est plus abondant dans les minerais que le platine.

La Figure II-16 illustre l'exemple d'un voltammogramme cyclique enregistré avec les nanotubes **NTA-Pd-e** à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ dans une solution aqueuse de KOH (1 M) et d'éthanol (1 M).

L'oxydation complète de l'éthanol s'écrit :



Cependant, en milieu alcalin, la séquence suivante est généralement admise :



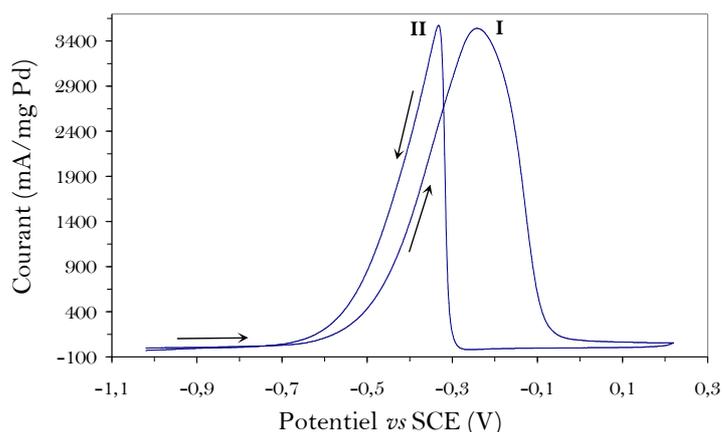


Figure II-16 : Voltammogramme cyclique de l'oxydation de l'éthanol par les nanotubes **NTA_{sat}-Pd-e** dans une solution de KOH (1 M) et d'éthanol (1 M) à 50 mV.s⁻¹

Le Tableau II-5 rassemble les principales caractéristiques (définies plus haut) obtenues à partir des voltammogrammes cycliques enregistrés pour tous les échantillons. Dans ce tableau figurent également les résultats les plus significatifs rapportés dans la littérature.^{99,104}

Electrode	^a E _{onset} , mV/SCE	^a E _f , mV/SCE	^a E _b , mV/SCE	^a I _f , mA. mg ⁻¹ de Pd	Réf.
Natif-Pd-γ	- 630	- 215	- 382	1200	Ce travail
NTA_{sat}-Pd-γ	-630	- 225	- 324	1430	Ce travail
PCP-Pd-γ	- 670	- 286	- 400	1045	Ce travail
Natif-Pd-e	- 564	- 242	- 451	364	Ce travail
NTA_{sat}-Pd-e	- 670	- 245	- 332	3540	Ce travail
PCP-Pd-e	- 640	- 251	- 330	1140	Ce travail
MWNT-Pd	nd	~ - 270	~ - 370	~140	99
C-Pd^c	- 649	- 269	~ - 380	853 ^b	104
CMS-Pd^d	- 709	- 269	~ - 360	2540 ^b	104

^aE_{onset} : potentiel nécessaire au courant de démarrage du courant faradique ; E_f : potentiel du pic de la vague aller ; E_b : potentiel du pic de la vague retour ; I_f : intensité du courant du pic de la vague aller ; I_b : intensité du courant du pic de la vague retour

^b Ces valeurs résultent de la réévaluation des valeurs de la littérature pour une vitesse de balayage de 50 mV.s⁻¹

^c C-Pd : Palladium sur noir de charbon

^d CMS : *Carbon MicroSpheres*

Tableau II-5 : Caractéristiques voltammétriques de l'oxydation de l'éthanol (1 M) dans une solution de KOH (1 M) à 50 mV.s⁻¹ et comparaison avec la littérature

En résumé, les électrodes recouvertes de nanotubes **NTA-Pd** sont nettement plus performantes, quelle que soit la source de réduction utilisée. Si les potentiels correspondant aux pics d'oxydation sont peu différents, les courants obtenus, eux, varient sensiblement. Leurs valeurs mettent en évidence une efficacité nettement accrue pour les nanotubes **NTA-Pd-e**. Ceux-ci sont environ trois fois plus performants que les nanotubes **PCP-Pd-e** et dix

fois plus que les nanotubes **Natif-Pd-e**. Par contre, si la même comparaison est effectuée pour les matériaux obtenus par irradiation γ , un écart plus faible est remarqué. Dans tous les cas, les nanotubes **NTA-Pd-e** restent ceux fournissant le courant le plus élevé pour une quantité donnée de palladium.

Ces matériaux ont également été testés par des cycles continus de $-1,02$ V à $-0,220$ V à 50 mV.s⁻¹. Au cours de la première vingtaine de cycles, toutes les caractéristiques du voltammogramme s'améliorent légèrement (courant et potentiel), puis le courant se stabilise ou diminue progressivement selon le matériau. La comparaison est faite sur le courant au bout de 200 cycles. Pour les matériaux obtenus par irradiation γ , le courant diminue et on obtient 75%, 83% et 72% du courant initial pour les nanotubes **Natif-Pd- γ** , **NTA_{sat}-Pd- γ** et **PCP-Pd- γ** respectivement. Ce pourcentage descend à 45% pour les nanotubes **Natif-Pd-e**, mais reste de manière surprenante à 94% et quasiment 100% pour les nanotubes **NTA-Pd-e** et **PCP-Pd-e** respectivement. Les systèmes de la littérature ont des stabilités comparables, mais les indications portent sur des durées courtes.

Du point de vue de la performance (courant généré par milligramme de palladium) par rapport aux données récentes de la littérature, les nanotubes **NTA-Pd-e** sont nettement meilleurs.^{99,104-107} En effet, nos hybrides **NTA-Pd-e** présentent une valeur de I_f 25 fois supérieure au meilleur système à base de nanotube de carbone décrit dans la littérature.⁹⁹ De même, un facteur 1,4 est observé par rapport au composite le plus performant connu à ce jour : des microsphères de carbone recouvertes de palladium.¹⁰⁴

V. Conclusion

La méthode que nous avons développée repose sur le principe d'imprégnation où les nanoparticules sont synthétisées directement sur le support. Nous avons adopté pour ce faire une réduction, soit par irradiation γ , soit par faisceau d'électrons. Nous avons également mis en évidence l'utilité de fonctionnaliser les nanotubes de carbone avec un lipide se fixant fortement sur leur surface et jouant le rôle d'accroche pour les nanoparticules. En effet, la présence des différents lipides synthétisés induit généralement un fort recouvrement de la surface des nanotubes ainsi qu'une organisation très homogène des nanoparticules.

Dans un deuxième temps, nous avons testé les différents nanoobjets obtenus en catalyse pour l'oxydation du méthanol (avec le platine) et de l'éthanol (avec le palladium). Les essais menés avec les nanotubes recouverts des nanoparticules de platine se sont avérés avoir des performances proches des résultats rapportés dans la littérature. Pour le palladium, les performances enregistrées pour les différents matériaux sont nettement supérieures à celles qui sont usuellement décrites. Un échantillon (**NTA-Pd-e**) se démarque par rapport aux

autres avec une intensité de courant 30% plus élevée que les meilleurs systèmes de la littérature.

Une interprétation possible de cette différence de comportement des nanoobjets synthétisés et des valeurs élevées de courant repose directement sur la morphologie des nanoparticules à la surface des nanotubes. En effet, ces dernières forment un réseau cristallin et il est possible que les faces cristallines accessibles à la catalyse correspondent à celles qui sont les plus actives (1 1 1 et 1 1 0).

L'obtention de ces systèmes conjugués, combinant des nanoparticules (Pt et Pd) et des nanotubes de carbone, présente un fort potentiel pour le développement de composites pour les piles à combustible.

VI. Bibliographie

- ¹ George, A. O. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 2636.
- ² Winter, M.; Brodd, R. J. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4245.
- ³ Service, R. F. *Science* **2007**, *315*, 172.
- ⁴ Ahmadi, T. S.; Wang, Z. L.; Green, T. C.; Henglein, A.; El-Sayed, M. A. *Science* **1996**, *272*, 1924.
- ⁵ Bessel, C. A.; Laubernds, K.; Rodriguez, N. M.; Baker, R. T. K. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 1115.
- ⁶ Liu, Z.; Ling, X. Y.; Guo, B.; Hong, L.; Lee, J. Y. *J. Power Sources* **2007**, *167*, 272.
- ⁷ Oh, S.-D.; Yoon, K. R.; Choi, S.-H.; Gopalan, A.; Lee, K.-P.; Sohn, S.-H.; Kang, H.-D.; Choi, I. S. *J. Non-Crystal. Sol.* **2006**, *352*, 355.
- ⁸ Prabhuram, J.; Zhao, T. S.; Tang, Z. K.; Chen, R.; Liang, Z. X. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5245.
- ⁹ Zhao, Y.; Fan, L.; Zhong, H.; Li, Y.; Yang, S. *Adv. Func. Mater.* **2007**, *17*, 1537.
- ¹⁰ Kongkanand, A.; Vinodgopal, K.; Kuwabata, S.; Kamat, P. V. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 16185.
- ¹¹ Waje, M. M.; Wang, X.; Li, W.; Yan, Y. *Nanotechnology* **2005**, *16*, S395.
- ¹² Tian, Z. Q.; Jiang, S. P.; Liang, Y. M.; Shen, P. K. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5343.
- ¹³ Gangeri, M.; Perathoner, S.; Centi, G. *Inorg. Chim. Acta* **2006**, *359*, 4828.
- ¹⁴ Cao, J.; Du, C.; Wang, S. C.; Mercier, P.; Zhang, X.; Yang, H.; Akins, D. L. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 735.
- ¹⁵ Wang, J. J.; Yin, G. P.; Zhang, J.; Wang, Z. B.; Gao, Y. Z. *Electrochim. Acta* **2007**, *52*, 7042.
- ¹⁶ Jeng, K.-T.; Chien, C.-C.; Hsu, N.-Y.; Yen, S.-C.; Chiou, S.-D.; Lin, S.-H.; Huang, W.-M. *J. Power Sources* **2006**, *160*, 97.
- ¹⁷ Frackowiak, E.; Lota, G.; Cacciaguerra, T.; Béguin, F. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 129.
- ¹⁸ Gregory G. Wildgoose, Craig E. B. Richard G. C. *Small* **2006**, *2*, 182.
- ¹⁹ Shaijumon, M. M.; Ramaprabhu, S.; Rajalakshmi, N. *Appl. Phys. Lett.* **2006**, *88*, 253105.
- ²⁰ Mu, Y.; Liang, H.; Hu, J.; Jiang, L.; Wan, L. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 22212.
- ²¹ Li, W.; Liang, C.; Zhou, W.; Qiu, J.; Zhou, Z. H.; Sun, G.; Xin, Q. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 6292.
- ²² Liu, Z.; Lin, X.; Lee, J. Y.; Zhang, W.; Han, M.; Gan, L. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 4054.
- ²³ He, Z.; Chen, J.; Liu, D.; Tang, H.; Deng, W.; Kuang, Y. *Mat. Chem. Phys.* **2004**, *85*, 396.
- ²⁴ Lin, Y.; Cui, X.; Yen, C. H.; Wai, C. M. *Langmuir* **2005**, *21*, 11474.
- ²⁵ Lin, Y.; Cui, X.; Yen, C.; Wai, C. M. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 14410.
- ²⁶ Li, W.; Wang, X.; Chen, Z.; Waje, M.; Yan, Y. S. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 15353.
- ²⁷ Georgakilas, V.; Gournis, D.; Tzitzios, V.; Pasquato, L.; Guldi, D. M.; Prato, M. *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 2679.
- ²⁸ Correa-Duarte, M. A.; Pérez-Juste, J.; Sánchez-Iglesias, A.; Giersig, M.; Liz-Marzán, L. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4375.
- ²⁹ Zhu, H.; Zhu, Y.; Yang, X.; Li, C. *Chem. Lett.* **2006**, *35*, 326.
- ³⁰ Georgakilas, V.; Tzitzios, V.; Gournis, D.; Petridis, D. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1613.
- ³¹ Liu, L.; Wang, T.; Li, J.; Guo, Z.-X.; Dai, L.; Zhang, D.; Zhu, D. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *367*, 747.
- ³² Li, J.; Tang, S.; Lu, L.; Zeng, H. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**.
- ³³ Taft, B. J.; Lazarek, A. D.; Withey, G. D.; Yin, A.; Xu, J. M.; Kelley, S. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12750.
- ³⁴ Ou, Y. Y.; Huang, M. H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2031.
- ³⁵ Sainsbury, T.; Stolarczyk, J.; Fitzmaurice, D. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 16310.
- ³⁶ Kim, B.; Sigmund, W. M. *Langmuir* **2004**, *20*, 8239.
- ³⁷ Lee, K. Y.; Kim, M.; Hahn, J.; Suh, J. S.; Lee, I.; Kim, K.; Han, S. W. *Langmuir* **2006**, *22*, 1817.
- ³⁸ Carrillo, A.; Swartz, J. A.; Gamba, J. M.; Kane, R. S.; Chakrapani, N.; Wei, B.; Ajayan, P. M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 1437.
- ³⁹ Yoon, B.; Wai, C. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17174.
- ⁴⁰ Ellis, A. V.; Vijayamohan, K.; Goswami, R.; Chakrapani, N.; Ramanathan, L. S.; Ajayan, P. M.; Ramanath, G. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 279.
- ⁴¹ Jiang, K.; Eitan, A.; Schadler, L. S.; Ajayan, P. M.; Siegel, R. W.; Grobert, N.; Mayne, M.; Reyes-Reyes, M.; Terrones, H.; Terrones, M. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 275.
- ⁴² Rahman, G. M. A.; Guldi, D. M.; Zambon, E.; Pasquato, L.; Tagmatarchis, N.; Prato, M. *Small* **2005**, *1*, 527.
- ⁴³ Yu, R.; Chen, L.; Liu, Q.; Lin, J.; Tan, K. L.; Ng, S. C.; Chan, H. S. O.; Xu, G. Q.; Hor, T. S. A. *Chem. Mater.* **1998**, *10*, 718.
- ⁴⁴ Wang, D.; Li, Z. C.; Chen, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15078.
- ⁴⁵ Tao, L.; Chen, G.; Mantovani, G.; York, S.; Haddleton, D. M. *Chem. Commun.* **2006**, 4949.
- ⁴⁶ Zhang, R.; Wang, X. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 976.

- 47 Kim, Y. T.; Ohshima, K.; Higashimine, K.; Uruga, T.; Takata, M.; Suematsu, H.; Mitani, T. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 407.
- 48 Tzitzios, V.; Georgakilas, V.; Oikonomou, E.; Karakassides, M.; Petridis, D. *Carbon* **2006**, *44*, 848.
- 49 Yoo, E.; Gao, L.; Komatsu, T.; Yagai, N.; Arai, K.; Yamazaki, T.; Matsuishi, K.; Matsumoto, T.; Nakamura, J. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18903.
- 50 Chen, J.; Wang, M.; Liu, B.; Fan, Z.; Cui, K.; Kuang, Y. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 11775.
- 51 Wang, Y.; Xu, X.; Tian, Z.; Zong, Y.; Cheng, H.; Lin, C. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 2542.
- 52 Lu, S.; Panchapakesan, B. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 888.
- 53 Li, X.; Hsing, I.-M. *Electrochim. Acta* **2006**, *51*, 5250.
- 54 Hull, R. V.; Li, L.; Xing, Y.; Chusuei, C. C. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1780.
- 55 Planeix, J. M.; Coustel, N.; Coq, B.; Brotons, V.; Kumbhar, P. S.; Dutartre, R.; Geneste, P.; Bernier, P.; Ajayan, P. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7935.
- 56 Kim, D. S.; Lee, T.; Geckeler, K. E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 104.
- 57 Ang, L. M.; Hor, T. S. A.; Xu, G. Q.; Tung, C. h.; Zhao, S.; Wang, J. L. S. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 2115.
- 58 Choi, H. C.; Shim, M.; Bangsaruntip, S.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9058.
- 59 Qu, L.; Dai, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10806.
- 60 Ye, J.-S.; Cui, H.-F.; Wen, Y.; Zhang, W. D.; Xu, G. Q.; Sheu, F.-S. *Microchim. Acta* **2005**, *152*, 267.
- 61 Day, T. M.; Unwin, P. R.; Wilson, N. R.; Macpherson, J. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10639.
- 62 Quinn, B. M.; Dekker, C.; Lemay, S. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6146.
- 63 Tsai, M.-C.; Yeh, T.-K.; Tsai, C.-H. *Electrochem. Commun.* **2006**, *8*, 1445.
- 64 Chen, X.; Li, N.; Eckhard, K.; Stoica, L.; Xia, W.; Assmann, J.; Muhler, M.; Schuhmann, W. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 1348.
- 65 Zhao, Y.; E, Y.; Fan, L.; Qiu, Y.; Yang, S. *Electrochim. Acta* **2007**, *52*, 5873.
- 66 Mubeen, S.; Zhang, T.; Yoo, B.; Deshusses, M. A.; Myung, N. V. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 6321.
- 67 Zhang, Y.; Franklin, N. W.; Chen, R. J.; Dai, H. *Chem. Phys. Lett.* **2000**, *331*, 35.
- 68 Bezryadin, A.; Lau, C. N.; Tinkham, M. *Nature* **2000**, *404*, 971.
- 69 Star, A.; Joshi, V.; Skarupo, S.; Thomas, D.; Gabriel, J. C. P. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 21014.
- 70 Kongkanand, A.; Kuwabata, S.; Girishkumar, G.; Kamat, P. *Langmuir* **2006**, *22*, 2392.
- 71 Chen, Y.; Liu, H.; Ye, T.; Kim, J.; Mao, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8696.
- 72 Han, X.; Li, Y.; Deng, Z. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1518.
- 73 Guo, D.-j.; Li, H.-l. *Electrochem. Commun.* **2004**, *6*, 999.
- 74 Kim, Y. T.; Uruga, T.; Mitani, T. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 2931.
- 75 Che, G. L.; Lakshmi, B. B.; Fisher, E. R.; Martin, C. R. *Nature* **1998**, *393*, 346.
- 76 Joo, S. H.; Choi, S. J.; Oh, I.; Kwak, J.; Liu, Z.; Terasak, O.; Ryoo, R. *Nature* **2001**, *412*, 169.
- 77 Bonard, J.-M.; Stora, T.; Salvetat, J.-P.; Maier, F.; Stöckli, T.; Duschl, C.; Forró, L.; de Heer, W. A.; Châtelain, A. *Adv. Mater.* **1997**, *9*, 827.
- 78 Richard, C.; Balavoine, F.; Schultz, P.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Science* **2003**, *300*, 775.
- 79 Aksay, I. A.; Trau, M.; Manne, S.; Honma, I.; Yao, N.; Zhou, L.; Fenter, P.; Eisenberger, P. M.; Gruner, S. M. *Science* **1996**, *273*, 892.
- 80 Surendran, G.; Tokumoto, M. S.; PenadosSantos, E.; Remita, H.; Ramos, L.; Kooyman, P. J.; Santilli, C. V.; Bourgaux, C.; Dieudonne, P.; Prouzet, E. *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 1505.
- 81 Muetterties, E. L.; Bleeke, J. R.; Wucherer, E. J.; Albright, T. *Chem. Rev.* **1982**, *82*, 499.
- 82 Hochuli, E.; Dobeli, H.; Schacher, A. *J. Chromato. A* **1987**, *411*, 177.
- 83 Jonas, U.; Shah, K.; Norvez, S.; Charych, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 4580.
- 84 Teranishi, T.; Hosoe, M.; Tanaka, T.; Miyake, M. *J. Phys. Chem. B.* **1999**, *103*, 3818.
- 85 Narayanan, R.; El-Sayed, M. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8340.
- 86 Wang, H.; Sun, X.; Ye, Y.; Qiu, S. *J. Power Sources* **2006**, *161*, 839.
- 87 Zheng, M.; Rostovtsev, V. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7702.
- 88 Svergun, D. I.; Shtykova, E. V.; Kozin, M. B.; Volkov, V. V.; Dembo, A. T.; Shtykova, E. V.; Bronstein, L. M.; Platonova, O. A.; Yakunin, A. N.; Valetsky, P. M.; Khokhlov, A. R. *J. Phys. Chem. B.* **2000**, *104*, 5242.
- 89 Gu, Y. J.; Wong, W. T. *Langmuir* **2006**, *22*, 11447.
- 90 Bayrakceken, A.; Kitkamthorn, U.; Aindow, M.; Erkey, C. *Scripta Mat.* **2007**, *56*, 101.
- 91 Remita, H.; Derai, R.; Delcourt, M. O. *J. Chim. Phys.* **1991**, *88*, 845.
- 92 Marignier, J.-L.; Belloni, J. *J. Chim. Phys.* **1988**, *85*, 21.
- 93 Amblard, J.; Platzer, O.; Ridard, J.; Belloni, J. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 2341.
- 94 Amblard, J.; Belloni, J.; Platzer, O. *J. Chim. Phys.* **1991**, *88*, 835.
- 95 Ferradini, C.; Pucheault, J. *Biologie de l'action des rayonnements ionisants*, **1983**.
- 96 Swallow, A. J. *Radiation chemistry. An introduction.*, **1973**.
- 97 Buxton, G. V.; Greenstock, C. L.; Helman, W. P.; Ross, A. B. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1988**, *17*, 513.
- 98 Yen, C. H.; Shimizu, K.; Lin, Y. Y.; Bailey, F.; Cheng, I. F.; Wai, C. M. *Energy & Fuels* **2007**, *21*, 2268.
- 99 Zheng, H. T.; Li, Y.; Chen, S.; Shen, P. K. *J. Power Sources* **2006**, *163*, 371.

-
- ¹⁰⁰ Gao, G.-Y.; Guo, D.-J.; Li, H.-L. *J. Power Sources* **2006**, *162*, 1094.
- ¹⁰¹ Krishna Kumar, M.; Ramaprabhu, S. *Inter. J. Hydro. Energy* **2006**.
- ¹⁰² Chen, C.-C.; Chen, C.-F.; Chen, C.-M.; Chuang, F.-T. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 159.
- ¹⁰³ Zheng, S. F.; Hu, J. S.; Zhong, L. S.; Wan, L. J.; Song, W. G. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11174.
- ¹⁰⁴ Xu, C.; Cheng, L.; Shen, P.; Liu, Y. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 997.
- ¹⁰⁵ Xu, C.; Shen, P. k.; Liu, Y. *J. Power Sources* **2007**, *164*, 527.
- ¹⁰⁶ Wang, H.; Xu, C.; Cheng, F.; Jiang, S. *Electrochem. Commun.* **2007**, *9*, 1212.
- ¹⁰⁷ Hu, F.; Ding, F.; Song, S.; Shen, P. K. *J. Power Sources* **2006**, *163*, 415.

CHAPITRE III

Premiers pas vers un nanobiosenseur

I. Préambule

Les biosenseurs – introduits dans les années 60¹ – sont des outils analytiques exploitant la remarquable spécificité de la reconnaissance biomoléculaire. Un biosenseur est défini comme un détecteur chimique incorporant un élément de reconnaissance biologique et un transducteur physico-chimique. L'élément senseur consiste en un matériel biologique comme une protéine (*i.e.* enzyme, anticorps, récepteur cellulaire), un oligonucléotide, un microorganisme ou un tissu biologique.^{2,3} Il peut être utilisé pour le suivi de processus biologiques ou pour reconnaître la présence et/ou la concentration d'un analyte spécifique en solution.

Dans le cas particulier auquel nous nous sommes intéressés, l'élément senseur est un antigène (Ag) ou un anticorps (Ac) intimement lié à un capteur incorporé dans un dispositif analytique (Schéma III-1). Nous parlons alors d'immunosenseur. Celui-ci, sur la base de la spécificité de l'interaction Ag/Ac, fournit un outil sensible et sélectif pour déceler un analyte cible. Il résulte de cette reconnaissance un changement mesurable d'une propriété de la solution. Le mode de transduction va alors convertir ce changement en un signal quantifiable (électrochimique, optique ou une mesure de masse ou de chaleur).

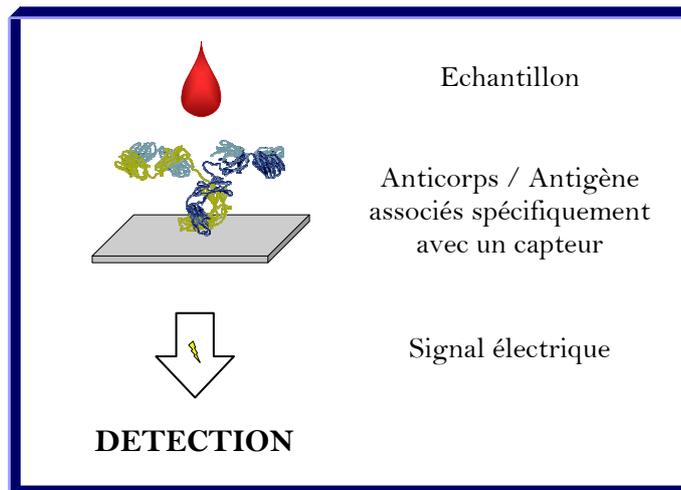


Schéma III-1 : Représentation du principe d'un immunosenseur

Les développements récents des biosenseurs s'inscrivent dans le domaine de la nanobiotechnologie, née de l'alliance des nanotechnologies et de la biologie. Ce secteur, en plein essor depuis une dizaine d'années, est un exemple parfait de l'approche *bottom-up* selon laquelle les chercheurs construisent de nouveaux instruments à partir d'un assemblage de briques nanométriques. Associées à la puissance de la microélectronique, les nanobiotechnologies laissent entrevoir d'innombrables applications pour identifier les nombreux composants du vivant, suivre le fonctionnement des organes au plus près et, enfin, traiter des pathologies.

Par exemple, les puces à ADN sont déjà capables de réaliser toutes les tâches d'identification génétique, que ce soit pour la médecine, l'agroalimentaire ou la surveillance bactérienne de l'environnement. Ce type de puces permet d'alléger le processus d'obtention des résultats des tests et d'intervention.

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés aux puces à protéines qui ont pour mission de détecter des protéines cibles parmi toutes celles présentes dans un organisme vivant. Traditionnellement, la détection de protéines s'effectue par des tests biologiques qui incluent des méthodes telles que ELISA (dosage immunoenzymatique sur support solide), RIA (dosage immunoanalytique par radiomarquage) et l'immunoaffinité. Cependant, la plupart de ces techniques requiert une instrumentation spécifique et des étapes d'analyse relativement longues. Par conséquent, rechercher de nouvelles méthodes de diagnostic, simples, sensibles, fiables, peu coûteuses et avec une réponse en temps réel est d'un intérêt considérable. Une des limites au perfectionnement de ces systèmes est l'obtention d'une bonne sensibilité pour une taille minimale. Cela permettrait de réaliser un biodétecteur portatif n'utilisant qu'une quantité infime de réactif (sang, sérum,...).

Une des méthodes principales pour pallier ce problème est d'optimiser la surface spécifique accessible à l'échantillon à analyser, où sont fixés les éléments senseurs, et ainsi d'augmenter leur concentration. Des développements récents ont été effectués en utilisant diverses nanoparticules telles que des particules de latex,⁴ d'or,⁵⁻⁸ et des nanotubes de carbone⁹⁻¹² pour immobiliser la biomolécule senseur. Les nanotubes présentent l'avantage, d'une part, d'avoir un ratio surface sur masse élevé (qui peut atteindre 1000 m²/g) et d'autre part une grande accessibilité de la surface pour l'immobilisation de biomolécules. De plus, compte tenu de leurs propriétés mécaniques et conductrices, ils constituent un matériau très prometteur pour le développement d'immunosenseurs ultrasensibles.

I.1. Nanotubes de carbone & biosenseurs

En 1998, Sadler et *coll.* ont découvert qu'il était possible d'immobiliser des biomolécules sur les nanotubes de carbone par une simple mise en contact.^{13,14} Ils ont caractérisé par microscopie leurs travaux mettant en jeu aussi bien des protéines métallées qu'un oligomère d'ADN (incluant des atomes d'iode et de platine) ou encore une enzyme β -lactamase. Peu de temps après, au laboratoire, Balavoine et *coll.* ont montré qu'il était possible d'obtenir une cristallisation hélicoïdale de protéines autour de nanotubes.¹⁵ Ils rapportent que des systèmes protéiques tels que la HupR et la streptavidine s'organisent spontanément en hélice le long des nanotubes de carbone. Cette organisation est rendue possible grâce aux interactions entre les domaines hydrophobes propres à la structure protéique et le feuillet graphite des nanotubes de carbone.

Cependant, les nanotubes natifs ne sont pas à même d'identifier spécifiquement des biomolécules. Il est donc important de doter les nanotubes d'une fonction de reconnaissance moléculaire, l'ensemble agissant comme transducteur de signal. Ils pourraient ainsi capter de manière spécifique des biomolécules provenant d'un échantillon biologique complexe. Le moyen le plus simple de conférer aux nanotubes ces propriétés d'identification est d'y fixer un anticorps, un antigène ou une enzyme, apte à interagir sélectivement avec la molécule cible.

Notre objectif est de construire un biosenseur à base de nanotubes de carbone. La stratégie envisagée repose sur l'accroche d'une protéine senseur à la surface des nanotubes. Plusieurs méthodes d'immobilisation de protéines ont été décrites dans la littérature. Les principales sont rapportées dans la section suivante.

I.2. Méthodes d'immobilisation de protéines

Pour immobiliser des protéines sur la surface d'un nanotube, deux approches peuvent être envisagées : soit le greffage direct d'une protéine à la surface des nanotubes, soit l'utilisation d'une molécule bifonctionnelle servant de relais entre la protéine et le nanotube (Figure III-1).

Les principaux travaux rapportés dans le domaine utilisent essentiellement le greffage direct de protéines. Dans ce cas, les fonctions acide carboxylique générées à la surface des nanotubes par traitement oxydant servent de point d'ancrage. Il est alors possible de fixer de manière covalente une protéine (côté N-terminal) sur la surface des nanotubes par couplage peptidique.¹⁶⁻²⁴ Le système inverse, *i.e.* des nanotubes portant des fonctions amine à leur surface, a également été décrit pour un couplage avec la partie C-terminale d'une protéine.^{25,26}

La deuxième approche repose sur une molécule possédant idéalement un groupement **A** permettant son accroche sur les nanotubes ainsi qu'une fonction, **B**, pour l'ancrage de la protéine senseur. Cette dernière peut se fixer à **B** de manière covalente ou non covalente.²⁷

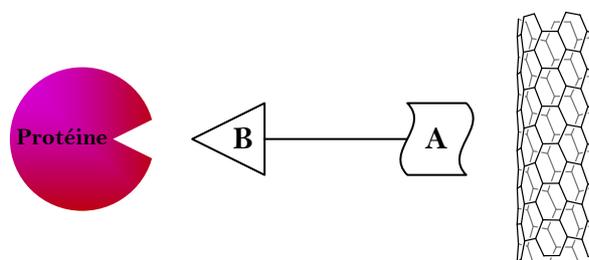


Figure III-1 : Fixation d'une protéine sur un nanotube *via* une molécule bifonctionnelle B—A

Avec un groupement **B** acide ou amine, plusieurs équipes décrivent l'utilisation d'une molécule possédant un groupement **A** pouvant se fixer de manière non covalente sur la

surface des nanotubes de carbone. **A** est généralement défini comme étant un motif pyrène pouvant interagir avec la surface des nanotubes par des interactions de π -stacking.²⁸⁻³³ Ce groupement **A** peut aussi être assimilé à une longue chaîne carbonée interagissant par des interactions hydrophobes avec la surface des nanotubes. L'emploi de Tween 20 activé a ainsi été décrit dans ce cas.³⁴⁻³⁶

Le groupement **B** peut également être utilisé pour interagir avec la protéine de manière non covalente. L'attrait pour cette méthode s'explique par les conditions douces utilisées qui devraient faciliter une immobilisation homogène ainsi que la possibilité de détacher la protéine et de pouvoir réutiliser le support.²⁷ Cependant très peu de travaux utilisent cette méthode.

L'équipe de Star a récemment rapporté l'utilisation d'un dispositif de détection électrique reposant sur un nanotube SWNT recouvert d'un polymère, le PEI (polyéthylène imine) dérivé par un motif biotine.³⁷ Les auteurs ont montré que l'ajout de streptavidine dans ce système engendrait un signal électrique correspondant à la reconnaissance bioaffine spécifique de la streptavidine par la biotine.

Les autres travaux sur l'adsorption non covalente de protéines ne font pas intervenir de molécules bifonctionnelles. Ils relatent simplement l'observation de protéines en mélange avec les nanotubes^{12,38-40} ou emprisonnées dans un surfactant⁴¹ autour des nanotubes.

La méthodologie usuellement suivie, après avoir validé l'immobilisation de la protéine d'intérêt à la surface des nanotubes, revient à adapter le nouvel hybride dans un système de détection. Les différentes méthodes de détection généralement adoptées sont détaillées dans la section suivante.

I.3. Méthodes de détection existantes

Plusieurs méthodes de détection à base de nanotubes ont été développées aussi bien pour la reconnaissance de protéines et d'enzymes que pour l'évaluation d'interactions anticorps/antigène. Actuellement, trois principaux modes sont utilisés : la microbalance à cristal de quartz (QCM : *Quartz Crystal Microbalance*), le transistor à effet de champ (FET : *Field Effect Transistor*) et l'électrochimie.

I.3.1. Microbalance à cristal de quartz

Cet instrument de haute précision permet de mesurer des variations de masse très faibles à la surface d'une électrode. Cet outil est basé sur les propriétés piézoélectriques du quartz. A une fréquence électrique appropriée, le quartz vibre dans un mode de résonance mécanique (vibration en cisaillement). Si la masse du dispositif est modifiée, un déplacement de la fréquence sera observé et cette variation pourra être reliée linéairement au changement

de masse. Par exemple, si la fréquence de résonance du quartz utilisé est 27 MHz, une variation de masse de 0,36 nanogrammes entraînera un glissement de fréquence de 1 Hz. Cette sensibilité est suffisante pour des expériences de biodétection.

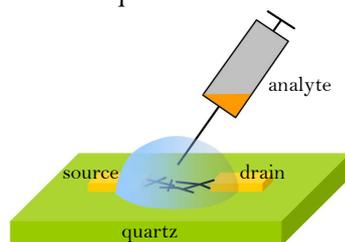


Figure III-2 : Schéma de principe de détection en solution sur une microbalance à quartz

Dai et *coll.* ont utilisé cette méthode avec succès pour mettre en évidence la fixation covalente d'une protéine ainsi que la reconnaissance spécifique d'un anticorps dirigé contre cette dernière (Figure III-2).³⁴ Leur travaux reposent sur le greffage covalent de la protéine A de *Staphylococcus aureus* sur du Tween 20 adsorbé à la surface des nanotubes. Cette protéine, utilisée comme un antigène, permet la détection spécifique de l'anticorps associé.

I.3.2. Transistor à effet de champ (FET)

Un transistor à effet de champ est un appareil couramment utilisé pour de faibles amplifications de signal. Dans un FET, le courant circule le long d'un chemin semi-conducteur appelé canal. En 1998, Tans et *coll.* ont mis en évidence qu'il était possible d'utiliser un nanotube monoparoî comme canal.⁴² A chaque extrémité de celui-ci se trouve une électrode, la source d'une part et le drain d'autre part. La conductivité du FET dépend du milieu électrique environnant ce canal. Si un petit changement de cet environnement intervient (par exemple, la mise au contact d'une cible), il peut en résulter une grande variation de courant entre la source et le drain. Par conséquent, si une protéine se fixe sur ce canal, une variation de signal sera engendrée et permettra sa détection.

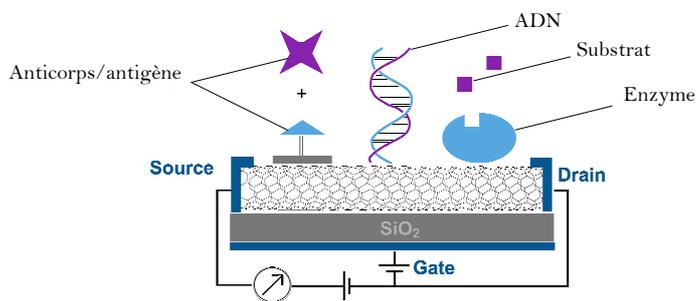


Figure III-3 : Représentation schématique d'un FET à base de nanotube

Depuis, de nombreuses équipes ont utilisé cette méthode pour mettre au point des dispositifs de détection miniaturisés, que ce soit pour la reconnaissance d'antigènes ou

d'anticorps, de substrats ciblés par les enzymes correspondantes ou encore pour l'hybridation d'ADN (Figure III-3).^{10,11,18}

I.3.3. Méthode électrochimique

Cette dernière méthode consiste à modifier une électrode *via* la synthèse de nanotubes directement sur sa surface. Ainsi la surface spécifique de l'électrode devient nettement plus grande et par conséquent, un plus grand nombre de protéines peut être immobilisé sur celle-ci (Figure III-4). Cela permet d'avoir sur un même support une multi-présentation de protéines et d'accroître ainsi considérablement la sensibilité du système. Il est alors possible de détecter une cible de manière électrochimique (voltammétrie cyclique).²⁴

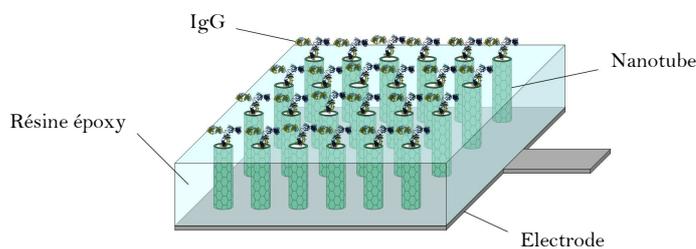


Figure III-4 : Configuration idéalisée d'une forêt de nanotube sur une électrode comme immunosenseur

Les techniques décrites précédemment pourraient être facilement accessibles pour l'élaboration à moyen terme d'un dispositif de détection. Aussi pourrions-nous choisir celle qui est la plus adaptée au système que nous souhaitons mettre en œuvre. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'assemblage de notre unité de base "nanotube-senseur".

I.4. Stratégie employée

La stratégie que nous avons choisie de suivre pour l'obtention d'un nanobiosenseur passe par l'immobilisation non covalente d'une protéine à la surface de nanotubes (Figure III-5).

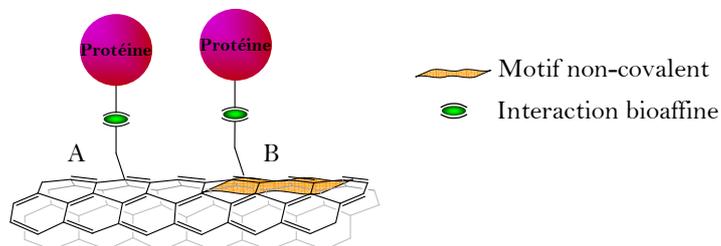


Figure III-5 : Représentation schématique du greffage non covalent d'une protéine sur une molécule bifonctionnelle fixée covalentement (A) ou non (B) sur un nanotube

Dans une première étape, les nanotubes de carbone sont fonctionnalisés aussi bien de manière covalente (A) que non covalente (B) par des motifs bifonctionnels. La conception de

ces entités doit permettre d'une part, leur interaction avec le nanotube et d'autre part, de servir de point d'ancrage à une protéine senseur. Dans un deuxième temps, nous testerons l'affinité de la protéine senseur immobilisée sur les nanotubes pour la protéine cible à détecter. Une bonne affinité induira une fixation de la cible sur la surface du nanotube.

Pour développer ces nanoobjets, nous avons choisi, comme dans le chapitre précédent, d'utiliser des MWNTs. Leur grande surface spécifique, l'absence de catalyseur métallique et leurs propriétés de conductivité en font un matériau de choix pour des applications de biodétection.⁴³

II. Présentation de la protéine senseur

L'immobilisation non covalente d'anticorps sur la surface des nanotubes peut présenter des difficultés dues à leur taille (Ex : Immunoglobuline G, IgG = 150 kDa) par rapport au diamètre des nanotubes. En effet, le poids moléculaire élevé des IgG peut compromettre la fixation et la stabilité de ces dernières sur les nanotubes.⁴⁴ De plus, dans le cas d'un immunosenseur où l'anticorps est immobilisé sur les nanotubes, la détection de l'antigène correspondant (~ 30 kDa) n'induit qu'une faible perturbation de l'environnement.

Par conséquent, nous avons retenu comme modèle un anticorps recombinant ayant un poids moléculaire beaucoup plus faible (~ 30 kDa) qu'un anticorps entier. Notre choix s'est porté sur un fragment d'anticorps dénommé scFv (*single chain Fragment variable*) construit de telle manière qu'il en conserve la spécificité et l'affinité vis-à-vis de l'antigène cible. Cette étude a été menée en collaboration avec Séverine Padiolleau-Lefèvre et Didier Boquet du Service de Pharmacologie et d'Immunologie (SPI) du CEA de Saclay.

II.1. Généralités sur les anticorps

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont des glycoprotéines. Elles circulent dans le sang et les autres fluides de l'organisme, où elles sont capables de reconnaître spécifiquement un antigène. La liaison de l'anticorps à l'antigène permet par exemple l'inactivation des toxines virales et bactériennes par blocage de leur fixation aux récepteurs des cellules cibles. De même, cette reconnaissance aide à la destruction des microorganismes, soit en permettant aux cellules phagocytaires de les internaliser plus facilement, soit en activant un complexe protéique du sang capable de les éliminer.

Les anticorps sont produits naturellement par la réponse immunitaire humorale, induite par les lymphocytes B pour défendre l'organisme contre toute forme d'agent infectieux. Ces anticorps se lient spécifiquement à l'antigène étranger qui a provoqué leur production.⁴⁵

II.1.1. Structure des anticorps

Les anticorps représentent une des classes majeures des protéines du sang, constituant environ 20% de la masse totale des protéines du plasma. Il s'agit de protéines glycosylées bivalentes, hétérodimères et symétriques.

L'unité structurale de base d'une immunoglobuline est constituée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères identiques deux à deux, reliées entre elles par deux ponts disulfure intercaténaux et par des interactions non covalentes (Figure III-6).

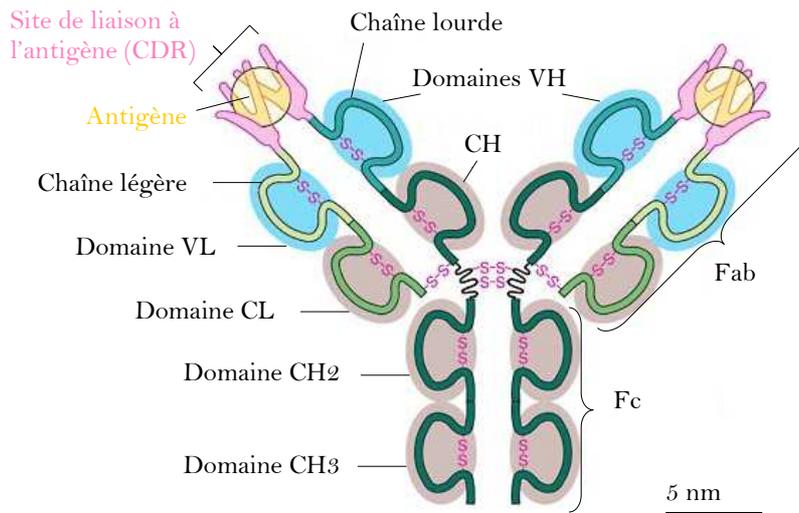


Figure III-6 : Représentation schématique d'un anticorps, exemple d'une IgG

Chaque chaîne possède une partie constante (C) et une partie variable (V). Ainsi, dans le cas d'une IgG (immunoglobuline majoritaire dans le sang), la chaîne légère est constituée de deux domaines globulaires : un domaine constant (CL) C-terminal et un domaine variable (VL) N-terminal, tandis que la chaîne lourde est composée de quatre domaines globulaires : trois domaines constants (CH₁, CH₂ et CH₃) C-terminaux et un variable (VH) N-terminal. Le domaine N-terminal de chaque chaîne (région variable) contient trois régions hypervariables portant la spécificité à l'antigène : les CDRs (*Complementary Determining Regions*).

Enfin, à partir d'un anticorps, il est possible de générer des fragments Fab et Fc par digestion à la papaïne du premier pont disulfure au niveau de la partie N-terminale ou un fragment Fab'₂ par digestion à la pepsine. Fab'₂ est un fragment bivalent porteur de la spécificité antigénique et Fab est un fragment monovalent également capable de reconnaître l'antigène. Ces fragments peuvent aussi être obtenus par clonage au moyen de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en utilisant des amorces nucléotidiques. Par cette technique, il est aussi possible d'obtenir d'autres types de fragments (Figure III-7) très utiles dans les études et les applications des anticorps :

- les Fv, fragments constitués de deux domaines variables liés de façon non covalente,⁴⁶
- les scFv, constitués de deux domaines variables reliés entre eux par un peptide,^{47,48}
- les *diabodies*, constitués de deux fragments variables reliés par deux “*linkers*”,⁴⁹
- les bis-scFv, constitués de deux scFv de spécificité différente reliés par un “*linker*”.

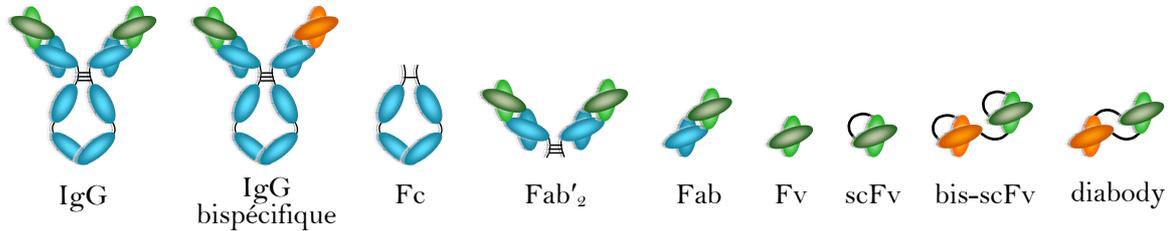


Figure III-7 : Classe des différents formats d'anticorps recombinants

II.1.2. Intérêts des scFv

Les fragments d'anticorps scFv, associations par un “*linker*” des régions variables des chaînes lourde et légère, présentent de nombreux avantages. Ce sont les plus petites entités ayant une stabilité et une affinité pour l'antigène équivalente à un Fab.^{50,51} Par conséquent, cela fait d'eux des candidats idéaux pour concevoir de nouveaux immunosenseurs.

II.2. Synthèse d'un scFv dirigé contre la protéine Prion

L'activité du SPI au CEA est concentrée principalement sur des études autour de la protéine prion (PrP). Ce service est, entre autres, à l'origine du test adopté par la communauté européenne pour la détection *post mortem* de l'encéphalopathie spongiforme bovine (ESB). Le scFv synthétisé (SAF34) au sein de ce service par Séverine Padiolleau-Lefèvre est dirigé contre cette protéine.⁵¹

Le scFv SAF34 a été cloné dans un vecteur d'expression cytoplasmique SPI 4.0, dérivé du vecteur commercial pET9c, présentant une résistance à la kanamycine. La bactérie hôte utilisée pour le clonage est une souche d'*Escherichia coli*. Des séquences spécifiques (tag ou étiquettes moléculaires) ont été insérées (Schéma III-2) dans la construction du scFv comme outils pour sa détection et sa purification : le tag HA d'une part (séquence : YPYDVPDYA à l'extrémité N-terminale), et le tag histidine (His) d'autre part (six histidines successives à l'extrémité C-terminale).

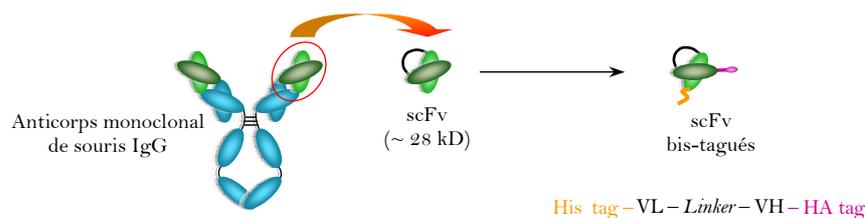


Schéma III-2 : Présentation du scFv SAF34 doublement étiqueté (HA et His)

Nous profiterons de la présence du tag His, servant à la purification du scFv, pour immobiliser la protéine sur la surface des nanotubes. Le tag HA sera, quant à lui, utilisé pour mettre en évidence l'accroche du scFv à la surface du nanotube de carbone. Cette étiquette interagit en effet avec l'Ac monoclonal de souris anti-tag HA (l'AcM 12CA5), marqué avec de l'acétylcholinestérase (G4), permettant de détecter la pleine longueur du scFv (cette méthode sera décrite dans la partie IV.2).

Etant donné que le scFv, *via* son tag HA, peut être reconnu par un anticorps nous pourrions également considérer dans cette étude le scFv comme un antigène. Cette stratégie présente plusieurs avantages :

- Elle permet la conception simple d'un biosenseur "nanotube-antigène" pour la reconnaissance d'anticorps.
- Elle est universelle. En effet, la majorité des protéines recombinantes possède un tag His que nous voulons utiliser pour la fixation de protéine sur les nanotubes. De plus, de très nombreuses protéines recombinantes sont des antigènes ayant un intérêt dans le diagnostic de pathologies causées par des protéines virales, des antigènes bactériens ou tumoraux,...
- Elle est sensible. Ce format de détection devrait impliquer une plus grande perturbation de l'environnement du nanotube (donc de sa conductivité) lors de la détection de l'anticorps par le scFv car la masse d'un anticorps entier est cinq fois plus importante qu'un scFv.

Pour fixer le scFv de manière sélective sur le nanotube par son tag His, des complexes avec du nickel ont été envisagés. Nous détaillerons les composés synthétisés dans la section suivante.

III. Synthèse et greffage de molécules hétéro bifonctionnelles

Les outils chimiques que nous envisageons de préparer sont des réactifs hétéro-bifonctionnels constitués d'une part, d'un groupement pouvant interagir avec le nanotube et d'autre part, d'un groupement pouvant chélater le nickel. L'intérêt du nickel est son affinité pour le tag His du scFv. En effet, ce motif, inséré par biologie moléculaire dans les protéines recombinantes, est utilisé pour les purifier sur colonne de résine chargée avec un complexe de nickel. Le nickel, ayant à la fois une affinité pour l'étiquette His et la molécule bifonctionnelle, va donc servir de relais dans l'assemblage "tag His - Ni - molécule bifonctionnelle - nanotube" de type sandwich (Figure III-8).

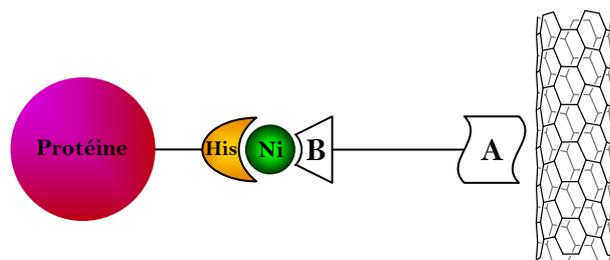


Figure III-8 : Représentation schématique de l'assemblage "tag His - Ni - molécule bifonctionnelle - nanotube"

III.1. Vers une fonctionnalisation non covalente des nanotubes

III.1.1. Nature des groupements chélatants B

La littérature donne une multitude d'exemples de motifs capables de chélater des métaux pour la reconnaissance de biomolécules.⁵²⁻⁵⁷ Nous avons choisi d'étudier deux exemples : les groupements NTA et cyclam.

III.1.1.a. Groupement acide nitrilotriacétique (NTA)

En 1987, Hochüli et *coll.* ont élaboré une méthode de purification de protéines utilisant une résine d'agarose fonctionnalisée par des complexes nitrilotriacétate du nickel (Ni-NTA).⁵⁸ Ce complexe a une structure octaédrique dans laquelle deux molécules d'eau complexées à l'ion Ni^{2+} peuvent être échangées par deux résidus imidazoles du tag histidine d'une protéine (Schéma III-3). Dans ces conditions, les protéines étiquetées sont retenues sur la résine. Ces protéines peuvent ensuite être décrochées par un gradient d'imidazole qui déplace l'équilibre de formation du complexe "prot-His₆-Ni-NTA".

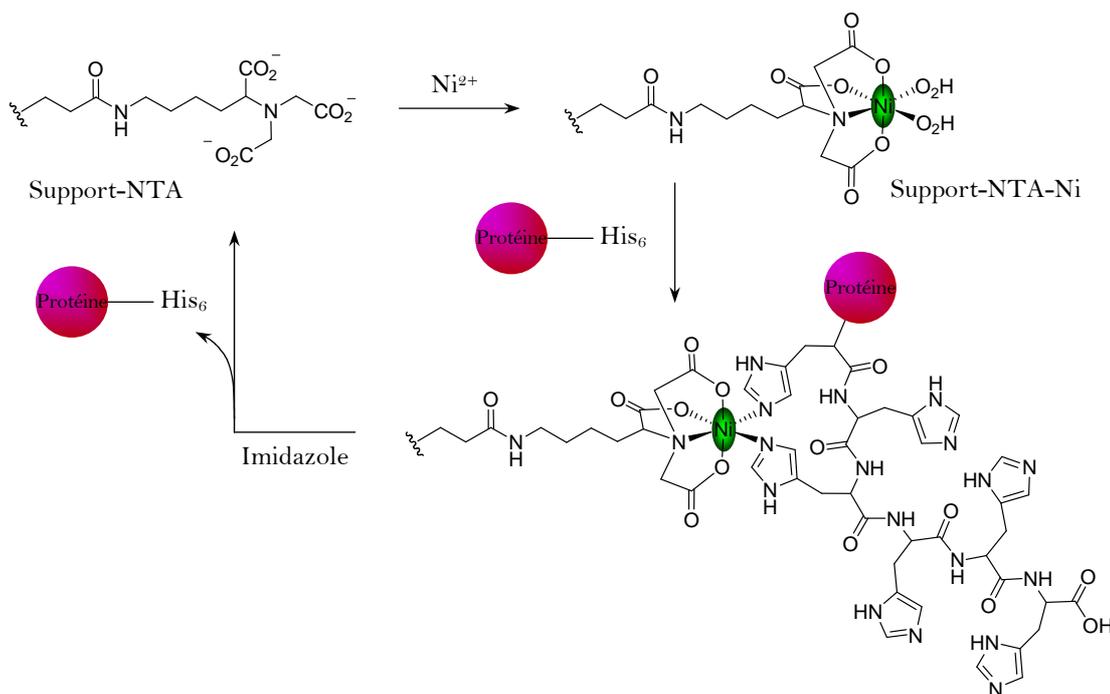


Schéma III-3 : Principe de purification d'une protéine taguée His par accroche bioaffine sur un complexe Ni-NTA

Depuis, ce type d'interaction a été adapté aussi bien à d'autres supports comme des clusters d'or⁵⁹ ou des nanoparticules magnétiques⁶⁰ que pour la cristallisation de protéines⁶¹⁻⁶⁴ ou encore le marquage fluorescent de protéines.^{65,66}

Par analogie avec ces différents concepts, nous avons choisi de concevoir et de préparer plusieurs outils chimiques bifonctionnels, à base de complexes NTA-Ni. Parallèlement, nous nous sommes intéressés à l'utilisation du groupement cyclam pour la complexation du nickel.

III.1.1.b. Groupement 1,4,8,11-tétraazacyclotétradécane (cyclam)

Le cyclam, introduit par Bosnich et *coll.* en 1965, est un macrocycle de 14 atomes comprenant quatre azotes.⁶⁷ Ce ligand est connu pour chélater des ions divalents comme le nickel, le zinc, le cuivre ou le mercure. Le complexe formé est stabilisé en solution par un effet dit "effet de macrocycle".⁶⁸

Depuis, différents complexes M(II)-Cyclam ont été synthétisés et utilisés comme outils pour l'étude de l'interconversion du spin dans les complexes des métaux de transition (induite par la température^{69,70} ou le pH⁷¹), comme chimiosenseurs fluorescents^{72,73} ou encore pour la reconnaissance d'acides aminés.⁷⁴⁻⁷⁹ Ces derniers travaux ont montré qu'il était possible pour un complexe Hg(II)-Cyclam ou Ni(II)-Cyclam de reconnaître des motifs imidazole, bis-imidazole, histidine, glycine, tryptophane et acide aspartique.

Le cyclam peut adopter plusieurs conformations lors de sa complexation avec un ion métallique : cinq configurations *trans* (planes) et une configuration *cis* (Figure III-9).⁶⁷ Il a été montré que le complexe de zinc(II) s'équilibrait sur une période de quelques heures entre les différentes formes conformères *cis-V*, *trans-I* et *trans-III*.⁸⁰

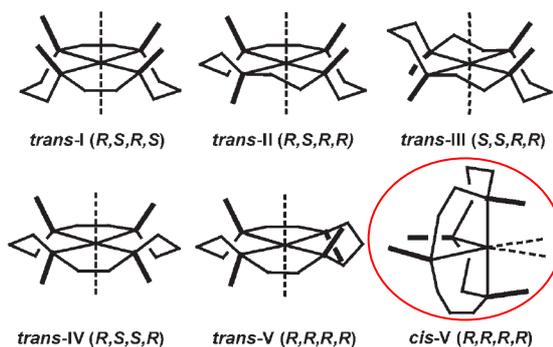


Figure III-9 : Configurations du complexe ion métallique-Cyclam

Bien qu'aucun exemple utilisant un complexe M(II)-Cyclam n'ait été décrit dans la littérature pour l'immobilisation d'une protéine *via* un tag His, il est probable qu'un tel système soit tout de même efficace. Deux résultats viennent appuyer cette hypothèse :

- Une des conformations majoritaires (*cis-V*) prise par le complexe ion métallique-Cyclam a une géométrie très proche de celle du complexe Ni-NTA avec deux sites de coordination vacants adjacents.
- Une équipe a reporté l'étude d'un complexe de nickel composé d'un macrocycle azoté (Acbtztacln = 1-acétato-4-benzyltriazaclononane) pour l'immobilisation d'une protéine étiquetée His.⁸¹ Ils rapportent que leur système permet une meilleure fixation de cette protéine par rapport au complexe Ni-NTA. Ils interprètent cette amélioration principalement comme une meilleure stabilisation du nickel par ce complexe comportant trois atomes d'azote et une fonction acide carboxylique.

Le cyclam étant commercial et connaissant ses propriétés, nous avons opté pour ce modèle pour mener notre étude plutôt que l'Acbtztacln nécessitant une synthèse multi-étapes.

III.1.2. Groupements A permettant l'interaction avec la surface des nanotubes

L'interaction des réactifs bifonctionnels (comportant un motif complexant le nickel(II)) avec la surface des nanotubes peut être réalisée selon deux approches, soit par des interactions de type π - π avec des motifs polyaromatiques, soit par des interactions hydrophobes avec une longue chaîne carbonée.

Les deux méthodes présentent un intérêt. L'utilisation de motifs polyaromatiques va permettre de fixer fortement des molécules d'intérêt tout en gardant une certaine mobilité du réactif à la surface des tubes. L'utilisation d'une longue chaîne carbonée, *i.e.* un surfactant, un lipide ou un polymère, va permettre une meilleure solubilisation des nanotubes ainsi qu'une densité surfacique de fonctions désirées plus importante.

Dans les deux cas, l'intérêt est de ne pas détruire le réseau graphitique des nanotubes. La Figure III-10 ci-après rassemble les structures des réactifs bifonctionnels que nous avons synthétisés.

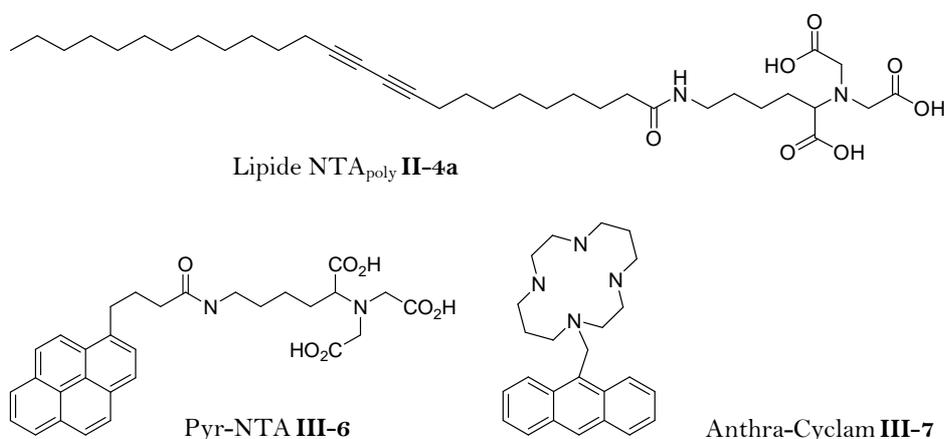


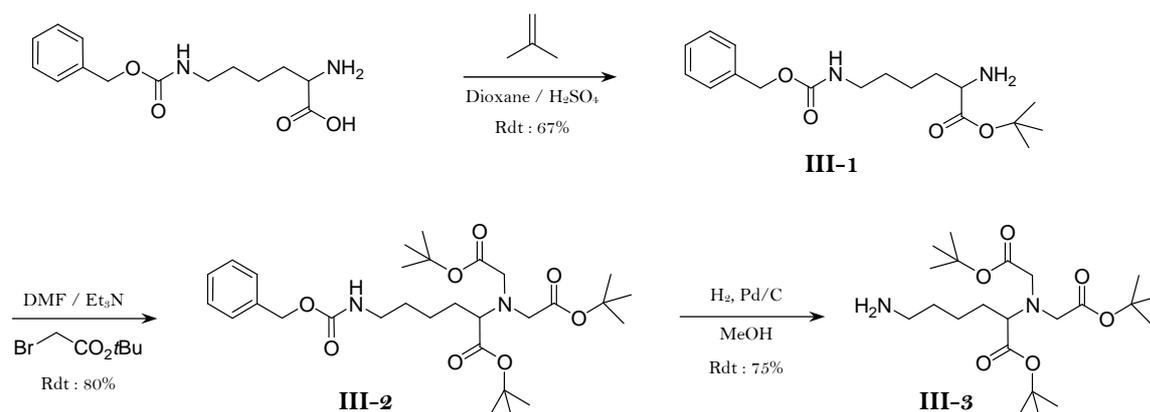
Figure III-10 : Molécules synthétisées pour la fixation de protéines

III.1.3. Synthèses des réactifs bifonctionnels

Le lipide NTA_{poly} **II-4a** ayant déjà été utilisé pour la déposition de nanoparticules métalliques (*cf* Chapitre II), nous ne décrivons que la synthèse des deux autres composés.

III.1.3.a. Synthèse du réactif Pyrène-NTA

La synthèse du réactif pyrène-NTA **III-6** a été effectuée de manière convergente avec la préparation, dans un premier temps, de la tête polaire sous forme protégée (Schéma III-4).

Schéma III-4 : Synthèse de la tête NTA *tert*-butylée

Pour ce faire, l'acide de la *N*-benzyloxycarbonyl-*L*-Lysine a été protégé par estérification en présence de 2-méthylpropène en milieu acide. Le composé *tert*-butylé **III-1** obtenu a ensuite été alkylé avec un excès de bromoacétate de *tert*-butyle dans un mélange DMF/Et₃N pour donner le composé **III-2**. Enfin, le groupement protecteur benzyloxycarbonyle a été enlevé par hydrogénolyse dans le méthanol. Le produit désiré **III-3** (NTA-*t*Bu) a été obtenu après filtration avec un rendement global de 45%.

La synthèse du composé pyrène-NTA s'opère par un couplage peptidique entre l'amine du motif NTA-*t*Bu **III-3** et le produit **III-4** issu de l'activation de l'acide 1-pyrènebutyrique (Schéma III-5). L'activation de l'acide a été réalisée par ajout de NHS et d'EDCI dans le dichlorométhane pour obtenir quantitativement le produit **III-4**. Ensuite, le couplage a été accompli dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine pour former le composé **III-5**. Enfin, le produit final **III-6** a été obtenu par déprotection des acides carboxyliques par de l'acide trifluoroacétique.

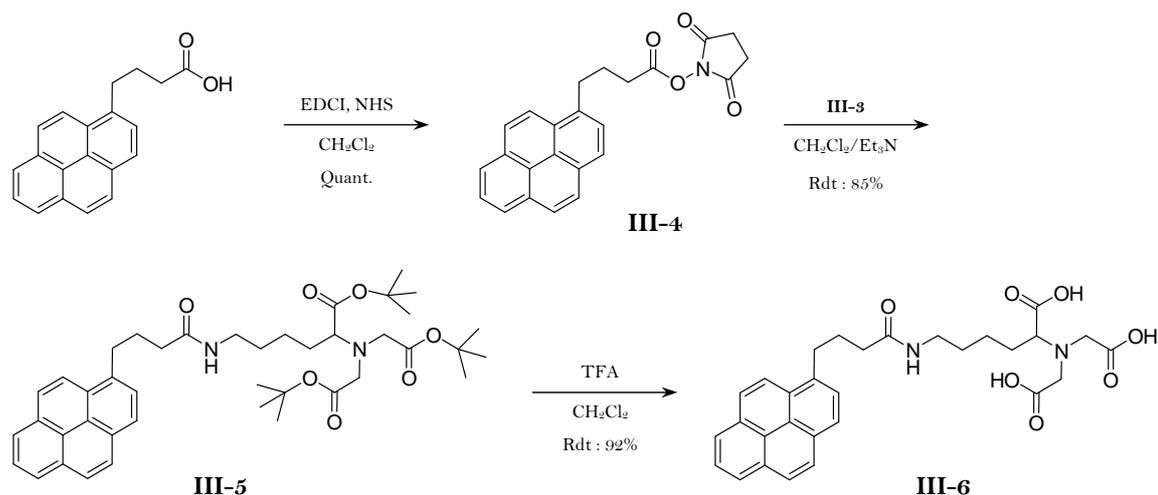
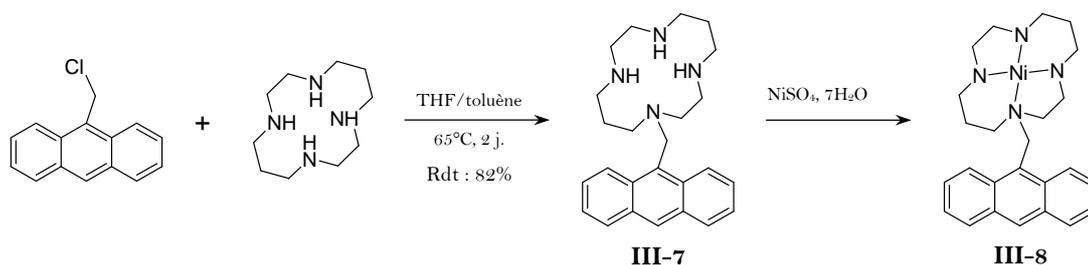


Schéma III-5 : Synthèse du motif Pyr-NTA

III.1.3.b. Synthèse du réactif Anthracène-Cyclam

Le dérivé du cyclam **III-7** a été synthétisé en une étape à partir du 9-chlorométhylanthracène (Schéma III-6). La substitution nucléophile est effectuée par chauffage à 65°C du 1,4,8,11-tétraza-cyclotétradécane avec du 9-chlorométhylanthracène pendant deux jours. Le composé désiré **III-7** a été récupéré par précipitation dans l'éthanol légèrement acidifié.

Schéma III-6 : Synthèse du composé anthracène-cyclam **III-7** et du complexe **III-8** correspondant

Pour des questions pratiques, nous avons synthétisé le complexe anthracène-cyclam-Ni **III-8** avant qu'il ne soit mis en contact avec les nanotubes. La synthèse de ce produit a été effectuée par une mise en contact du composé **III-7** avec un équivalent de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La formation du complexe **III-8** a été vérifiée par RMN. En effet, la présence du nickel induit un déplacement vers les champs faibles pour les signaux de l'anthracène et vers les champs forts pour les signaux du cyclam.

III.1.4. Contrôle du π -stacking sur les nanotubes

Pour la mise en évidence de l'adsorption des entités polyaromatiques sur les nanotubes de carbone, la méthode de choix est la spectroscopie UV-Vis. Celle-ci permet de déterminer le taux de chargement du motif aromatique sur les nanotubes. Le protocole

effectué est détaillé dans le Schéma III-7. Il repose sur l'analyse du surnageant d'un mélange de nanotubes et du motif π -stacker par spectroscopie d'absorption UV-Vis.

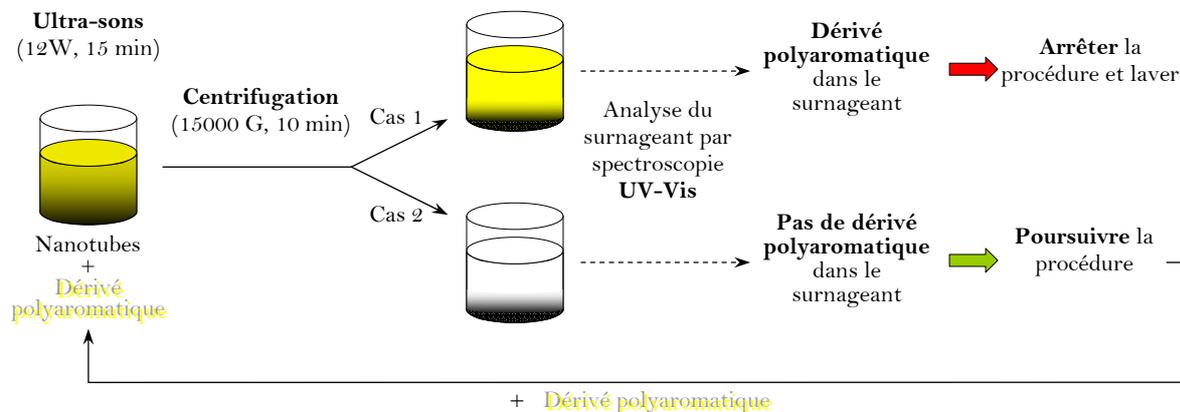


Schéma III-7 : Principe de la détermination du taux de recouvrement des nanotubes

A une suspension de nanotubes dans un tampon Tris (0,1 M, pH 8) est ajouté 1% en masse (par rapport aux nanotubes) du dérivé aromatique (**III-6**, **III-7** ou **III-8**). Le mélange est soniqué à l'aide d'une sonde à ultrasons (12W) pendant 15 minutes. La sonication permet de dissocier les fagots de nanotubes et de favoriser le π -stacking. Ensuite, la solution est centrifugée (15000 G, 10 min) pour faire tomber les nanotubes et le surnageant est analysé par spectroscopie UV-Vis. Deux cas de figures peuvent se présenter :

- Soit le surnageant contient du dérivé aromatique interagissant par π -stacking, cela signifie que le taux de chargement maximum a été atteint (cas 1).
- Soit au contraire, rien n'est observé, alors le processus est réitéré jusqu'à ce qu'un signal soit détecté dans le surnageant (cas 2).

En fin de cycle, la robustesse de l'édifice est vérifiée par lavage avec du tampon Tris. Si le dérivé aromatique se détache, il sera visible par analyse spectroscopique du surnageant.

Il est possible de mettre en évidence le π -stacking par microscopie électronique utilisant l'acétate d'uranyle comme agent de contraste. En effet, les ions uranyle (UO_2^{2+}) s'ancrent à la surface des nanotubes en recouvrant les fonctions carboxylate des groupements NTA. Les ions uranyles apparaissent alors sous la forme de points noirs (Figure III-11). Nous avons dans ce cas une coloration positive apparente de l'échantillon.

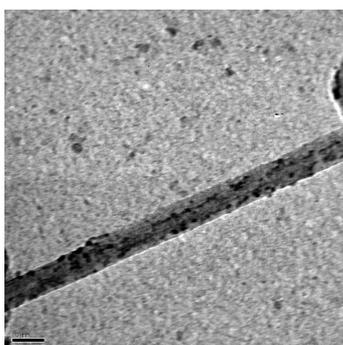


Figure III-11 : Cliché de microscopie du motif **III-6** sur les nanotubes (Echelle 20 nm)

Dans le cas du composé **III-9**, nous avons obtenu un taux de chargement massique de 1,4% par rapport aux nanotubes, pour le produit **III-10**, un taux de 1,7% et 0,8% pour le complexe **III-11**.

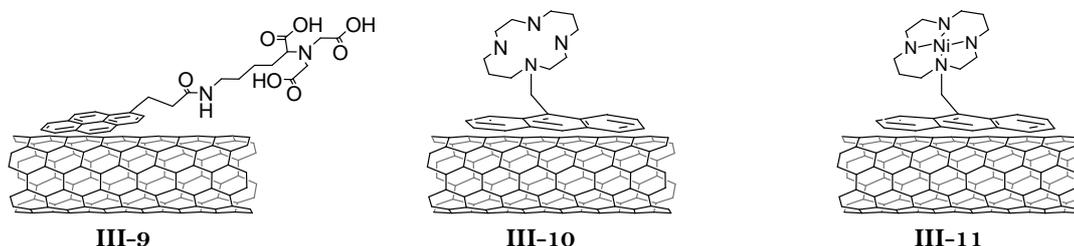


Figure III-12 : Représentation des entités **III-6**, **III-7** et **III-8** interagissant par π -stacking sur les nanotubes

III.2. Vers une fonctionnalisation covalente

En parallèle avec la fonctionnalisation non covalente des nanotubes, nous avons voulu élargir notre étude en greffant covalamment à la surface des nanotubes de carbone les réactifs complexant le nickel. Pour ce faire, nous avons utilisé deux techniques différentes. La première utilise la méthode classique du couplage d'une amine avec les acides carboxyliques de surface générés par traitement oxydant. Pour cette méthode, nous avons utilisé le composé **II-2** possédant une tête NTA (Figure III-13).

La seconde est une méthode initialement développée par Billups *et coll.* pour aryle ou alkyle des SWNTs.⁸²⁻⁸⁴ Elle consiste en l'alkylation (ou arylation) réductrice de nanotubes en présence de lithium et d'iodure d'alkyle (ou aryle) dans l'ammoniac liquide. En 2006, Tour *et coll.* ont montré qu'il était possible d'utiliser cette méthode pour fonctionnaliser les MWNTs.⁸⁵ Pour cette méthode, nous avons synthétisé la molécule **III-17** (Figure III-13).

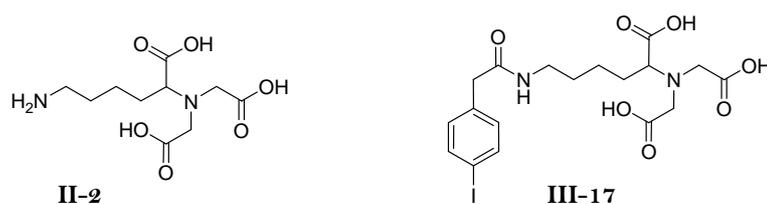


Figure III-13 : Présentation des réactifs bifonctionnels utilisés pour la fonctionnalisation covalente

III.2.1. Couplage peptidique de **II-2** *via* les acides carboxyliques de surface

La stratégie repose sur l'utilisation des fonctions acide carboxylique comme point d'ancrage. Les acides sont essentiellement localisés au niveau des sites défectueux des nanotubes, *i.e.* principalement aux extrémités puisque ce sont des zones fragilisées, mais aussi aléatoirement sur leur surface.

La séquence réactionnelle que nous avons employée est représentée sur le Schéma III-8. Les nanotubes ont, au préalable, été oxydés dans un mélange acide sulfurique

concentré/acide nitrique (69%) pendant 24 heures à 100°C. L'activation des acides *via* la formation de chlorures d'acides pour donner **III-13** a été effectuée à 70°C dans le chlorure de thionyle en présence d'une quantité catalytique de DMF. La réaction avec **II-2** à 90°C dans le THF et en présence de triéthylamine pendant 2 jours a conduit aux amides correspondants sur **III-14**.

Cependant, et malgré de nombreuses tentatives, les essais de greffage de scFv et de détection de l'anticorps avec ces nanotubes n'ont pas donné de résultats positifs. Ils ne seront pas présentés dans la partie résultats.

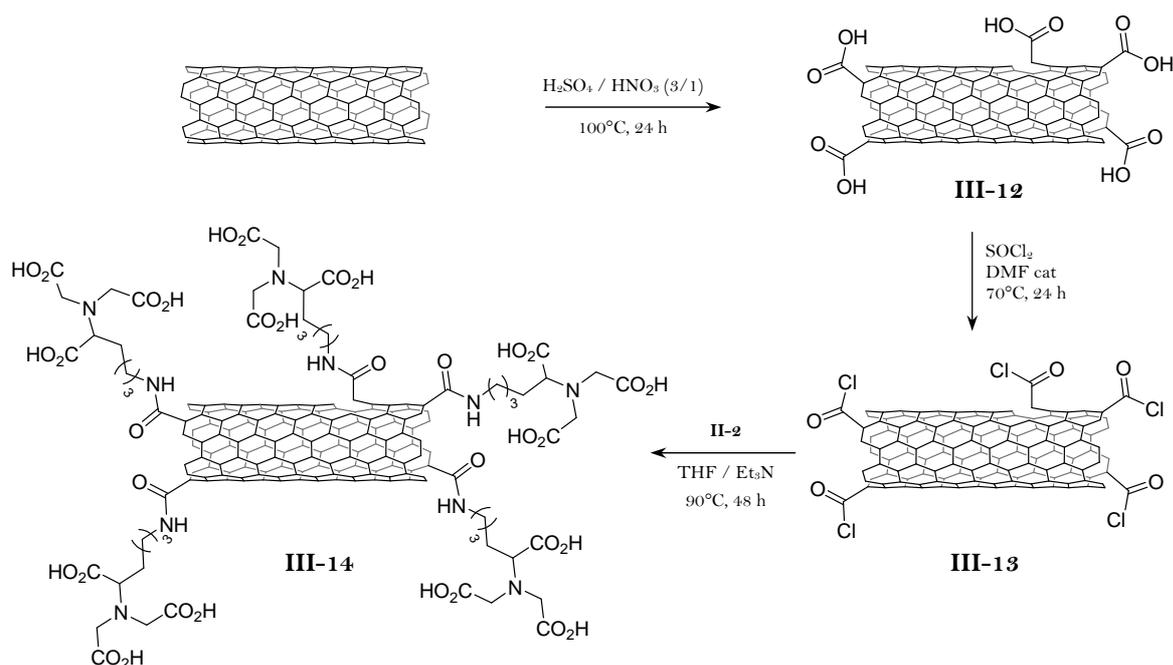


Schéma III-8 : Réaction de formation des NT-NTA *via* une liaison amide

III.2.2. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone par la méthode Billups

III.2.2.a. Synthèse du motif NTA greffable

Ayant adopté la méthodologie de Billups, nous avons synthétisé un dérivé "iodophényle" de la NTA, par activation initiale de l'acide 4-iodophénylacétique en présence de NHS et d'EDCI dans le dichlorométhane. La réaction d'activation est quantitative et donne le composé **III-15** qui est couplé avec la tête NTA protégée **III-3** dans le dichlorométhane en présence de triéthylamine. Le produit résultant **III-16** est déprotégé par ajout d'acide trifluoroacétique pour obtenir le produit désiré **III-17**.

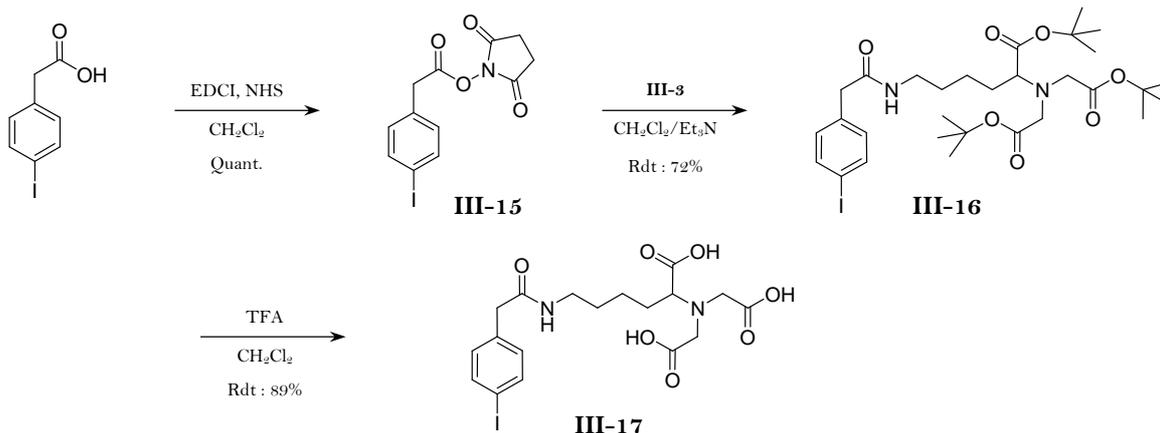
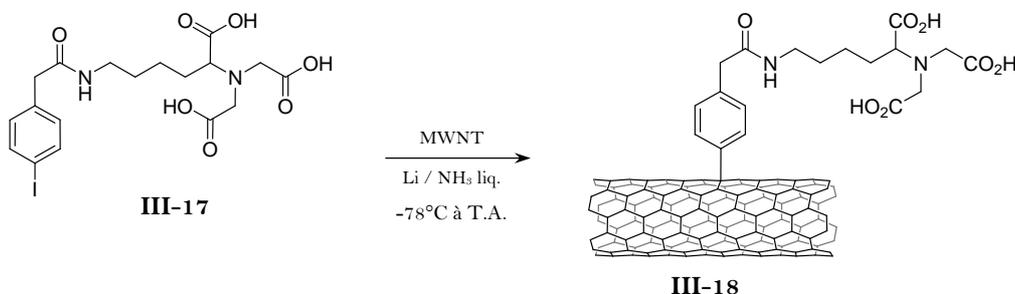


Schéma III-9 : Synthèse du dérivé iodophényle de la NTA

III.2.2.b. Accroche du dérivé iodé de la NTA sur les nanotubes MWNTs

Le procédé mis en œuvre pour cette réaction repose sur une réduction de Birch par les métaux dissous (Schéma III-10). Dans un premier temps, les nanotubes captent les électrons provenant d'un métal alcalin (lithium) pour former des radicaux anioniques sur leur surface. Cette réaction s'effectue par dissolution du lithium dans l'ammoniac liquide à -78°C . La substitution nucléophile de l'iodure d'aryle **III-17** entraîne la fixation du motif souhaité sur les nanotubes. La réaction est arrêtée après quatre heures à température ambiante conduisant à l'obtention des nanotubes **III-18**.

Schéma III-10 : Fonctionnalisation des nanotubes *via* la réaction de Billups

III.2.3. Contrôle de la fonctionnalisation

Le contrôle de la fonctionnalisation covalente sur les nanotubes MWNTs est plus délicat que pour les SWNTs.

En effet, les techniques classiques de caractérisation des nanotubes monoparoi telles que l'analyse par spectroscopie UV-Vis-NIR ou la spectroscopie Raman ne sont pas adaptées pour les MWNTs. En effet, l'empilement de plusieurs nanotubes les uns dans les autres avec des propriétés électroniques différentes, ainsi que l'augmentation du nombre de défauts empêche ce type d'analyse.

La méthode analytique qui nous a donné des indications sur la fonctionnalisation des nanotubes est la spectroscopie IR. La technique utilisée est la réflexion totale atténuée (ATR : *Attenuated Total Reflectance*) où le matériau est déposé et analysé sur un diamant. Elle présente l'avantage d'éviter la mise en forme des échantillons. En effet, la préparation de pastilles de KBr n'est pas la méthode la plus appropriée du fait d'une trop forte opacité de la pastille. Les règles de sélection infrarouge prévoient de faibles intensités pour les modes relatifs aux nanotubes natifs, ce qui permet de détecter la présence de greffons organiques et d'identifier les groupements fonctionnels actifs en infrarouge. Sur le spectre IR des nanotubes fonctionnalisés **III-14** et **III-18** apparaissent notamment deux bandes fines (2959 et 2921 cm^{-1}) qui confirment la présence de fonctions méthylène. Moins clairement, des bandes dans la région des fonctions carbonyle (1700 - 1750 cm^{-1}) ont pu être visualisées.

De plus, les échantillons fonctionnalisés **III-14** et **III-18** se sont avérés avoir une solubilité accrue dans l'eau par rapport aux nanotubes natifs qui s'agrègent spontanément. Cette observation donne une indication supplémentaire sur le fait que les nanotubes sont effectivement fonctionnalisés.

A l'issue de l'étape de fonctionnalisation il reste à charger les nanotubes en nickel pour finaliser notre méthode d'ancrage sélective de protéines étiquetées His. La détermination du taux de chargement en nickel nous permettra également de vérifier de manière indirecte que les nanotubes sont effectivement fonctionnalisés.

III.3. Détermination du taux de chargement en nickel sur les nanotubes

Parmi les méthodes décrites pour doser le nickel(II), la plus commune utilise une détection colorimétrique d'un complexe du nickel avec le diméthylglyoxime. Pour déterminer le taux de chargement en nickel sur les nanotubes de carbone, le protocole que nous avons suivi repose sur la mesure de la quantité de nickel présente dans le surnageant après i) incubation du nickel avec les nanotubes fonctionnalisés et ii) centrifugation du mélange. Les résultats préliminaires obtenus *via* cette méthode n'ont pas permis de calculer de manière satisfaisante la quantité de nickel restant en solution. Cela s'explique par une cinétique de réaction lente et variable et par le fait que le réactif en excès peut précipiter, compromettant ainsi les résultats.

Pour doser le nickel, nous nous sommes donc tournés vers l'utilisation du dithiothréitol (DTT) comme ligand du nickel tel que décrit par DerVartanian et *coll.*⁸⁶ La combinaison de ce ligand avec un tampon phosphate permet la formation d'un complexe phosphothioate du nickel détectable par absorption UV-Vis.

Dans une expérience type, les nanotubes fonctionnalisés sont incubés dans un tampon phosphate (10 mM, pH 7,5) en présence de $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La suspension est soniquée

légèrement pour éviter de détruire les interactions des échantillons fonctionnalisés de manière non covalente et agitée pendant 12 heures pour forcer la fixation du nickel sur les nanotubes.

Dans un second temps, la solution est centrifugée (15000 G, 5 min), le surnageant est récupéré et une solution de DTT est rajoutée (de manière à obtenir une concentration finale de 1 mM dans un échantillon). La nouvelle solution est alors analysée par spectroscopie UV-Vis et par différence avec une solution de référence (solution identique mais sans nanotubes), il est possible de quantifier le nickel fixé.

Pour tous les échantillons traités, une diminution significative du signal initial (~30%) a été observée, impliquant une chélation du nickel à la surface des nanotubes fonctionnalisés. A l'issue de cette étape, nous avons ainsi un hybride "nanotube-ligand-nickel". En premier lieu, nous l'utiliserons pour accrocher le scFv *via* son tag His. Ensuite, avec un même test immunoanalytique, nous mettrons en évidence cette accroche ainsi que la possibilité, pour le biosenseur construit, de détecter une cible.

IV. Détection d'un anticorps par un hybride "NT-Antigène"

IV.1. Méthode générale

La construction du nanobiosenseur NT-scFv est réalisée par la mise en contact du scFv pendant 3 heures avec les nanotubes **A** recouverts des complexes "réactif bifonctionnel-Ni" (Schéma III-11) dans un tampon choisi pour faciliter l'interaction.

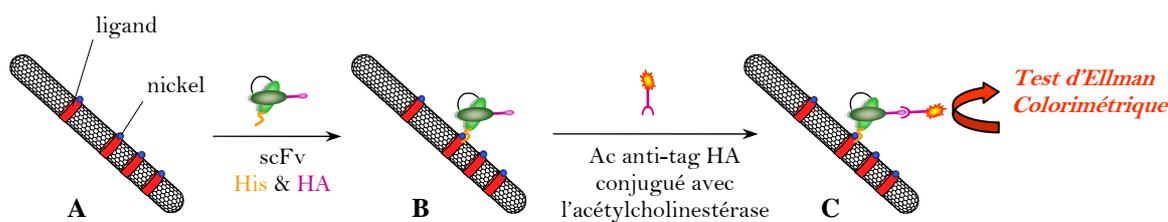


Schéma III-11 : Protocole de fixation et de détection du scFv sur un nanotube

Dans cette première étape, c'est la reconnaissance entre l'étiquette His du scFv et le nickel chélaté sur les nanotubes qui permet l'assemblage du biosenseur **B**. Nous détaillerons par la suite les conditions permettant de favoriser sa formation.

Pour valider l'accroche du scFv et l'obtention de l'outil de détection voulu **B**, nous avons utilisé un anticorps monoclonal de souris marqué à l'acétylcholinestérase (AChE), le 12CA5G4 (Schéma III-11). En effet, ce dernier est dirigé contre le tag HA porté par le scFv. Par conséquent, un dosage colorimétrique spécifique de l'acétylcholinestérase –AChE– (test d'Ellman) permettra de confirmer la présence de scFv à la surface des nanotubes, et ainsi,

valider le système de détection. Cela nous permettra également d'attester de la spécificité de la liaison du scFv aux nanotubes par comparaison du signal obtenu entre les nanotubes fonctionnalisés avec ou sans nickel. En absence de nickel, le scFv n'est pas censé pouvoir se fixer sur les nanotubes. Ainsi, la différence de signal entre ces deux échantillons de nanotubes représentera la valeur du **signal spécifique**. Un **bruit de fond** sera également déterminé par mesure de la quantité de 12CA5G4 s'accrochant sur les nanotubes **A** n'ayant pas été mis en contact avec le scFv. Le principe du dosage d'Ellman sera détaillé dans la section IV.2 suivante.

IV.2. Détection d'Ellman *via* l'acétylcholinestérase

Les anticorps monoclonaux dirigés contre le tag HA sont marqués par de l'acétylcholinestérase (AChE). C'est une hydrolase à sérine qui hydrolyse préférentiellement les esters de la choline. Cette enzyme est extraite des organes électriques de certains poissons comme le Gymnote ou la Torpille et a un poids moléculaire de 80 kDa.

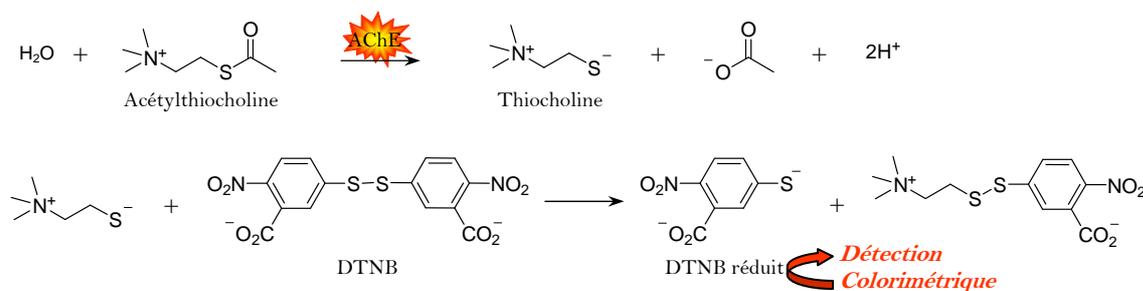


Schéma III-12 : Principe de la méthode colorimétrique d'Ellman

Le dosage d'Ellman (Schéma III-12), utilise comme pseudo-substrat l'acétylthiocholine (AcTCh), qui est hydrolysée par l'enzyme à la même vitesse que l'acétylcholine.⁸⁷ L'hydrolyse de l'AcTCh, catalysée par l'AChE, conduit à la formation de thiocholine (TCh) qui réagit avec le 5,5'-dithiobisnitrobenzoate (DTNB), un réactif classiquement utilisé pour doser les groupements thiols.⁸⁸ Le DTNB réduit formé absorbe fortement dans le visible en produisant une coloration jaune ($\lambda = 412 \text{ nm}$).

Il est courant d'exprimer les concentrations d'AChE en fonction des mesures effectuées avec la méthode d'Ellman. Une unité Ellman correspond à $7,35 \cdot 10^{-2}$ unités enzymatiques, elle-même définie comme la quantité d'enzyme catalysant l'hydrolyse d'une micromole de substrat pendant une minute à 25°C .

Le réactif d'Ellman utilisé pendant notre étude contient 10^{-4} M de DTNB, $7,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ d'AcTCh dans un tampon phosphate à 10^{-2} M .

Dans un premier temps, nous avons utilisé cette méthode pour mettre au point les conditions de fixation du scFv sur les nanotubes.

IV.3. Mise au point

Plusieurs paramètres se sont révélés être importants au cours de notre étude. Leur examen nous a permis d'identifier les conditions optimales pour la fixation spécifique des scFv sur les nanotubes ainsi que pour leur détection *via* l'anticorps marqué. Parmi ces différents facteurs, aussi bien la manipulation de l'échantillon que sa composition ou celle du tampon sont à prendre en compte.

IV.3.1. Composition de l'échantillon

Les premiers essais effectués ont été réalisés en conditions dénaturantes (Urée 8M) avec un scFv purifié. Lors de ces essais, nous avons observé que ce scFv ne se fixait pas de manière reproductible sur les nanotubes. Une interprétation probable de ces résultats est que le scFv utilisé a été purifié et que, de ce fait, il a déjà été en contact avec du nickel. En effet, la purification de protéines recombinantes s'effectue sur une colonne de résine chargée par un complexe NTA-Ni. Il y a donc une possibilité pour qu'une nouvelle reconnaissance de ce scFv par un système équivalent puisse être compromise.⁸⁹ Nous avons donc choisi d'utiliser un scFv sous sa forme d'extrait brut. En d'autres termes, le scFv est ici mélangé à l'ensemble des protéines endogènes du système d'expression procaryote dont il est issu. Ainsi, en une seule et même étape, il y a adsorption sélective du scFv sur le nanotube aboutissant *in fine* à sa purification.

Nous avons aussi contrôlé la concentration de scFv à utiliser pour une quantité donnée de nanotubes fonctionnalisés (Figure III-14). En effet, si la dose de scFv est trop importante, le signal va être saturé. Au contraire, si la dose est trop faible, la réponse obtenue ne sera pas significative et sera noyée dans le bruit de fond. Il est donc nécessaire de choisir une concentration dans la fourchette qui permet dans le même temps d'obtenir un signal linéaire pour un temps modéré de mise en contact avec le réactif d'Ellman.

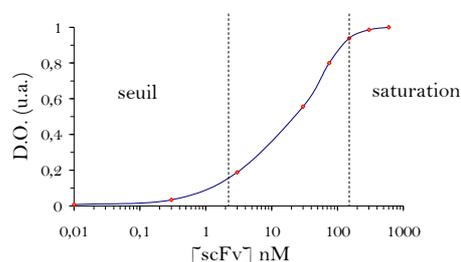


Figure III-14 : Effet de dose du scFv (extrait brut) sur les nanotubes bagués avec le lipide **II-4a** dans un tampon Urée/Tris à pH 8,5

Enfin, parmi les lots de nanotubes testés, il s'est avéré que les nanotubes habillés par le lipide NTA **II-4a** chélaient mal le nickel. En effet, le comparatif entre les nanotubes fonctionnalisés NTA, avec et sans nickel, a donné les mêmes résultats pour la fixation du

scFv. Ce résultat met en évidence une fixation principalement non spécifique de ce dernier sur les nanotubes fonctionnalisés avec le lipide **II-4a**. De plus, une étude par microscopie couplée à une analyse chimique EDX (*Energy Dispersive X-ray*) des échantillons censés contenir du nickel a montré que très peu de nickel était présent sur ces nanotubes. Nous avons interprété ces résultats comme une trop grande densité de fonction NTA sur la surface des nanotubes. La tête NTA ne peut plus alors jouer son rôle et chélater le nickel.

Nous avons donc mené la suite de nos expériences avec deux échantillons de nanotubes fonctionnalisés par π -stacking (**III-9** et **III-11**) et deux greffés de manière covalente (**III-14** et **III-18**) où la densité de fonction NTA est nettement moins grande. Lors des différents essais dans les conditions expérimentales optimisées, l'échantillon de nanotubes fonctionnalisés **III-14** n'a pas donné de résultat positif. Il ne sera pas présenté dans les résultats suivants.

IV.3.2. Effet du tampon

La composition du tampon s'est révélée être très importante, aussi bien pour favoriser la liaison spécifique du scFv sur les nanotubes que pour empêcher l'interaction de l'anticorps 12CA5G4 avec des nanotubes ne portant pas de scFv.

Le point isoélectrique théorique du scFv utilisé (dédduit de sa séquence) est de 8,5. Par conséquent, il est nécessaire de fixer le pH du tampon à 8,5 pour que la protéine soit le plus près de la neutralité et ainsi limiter les interactions ioniques avec la surface chargée des nanotubes fonctionnalisés. C'est à ce pH que le signal spécifique le plus important a été obtenu (Figure III-15). Cependant, la protéine étant potentiellement chargée, il est préférable d'augmenter la force ionique de la solution par ajout de NaCl (300 mM) pour minimiser ce type d'interaction. De même, pour empêcher des interactions hydrophobes entre une protéine et la surface des nanotubes l'addition de glycérol (50 % en masse) dans le tampon est préconisée.

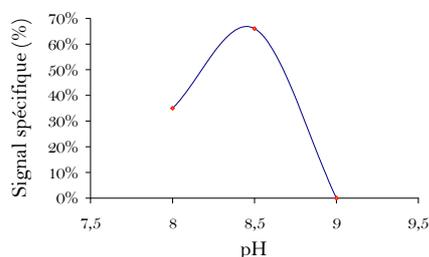


Figure III-15 : Effet du pH sur la liaison spécifique du scFv sur les nanotubes bagués avec le lipide **II-4a** dans un tampon Tris / NaCl / Tween 20

Enfin, d'après Qiagen, un fabricant de colonne de résine NTA-Ni pour la purification de protéines étiquetées His, il est conseillé, d'un point de vue expérimental, d'utiliser un

tampon phosphate (100 mM) plutôt qu'un tampon Tris. Ce dernier déstabiliserait l'accroche du nickel sur la résine et par conséquent la fixation de la protéine.⁹⁰

IV.4. Résultats

IV.4.1. Accroche du scFv et détection de l'anticorps

Pour les essais décrits dans cette partie, les valeurs des différents graphiques transcrivent l'interaction spécifique du scFv avec les nanotubes. Ces valeurs correspondent à la différence de densité optique (révélation Ellman) pour les lots de nanotubes avec nickel et sans nickel.

Tous les résultats présentés (Figure III-16, Figure III-17 et Figure III-18) ont été normalisés *a posteriori* par rapport au meilleur système qui utilise les nanotubes **III-11** fonctionnalisés par le motif cyclam (Figure III-17, Graphique B, valeur = 100%). Pour ces graphiques, la mesure du bruit de fond est assimilée à la quantité de 12CA5G4 interagissant de manière non spécifique avec des nanotubes n'ayant pas été en contact avec les scFv. Nous avons exprimé cette mesure comme un pourcentage du signal spécifique.

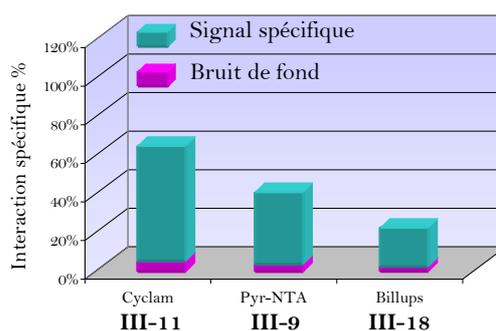


Figure III-16 : Graphiques représentant l'interaction spécifique du scFv avec les nanotubes

Dans un premier temps, nous avons effectué nos expériences en incubant directement le scFv (extrait brut) avec les nanotubes fonctionnalisés dans un tampon phosphate composé de glycérol, d'urée et de NaCl (Schéma III-11, p. 103). Dans tous les cas, nous avons obtenu un signal spécifique avec un faible bruit de fond (Figure III-16). Nous pouvons aussi observer que les nanotubes recouverts du motif cyclam permettent d'obtenir un signal spécifique plus important que celui des nanotubes **III-9** et **III-18**. Une interprétation possible à cette différence est que le complexe Ni-Cyclam est plus stable que le complexe Ni-NTA. De plus, le bruit de fond observé au cours de ces expériences est faible (~ 13% du signal spécifique). Cette valeur correspond au 12CA5G4 qui s'est fixé sur la surface des nanotubes en absence de scFv.

Ces premiers résultats confirment donc l'assemblage de l'édifice "NT-Ligand-Ni-scFv" ainsi que son aptitude à détecter l'anticorps 12CA5G4. Cependant, bien qu'un signal

spécifique soit clairement obtenu, une accroche non spécifique (en absence de nickel) est observée : en moyenne, l'absorbance mesurée représente 81% de celle des échantillons avec nickel (non illustré). Même si ce pourcentage est non négligeable, le signal spécifique reste nettement identifiable. En effet, sa valeur correspond à une densité optique de 1,3 pour une heure de révélation ce qui est suffisamment élevé pour être significatif.

Dans un deuxième temps, nous avons décidé de tester différentes conditions dans le but d'optimiser les résultats obtenus.

IV.4.2. Optimisation des résultats de détection

Afin d'améliorer principalement le signal spécifique, nous avons modifié la méthode de préparation des lots de nanotubes ainsi que l'étape d'incubation du scFv.

Un des moyens utilisé pour limiter la fixation non spécifique des scFv est de masquer la surface des nanotubes pour ne laisser disponibles que les fonctions réactives. Pour ce faire, il est possible de saturer au préalable la surface des nanotubes avec un agent hydrophobe (Schéma III-13). L'utilisation de PVP ou de BSA n'a pas permis de mettre en évidence une amélioration notable du signal spécifique. Le Tween 20, largement employé par Dai et *coll.* pour l'élaboration de biosenseurs,^{31,34} a pu rendre possible une certaine augmentation du signal.

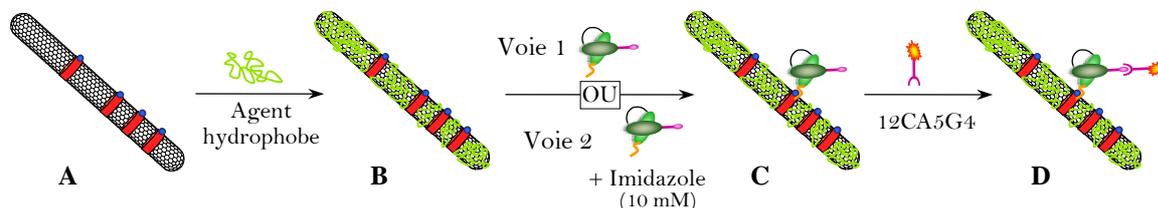


Schéma III-13 : Protocole d'optimisation du signal spécifique

Cependant, les meilleurs résultats ont été obtenus lorsque les nanotubes sont recouverts par l'extrait brut exempt de scFv (Figure III-17, Graphique B). Dans ce cas, ce sont les protéines contenues dans l'extrait brut qui vont saturer la surface des nanotubes. Les mesures d'absorptions ont été effectuées après mise en contact avec le scFv.

Effectivement, nous pouvons remarquer, pour les trois échantillons considérés, une augmentation significative du signal correspondant à l'interaction spécifique (Figure III-17, Graphique B).

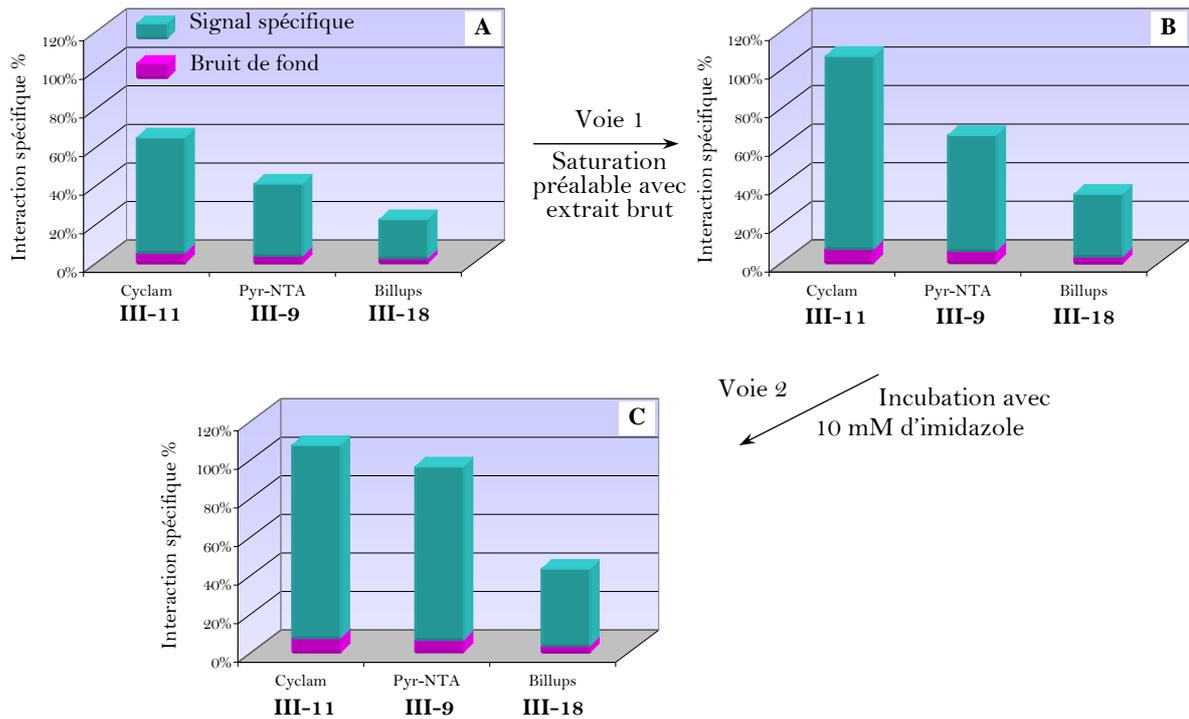


Figure III-17 : Graphiques représentant l'interaction spécifique du scFv avec les nanotubes lorsque ceux-ci ne sont pas saturés préalablement (A), quand ils le sont avec un extrait brut suivi de la mise en contact avec le scFv sans imidazole (B) ou avec 10 mM d'imidazole (C)

Une seconde méthode permettant de diminuer les interactions non spécifiques est d'ajouter une faible quantité d'imidazole (10 mM) lors de la mise en contact du scFv avec les nanotubes (Schéma III-13, voie 2). La présence d'imidazole permet de minimiser toutes les interactions entre les résidus histidine des protéines présentes dans l'extrait brut et les complexes "réactif bifonctionnel-Ni" à la surface des nanotubes.

Dans ce cas, l'interaction spécifique des échantillons **III-9** et **III-18** augmente encore (Figure III-17, Graphique C). Cependant, il est difficile d'expliquer pourquoi cette procédure n'a pas eu d'effet sur l'échantillon de nanotubes **III-11**.

Dans l'ensemble, ces résultats confirment les hypothèses émises pour l'amélioration de l'accrochage du scFv de manière spécifique. De même, ils mettent en évidence la détection spécifique du hybride "nanotube-scFv" par l'anticorps correspondant et valident ainsi la stratégie initiale mise en œuvre. Par contre, même si nous avons amélioré le signal spécifique, le signal correspondant au "nanotube-scFv" sans nickel reste élevé (72% du signal avec nickel).

Il est également nécessaire de vérifier si la liaison entre le scFv et le nanotube est, elle aussi, spécifique.

IV.4.3. Contrôles de la spécificité de l'accrochage du scFv sur les nanotubes

L'une des méthodes pour vérifier la spécificité de l'interaction entre le scFv et les nanotubes est d'ajouter de l'imidazole à une concentration forte de 200 mM lors de la mise en contact du scFv avec les nanotubes. Cette concentration d'imidazole empêche la fixation du scFv à la surface des nanotubes. En effet, la réalisation d'un test d'Ellman (Figure III-18) confirme une forte baisse du signal de l'interaction spécifique.

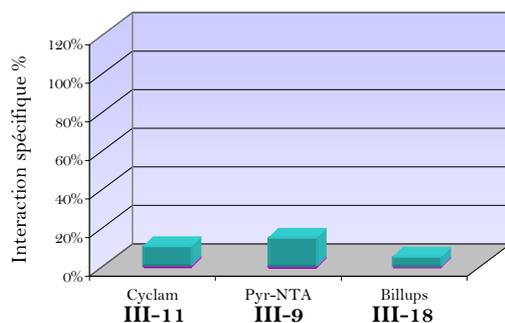


Figure III-18 : Graphiques représentant l'interaction spécifique du scFv avec les nanotubes lorsque ceux-ci sont saturés préalablement avec un extrait brut puis incubés avec 200 mM d'imidazole (B)

Un second contrôle a été effectué pour mettre en évidence la sélectivité de l'interaction du scFv avec les nanotubes. Ce test implique une incubation des nanotubes **D** avec de l'imidazole (200 mM, Schéma III-14) qui va entrer en compétition avec les résidus histidine du scFv et éluer le complexe "scFv-12CA5G4". La vérification de cette élution est effectuée par le test d'Ellman.

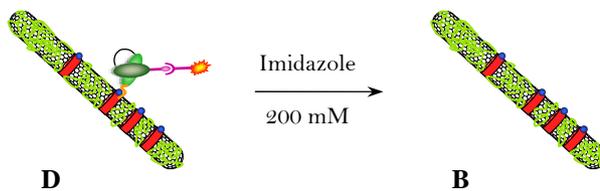


Schéma III-14 : Contrôles de la spécificité de l'accrochage du scFv sur les nanotubes

Le dosage confirme une forte baisse du signal initial (98 %) correspondant au décrochage du complexe scFv lié au 12CA5G4 de la surface des nanotubes. Ce contrôle supplémentaire corrobore effectivement la première série de témoins réalisée (Figure III-18).

IV.5. Conclusion

Les résultats obtenus permettent de valider la construction du système "nanotube-scFv" pour la détection d'un anticorps. En effet, quels que soient les essais effectués, l'anticorps ne se fixe pas sur les nanotubes si le scFv n'a pas été immobilisé auparavant sur leur surface. Lors de ces tests, nous nous sommes aperçus que le scFv se fixait préférentiellement de manière spécifique. Toutefois, il est important de préciser que même si

le signal non spécifique est non négligeable, le signal spécifique est nettement identifiable. Ce signal est, en effet, suffisamment élevé et distinct du signal non spécifique pour être significatif.

V. Approche pour la détection de la protéine Prion

Dans le but de construire un biosenseur dirigé contre la protéine Prion (PrP), nous avons effectué des tests pour accrocher le scFv sur les nanotubes, dans des conditions renaturantes. Cela signifie que le scFv est purifié au préalable puis placé dans un tampon adéquat lui permettant de retrouver le repliement adapté à son activité biologique, à savoir la reconnaissance de la PrP.

Ces conditions natives impliquent la présence de tampon Tris (0,1 M) et d'arginine (0,4 M). Nous avons adapté ces conditions pour améliorer la spécificité de la liaison du scFv sur les nanotubes en rajoutant un détergent non ionique (Tween 20) et du NaCl (300 mM). Comme indiqué dans les sections précédentes, ces conditions ne sont pas idéales (présence de Tris, d'arginine et purification du scFv) pour fixer un tag His sur un complexe du nickel. Les tests de greffage du scFv sur les nanotubes ont permis de mettre en évidence une fixation spécifique de ce dernier. Cependant, il est à noter que la différence de signal entre les nanotubes ayant du nickel et ceux qui n'en contiennent pas est faible.

Ces résultats préliminaires sont encourageants, néanmoins, il reste à améliorer l'accrochage spécifique du scFv et à montrer la capacité à détecter de ce dernier vis-à-vis de la protéine Prion.

VI. Perspectives

L'universalité de l'approche pour la détection de cibles reste à démontrer en immobilisant par notre méthode différents antigènes/anticorps recombinants possédant un tag His.

A moyen terme, il est envisagé d'adapter notre stratégie et de l'inclure dans un système de détection adéquat. Il sera intéressant de vérifier si l'on peut détecter dans des fluides biologiques (sérum, sang, urine,...) la présence d'anticorps spécifiques. Actuellement, un système reposant sur les ondes acoustiques, comme la microbalance à quartz, semble être le plus adapté avec l'analyse d'un échantillon liquide.

Concernant l'approche visant à détecter la protéine Prion, nous envisageons d'effectuer des essais avec un analogue, la protéine Prion marquée par l'acétylcholinestérase (PrP-G4). Cela permettrait effectivement d'identifier si cette dernière est reconnue

spécifiquement quand le scFv est accroché sur les nanotubes et de valider l'activité biologique du scFv. Dans le cas où il n'y aurait pas de reconnaissance, il serait possible de renaturer le scFv directement sur les nanotubes. Cette méthode a déjà été expérimentée sur support solide.

VII. Conclusion

La troisième partie de ce mémoire a porté sur l'élaboration d'hybrides composés de nanotubes de carbone et de fragments d'anticorps. Ces objets sont d'un grand intérêt pour la construction de biodétecteurs et en particulier d'immunosenseurs.

Un inconvénient majeur à l'étude et au développement de ces outils est l'affinité intrinsèque que peut avoir une protéine pour la surface des nanotubes. Nous avons résolu cette difficulté en fonctionnalisant les nanotubes avec des motifs bifonctionnels. Il nous a paru intéressant d'aborder cette étape selon deux approches différentes. Nous avons utilisé des entités qui permettent aussi bien un greffage covalent que non-covalent sur des nanotubes multiparois. Ces entités offrent la possibilité de chélater des ions nickel connus pour interagir avec les étiquettes histidine insérées dans la plupart des protéines recombinantes, soulignant l'universalité de l'approche. Ces protéines sont obtenues grâce aux progrès des biotechnologies qui permettent d'envisager de produire dans des cellules n'importe quelle protéine. On dispose alors d'une source inépuisable et peu onéreuse de protéines d'intérêt (enzymes, cytokines, facteurs de croissance, allergènes...).

Dans un premier temps, nous avons exploré le moyen de détecter un anticorps en accrochant de manière spécifique un scFv, jouant le rôle d'antigène, sur les nanotubes. Plusieurs approches ont été explorées pour fixer le scFv de manière spécifique : la fonctionnalisation covalente des nanotubes avec des groupements NTA et l'interaction par π -stacking de motifs polyaromatiques, portant une fonction NTA ou cyclam, avec les nanotubes. Les meilleurs résultats utilisent le groupement cyclam comme ligand du nickel. Nous avons également optimisé cette approche, dans le but d'obtenir une fixation spécifique du scFv plus importante, en utilisant une combinaison de plusieurs paramètres : une saturation préalable de la surface des nanotubes, l'ajout d'une faible quantité d'imidazole et l'utilisation du scFv sous sa forme extrait brut. De plus, ces résultats ont permis de mettre en évidence la reconnaissance spécifique de l'hybride "nanotube-scFv" par l'anticorps correspondant.

Dans un deuxième temps, en se basant sur le même principe, nous avons abordé l'approche inverse en se servant du scFv renaturé pour sa reconnaissance de la protéine Prion. Bien que nous ayons réussi à confirmer sa fixation sur les tubes, nous n'avons pas encore pu démontrer s'il avait gardé le repliement idéal pour reconnaître la protéine Prion.

VIII. Bibliographie

- ¹ Clark, L. C. J.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29.
- ² Wilson, G. S.; Gifford, R. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2388.
- ³ Malhotra, B. D.; Singhal, R.; Chaubey, A.; Sharma, S. K.; Kumar, A. *Curr. Appl. Phys.* **2005**, *5*, 92.
- ⁴ Kubitschko, S.; Brückner, T.; Pohl, S.; Oranth, N. *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 112.
- ⁵ Malecki, M.; Hsu, A.; Truong, L.; Sanchez, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 213.
- ⁶ Shen, Z.; Mernaugh, R. L.; Yan, H.; Yu, L.; Zhang, Y.; Zeng, X. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 6834.
- ⁷ Tang, D.; Yuan, R.; Chai, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 1116.
- ⁸ Zhang, L.; Yuan, R.; Huang, X.; Chai, Y.; Tang, D.; Cao, S. A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 1036.
- ⁹ Allen, B. L.; Kichambare, P. D.; Star, A. *Adv. Mater.* **2007**, *19*, 1439.
- ¹⁰ Balasubramanian, K.; Burghard, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *385*, 452.
- ¹¹ Gruner, G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 322.
- ¹² Veetil, J. V.; Ye, K. *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 517.
- ¹³ Davis, J. J.; Green, M. L. H.; Hill, H. A. O.; Leung, Y. C.; Sadler, P. J.; Sloan, J.; Xavier, A. V.; Tsang, S. C. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *272*, 261.
- ¹⁴ Guo, Z.; Sadler, P. J.; Tsang, S. C. *Adv. Mater.* **1998**, *10*, 701.
- ¹⁵ Balavoine, F.; Schultz, P.; Richard, C.; Mallouh, V.; Ebbesen, T. W.; Mioskowski, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1912.
- ¹⁶ Huang, W.; Taylor, S.; Fu, K.; Lin, Y.; Zhang, D.; Hanks, T. W.; Rao, A. M.; Sun, Y. P. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 311.
- ¹⁷ Yu, X.; Munge, B.; Patel, V.; Jensen, G.; Bhirde, A.; Gong, J. D.; Kim, S. N.; Gillespie, J.; Gutkind, J. S.; Papadimitrakopoulos, F.; Rusling, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11199.
- ¹⁸ Wohlstadter, J. N.; Wilbur, J. L.; Sigal, G. B.; Biebuyck, H. A.; Billadeau, M. A.; Dong, L.; Fischer, A. B.; Gudiband, S. R.; Jameison, S. H.; Kenten, J. H.; Leginus, J.; Leland, J. K.; Massey, R. J.; Wohlstadter, S. J. *Adv. Mater.* **2003**, *15*, 1184.
- ¹⁹ Elkin, T.; Jiang, X.; Taylor, S.; Lin, Y.; Gu, L.; Yang, H.; Brown, J.; Collins, S.; Sun, Y.-P. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 640.
- ²⁰ Gooding, J. J.; Wibowo, R.; Liu, J. Q.; Yang, W.; Losic, D.; Orbons, S.; Mearns, F. J.; Shapter, J. G.; Hibbert, D. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9006.
- ²¹ Jiang, K.; Schadler, L. S.; Siegel, R. W.; Zhang, X.; Zhang, H.; Terrones, M. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 37.
- ²² Yu, X.; Kim, S. N.; Papadimitrakopoulos, F.; Rusling, J. F. *Mol. Biosyst.* **2005**, *1*, 70.
- ²³ ShiKam, N. W.; Jessop, T. C.; Wender, P. A.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6850.
- ²⁴ Yun, Y. H.; Bange, A.; Heineman, W. R.; Halsall, H. B.; Shanov, V. N.; Dong, Z.; Pixley, S.; Behbehani, M.; Jazieh, A.; Tu, Y.; Wong, D. K. Y.; Bhattacharya, A.; Schulz, M. J. *Sensors Actu. B Chem.* **2007**, *123*, 177.
- ²⁵ Lin, Y.; Allard, L. F.; Sun, Y. P. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 3760.
- ²⁶ Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Graff, R.; Hoebeke, J.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 6160.
- ²⁷ Rusmini, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775.
- ²⁸ Li, C.; Curreli, M.; Lin, H.; Lei, B.; Ishikawa, F. N.; Datar, R.; Cote, R. J.; Thompson, M. E.; Zhou, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12484.
- ²⁹ Okuno, J.; Maehashi, K.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Matsumoto, K.; Tamiya, E. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, *22*, 2377.
- ³⁰ Maehashi, K.; Katsura, T.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Matsumoto, K.; Tamiya, E. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 782.
- ³¹ Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3838.
- ³² Wang, C.-W.; Pan, C.-Y.; Wu, H.-C.; Shih, P.-Y.; Tsai, C.-C.; Liao, K.-T.; Lu, L.-L.; Hsieh, W.-H.; Chen, C.-D.; Chen, Y.-T. *Small* **2007**, *9999*, NA.
- ³³ Holder, P. G.; Francis, M. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 4370.
- ³⁴ Chen, R. J.; Bangsaruntip, S.; Drouvalakis, K. A.; Kam, N. W. S.; Shim, M.; Li, Y.; Kim, W.; Utz, P. J.; Dai, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 4984.
- ³⁵ Byon, H. R.; Hong, B. J.; Gho, Y. S.; Park, J. W.; Choi, H. C. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1331.
- ³⁶ So, H. M.; Won, K.; Kim, Y. H.; Kim, B. K.; Ryu, B. H.; Na, P. S.; Kim, H.; Lee, J. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11906.
- ³⁷ Star, A.; Gabriel, J. C. P.; Bradley, K.; Gruner, G. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 459.
- ³⁸ Karajanagi, S. S.; Yang, H.; Asuri, P.; Sellitto, E.; Dordick, J. S.; Kane, R. S. *Langmuir* **2006**, *22*, 1392.
- ³⁹ Wang, S.; Humphreys, E. S.; Chung, S.-Y.; Delduco, D. F.; Lustig, S. R.; Wang, H.; Parker, K. N.; Rizzo, N. W.; Subramoney, S.; Chiang, Y.-M.; Jagota, A. *Nat. Mater.* **2003**, *2*, 196.
- ⁴⁰ Nepal, D.; Geckeler, K. E. *Small* **2007**, *3*, 1259.
- ⁴¹ Yan, Y.; Zheng, W.; Zhang, M.; Wang, L.; Su, L.; Mao, L. *Langmuir* **2005**, *21*, 6560.
- ⁴² Tans, S. J.; Vershueren, A. R. M.; Dekker, C. *Nature* **1998**, *393*, 49.

- ⁴³ Li, N.; Yuan, R.; Chai, Y.; Chen, S.; An, H.; Li, W. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 8443.
- ⁴⁴ Kam, N. W. S.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6021.
- ⁴⁵ Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Système immunitaire*, La cellule, **1994**.
- ⁴⁶ Skerra, A.; Plückthun, A. *Science* **1988**, *240*, 1038.
- ⁴⁷ Huston, J. S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M.; Novotny, J.; Margolies, M. N.; Ridge, R. J.; Bruccoleri, R. E.; Haber, E.; Crea, R.; Oppermann, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 5879.
- ⁴⁸ Bird, R. E.; Hardmann, K. D.; Jacobson, J. W.; Johnson, S.; Kaufman, B. M.; Lee, S.; Pope, S. H.; Riordan, G. S.; Whitlow, M. *Science* **1988**, *242*.
- ⁴⁹ Holliger, P.; Hudson, P. J. *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1126.
- ⁵⁰ Rothlisberger, D.; Honegger, A.; Pluckthun, A. *J. Mol. Biol.* **2005**, *347*, 773.
- ⁵¹ Padiolleau-Lefevre, S.; Alexandrenne, C.; Dkhissi, F.; Clement, G.; Essono, S.; Blache, C.; Couraud, J. Y.; Wijkhuisen, A.; Boquet, D. *Mol. Immunol.* **2007**, *44*, 1898.
- ⁵² Kruppa, M.; König, B. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3520.
- ⁵³ Zhou, H.; Baldini, L.; Hong, J.; Wilson, A. J.; Hamilton, A. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2421.
- ⁵⁴ Zhang, C.; Suslick, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11548.
- ⁵⁵ Kimura, E. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 171.
- ⁵⁶ Aoki, S.; Kimura, E. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 769.
- ⁵⁷ Amendola, V.; Fabbri, L.; Mangano, C.; Pallavicini, P. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 488.
- ⁵⁸ Hochuli, E.; Dobeli, H.; Schacher, A. *J. Chromato. A* **1987**, *411*, 177.
- ⁵⁹ Hainfeld, J. F.; Liu, W.; Halsey, C. M. R.; Freimuth, P.; Powell, R. D. *J. Struct. Biol.* **1999**, *127*, 185.
- ⁶⁰ Kim, J. S.; Valencia, A. C.; Liu, R.; Lin, W. *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 333.
- ⁶¹ Dang, T. X.; Milligan, R. A.; Tweten, R. K.; Wilson-Kubalek, E. M. *J. Struct. Biol.* **2005**, *152*, 129.
- ⁶² Venien-Bryan, C.; Balavoine, F.; Toussaint, B.; Mioskowski, C.; Hewat, E. A.; Helme, B.; Vignais, P. M. *J. Mol. Biol.* **1997**, *274*, 687.
- ⁶³ Lebeau, L.; Lach, F.; Vénien-Bryan, C.; Renault, A.; Dietrich, J.; Jahn, T.; Palmgren, M. G.; Kühlbrandt, W.; Mioskowski, C. *J. Mol. Biol.* **2001**, *308*, 639.
- ⁶⁴ Courty, S.; Lebeau, L.; Martel, L.; Lenné, P. F.; Balavoine, F.; Dischert, W.; Konovalov, O.; Mioskowski, C.; Legrand, J. F.; Vénien-Bryan, C. *Langmuir* **2002**, *18*, 9502.
- ⁶⁵ Lata, S.; Gavutis, M.; Tampe, R.; Piehler, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2365.
- ⁶⁶ Lata, S.; Reichel, A.; Brock, R.; Tampe, R.; Piehler, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10205.
- ⁶⁷ Bosnich, B.; Poon, C. K.; Tobe, M. L. *Inorg. Chem.* **1965**, *4*, 1109.
- ⁶⁸ Cabbiness, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 1.
- ⁶⁹ Engeser, M.; Fabbri, L.; Licchelli, M.; Sacchi, D. *Chem. Commun.* **1999**, *1191*, 1192.
- ⁷⁰ Boiocchi, M.; Fabbri, L.; Foti, F.; Vazquez, M. *Dalton Trans.* **2004**, 2616.
- ⁷¹ Fabbri, L.; Foti, F.; Licchelli, M.; Poggi, A. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 4612.
- ⁷² Dubois, F. *Etudes des modifications des propriétés spectroscopiques de chemosenseurs fluorescents extrinsèques en présence de Cd(II), de Zn(II) et de Hg(II)*, Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles, **2002**.
- ⁷³ Fabbri, L.; Licchelli, M.; Pallavicini, P. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 846.
- ⁷⁴ Hunter, T. M.; McNae, I. W.; Simpson, D. P.; Smith, A. M.; Moggach, S.; White, F.; Walkinshaw, M. D.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 40.
- ⁷⁵ Sun, S.; Saltmarsh, J.; Mallik, S.; Thomasson, K. *Chem. Commun.* **1998**, 519.
- ⁷⁶ Kimura, E.; Shionoya, M.; Mita, T.; Iitaka, Y. *Chem. Commun.* **1987**, *21*, 1712.
- ⁷⁷ Hunter, T. M.; McNae, I. W.; Liang, X.; Bella, J.; Parsons, S.; Walkinshaw, M. D.; Sadler, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 2288.
- ⁷⁸ Mallik, S.; Johnson, R. D.; Arnold, F. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 8902.
- ⁷⁹ Tadokoro, M.; Sato, K.; Shiomi, D.; Takui, T.; Itoh, K. *Mol. Cryst. Liq. Cryst. Sci. Technol., Sect. A* **1997**, *306*, 49.
- ⁸⁰ Liang, X.; Parkinson, J. A.; Weishaupl, M.; Gould, R. O.; Paisey, S. J.; Park, H. S.; Hunter, T. M.; Blindauer, C. A.; Parsons, S.; Sadler, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9105.
- ⁸¹ Johnson, D. L.; Martin, L. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2018.
- ⁸² Liang, F.; Sadana, A. K.; Peera, A.; Chattopadhyay, J.; Gu, Z.; Hauge, R. H.; Billups, W. E. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1257.
- ⁸³ Chattopadhyay, J.; Sadana, A. K.; Liang, F.; Beach, J. M.; Xiao, Y.; Hauge, R. H.; Billups, W. E. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 4067.
- ⁸⁴ Liang, F.; Beach, J. M.; Rai, P. K.; Guo, W.; Hauge, R. H.; Pasquali, M.; Smalley, R. E.; Billups, W. E. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 1520.
- ⁸⁵ Stephenson, J. J.; Sadana, A. K.; Higginbotham, A. L.; Tour, J. M. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 4658.
- ⁸⁶ DerVartanian, D. V.; Chenoweth, M. R. *Patent US6020204* **2000**.
- ⁸⁷ Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andres, V.; Feather-Stone, R. M. *Biochem. Pharmacol.* **1961**, *7*, 88.
- ⁸⁸ Ellman, G. L. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70.
- ⁸⁹ Rhulmann, C. *Conversation personnelle* **2006**.

⁹⁰ Quiagen *The Quiaexpressionist* **2002**.

CHAPITRE IV

Agents oxydants de l'ADN et transfert électronique photoinduit

I. Introduction

Dans cette partie, nous allons exposer différentes stratégies mises en œuvre pour obtenir des composés hybrides à base de nanotubes de carbone et étudier les mécanismes électroniques intervenant lors de l'excitation lumineuse de ces composés. Le premier objectif a été de fonctionnaliser les nanotubes avec un motif capable de s'intercaler dans les brins de l'ADN et d'observer la capacité des nanotubes fonctionnalisés à couper l'ADN sous irradiation lumineuse UV. Nous avons poursuivi par l'étude des phénomènes physiques intervenant lors de l'excitation lumineuse par des mesures de fluorescence stationnaire et résolue en temps ainsi que par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE).

Les tests de fluorescence et les mesures de temps de vie ont été réalisés en collaboration avec Jacques Delaire au laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaire et Macromoléculaire (PPSM) à l'Ecole Normale Supérieure de Cachan. Les expériences de RPE ont été effectuées au Laboratoire de Bioénergétique Moléculaire et Photosynthèse (LBMP) du CEA de Saclay en collaboration avec William Rutherford.

II. Conception d'un agent clivant de l'ADN

II.1. Intérêt biologique

L'étude de l'interaction de différents ligands avec l'ADN est d'un intérêt considérable en particulier pour la conception de médicaments ciblant l'ADN. L'insertion de ligands au niveau des bases de l'ADN permet à plusieurs anticancéreux, comme la Doxorubicine ou la Mitomycine, d'exercer leur activité biologique.

Une des techniques de plus en plus utilisée pour le traitement de certains cancers ainsi que pour l'inactivation de virus ou de bactéries résistantes est la photothérapie dynamique. Cette procédure implique l'administration d'une drogue photoactive (photosensibilisateur) suivie par une irradiation des tissus cibles à une longueur d'onde spécifique absorbée par la drogue. La forme excitée de la drogue va alors entraîner la nécrose des cellules irradiées.

Une condition pré-requise pour avoir une activité photodynamique efficace est que le photosensibilisateur soit retenu de manière préférentielle et sélective dans les tissus malades. Ce pré-requis est en partie rempli par l'utilisation de chromophores spécifiques qui peuvent se lier avec une grande affinité aux acides nucléiques et les endommager.

Les différentes stratégies reposent aussi bien sur l'utilisation de photosensibilisateurs endogènes (porphyrines, flavines, quinones,...) que xénobiotiques (complexes métalliques,

bleu de méthylène, acridine,...). Ces différentes entités, lorsqu'elles sont employées en solution, sont transformées en photonucléases par excitation lumineuse. La génération de ces espèces excitées va induire une série de réactions en chaîne qui pourra conduire à la coupure de l'ADN.¹⁻⁴

Le clivage de l'ADN peut aussi bien provenir d'une réaction chimique en présence d'espèces diffusantes que par transfert électronique entre une espèce excitée et une base de l'ADN.

II.2. Mécanismes du clivage de l'ADN

L'excitation lumineuse d'un chromophore en milieu aérobie peut provoquer aussi bien la génération d'espèces diffusantes que l'oxydation directe d'une base de l'ADN. Quel que soit le mécanisme suivi, il en résulte le clivage de l'ADN.

Un exemple d'espèce diffusante est l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2^*$). Cette espèce est formée par la présence conjointe d'oxygène et d'une espèce dans son état excité. Cette espèce provoque l'arrachage d'un atome d'hydrogène sur une des 5 positions du cycle désoxyribose. Cet arrachage induit la présence d'un radical qui va entraîner une cascade de réactions menant au clivage de l'ADN. La littérature propose de nombreux mécanismes pour expliquer ce phénomène.¹⁻⁴

II.2.1. Transfert électronique photoinduit

II.2.1.a. Principe général

La seconde voie permettant d'induire un clivage de l'ADN repose sur l'oxydation d'une base de l'ADN par transfert électronique photoinduit. Ce mécanisme (Schéma IV-1) implique la présence d'une espèce électroniquement excitée (R^*) produite par irradiation lumineuse. Par transfert électronique, une base de l'ADN (B) va être oxydée en radical cationique. Ce dernier est soit piégé par la base où il se trouve soit migre par une série de réactions de transfert d'électrons jusqu'à atteindre un site thermodynamiquement favorisé, *i.e.* ayant un faible potentiel d'oxydation. Il peut en découler une coupure de l'ADN.

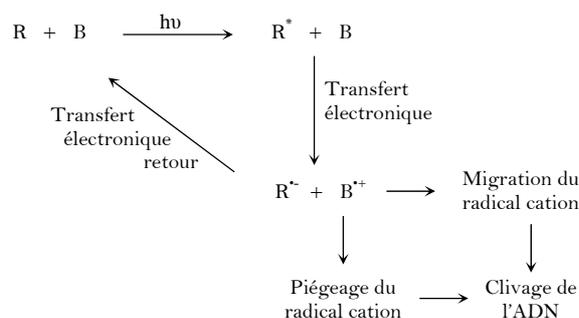


Schéma IV-1 : Mécanisme par transfert électronique

Une des principales limitations associées au transfert d'électron est la recombinaison rapide anion-cation avant que l'ADN ne soit endommagé. Pour remédier à ce problème, des essais ont été menés en se basant sur des mécanismes de co-sensibilisation.

II.2.1.b. Mécanisme de co-sensibilisation

Ce concept consiste à utiliser en plus du photosensibilisateur (intercalant) un co-sensibilisateur (accepteur d'électron). Ainsi, après excitation de l'intercalant, ce dernier va pouvoir transférer un électron à l'accepteur et par conséquent retarder, voire inhiber le transfert électronique exergonique retour. Deux mécanismes d'action peuvent être proposés (Schéma IV-2) pour l'oxydation de l'ADN. Dans le chemin réactionnel A, la base de l'ADN (préférentiellement la guanine) transfère un électron à l'intercalant dans son état excité (D^*) qui est suivi par un second transfert électronique du radical anion $D^{\cdot-}$ au groupement accepteur avec la formation d'un état de séparation de charge. La deuxième voie possible (B) consiste, dans un premier temps, en un transfert d'électron du groupement donneur dans son état excité vers le co-sensibilisateur (A). Ce transfert est alors suivi par la réduction du radical cation $D^{\cdot+}$ par une base de l'ADN.

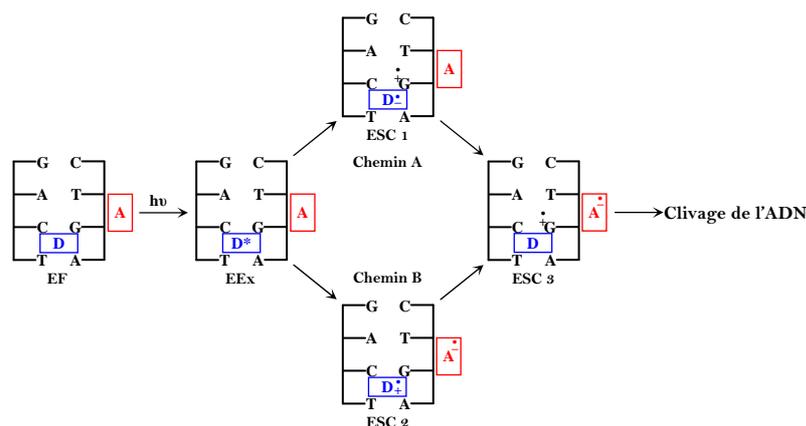


Schéma IV-2 : Représentation schématique des chemins A et B pour le clivage de l'ADN induit par la photoactivation d'un intercalant en présence d'un groupement accepteur. (EF = État fondamental, EEx = état excité, ESC = Etat de séparation de charge, D = intercalant/groupe donneur, A = groupe accepteur)

Quel que soit le chemin, l'oxydation de la base de l'ADN induit un clivage de ce dernier.

II.3. Elaboration d'un agent clivant de l'ADN

Il a été montré que pour améliorer ce système donneur-accepteur, il était avantageux de relier entre eux les deux partenaires par un lien covalent. En effet, la présence d'un bras espaceur permet de contrôler au mieux la liaison du système à l'ADN ainsi que les propriétés de transfert électronique. Il a été mis en évidence qu'il existait une longueur optimale du bras espaceur pour obtenir la durée de vie de l'état de séparation de charge la plus élevée. La

coupure de l'ADN se produisant pendant l'état de séparation de charge, plus la durée de vie de cet état est grande, meilleure sera l'efficacité du système.

Un autre moyen implicite pour améliorer ce système est de jouer sur la nature du donneur et de l'accepteur. Le groupement donneur doit être capable de s'intercaler dans le brin d'ADN tandis que le groupement accepteur doit être capable de stocker suffisamment longtemps des électrons.

II.3.1. Nature du groupement donneur

Plusieurs types de molécules sont couramment utilisées en tant qu'intercalant de l'ADN. Leur caractéristique principale est d'avoir une structure polyaromatique plane. Le plus utilisé est le bromure d'éthidium. Il sert généralement en biologie moléculaire pour la révélation des gels d'agarose. Nous pouvons également citer, l'iodure de propidium, le pyrène, les dérivés de l'acridine ainsi que ceux de l'antraquinone. Certains dérivés de l'antraquinone comme la Doxorubicine ou la Mitomycine sont des agents anticancéreux efficaces.

Pour notre étude, nous avons choisi un système basé sur un dérivé de l'acridine. C'est l'un des premiers chromophores à avoir été étudié pour son interaction non covalente avec l'ADN par Lerman en 1961.⁵ C'est un intercalant de l'ADN qui agit comme donneur d'électrons. Plusieurs équipes ont étudié l'interaction de ce composé et d'analogues avec l'ADN.

II.3.2. Exemples de systèmes "Acridine-Accepteur" et "Acridinium-Donneur"

Ramaiah et *coll.* ont rapporté que le couple "acridine – méthyle viologène" est un système efficace pour la dégradation de l'ADN.⁶⁻⁹ Ils ont également montré que la liaison covalente des deux groupements permettait d'augmenter l'efficacité du modèle. Leurs travaux montrent qu'une petite longueur de chaîne et/ou une conformation stériquement encombrée nuisent à un clivage efficace de l'ADN.

Miyata et *coll.* ont greffé un motif phénylacridine sur un fullerène, qui est un fort accepteur d'électrons.¹⁰ Bien que sous excitation lumineuse le fullerène puisse former de l'oxygène singulet et par conséquent cliver l'ADN, le couplage de ces deux entités améliore nettement leur activité respective.

Un dernier exemple pertinent d'utilisation de l'acridine dans un système impliquant une co-sensibilisation est son association avec une porphyrine métallée ou non. L'étude de ces cofacteurs a montré encore une fois l'importance de la présence d'un lien covalent ainsi que leur efficacité que ce soit avec l'acridine comme donneur ou l'acridinium comme accepteur d'électrons.^{11,12}

L'utilisation de motif acridinium permet effectivement de multiplier les possibilités de construction de systèmes actifs pour le clivage de l'ADN. Fukuzumi et *coll.* ont démontré que l'excitation du 9-mésityle-10-méthylacridinium (Acr^+-Mes) induisait un état de séparation de charge ($\text{Acr}^{\bullet}-\text{Mes}^{*+}$) de plus de deux heures à température ambiante.^{13,14} Cet état est dû à un transfert d'électron du groupement mésityle vers l'acridinium dans son état excité singulet. Sous sa forme protonée, l'acridine va jouer ici le rôle d'accepteur d'électrons et c'est le radical cation Mes^{*+} qui va oxyder la base de l'ADN.

II.4. Stratégie suivie

La stratégie que nous proposons de mettre en place repose sur l'utilisation d'une structure de type donneur-accepteur, qui combine un nanotube de carbone à un dérivé acridine ou acridinium (Schéma IV-3). En effet, les nanotubes ont la capacité de véhiculer une grande quantité d'électrons *via* leur réseau graphitique. Ils peuvent être considérés comme des réservoirs à électrons pouvant jouer aussi bien un rôle de donneur ou d'accepteurs d'électrons. De plus, il a été montré que l'ADN pouvait s'organiser spontanément autour des nanotubes par des interactions de type π -*stacking* entre les bases nucléiques et la paroi des tubes.¹⁵⁻¹⁷ Notre système pourrait ainsi combiner une interaction de l'ADN avec le nanotube et le dérivé acridine.

Pour la jonction entre le nanotube et le dérivé d'acridine nous avons, dans un premier temps, utilisé un lien covalent rigide. Ce type de construction permet de limiter les interactions de π -*stacking* entre les deux entités et favorise l'intercalation de l'acridine. L'évaluation de ces systèmes sera effectuée dans un premier temps par observation sur gel d'agarose de l'ADN clivé puis par l'étude du transfert électronique entre l'entité donneuse et l'accepteur.

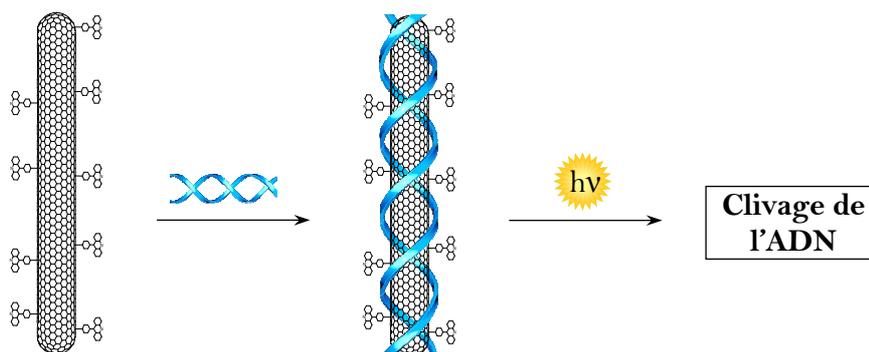


Schéma IV-3 : Représentation schématique du clivage de l'ADN par un système nanotube-acridine. Dans ce cas, le nanotube jouerait le rôle d'accepteur d'électrons.

III. Association covalente de SWNTs avec un dérivé de l'acridine et clivage de l'ADN

Pour fonctionnaliser les nanotubes, nous nous sommes inspirés des travaux décrits par Tour et *coll.* qui ont développé une méthode de fonctionnalisation efficace des nanotubes monoparoie avec des sels d'aryldiazonium (*cf* Chapitre I). Dans cette optique, nous avons donc synthétisé un dérivé de l'acridine (Figure IV-1), précurseur de l'entité aryldiazonium, avec un groupement aniline en *para* du noyau pyridine.

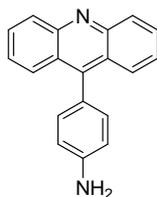


Figure IV-1 : Structure du 9-(4-aminophényle)acridine

Nous avons ainsi une molécule capable d'être greffée sur le nanotube et qui est orientée perpendiculairement par rapport à l'axe du tube. Les SWNTs natifs que nous avons utilisés proviennent de la société CNI (*Carbon Nanotechnology Incorporated*) au Texas et ont été synthétisés par la méthode HiPCO (*cf* Chapitre I). Ils seront dénommés HiPCO dans la suite de ce mémoire. Ils possèdent une distribution de diamètre comprise entre 0,7 et 1,4 nm.

III.1. Synthèse d'un analogue greffable de l'acridine et fonctionnalisation de nanotubes SWNTs

La séquence réactionnelle mise en œuvre est présentée sur le Schéma IV-4. Dans un premier temps, le groupement 4-aminophényle est introduit sur le noyau central de l'acridine par réaction du chlorhydrate de l'acridine **IV-1** en présence de chlorure d'argent à 130°C. Le sel de diazonium **IV-3** est ensuite préparé à partir du dérivé **IV-2** par oxydation au tétrafluoroborate de nitrosonium. A 60°C, le sel de diazonium **IV-3** se décompose en libérant une molécule d'azote et génère ainsi un radical carbocentré très réactif. Ce dernier peut alors s'additionner à la surface des nanotubes, pour conduire aux nanotubes fonctionnalisés **IV-6**.

Pour notre étude, il est également nécessaire d'utiliser une molécule de référence. Pour ce faire, nous avons préparé l'analogue **IV-4** par hydrodediazonation en présence d'acide hypophosphoreux. Les dérivés acridinium du produit de référence **IV-4** et des nanotubes **IV-6** (**IV-5** et **IV-7** respectivement) ont été obtenus par traitement à reflux de l'iodure de méthyle pur pendant 3 jours. Il en résulte la méthylation du noyau pyridine.

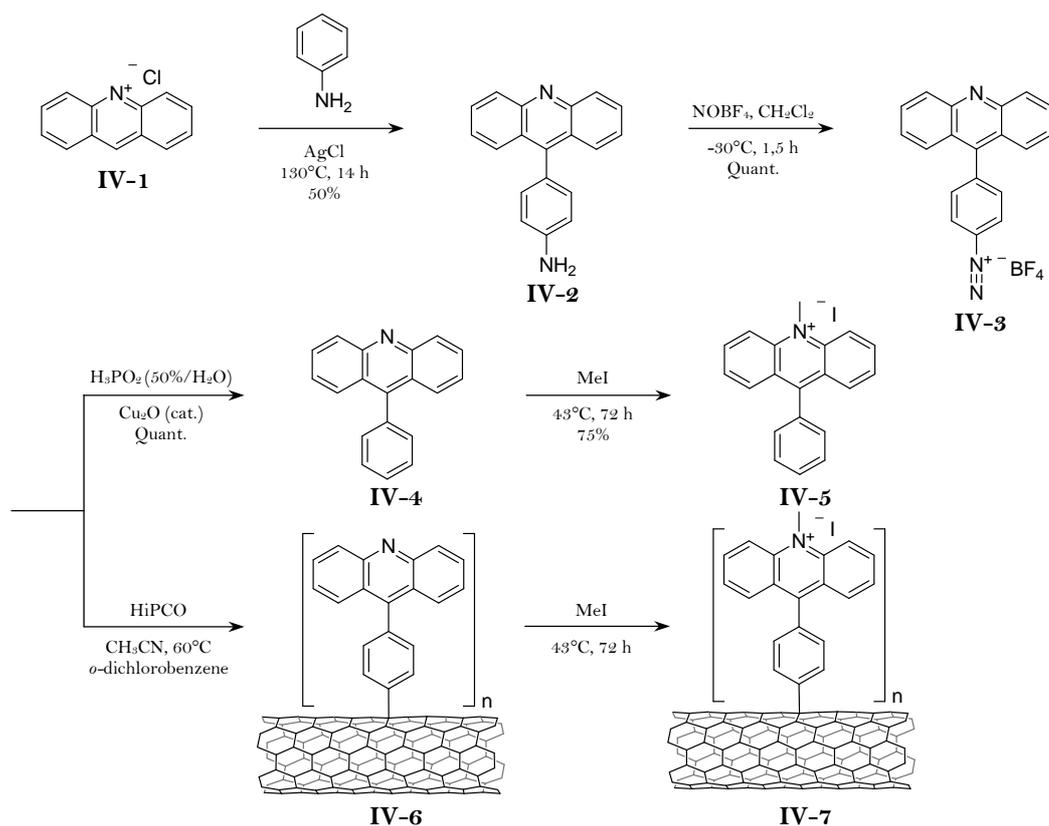


Schéma IV-4 : Séquences réactionnelles pour la préparation des dérivés acridine (IV-4 et IV-5) et des nanotubes fonctionnalisés (IV-6 et IV-7)

III.2. Caractérisation des nanotubes fonctionnalisés

Les spectroscopies de diffusion Raman et d'absorption UV-Vis-NIR sont des méthodes de choix pour déterminer si la fonctionnalisation est covalente ou s'il s'agit uniquement d'une adsorption physique. Nous avons également utilisé l'analyse par thermogravimétrie pour déterminer le taux de fonctionnalisation des nanotubes.

III.2.1. Spectroscopie de diffusion Raman

La spectroscopie de diffusion Raman permet d'obtenir des informations quant aux modifications des propriétés électroniques des nanotubes. Elle nous donne des informations sur les vibrations du réseau hexagonal des nanotubes et s'effectue en mode résonant. Ce mode est atteint lorsque l'énergie des photons incidents (provenant d'un laser) est égale à l'énergie d'absorption des nanotubes représentée par le gap entre la bande de valence et la bande de conduction d'un nanotube. Il est à noter que cette énergie dépend du diamètre et de l'hélicité des nanotubes. Par conséquent, suivant l'énergie (longueur d'onde) utilisée, des nanotubes de diamètre et d'hélicité différente seront observés. Les études Raman ont été effectuées en collaboration avec Eric Anglaret du Laboratoire des Colloïdes, Verres et Nanomatériaux de l'Université de Montpellier II.

Lors de l'étude d'un spectre Raman spécifique des nanotubes de carbone, trois zones d'intérêt sont usuellement prises en compte (Figure IV-2) : le mode RBM (*Radial Breathing Mode*), la bande D (*Defect*) et le mode tangentiel (TM = *Tangential Mode*) ou bande G (*Graphite*).

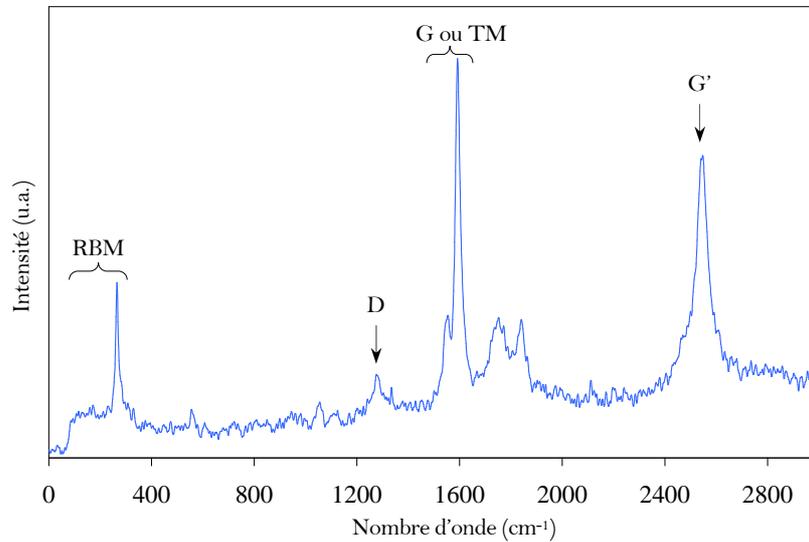


Figure IV-2 : Spectre Raman de nanotubes de carbone natifs HiPCO à 1064 nm

Le RBM est le mode de respiration radiale des nanotubes. Il est situé en général entre 75 et 300 cm^{-1} . Une diminution de son intensité est observée lorsqu'une contrainte due soit à un dopage par intercalation, soit à une pression ou à un greffage covalent sur les parois, s'exerce sur les nanotubes. Aussi, à partir du nombre d'ondes ω_r du mode radial d'un nanotube il est possible de déterminer son diamètre par la relation suivante :

$$\omega_r(\text{cm}^{-1}) = 2237,5 / d(\text{\AA})$$

La bande D, localisée vers 1300 cm^{-1} , permet d'évaluer le succès de la fonctionnalisation covalente des nanotubes. En effet, le greffage de molécules à la surface des nanotubes peut se traduire comme l'introduction de défauts dans le réseau de graphène. La bande D étant sensible à ces défauts, si ces derniers augmentent alors l'intensité de la bande D augmente avec le taux de fonctionnalisation covalente.

La bande G ($\sim 1580 \text{ cm}^{-1}$) correspond à un mode de vibration tangentiel et dépend des élongations de liaisons C-C de la paroi des nanotubes. Elle donne des indications sur les propriétés électroniques des nanotubes et sert également de référence pour normaliser différents spectres entre eux et évaluer l'augmentation relative de la bande D.

Enfin, la bande G' (également appelée D', 2530 cm^{-1}) correspondant à la seconde harmonique de la bande D, est sensible au désordre présent à la surface des nanotubes. Son étude n'est cependant pas systématique.

Le spectre Raman du système hybride nanotubes/acridine **IV-6** (a) indique une forte augmentation de l'intensité relative de la bande D (Figure IV-3). Le rapport des intensités de

la bande D par rapport à la bande G (I_D/I_G) augmente d'un facteur 4,6 entre les nanotubes natifs (0,098) et les nanotubes fonctionnalisés (0,456). De plus un déplacement de 2 cm^{-1} vers les hautes fréquences du mode RBM est observé. Ces deux modifications sont caractéristiques d'une fonctionnalisation covalente de la surface des nanotubes.

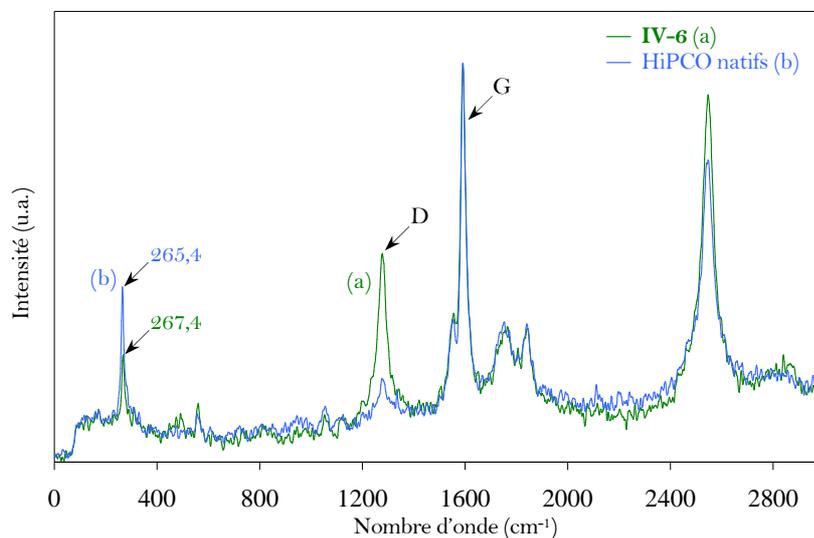


Figure IV-3 : Spectre Raman des nanotubes fonctionnalisés **IV-6** (a) et des HiPCO natifs (b), à 1064 nm

III.2.2. Spectroscopie UV-Vis-NIR

L'analyse par spectroscopie UV-Vis-NIR a pour but de confirmer le caractère covalent de la fonctionnalisation par l'observation des singularités de van Hove. L'existence de ces singularités dépend de la densité d'états électroniques des nanotubes et par conséquent de l'énergie de leurs gaps et de leurs propriétés électroniques.

Aussi, la création de liaisons covalentes à la surface des nanotubes entraîne une réhybridation des atomes de carbone sp^2 en carbone sp^3 . Ce changement induit une modification des propriétés électroniques des nanotubes et par conséquent des singularités de van Hove. La fonctionnalisation des nanotubes se traduit par une atténuation voire une disparition de ces singularités sur le spectre d'absorption.

La courbe (a) de la Figure IV-4 correspondant aux nanotubes fonctionnalisés **IV-6** présente une disparition des absorptions spécifiques par rapport aux nanotubes natifs (courbe b). Elle présente également vers 360 nm une bande d'absorption caractéristique de l'acridine greffée. Après ajustement de la ligne de base, une soustraction entre les deux spectres (Figure IV-4) peut être effectuée. La différence d'absorbance renseigne alors sur l'acridine fixée sur les nanotubes et par conséquent sa concentration. A partir de cette mesure, nous avons estimé que les motifs acridine représentaient 8% de la masse des nanotubes fonctionnalisés.

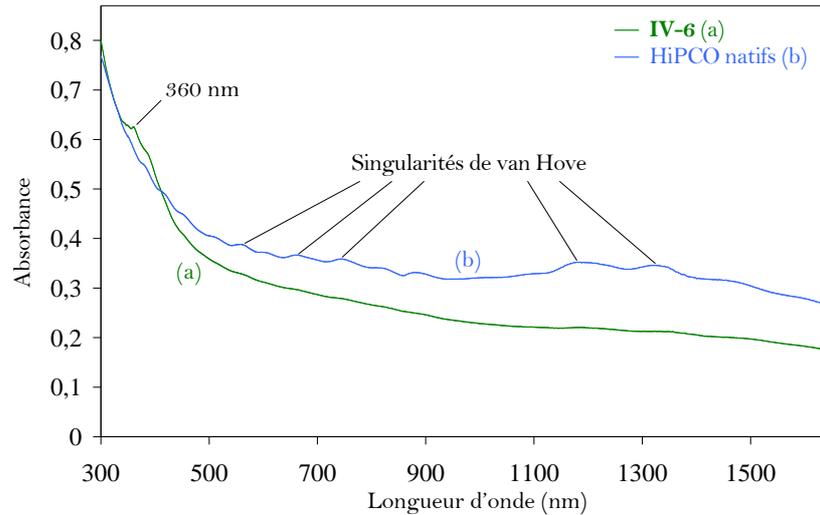


Figure IV-4 : Spectres UV-Vis-NIR des nanotubes fonctionnalisés **IV-6** (a) et HiPCO natifs (b) dans le DMF

Une méthode complémentaire pour quantifier la fonctionnalisation covalente des nanotubes est l'analyse thermogravimétrique.

III.2.3. Analyse thermogravimétrique

Une analyse thermogravimétrique (ATG) consiste à chauffer un échantillon dans un four sous atmosphère inerte et à suivre l'évolution de sa masse en fonction de la température. L'atmosphère inerte permet d'éviter la combustion des nanotubes. Dans le cas de nanotubes fonctionnalisés, les groupements fonctionnels liés aux nanotubes sont thermiquement labiles et vont se sublimer. De ce fait, l'analyse thermogravimétrique de nanotubes fonctionnalisés donne une indication sur le degré de fonctionnalisation. Pour analyser nos échantillons, nous avons fait varier la température entre 100 et 800°C, à une vitesse de 10°C/min.

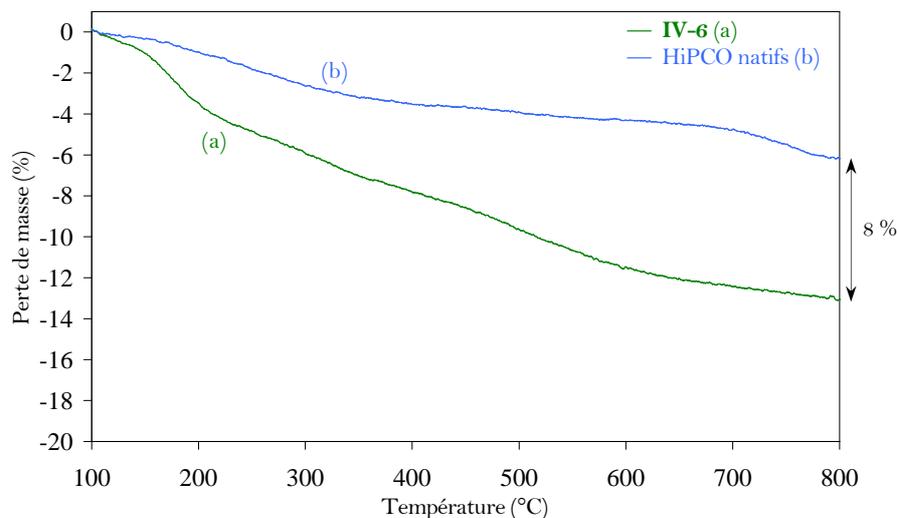


Figure IV-5 : Analyse thermogravimétrique des nanotubes **IV-6** (a) et HiPCO natifs (b)

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Sylvie Chatain du Laboratoire de Modélisation Thermodynamique et Thermochimique du CEA de Saclay. Nous observons une perte de masse des nanotubes "NT-Acridine" d'environ 8%, ce qui corrobore la mesure calculée par absorption (Figure IV-5). Comme les nanotubes ont été fonctionnalisés de manière covalente, nous pouvons calculer qu'une perte de masse de 8% équivaut à la présence d'un groupe fonctionnel pour 245 atomes de carbone.

Les différentes techniques que nous avons utilisées pour la caractérisation des nanotubes de carbone ayant réagi avec l'acridine nous permettent de conclure à une fonctionnalisation covalente de la surface des nanotubes.

Les nanotubes fonctionnalisés **IV-7** avec le motif acridinium présentent les mêmes caractéristiques. En effet, leur synthèse est obtenue directement à partir des nanotubes **IV-6** par traitement à reflux de l'iodure de méthyle pur pendant 3 jours. Les nanotubes fonctionnalisés ont alors été utilisés dans les expériences de coupure de l'ADN. Ces résultats sont présentés dans la section suivante.

III.3. Clivage de l'ADN

III.3.1. Choix de l'ADN

Pour les expériences de clivage de l'ADN, notre choix s'est porté sur l'ADN plasmidique. Ce type d'ADN est particulièrement intéressant du fait qu'il est couramment utilisé en biologie moléculaire. Il sert principalement comme vecteur d'expression dans un organisme procaryote (*E. Coli*). Prato et coll. ont montré également que l'ADN plasmidique pouvait interagir avec la surface de nanotubes fonctionnalisés par des ammoniums. L'ensemble peut être internalisé dans les cellules et ainsi être utilisé pour la vectorisation de gènes.^{18,19}

Les plasmides que nous avons utilisés ont été extraits et purifiés par des colonnes échangeuses d'ions (Qiagen) en collaboration avec Didier Boquet du Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse du CEA de Saclay.

Ces plasmides diffèrent par leur nombre de paires de bases. Le premier plasmide dont nous nous sommes servis est le SPI 3.0. Il a été élaboré à partir d'un plasmide commercial, le pET26b qui possède 5360 paires de bases. Le second est le pUC 18 qui ne possède que 2686 paires de bases. Du fait de sa plus petite taille, le pUC 18 est plus stable que le SPI 3.0.

III.3.2. Les différentes formes de l'ADN plasmidique

Selon l'état de dégradation de l'ADN plasmidique, ce dernier peut se présenter sous différentes formes (Figure IV-6).

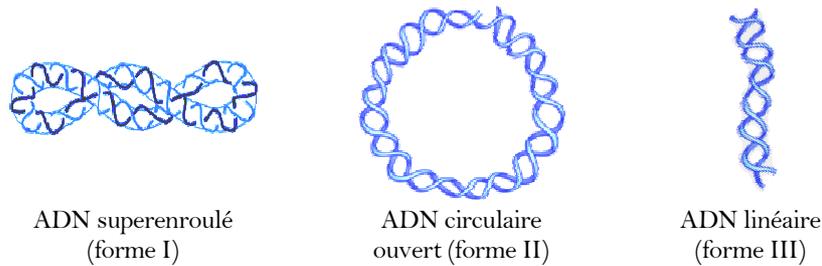


Figure IV-6 : Représentation schématique des différentes formes d'ADN

Lorsque l'ADN plasmidique est purifié et isolé, il est sous une forme superenroulée (sc = *supercoiled*) ou forme I. Si cet ADN est coupé une fois, il va devenir circulaire et ouvert (oc = *open circular*). Cette forme est aussi appelée forme II ou *nicked* (entaillé). Enfin, si un clivage supplémentaire est effectué alors l'ADN se retrouve dans sa forme linéaire (forme III).

La différenciation entre ces différentes formes peut s'effectuer par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette technique permet de faire migrer l'ADN plus ou moins loin suivant sa taille (Figure IV-7). D'un point de vue stérique, le plasmide superenroulé est très compact et va donc migrer le plus loin. Par contre, l'ADN circulaire ouvert occupe un maximum d'espace et va par conséquent très peu migrer. Enfin, la forme III ou linéaire de l'ADN migrera entre les deux formes précédentes.

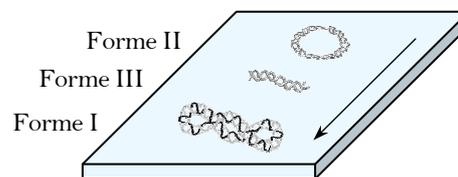


Figure IV-7 : Ordre de migration des différentes formes d'ADN sur un gel d'agarose

III.3.3. Résultats

Afin d'observer l'influence relative des différents échantillons de nanotubes sur l'ADN, le protocole suivant est appliqué. Dans un premier temps, le plasmide est mélangé aux échantillons (nanotubes seuls, en mélange avec l'acridine **IV-4** et nanotubes fonctionnalisés **IV-6**) avec une concentration finale de 10 ng/ μ L. Dans le but d'optimiser et de forcer l'interaction entre l'ADN et les nanotubes, le milieu est laissé à 4°C pendant une nuit. Ensuite, afin de mettre en évidence l'effet d'un transfert photoinduit, les échantillons sont soit irradiés avec une lampe à 365 nm (6W) soit laissés dans l'obscurité. Enfin, 5 μ L du mélange sont déposés dans un puits de gel d'agarose. Le courant généré lors de l'électrophorèse permet de faire migrer l'ADN qui s'est fixé sur les nanotubes.

Dans un premier temps, nous avons calibré la puissance de la lampe utilisée. Si l'intensité est trop forte, alors l'irradiation lumineuse seule va induire une dégradation de

l'ADN. Nous nous sommes donc assuré que la lampe utilisée n'induisait pas, à elle seule, des dommages (lignes A (obscurité) et B (lumière), Figure IV-8).

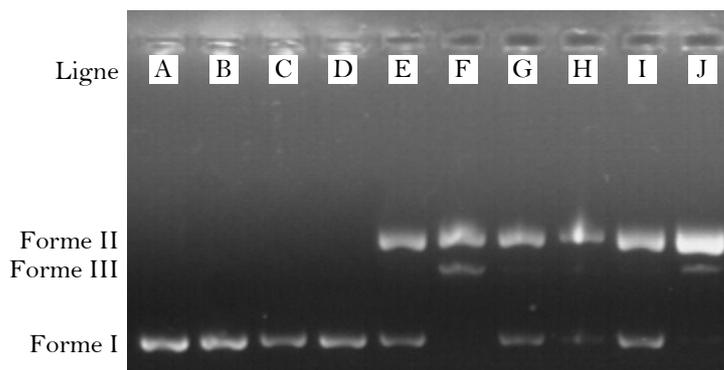


Figure IV-8 : Gel d'agarose des échantillons d'ADN SPI 3.0 irradiés (B, D, F, H, J) et non irradiés (A, C, E, G, I) : Eau (A, B) ; **IV-4** (C, D) ; HiPCO natifs (E, F) ; HiPCO + **IV-4** (G, H) ; **IV-6** (I, J).

Ensuite, nous avons testé les nanotubes fonctionnalisés **IV-6** sous irradiation lumineuse (ligne J). Nous avons remarqué que la bande correspondant à l'ADN superenroulé disparaissait complètement, qu'une bande intense apparaissait pour l'ADN circulaire (sous forme de *smear*, effet de trainée) et qu'une fine bande apparaissait également pour l'ADN linéaire. Ces observations vont bien dans le sens d'un clivage de l'ADN. Cependant, lorsque la même expérience est menée dans le noir (ligne I) une coupure est également observée. Bien que celle-ci soit moins forte, elle met en évidence un effet intrinsèque des nanotubes. En effet, lorsque les nanotubes HiPCO natifs sont utilisés seuls (lignes E (obscurité) et F (lumière)) une dégradation similaire de l'ADN est notée. La bande correspondant à l'ADN linéaire est légèrement plus prononcée que pour les nanotubes fonctionnalisés (ligne J). Si les nanotubes natifs sont mis en mélange avec le dérivé acridine **IV-4**, il n'y a pas d'effet additionnel (lignes G et H) par rapport aux nanotubes natifs. Le dérivé acridine **IV-4** seul (lignes C et D), quant à lui, ne provoque pas de coupure de l'ADN.

Les différents résultats indiquent qu'une dégradation de l'ADN a bien été obtenue lors de différentes expériences. Cependant, ces résultats préliminaires laissent apparaître un effet intrinsèque lié aux nanotubes. En effet, des effets de clivage sont observés pour les nanotubes SWNTs natifs. Une explication à ce phénomène parasite pourrait être liée à la présence de fer ferreux et/ou ferrique dans les SWNTs. Ces espèces proviennent du mode de synthèse des nanotubes monoparois. Or, il est connu que le fer, *via* des réactions apparentées à celle de Fenton ou Haber-Weiss, peut induire une coupure de l'ADN.

Les nanotubes SWNTs HiPCO ne sont donc pas adaptés à ce type d'essais. Cependant, les résultats des nanotubes fonctionnalisés **IV-6** montrent, sous l'action de la lumière, un effet supplémentaire possiblement dû à l'interaction avec l'ADN. Nous avons voulu confirmer cet effet en utilisant des nanotubes multiparois exempts de métal. En effet, la

méthode de synthèse des nanotubes n-Tec est l'arc électrique et ne nécessite pas de catalyseur métallique.

IV. Fonctionnalisation des nanotubes MWNTS avec les dérivés de l'acridine et clivage de l'ADN

Nous avons utilisé différentes approches pour fonctionnaliser la surface des nanotubes de carbone MWNTs. Des approches covalentes avec la réaction développée par Billups et *coll.* ou encore la formation de liaison amide *via* l'oxydation des nanotubes et non covalentes par π -stacking de motifs acridine fonctionnalisés par un groupement pyrène.

IV.1. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone et caractérisation

IV.1.1. *Via* les acides carboxyliques

Cette stratégie (Schéma IV-5) repose sur l'utilisation des fonctions acides carboxyliques des nanotubes comme point d'ancrage. Les nanotubes sont au préalable oxydés dans un mélange d'acide sulfurique concentré et d'acide nitrique (69%) pendant 24 heures à 100°C. L'activation des acides carboxyliques par du chlorure de thionyle est suivie du couplage avec l'acridine **IV-2**. L'acridine liée aux nanotubes **IV-8** est transformée par action de l'iodure de méthyle au reflux pendant 3 jours. Les nanotubes **IV-9** obtenus possèdent ainsi un motif acridinium.

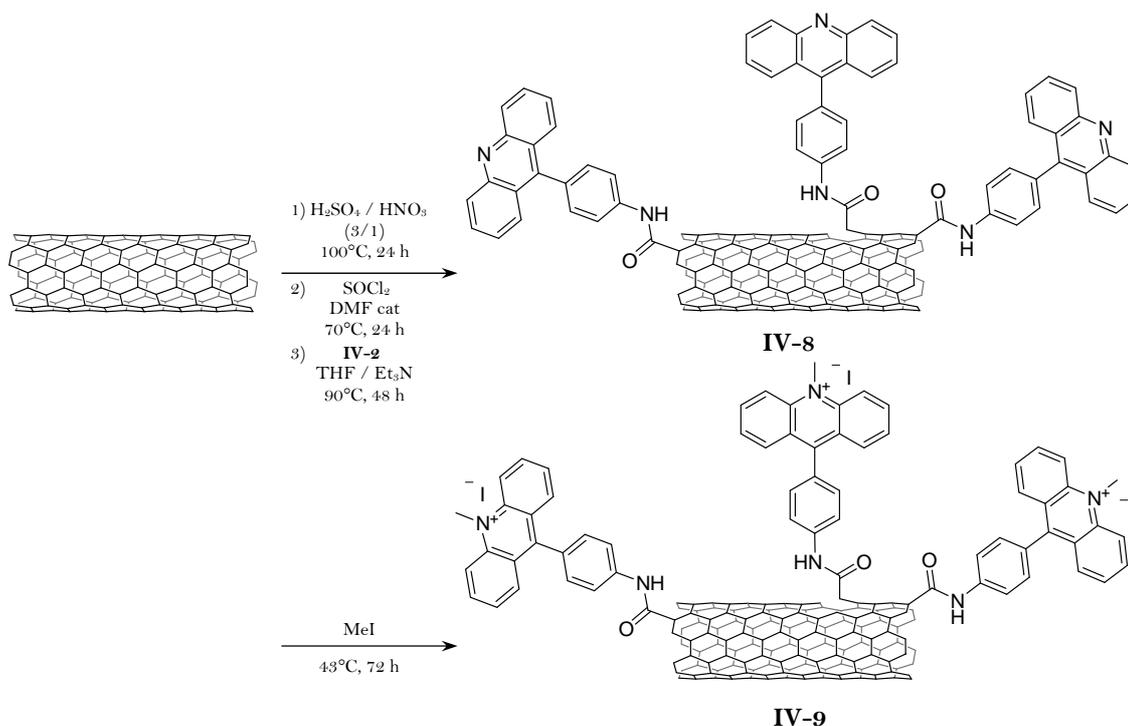


Schéma IV-5 : Fonctionnalisation des nanotubes avec l'analogue **IV-2** de l'acridine

Les nanotubes synthétisés présentent une solubilité accrue dans les solvants organiques. Après plusieurs cycles de lavage par centrifugation nous avons également contrôlé la fluorescence des nanotubes fonctionnalisés. Dans l'éthanol, une bande de fluorescence est effectivement observée à 445 nm confirmant le greffage de motifs acridine sur les nanotubes.

IV.1.2. Via la réaction de Billups

Pour ce procédé, il est nécessaire d'obtenir le dérivé iodé du composé **IV-4**. Au sel de diazonium **IV-3**, de l'iodure de tétrabutylammonium est ajouté, ce qui permet l'obtention du produit **IV-10** par précipitation dans l'acétone. Après métallation des nanotubes dans l'ammoniaque liquide en présence de lithium, l'addition de l'iodure d'aryle **IV-10** entraîne la fonctionnalisation des nanotubes. Une partie des nanotubes **IV-11** obtenus est transformée en leur équivalent acridinium **IV-12** avec de l'iodure de méthyle.

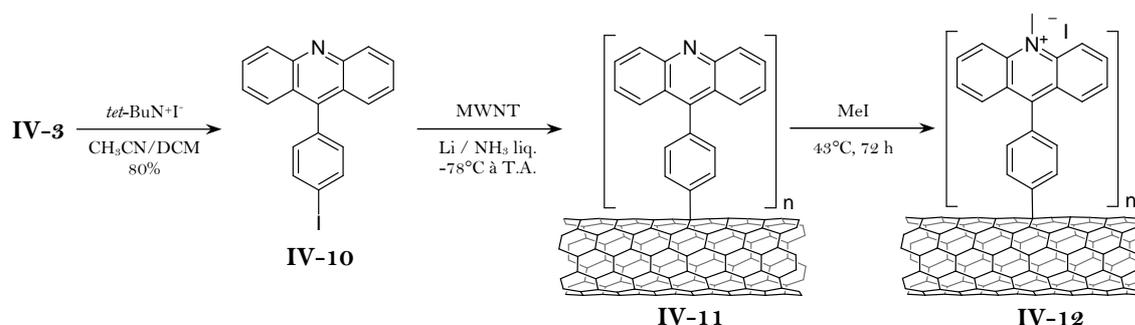
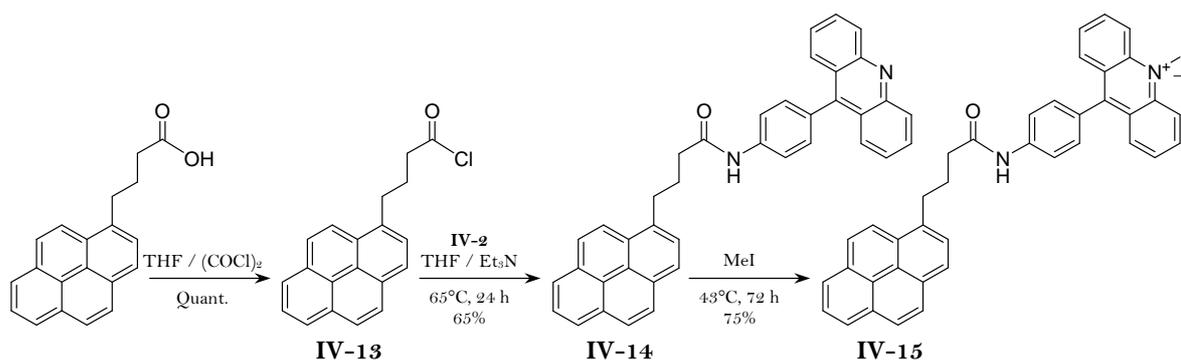


Schéma IV-6 : Fonctionnalisation des nanotubes *via* la réaction de Billups

Nous avons également contrôlé, à l'issue des étapes de lavage, la solubilité des nanotubes ainsi que la persistance d'un signal de fluorescence. Ces deux caractéristiques montrent que les nanotubes sont fonctionnalisés de manière covalente.

IV.1.3. Via la fonctionnalisation non-covalente

La dernière stratégie a été d'induire un π -stacking lors de la mise en mélange des nanotubes avec le dérivé de l'acridine **IV-4**. Pour ce faire, nous avons choisi de coupler ce dernier avec un motif pyrène connu pour interagir fortement avec la surface des nanotubes. L'amine de la molécule **IV-2** étant particulièrement peu nucléophile, il est nécessaire que l'acide pyrènebutyrique soit activé sous forme d'un chlorure d'acide. Le produit activé **IV-13** est obtenu par réaction du chlorure d'oxalyle dans le THF. Dans un deuxième temps, il est engagé en présence de l'acridine **IV-2** au reflux du THF pendant 24 heures pour donner le composé **IV-14**. Une fraction de ce dernier est méthylyé par de l'iodure de méthyle pour obtenir le dérivé acridinium correspondant **IV-15**.

Schéma IV-7 : Synthèse des dérivés pyrène-acridine **IV-14** et pyrène-acridinium **IV-15**

IV.1.4. Adsorption des dérivés de l'acridine avec les MWNTS

Nous avons utilisé la méthode de titration UV développée dans le chapitre précédent (*cf* partie III.1.4. du chapitre III) pour quantifier le pourcentage massique des dérivés **IV-4**, **IV-5**, **IV-14** et **IV-15** qui est en interaction avec les nanotubes. Les dérivés **IV-4** et **IV-5** ont été utilisés à titre de référence et vérifier ainsi la contribution du motif pyrène.

Ainsi, nous avons déterminé que le taux de recouvrement massique des nanotubes par les composés **IV-4** et **IV-5** dans un mélange eau/éthanol est de 0,8%. Pour les adduits à base de pyrène **IV-14** et **IV-15**, le taux de recouvrement mesuré est légèrement supérieur avec une valeur de 1,4%.

Nous avons également contrôlé par absorption UV que la concentration des différents dérivés acridine et acridinium utilisés en mélange avec les MWNTs était bien proche de celle utilisée pour les composés **IV-4** et **IV-5** lors des expériences “en mélange” avec les SWNTs.

IV.2. Clivage de l'ADN

Tout d'abord, nous avons remarqué lors de ces tests que les MWNTs natifs n'induisaient pas de coupure de l'ADN contrairement aux SWNTs. Par contre, de manière générale pour les nanotubes fonctionnalisés, un clivage de l'ADN est observé.

Parmi les échantillons de nanotubes fonctionnalisés de manière covalente, les nanotubes **IV-8** et **IV-12** induisent bien un clivage sous irradiation, tandis que, de manière surprenante, les nanotubes **IV-9** et **IV-11** ne provoquent aucun changement. Le clivage observé se traduit par la formation d'ADN circulaire et linéaire mais cette dégradation est peu reproductible. Les expériences de contrôles menés en absence de lumière conduisent aux mêmes résultats, *i.e.* une coupure de l'ADN aléatoire selon les essais.

Les essais effectués sur les nanotubes “en mélange” avec les différents composés synthétisés (**IV-4**, **IV-5**, **IV-14** et **IV-15**) ont donné des résultats semblables. De manière

non systématique nous avons observé, sous irradiation, une atténuation voire une disparition de la bande correspondant à l'ADN superenroulé. Cette dernière pouvant être accompagnée d'une intensification de la bande de l'ADN circulaire et/ou de l'apparition de la bande de l'ADN linéaire. De même, en absence de lumière, des résultats contradictoires ont été observés.

Enfin, nous avons noté que les espèces seules en solutions (**IV-4**, **IV-5**, **IV-14** et **IV-15**) ne provoquaient pas le clivage de l'ADN.

IV.3. Conclusion

Dans un premier temps, nous avons synthétisé des SWNTs-acridine (-ium) que nous avons testé pour le clivage de l'ADN. Les résultats obtenus pour ces nanotubes ont mis en évidence l'effet de dégradation de l'ADN attendu. Cependant, un effet similaire a été obtenu pour les nanotubes HiPCO natif. Nous avons interprété ces résultats comme étant dus à la présence de fer dans les échantillons et en conséquence nous avons complété notre étude avec des nanotubes multiparois exempts de traces de métaux. Ces nanotubes n'ont, en effet, montré aucune dégradation de l'ADN à l'état natif. Par contre, s'ils sont fonctionnalisés ou utilisés en mélange avec les entités synthétisées, alors un effet de dégradation, plus ou moins fort, a pu être observé. Cependant, nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un effet net dû au rayonnement lumineux.

Les résultats obtenus étant peu clairs, nous avons entrepris de mettre à jour le phénomène de transfert électronique photoinduit à l'aide de mesures en spectroscopie de fluorescence stationnaire et pulsée ainsi que par spectroscopie de résonance paramagnétique électronique. Cette partie est développée dans la section suivante.

V. Etudes photophysiques de l'interaction nanotube-acridine et nanotube-acridinium

L'étude du transfert électronique photoinduit permet de comprendre les mécanismes mis en jeu lors du clivage de l'ADN mais est également utilisée en lien étroit avec les nanotubes pour élaborer de nouvelles voies pour des applications en photovoltaïque,²⁰⁻²² conversion de l'énergie solaire²³ et senseurs. Dans tous ces domaines l'objectif est le même : induire un transfert électronique de ou vers un nanotube après excitation d'un chromophore adéquat lié de manière covalente ou " *π -stacké*" sur la surface du nanotube.

Les deux stratégies (covalente et non-covalente) ont été suivies pour la construction d'hybrides pour le transfert photoélectronique. La présence d'un système π -conjugué fait des

nanotubes un matériau idéal pour le transport et le transfert de charge quand ils sont combinés avec une espèce photoexcitée.

V.1. Systèmes existants

Les chromophores ayant déjà été étudiés en interaction avec les nanotubes dans un système “donneur-accepteur” sont principalement les porphyrines^{22,24-31} et les métalloporphyrines^{21,23,32-42} ou des motifs apparentés (sapphyrine⁴³ et phthalocyanine^{38,44-46}). Leurs macrocycles permettent une interaction non-covalente avec le nanotube, mais il est aussi possible de les greffer soit directement^{24,25,44} soit par diverses techniques : avec une structure dendrimérique,²⁶ *via* la complexation du métal en position centrale avec un motif pyridyle,^{32,33} *via* des interactions électrostatiques.^{21,27,33-37} Généralement, sous irradiation lumineuse, un fort *quenching* de fluorescence est observé et est attribué à un transfert électronique du macrocycle vers le nanotube. Dans quelques cas, la mise en évidence expérimentale d'une paire d'ions générée par excitation lumineuse a été obtenue par des mesures d'absorption transitoire après excitation par une impulsion laser.^{22,26,30-36,39,44,47,48} Cela met en évidence la présence du radical cation de la porphyrine. Ce radical a une longue durée de vie due à la grande délocalisation des électrons transférés aux nanotubes. Bien qu'il soit difficile d'obtenir une cinétique précise à cause des interférences avec les phénomènes d'absorption de l'état triplet de la porphyrine et de la diffusion non-linéaire des nanotubes, un temps de vie d'environ 100 ns a été estimé.^{39,49}

D'autres nanocomposites ont été élaborés avec l'objectif de développer le transfert électronique photoinduit avec les nanotubes. Prato et *coll.* ont mis en évidence un transfert de charge photoinduit entre les nanotubes et le ferrocène, groupement donneur d'électrons, greffé de manière covalente.⁴⁸ En effet, ils rapportent une diminution de fluorescence des nanotubes avec une absorption transitoire attribuée à l'ion ferricinium oxydé, dont le temps de vie est de plus d'une microseconde. Des motifs polyaromatiques,^{50,51} tétrathiafulvène,⁵² 2,5-diarylpyrazoline,⁴⁷ maléimide,⁵³ et des *quantum dots*^{54,55} ont aussi servi à l'élaboration d'hybrides et un transfert électronique photoinduit a été mis en évidence.

Séparément, l'acridine et ses dérivés ont déjà fait l'objet d'études de transfert électronique photoinduit aussi bien dans un rôle d'accepteur que de donneur d'électrons. Par exemple, les dérivés acridinium ont été étudiés, dans des systèmes “donneur-accepteur”, comme catalyseur pour des réactions d'oxydation photoinduite.^{14,56-64} Bien que des hybrides tels que “fullerène-acridine” aient déjà été synthétisés et étudiés,¹⁰ des systèmes à base de nanotubes de carbone n'ont, à notre connaissance, jamais encore été étudiés.

Pour mener notre étude, nous avons utilisé les nanotubes SWNT fonctionnalisés avec les dérivés acridine (**IV-6**) et acridinium (**IV-7**). Ces nanotubes présentent l'avantage

d'être très bien dispersables (voire solubles pour les nanotubes **IV-6**) dans certains solvants organiques.

V.2. Etude de l'hybride "nanotube-acridine"

Pour mettre en évidence un transfert électronique entre les nanotubes et le motif acridine greffé de manière covalente, il est nécessaire de comparer les nanotubes fonctionnalisés avec les nanotubes HiPCO seuls, en mélange avec le dérivé acridine et le dérivé acridine seul. Aussi, pour que les mesures de fluorescence soient comparables, les concentrations des solutions ont été calibrées par absorption UV.

V.2.1. Absorption UV

Le transfert électronique repose sur l'excitation lumineuse de l'acridine **IV-4** dont le maximum d'absorption est à 360 nm (courbe (d) noire, Figure IV-9). Nous avons ainsi ajusté l'absorbance des différentes solutions à cette valeur. Cette bande d'absorption correspond à la transition électronique de nature $\pi-\pi^*$. Cette bande est beaucoup plus intense en énergie que celle correspondant à la transition $n\rightarrow\pi^*$, moins discernable.

Connaissant le taux de greffage des nanotubes fonctionnalisés **IV-6** (8%), nous avons pu ajuster l'absorbance à 360 nm du mélange "acridine + HiPCO natifs" (courbe (c) rose) pour qu'elle soit identique à celle de la solution des nanotubes **IV-6**. Ainsi pour les deux solutions la concentration en acridine ($C_{IV-4} = 1,9.10^{-6}$ M) et en nanotubes est identique. Pour la solution contenant l'acridine seule (courbe d), l'absorbance correspond à une concentration de $1,9.10^{-6}$ M.

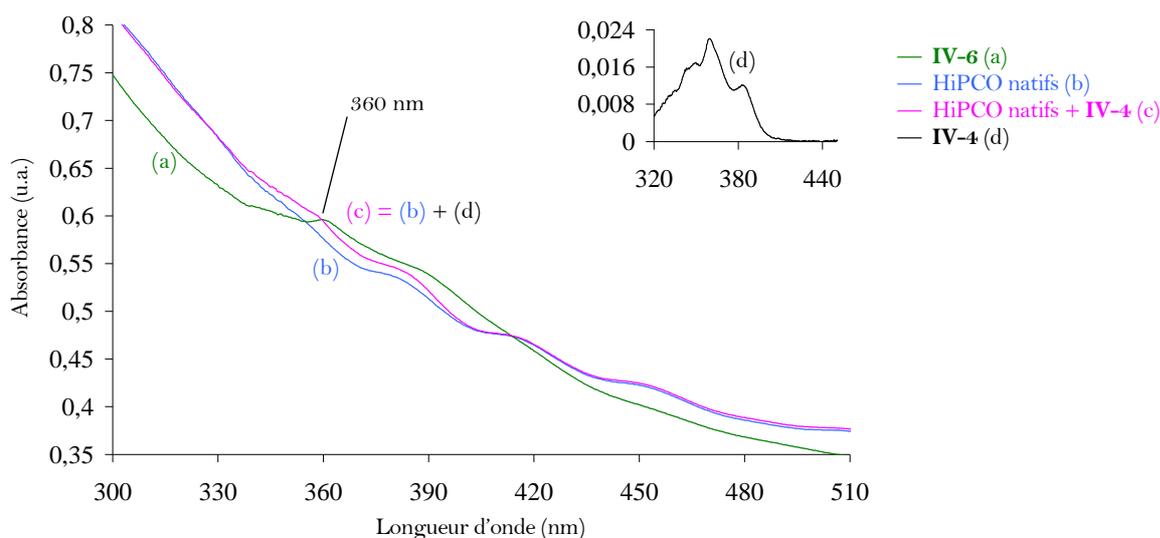


Figure IV-9 : Courbes d'absorption UV dans le DMF d'une solution (a) de nanotubes **IV-6** fonctionnalisés avec le dérivé **IV-4**, de nanotubes HiPCO natifs (b), d'un mélange d'HiPCO natifs avec **IV-4** (c) et du dérivé **IV-4** seul en solution (d)

V.2.2. Spectroscopie de fluorescence

L'analyse par spectroscopie de fluorescence se définit comme l'étude de l'émission de photons accompagnant la relaxation de l'état singulet excité S_1 ($n-\pi^*$) à l'état fondamental S_0 . Nous avons utilisé un spectrofluorimètre continu. Cela signifie que la source lumineuse (arc ou xenon) envoie un flux constant de photons et par conséquent que la concentration de l'espèce excitée reste constante. En parallèle, un montage laser de comptage de photons a été utilisé afin de mesurer le temps de vie de fluorescence de l'état excité du composé étudié.

V.2.2.a. Dans le DMF

V.2.2.a.1. Fluorescence continue

Le premier solvant choisi pour mener notre étude est le DMF. Ce solvant présente l'avantage de solubiliser complètement les nanotubes **IV-6**. Avant de commencer des mesures sur ce lot de nanotubes, nous avons voulu vérifier l'influence des nanotubes natifs sur la fluorescence du composé **IV-4** (courbe c, Figure IV-10). En effet, la présence de nanotubes dans la solution en mélange avec le composé **IV-4** induit une diminution de la fluorescence de ce dernier (courbe b). Cette baisse pourrait être attribuée au fait que les nanotubes absorbent l'énergie du faisceau incident et par conséquent atténuent le signal sortant en jouant un rôle de filtre.

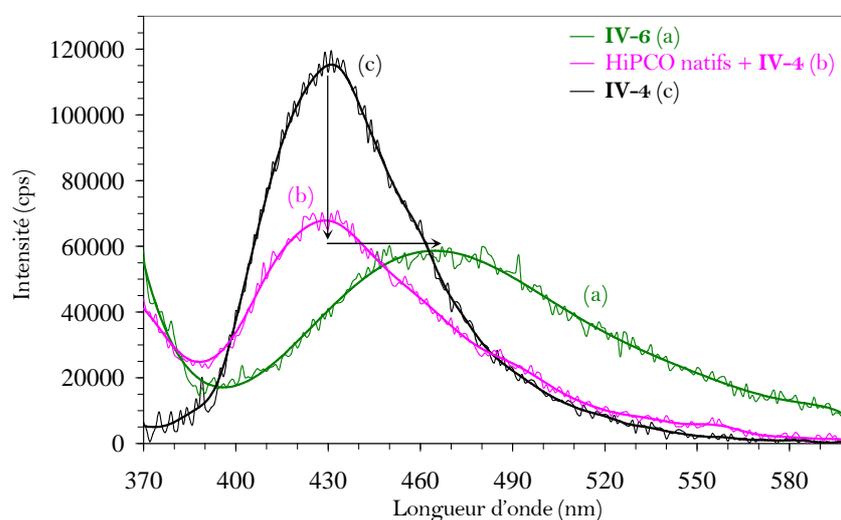


Figure IV-10 : Spectre d'émission de fluorescence ($Ex = 360$ nm) dans le DMF d'une solution (a) de nanotubes fonctionnalisés **IV-6** avec le dérivé **IV-4**, d'un mélange d'HiPCO natifs avec **IV-4** (b) et du dérivé **IV-4** seul en solution (c)

Par contre, le spectre de fluorescence des nanotubes fonctionnalisés (courbe a verte) présente un *quenching* supplémentaire en même temps qu'un déplacement bathochrome de 38 nm. Dans ce cas, cette atténuation peut être attribuée à un phénomène différent. Le déplacement de la bande vers le rouge est indicatif d'interactions électroniques entre les deux

entités. Ces deux phénomènes ont déjà été observés dans le cas de porphyrines greffées sur les nanotubes.²⁴

V.2.2.a.2. Fluorescence résolue en temps

Les résultats de fluorescence continue ont été complétés par des mesures de fluorescence résolue en temps (fluorescence pulsée). Cette technique est particulièrement sensible et est donc bien adaptée à l'analyse du dérivé d'acridine **IV-4** dont le rendement quantique est faible ($\Phi_F = 0,012$ en prenant comme valeur standard de référence le diphénylanthracène), en raison de la nature interdite des transitions $n \rightarrow \pi^*$.

Lors d'une mesure, l'échantillon est excité par une succession d'impulsions courtes de lumière (laser saphir titane délivrant des impulsions de 1 ps) et la réponse de fluorescence est enregistrée en fonction du temps. A chaque impulsion, un photon est détecté et enregistré. A partir de ces données l'intensité du déclin de fluorescence est reconstruite. Plus le nombre d'évènements est élevé, meilleure est la précision.

Pour pouvoir interpréter ces courbes (Figure IV-11), la méthode des moindres carrés non linéaires est utilisée. Cette méthode repose sur la minimisation d'une valeur (χ^2) qui exprime l'écart entre les données théoriques et expérimentales. Le déclin de fluorescence du composé **IV-4** permet de mesurer un temps de vie de 137 ps. Par contre, le déclin de fluorescence de l'échantillon de nanotubes **IV-6** indique un temps de vie plus court de 34 ps. Cette diminution du temps de vie de fluorescence est en accord avec la diminution de l'émission de fluorescence observée (Figure IV-10).

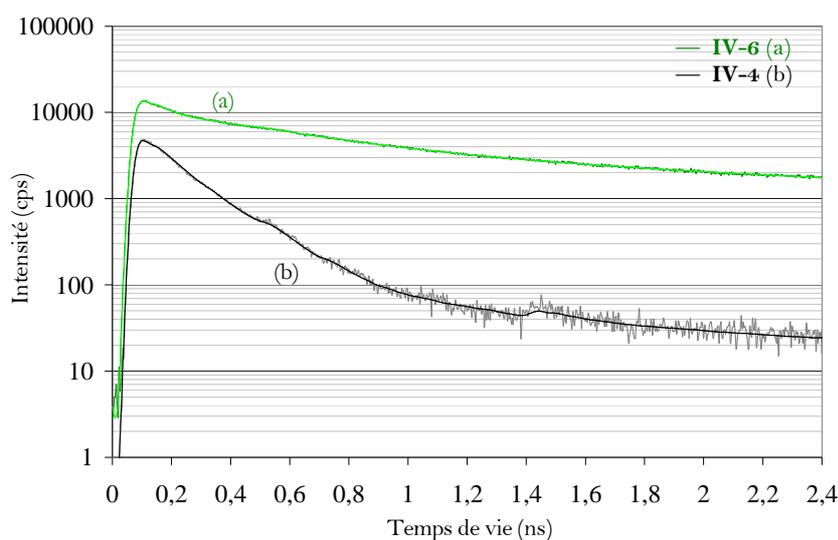


Figure IV-11 : Déclin de fluorescence des nanotubes **IV-6** et du dérivé acridine **IV-4**, dans le DMF mesuré pour une longueur d'onde de 470 nm ($E_x=336\text{nm}$)

Le déplacement bathochrome de l'émission de fluorescence des nanotubes fonctionnalisés **IV-6** par rapport à l'acridine **IV-4** ainsi que le court temps de vie de

fluorescence des nanotubes **IV-6**, ne peuvent résulter d'un simple *quenching* de l'état excité de l'acridine par les nanotubes.⁵⁰ Nous proposons que cette émission soit due à un exciplexe, *i.e.* l'association de l'état excité de l'acridine avec les nanotubes dans leur état fondamental. L'obtention de ce type de complexe serait favorisée par une forte concentration de nanotubes par rapport à l'acridine. Il est connu que l'acridine forme des exciplexes avec des composés aromatiques^{65,66} et les nanotubes peuvent être considéré comme une espèce aromatique avec un caractère accepteur d'électron. Ainsi, la fluorescence observée pour les nanotubes **IV-6** serait due à un exciplexe intramoléculaire formé entre l'acridine excité et les nanotubes. Comme l'émission d'exciplexe est sensible aux solvants nous avons examiné les propriétés de fluorescence des nanotubes fonctionnalisés **IV-6** dans deux solvants de polarités différentes : le THF et l'éthanol.

V.2.2.b. Dans l'éthanol et le THF

La fluorescence de composés hétérocycliques azotés (ou azarènes) est fortement dépendante du solvant.⁶⁷ En effet, dans un solvant protique (éthanol), la possibilité de former des liaisons hydrogène induit une inversion des états de basses énergies $n-\pi^*$ et $\pi-\pi^*$. La transition de plus basse énergie prend alors un caractère $\pi \rightarrow \pi^*$. Cela conduit à une intensité de fluorescence plus grande.

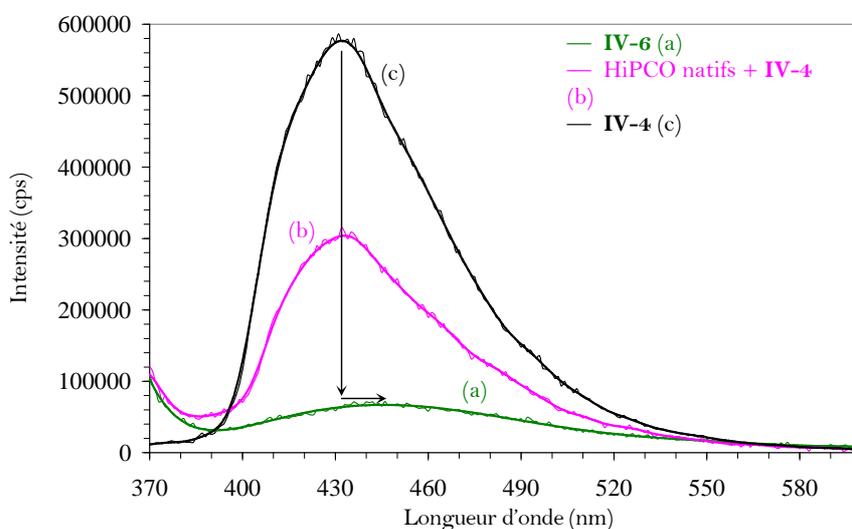


Figure IV-12 : Spectre d'émission de fluorescence ($E_x = 360$ nm) dans l'éthanol d'une solution (a) de nanotubes fonctionnalisés **IV-6** avec le dérivé **IV-4**, d'un mélange d'HiPCO natifs avec **IV-4** (b) et du dérivé **IV-4** seul en solution (c)

- **Dans l'éthanol**, la fluorescence du composé **IV-4** (courbe c, Figure IV-12) seul en solution est nettement plus intense (5x) que dans le DMF (courbe c, Figure IV-10). Nous pouvons aussi noter que la bande de fluorescence est légèrement déplacée vers le rouge dans l'EtOH. Ce déplacement provient du fait que la capacité de former des liaisons hydrogène est plus faible dans l'état excité qui, par conséquent, devient moins stabilisé que l'état

fondamental. La mesure du temps de vie de l'espèce libre **IV-4** corrobore l'augmentation de l'émission de fluorescence, par rapport au DMF, avec une mesure du temps de vie de 1,12 ns.

La solution mélange "HiPCO natif + **IV-4**" induit une diminution de fluorescence (courbe b) tandis que la solution de nanotubes fonctionnalisés **IV-6** (courbe a) se caractérise par un *quenching* encore plus important avec un déplacement léger (12 nm) du spectre vers le rouge. La mesure du déclin de fluorescence des nanotubes **IV-6** donne un temps de vie de 45 ps. Ce résultat est en accord avec les mesures de fluorescence effectuées.

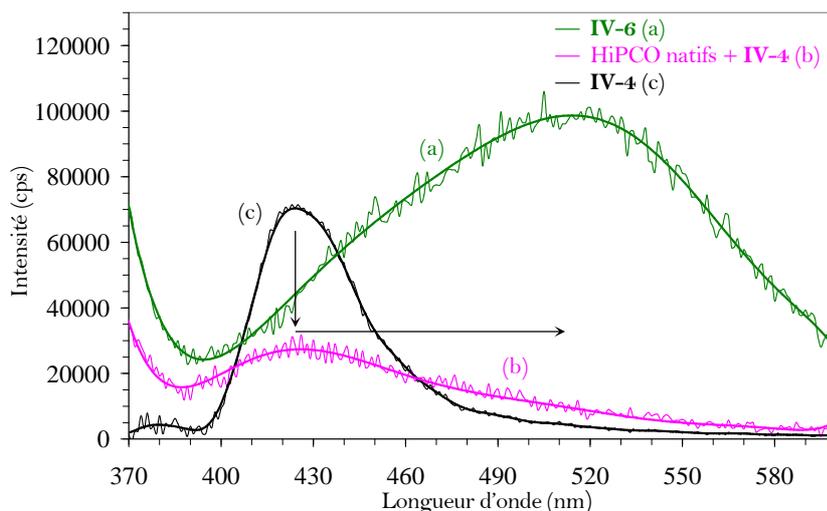


Figure IV-13 : Spectre d'émission de fluorescence ($E_x = 360$ nm) dans le THF d'une solution (a) de nanotubes fonctionnalisés **IV-6** avec le dérivé **IV-4**, d'un mélange d'HiPCO natifs avec **IV-4** (b) et du dérivé **IV-4** seul en solution (c)

- **Dans le THF** qui est un solvant aprotique mais moins polaire que le DMF, l'intensité de fluorescence du composé **IV-4** (courbe c, Figure IV-13) est du même ordre de grandeur et le maximum d'émission est légèrement décalé vers le bleu (par rapport au DMF). Ce décalage hypsochrome est dû à la plus faible polarité du solvant. Dans ce solvant, le temps de vie de la molécule **IV-4** seule en solution est de 39 ps. Cette différence avec les autres mesures de temps de vie confirme l'influence du solvant sur la fluorescence de molécules de type azarène.

Encore une fois, si des nanotubes natifs sont rajoutés à une solution d'acridine (courbe b) alors l'intensité de fluorescence s'atténue. Par contre, si on étudie la solution de nanotubes fonctionnalisés **IV-6** (courbe a), alors on remarque que l'intensité de fluorescence augmente avec un fort effet bathochrome (93 nm). En effet, le temps de vie de fluorescence des nanotubes **IV-6** est de 368 ps.

V.2.2.c. Analyse de l'effet du solvant

Pour mettre en évidence l'effet de la polarité du solvant, il est impossible de tenir compte que d'une seule valeur physique comme la permittivité du solvant. Par conséquent, il est nécessaire d'utiliser un paramètre empirique défini pour un système s'approchant du nôtre. Pour notre système, nous avons choisi comme échelle de polarité celle définie par Reichardt en 1994.^{68,69} Pour établir cette échelle, il a utilisé un chromophore, contenant un motif pyridinium, ayant un large solvatochromisme négatif. Ce type d'effet correspond à un shift hypsochrome lorsque la polarité du solvant augmente. La valeur de cette échelle est définie comme une énergie de transition électronique (E_{T^N}).

En comparant directement l'effet du solvant sur la molécule seule **IV-4** ou en mélange avec les nanotubes HiPCO natifs, nous pouvons observer qu'il n'y a pas de différence entre les deux (courbe b et c, Figure IV-14). Dans les deux cas, un léger déplacement bathochrome est induit lorsque la polarité du solvant augmente. Par contre, lorsque la molécule **IV-4** est greffée sur les nanotubes (courbe a), l'effet du solvant est inverse et nettement plus accentué : plus le solvant est apolaire, plus le spectre de fluorescence est décalé vers le rouge. De plus, nous pouvons remarquer, pour chaque solvant, un déplacement bathochrome plus ou moins fort, entre l'espèce seule en solution ou en mélange avec les nanotubes (courbe c ou b) et lorsqu'elle est greffée sur les nanotubes (courbe a).

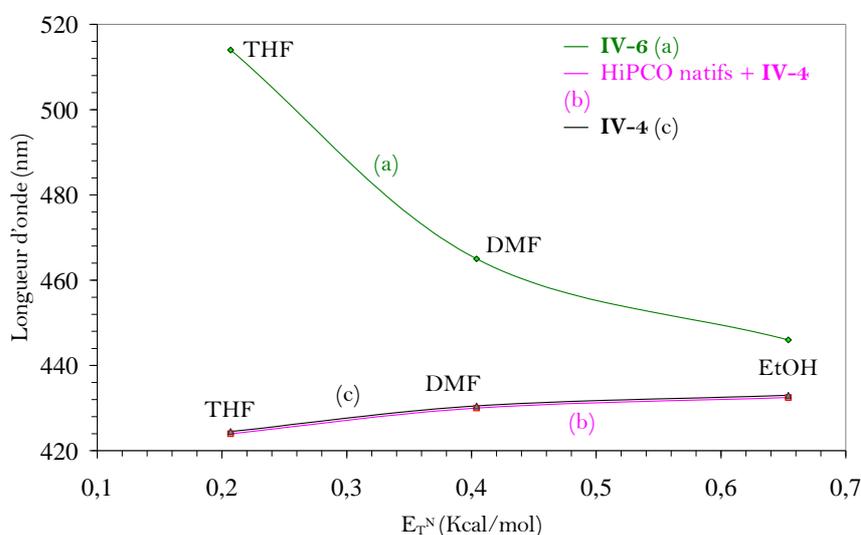


Figure IV-14 : Effet de la polarité du solvant sur le déplacement des bandes de fluorescence d'une solution (a) de nanotubes fonctionnalisés **IV-6** avec le dérivé **IV-4**, d'un mélange d'HiPCO natifs avec **IV-4** (b) et du dérivé **IV-4** seul en solution (c)

Ce large déplacement hypsochrome en fonction de la polarité du solvant, pour les nanotubes fonctionnalisés **IV-6**, n'est pas dû à un simple effet de solvant auquel cas nous aurions dû observer le même type de comportement pour l'espèce **IV-4** seule ou en mélange avec les nanotubes (courbe c et b respectivement). Par contre, une interprétation possible

rejoindrait la formation d'un exciplexe entre l'acridine et les nanotubes dans leur état fondamental.

L'effet de type "solvatochromisme négatif" pour les nanotubes **IV-6** dans les solvants polaires couplé a une diminution importante de la fluorescence a été observé par Cherkasov et *coll.* pour un mélange de phénylacridine et de diphénylanthracène en excès.⁷⁰ Un solvant polaire va déstabiliser l'exciplexe et de ce fait induire un fort *quenching*. L'effet hypsochrome observé lorsque la polarité du solvant augmente s'explique par le fait que le moment dipolaire de l'hybride **IV-6** est plus grand dans son état fondamental que dans son état excité. Par conséquent, l'état fondamental sera plus stabilisé que l'état excité, dans un solvant polaire.

V.2.3. Conclusion

Cette première étude, nous a permis de mettre en évidence une forte influence de la fonctionnalisation des nanotubes avec le dérivé acridine **IV-4**. En effet, lorsque les nanotubes sont fonctionnalisés une diminution de fluorescence est observée conjointement avec un déplacement bathochrome de la bande d'émission par rapport à l'acridine seule. Egalement, nous avons pu observer que lorsque la polarité du solvant augmente la bande d'émission de fluorescence des nanotubes fonctionnalisés **IV-6** était déplacée vers le bleu.

Nous avons attribué cet effet à la formation d'un exciplexe entre les nanotubes et l'acridine dans son état excité. Cependant, les spectres de fluorescence des exciplexes sont généralement déplacés vers le rouge lorsque la polarité du solvant augmente comme conséquence d'un transfert de charge de l'exciplexe. Afin de confirmer nos observations et pour déterminer si elles sont spécifiques à ce chromophore des expériences complémentaires seront à effectuer.

V.3. Etude de l'hybride "nanotube-acridinium"

Dans le cas du système des nanotubes **IV-7**, l'acridinium pourrait jouer le rôle d'accepteur d'électron et le nanotube, le rôle de donneur. Comme précédemment, nous avons voulu étudier la nature des phénomènes photophysiques mis en jeu lors de l'excitation lumineuse du chromophore sur les nanotubes.

V.3.1. Etudes de fluorescence

Pour cette étude, nous avons suivi le même protocole que pour l'hybride "nanotube-acridine". Nous avons comparé les propriétés de fluorescence de l'acridinium **IV-5** seul ou en mélange avec des nanotubes HiPCO natifs avec celles des nanotubes fonctionnalisés **IV-7**. Afin que la comparaison des mesures de fluorescence soit cohérente, nous avons calibré

l'absorbance des différents échantillons par spectroscopie UV au maximum d'absorption (360 nm) du motif acridinium (courbe (d) noire, Figure IV-15).

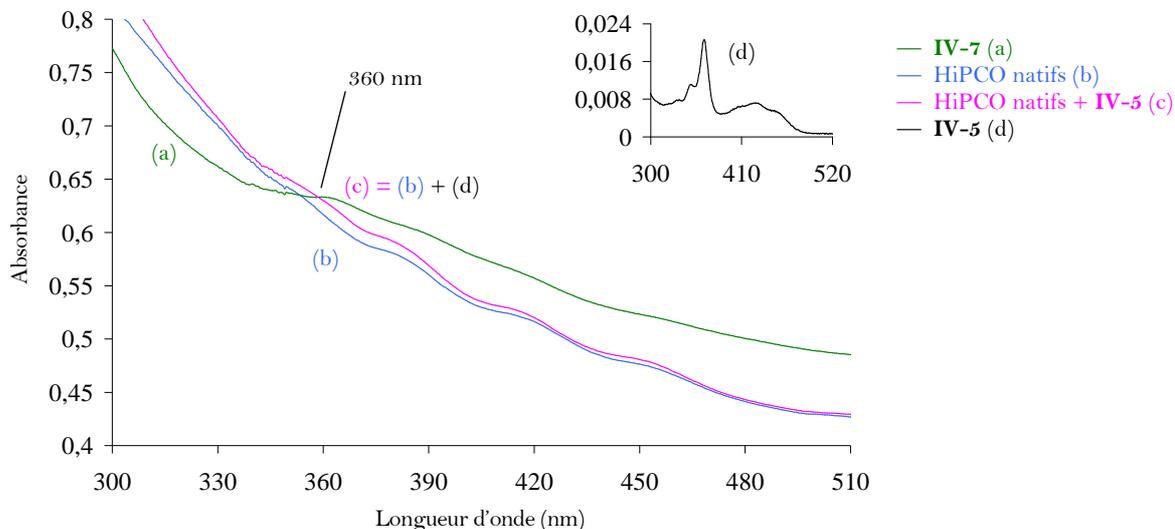


Figure IV-15 : Courbes d'absorption UV dans le DMF d'une solution (a) de nanotubes fonctionnalisés **IV-7** avec le dérivé **IV-5**, de nanotubes HiPCO natifs (b), d'un mélange d'HiPCO natifs avec **IV-5** (c) et du dérivé **IV-5** seul en solution (d)

En s'appuyant sur le taux de greffage des nanotubes fonctionnalisés **IV-7** (8%), nous avons pu ajuster l'absorbance à 360 nm du mélange "acridinium + HiPCO natifs" (courbe (c) rose) pour qu'elle soit identique à celle de la solution des nanotubes **IV-7**. Ainsi pour les deux solutions la concentration en acridinium ($C_{IV-5} = 1,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$) et en nanotubes est identique. Pour la solution contenant l'acridinium **IV-5** seul (courbe d), l'absorbance correspond à une concentration de $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Pour chaque solvant, nous avons comparé, en fluorescence stationnaire, les solutions d'acridinium libre **IV-5** (courbes c, Figure IV-16), de nanotubes HiPCO natifs en mélange avec le composé **IV-5** (courbes b) et de nanotubes fonctionnalisés **IV-7** (courbes a).

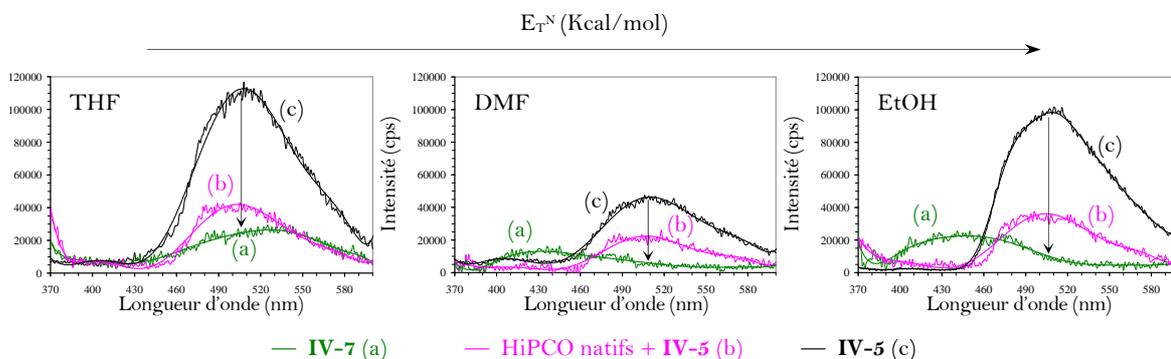


Figure IV-16 : Spectres d'émission de fluorescence ($E_x = 360 \text{ nm}$) dans le THF, le DMF et l'éthanol d'une solution (a) de nanotubes fonctionnalisés **IV-7** avec le dérivé **IV-5**, d'un mélange d'HiPCO natifs avec **IV-5** (b) et du dérivé **IV-5** seul en solution (c)

Lorsque la molécule **IV-5** est excitée seule en solution (courbes (c) noire), sa fluorescence n'augmente pas avec la polarité du solvant correspondant à l'échelle empirique définie par Reichardt. En effet, cette dernière prend en compte la formation de liaison hydrogène qui ici ne sont pas permises compte tenu que l'azote est méthylé. Par contre, si nous adoptons comme échelle de polarité la permittivité relative du solvant ($\epsilon_{r(\text{DMF})} > \epsilon_{r(\text{EtOH})} > \epsilon_{r(\text{THF})}$), alors lorsque celle-ci décroît, la fluorescence augmente. Ces résultats ont été corrélés avec la détermination de la durée de vie de fluorescence de ce composé dans les différents solvants. Dans le THF, la durée de vie de **IV-5** est de 1,73 ns alors que dans l'éthanol elle est de 1,44 ns et dans le DMF de 0,59 ns. Cette évolution est effectivement en accord avec l'intensité des bandes d'émission de fluorescence obtenue.

Si des nanotubes HiPCO natifs sont rajoutés à la molécule **IV-5** alors l'intensité de fluorescence diminue d'environ 60% (courbes b, Figure IV-16) sans qu'aucun décalage ne soit clairement observé. Comme dans le cas de l'acridine **IV-4**, la présence de nanotubes induit une absorption de l'énergie du faisceau incident et par conséquent le signal observé s'en trouve atténué. Lorsque ces courbes (mélange "acridinium + HiPCO") sont comparées avec celles correspondant aux nanotubes fonctionnalisés **IV-7**, alors la bande de fluorescence à 510 nm disparaît dans l'éthanol et dans le DMF et diminue de 63% dans le THF.

Dans le cas du DMF et de l'éthanol, une nouvelle bande centrée vers 437 nm apparaît. Cette dernière n'est pas présente dans le spectre d'absorption de l'ion acridinium de départ. Normalement, le spectre d'absorption UV de l'acridinium **IV-5** et le spectre d'excitation correspondant à la bande à 437 nm devraient se superposer. La Figure IV-17 montre qu'il n'en est rien : les deux spectres sont très différents. Nous avons attribué la bande de fluorescence observée à 437 nm à une impureté provenant de la fonctionnalisation et qui est exaltée dans ces deux solvants.

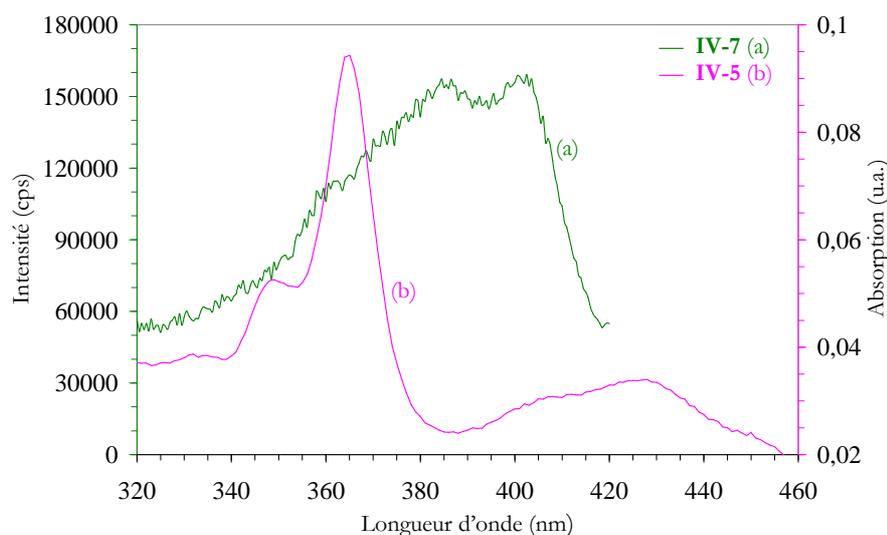


Figure IV-17 : Comparaison du spectre d'absorption UV du composé **IV-5** et du spectre d'excitation des nanotubes **IV-7** ($E_m = 435$ nm)

Nous avons pu observer pour l'hybride NT-acridinium **IV-7** un fort *quenching* de fluorescence aussi bien en spectroscopie de fluorescence pulsée que continue (Figure IV-16). Ce résultat ne peut également être dû à la formation d'exciplexes de cations acridinium avec les nanotubes. En effet, les exciplexes de cations acridinium avec des aromatiques ont déjà été observés dans l'éthanol mais à 77 K et non à température ambiante à cause d'un temps de vie trop court.⁷¹ Par contre, le *quenching* de fluorescence du cation phénylacridinium a déjà été observé et largement étudié car il donne un radical avec une longue durée de vie résultant d'un transfert électronique rapide.⁷² De par ce transfert électronique, l'acridinium a été utilisé comme photocatalyseur dans des réactions d'oxydation.^{58,73} Un transfert électronique intramoléculaire a également été observé pour le système donneur-accepteur 9-mésityl-10-méthylacridinium. Il en résulte la formation d'un état de transfert de charge (Acr-Mes^{•+}) avec un temps de vie très long.¹³ Par analogie avec nos travaux, le fort *quenching* de fluorescence observé pour les nanotubes **IV-7** pourrait être interprété par un transfert électronique rapide du nanotube vers l'ion acridinium (Schéma IV-8).

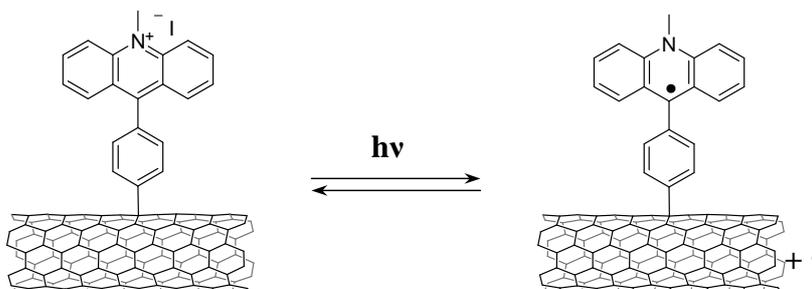


Schéma IV-8 : Transfert électronique photoinduit entre le nanotube et le motif acridinium et formation d'un radical et d'un radical cation.

Pour confirmer cette hypothèse et mettre en évidence la formation d'un radical, nous nous sommes tournés vers la spectroscopie de résonance paramagnétique électronique (RPE). En effet, cette technique permet d'apporter la preuve de la présence d'un radical et par conséquent d'éliminer l'ambiguïté sur le mécanisme par transfert électronique. Ce travail a été réalisé en collaboration avec William Rutherford au Laboratoire de Bioénergétique Moléculaire et Photosynthèse (LBMP) de l'Institut de Biologie et Technologie du CEA de Saclay.

V.3.2. Etude du transfert électronique photoinduit par RPE

La RPE est la méthode de choix pour l'étude des espèces radicalaires créées. La comparaison du signal RPE obtenu avec les données de la littérature permet de déterminer la nature du radical. Le spectre RPE des radicaux organiques est caractérisé par le tenseur g . Ce dernier est centré sur $g=2,0023$ qui représente la valeur de l'électron libre. La déviation par rapport à g est très faible pour les radicaux organiques (10^{-3}).

La détection des radicaux dépend de leur stabilité ; certains peuvent être détectés à température ambiante tandis que d'autres nécessiteront de très basses températures pour mesurer un signal suffisamment fort et résolu. Dans ce dernier cas, la technique dite de "freeze-trapping" est utilisée. Elle permet en outre de détecter les radicaux instables à température ambiante. En effet, l'intensité du signal RPE repose sur la distribution de Boltzmann : plus la différence entre la population de l'état excité avant et après irradiation sera grande, plus le signal observé en RPE sera intense. A 4 K, les spins sont tous à l'état fondamental. L'excitation micro-onde de l'échantillon va permettre le peuplement de l'état excité : le signal mesuré sera alors d'intensité maximale. A température ambiante, toujours selon la distribution de Boltzmann, le niveau excité sera déjà peuplé, induisant une plus faible amplitude voire une absence de signal.

Les expériences préliminaires à température ambiante n'ont pas permis de détecter de signal. A cette température, le signal radicalaire est sûrement trop faible pour être détectable. Nous avons donc effectué les mesures à une température de 4 K à une fréquence de 9 GHz.

V.3.2.a. RPE des "SWNT-acridinium"

Lorsque les nanotubes HiPCO natifs, irradiés *in situ* à 365 nm, sont analysés par RPE, une légère inflexion centrée à $g=2,0044$ (courbe b, Figure IV-18) est observée. Ce signal ne correspond pas à la présence classique de radicaux. Cependant, il est intéressant de noter que cette valeur de g est typique de radicaux phénoxy. Par conséquent, il est possible que cette déviation du signal provienne de la présence de groupements phénols générés sur la surface des nanotubes lors de leur purification par traitement oxydant. Si c'est le cas, cela signifie que le signal observé est très faible et très large.

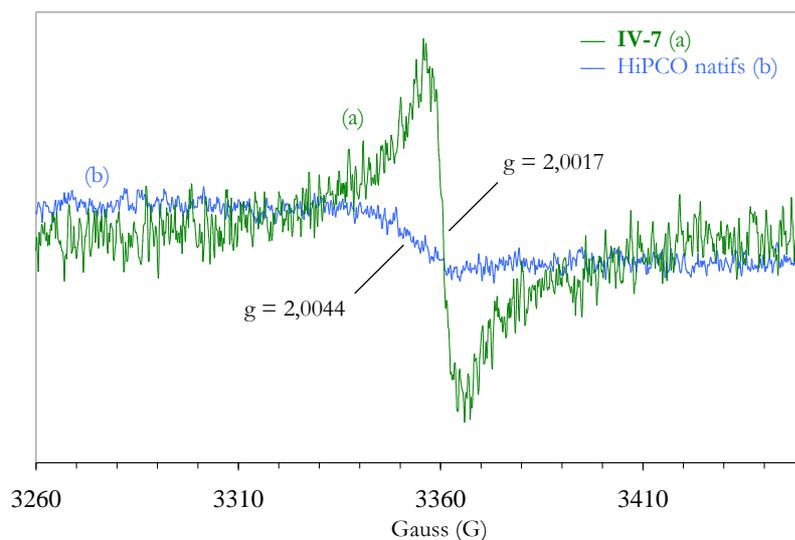


Figure IV-18 : Spectres RPE des solutions irradiées des nanotubes **IV-7** (a) et des nanotubes HiPCO natifs (b) dans le DMF à 4 K, obtenus à 9 GHz.

Lorsque les nanotubes sont fonctionnalisés avec le motif acridinium, leur irradiation avec une lampe UV à 365 nm induit la formation d'un signal radicalaire, légèrement décalé (par rapport aux radicaux libres) vers les hauts champs à $g = 2,0017$ (courbe a, Figure IV-18). Le signal reporté correspond au signal des nanotubes **IV-7** corrigé par rapport au signal des nanotubes natifs. Ce signal est effectivement un signal radicalaire, cependant la valeur de g est plus basse par rapport à celle attendue ($\sim 2,0023$). Une explication à cette variation pourrait venir de l'influence d'ions ferreux et/ou ferriques sur le signal radicalaire. En effet, bien que les nanotubes aient été purifiés, il reste du fer utilisé lors de leur synthèse.

Dans un deuxième temps, nous avons analysé par RPE les solutions irradiées de la molécule seule et en mélange avec les nanotubes. Dans les deux cas, aucun signal n'a été détecté dans la zone centrée à $g=2$. Par conséquent, ces mesures confirment que le signal obtenu pour les nanotubes **IV-7** est bien dû à un transfert photoinduit entre l'acridinium et le nanotube.

Enfin, nous avons voulu vérifier la présence du signal radicalaire sur les nanotubes-acridinium en absence de fer. Pour cela, nous avons effectué les mêmes expériences de RPE sur les nanotubes MWNTs **IV-12**.

V.3.2.b. RPE des "MWNT-acridinium"

Quand les nanotubes **IV-12** sont irradiés puis congelés à 4 K, un signal radicalaire est obtenu (courbe a, Figure IV-19). Par ailleurs, aucun signal n'est observé dans cette zone quand les nanotubes MWNTs natifs sont irradiés puis analysés. Il en est de même pour l'acridinium **IV-5** seul ou en mélange avec les nanotubes natifs. De plus, le signal détecté a une valeur de g de 2,0026 correspondant effectivement à la valeur attendue (par rapport aux radicaux libres).

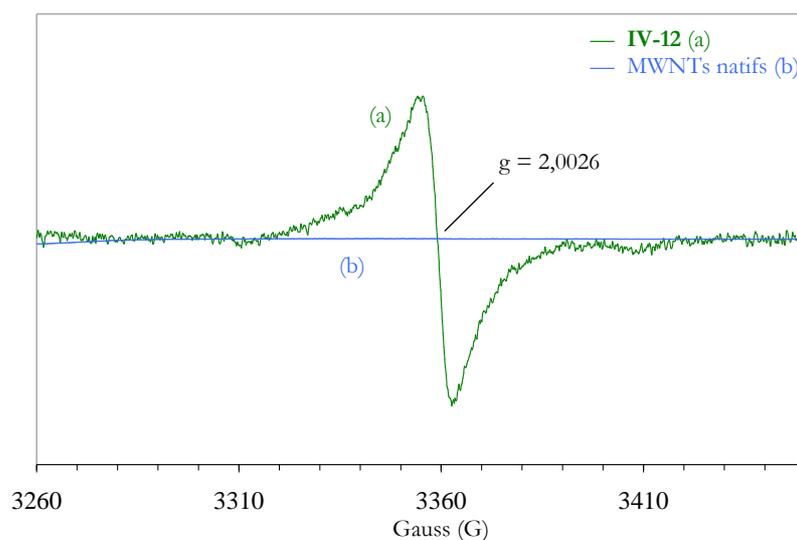


Figure IV-19 : Spectres RPE des solutions irradiées des nanotubes **IV-12** (a) et des MWNTs natifs (b) dans le DMF à 4 K, obtenus à 9 GHz.

Ces résultats corroborent notre hypothèse selon laquelle la présence du fer pourrait induire un déplacement vers les hauts champs du tenseur g . De plus, ces mesures semblent indiquer que le fer influe sur le temps de vie du radical. En effet, le signal obtenu est plus faible pour les SWNTs que pour les MWNTs alors que la concentration des MWNTs était plus faible.

VI. Conclusion

Les nanotubes de carbone possèdent de remarquables propriétés électroniques et sont connus pour interagir avec l'ADN. Nous avons ainsi envisagé différentes stratégies pour la conception d'un hybride donneur-accepteur capable de cliver l'ADN. Le principe repose sur l'excitation lumineuse d'un intercalant de l'ADN à proximité d'un nanotube sur une oxydation de l'ADN par un transfert électronique photoinduit.

La première approche que nous avons développée concerne la fonctionnalisation covalente de SWNTs avec un dérivé de l'acridine. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence un effet accentué de ce système par rapport aux nanotubes natifs, les deux endommageant l'ADN. Une des explications de ce phénomène serait la présence de fer dans les nanotubes HiPCO.

Nous avons alors abordé plusieurs approches, covalente et non-covalente, basées sur des MWNTs ne contenant pas d'éléments contaminants. Néanmoins, bien qu'une différence ait été obtenue entre les nanotubes natifs et fonctionnalisés, les expériences réalisées se sont avérées peu reproductibles mais encourageantes.

Pour tenter de mettre en évidence le mécanisme de transfert électronique photoinduit qui a lieu lors du clivage, nous nous sommes alors orientés vers l'étude d'hybrides "NT-acridine" **IV-6** et "NT-acridinium" **IV-7** par fluorescence et RPE.

Les nanotubes **IV-6** ont montré un effet de *quenching* de fluorescence couplé à un solvatochromisme négatif. Une explication à ce phénomène pourrait être la formation d'un exciplexe lors de l'excitation de l'acridine.

Les nanotubes **IV-7** ont montré une forte atténuation de fluorescence, caractéristique d'un transfert électronique. Ce phénomène a été corroboré par l'observation d'un signal radicalaire en RPE mettant en évidence de façon non ambiguë le transfert électronique photoinduit entre un dérivé d'acridine et les nanotubes de carbone.

VII. Bibliographie

- ¹ Da Ros, T.; Spalluto, G.; Boutorine, A. S.; Bensasson, R. V.; Prato, M. *Curr. Pharm. Design* **2001**, 7, 1781–1821.
- ² Armitage, B. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1171.
- ³ Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1109.
- ⁴ Pogozelski, W. K.; Tullius, T. D. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1089.
- ⁵ Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 18.
- ⁶ Joseph, J.; Eldho, N. V.; Ramaiah, D. *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 4444.
- ⁷ Kuruvilla, E.; Ramaiah, D. *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 6549.
- ⁸ Joseph, J.; Eldho, N. V.; Ramaiah, D. *Chem. Eur. J.* **2003**, 9, 5926.
- ⁹ Eldho, N. V.; Joseph, J.; Ramaiah, D. *Chem. Lett.* **2001**, 30, 438.
- ¹⁰ Yamakoshi, Y. N.; Yagami, T.; Sueyoshi, S.; Miyata, N. *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7236.
- ¹¹ Ishikawa, Y.; Yamashita, A.; Uno, T. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 287.
- ¹² Takashima, H.; Tara, C.; Namikawa, S.; Kato, T.; Araki, Y.; Ito, O.; Tsukahara, K. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 26413.
- ¹³ Fukuzumi, S.; Kotani, H.; Ohkubo, K.; Ogo, S.; Tkachenko, N. V.; Lemmetyinen, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 1600.
- ¹⁴ Ohkubo, K.; Yukimoto, K.; Fukuzumi, S. *Chem. Commun.* **2006**, 2504.
- ¹⁵ Zheng, M.; Jagota, A.; Strano, M. S.; Santos, A. P.; Barone, P.; Chou, S. G.; Diner, B. A.; Dresselhaus, M. S.; McLean, R. S.; Onoa, G. B. *Science* **2003**, 302, 1545.
- ¹⁶ Zheng, M.; Jagota, A.; Semke, E. D.; Diner, B. A.; McLean, R. S.; Lustig, S. R.; Richardson, R. E.; Tassi, N. G. *Nat. Mater.* **2003**, 2, 338.
- ¹⁷ Chen, Y.; Liu, H.; Ye, T.; Kim, J.; Mao, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 8696.
- ¹⁸ Pantarotto, D.; Singh, R.; McCarthy, D.; Erhardt, M.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5242.
- ¹⁹ Singh, R.; Pantarotto, D.; McCarthy, D.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Partidos, C. D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 4388.
- ²⁰ Guldi, D. M.; Rahman, G. M. A.; Zerbetto, F.; Prato, M. *ChemInform* **2006**, 37.
- ²¹ Guldi, D. M.; Rahman, G. M. A.; Zerbetto, F.; Prato, M. *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 871.
- ²² Hasobe, T.; Fukuzumi, S.; Kamat, P. V. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 25477.
- ²³ Guldi, D. M. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 11432.
- ²⁴ Baskaran, D.; Mays, J. W.; Zhang, X. P.; Bratcher, M. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 6916.
- ²⁵ Guo, Z.; Du, F.; Ren, D.; Chen, Y.; Zheng, J.; Liu, Z.; Tian, J. *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 3021.
- ²⁶ Campidelli, S.; Soombar, C.; Lozano-Diz, E.; Ehli, C.; Guldi, D. M.; Prato, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 12544.
- ²⁷ Guldi, D. M.; Rahman, G. M. A.; Ramey, J.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Paolucci, F.; Qin, S.; Ford, W. T.; Balbinot, D.; Jux, N. *Chem. Commun.* **2004**, 2034, 2034.
- ²⁸ Umeyama, T.; Fujita, M.; Tezuka, N.; Kadota, N.; Matano, Y.; Yoshida, K.; Isoda, S.; Imahori, H. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 11484.
- ²⁹ Chen, J.; Collier, C. P. *J. Phys. Chem. B* **2005**, 109, 7605.
- ³⁰ Saito, K.; Troiani, V.; Qiu, H.; Solladie, N.; Sakata, T.; Mori, H.; Ohama, M.; Fukuzumi, S. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 1194.
- ³¹ Guldi, D. M.; Taieb, H.; Rahman, G. M. A.; Tagmatarchis, N.; Prato, M. *Adv. Mater.* **2005**, 17, 871.
- ³² Alvaro, M.; Atienzar, P.; de la Cruz, P.; Delgado, J. L.; Troiani, V.; Garcia, H.; Langa, F.; Palkar, A.; Echegoyen, L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6626.
- ³³ Guldi, D. M.; Rahman, G. M. A.; Qin, S.; Tchoul, M.; Ford, W. T.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Paolucci, F.; Campidelli, S.; Prato, M. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 2152.
- ³⁴ Guldi, D. M.; Rahman, G. M. A.; Jux, N.; Tagmatarchis, N.; Prato, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 5526.
- ³⁵ Ehli, C.; Rahman, G. M. A.; Jux, N.; Balbinot, D.; Guldi, D. M.; Paolucci, F.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Melle-Franco, M.; Zerbetto, F.; Campidelli, S.; Prato, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11222.
- ³⁶ D'Souza, F.; Chitta, R.; Sandanayaka, A. S. D.; Subbaiyan, N. K.; D'Souza, L.; Araki, Y.; Ito, O. *Chem. Eur. J.* **2007**, 9999, NA.
- ³⁷ Guldi, D. M.; Rahman, G. M. A.; Jux, N.; Balbinot, D.; Tagmatarchis, N.; Prato, M. *Chem. Commun.* **2005**, 2038, 2040.
- ³⁸ Chitta, R.; Sandanayaka, A. S. D.; Schumacher, A. L.; D'Souza, L.; Araki, Y.; Ito, O.; D'Souza, F. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 6947.
- ³⁹ Aminur Rahman, G. M.; Guldi, D. M.; Campidelli, S.; Prato, M. *J. Mater. Chem.* **2006**, 16, 62.
- ⁴⁰ Kauffman, D. R.; Kuzmych, O.; Star, A. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 3539.

- ⁴¹ Murakami, H.; Nomura, T.; Nakashima, N. *Chem. Phys. Lett.* **2003**, *378*, 481.
- ⁴² Li, H.; Zhou, B.; Lin, Y.; Gu, L.; Wang, W.; Fernando, K. A. S.; Kumar, S.; Allard, L. F.; Sun, Y. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1014.
- ⁴³ Boul, P. J.; Cho, D. G.; Rahman, G. M. A.; Marquez, M.; Ou, Z.; Kadish, K. M.; Guldi, D. M.; Sessler, J. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5683.
- ⁴⁴ Ballesteros, B.; de la Torre, G.; Ehli, C.; Aminur Rahman, G. M.; Agullo-Rueda, F.; Guldi, D. M.; Torres, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5061.
- ⁴⁵ Feng, W.; Li, Y.; Feng, Y.; Wu, J. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 3274.
- ⁴⁶ Hatton, R. A.; Blanchard, N. P.; Stolojan, V.; Miller, A. J.; Silva, S. R. P. *Langmuir* **2007**, *23*, 6424.
- ⁴⁷ Alvaro, M.; Atienzar, P.; de la Cruz, P.; Delgado, J. L.; Garcia, H.; Langa, F. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 12691.
- ⁴⁸ Guldi, D. M.; Marcaccio, M.; Paolucci, D.; Paolucci, F.; Tagmatarchis, N.; Tasis, D.; Vazquez, E.; Prato, M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4206.
- ⁴⁹ Pagona, G.; Sandanayaka, A. S. D.; Araki, Y.; Fan, J.; Tagmatarchis, N.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Ito, O. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20729.
- ⁵⁰ D'Este, M.; Nardi, M. D.; Menna, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2006**, *2006*, 2517.
- ⁵¹ Wu, W.; Zhang, S.; Li, Y.; Li, J.; Liu, L.; Qin, Y.; Guo, Z. X.; Dai, L.; Ye, C.; Zhu, D. *Macromolecules* **2003**, *36*, 6286.
- ⁵² Herranz, M. Á.; Martín, N.; Campidelli, S.; Prato, M.; Brehm, G.; Guldi, D. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4478.
- ⁵³ Bhattacharyya, S.; Kymakis, E.; Amaratunga, G. A. J. *Chem. Mater.* **2004**, *16*, 4819.
- ⁵⁴ Guldi, D. M.; Rahman, G. M. A.; Sgobba, V.; Kotov, N. A.; Bonifazi, D.; Prato, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2315.
- ⁵⁵ Li, Q.; Sun, B.; Kinloch, I. A.; Zhi, D.; Sirringhaus, H.; Windle, A. H. *Chem. Mater.* **2006**, *18*, 164.
- ⁵⁶ Ohkubo, K.; Iwata, R.; Yanagimoto, T.; Fukuzumi, S. *Chem. Commun.* **2007**, 3139.
- ⁵⁷ Suga, K.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 3860.
- ⁵⁸ Ohkubo, K.; Suga, K.; Fukuzumi, S. *Chem. Commun.* **2006**, 2018.
- ⁵⁹ Suga, K.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 10168.
- ⁶⁰ Fukuzumi, S.; Okamoto, K.; Tokuda, Y.; Gros, C. P.; Guillard, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 17059.
- ⁶¹ Kotani, H.; Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15999.
- ⁶² Fukuzumi, S.; Fujita, S.; Suenobu, T.; Imahori, H.; Araki, Y.; Ito, O. *J. Phys. Chem. A* **2002**, *106*, 1465.
- ⁶³ Fukuzumi, S.; Ohkubo, K.; Suenobu, T.; Kato, K.; Fujitsuka, M.; Ito, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8459.
- ⁶⁴ Ohkubo, K.; Fukuzumi, S. *Org. Lett.* **2000**, *2*, 3647.
- ⁶⁵ Cherkasov, A. S.; Obyknovennaya, I. E. *Doklady Akad. Nauk SSSR* **1967**, *173*, 867.
- ⁶⁶ Cherkasov, A. S.; Obyknovennaya, I. E. *Izvestiya Akad. Nauk SSSR, Seria Fizich.* **1968**, *32*, 1419.
- ⁶⁷ Valeur, B. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, **2001**.
- ⁶⁸ Reichardt, C. *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry, 3rd Edition*, Wiley-VCH, **2003**.
- ⁶⁹ Reichardt, C. *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319.
- ⁷⁰ Obyknovennaya, I. E.; Cherkasov, A. S. *Doklady Akad. Nauk SSSR* **1966**, *173*, 867.
- ⁷¹ Ivanov, V. L.; Al'-Ainen, S. A.; Kuz'min, M. G. *Doklady Akad. Nauk SSSR* **1981**, *256*, 638.
- ⁷² Ivanov, V. L.; Al'-Ainen, S. A.; Kuz'min, M. G. *Doklady Akad. Nauk SSSR* **1977**, *237*, 1400.
- ⁷³ Ohkubo, K.; Suga, K.; Morikawa, K.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12850.

CHAPITRE V

Fonctionnalisation de nanotubes de carbone pour la limitation optique

I. Introduction

Le concept de limitation optique est apparu avec la prolifération des lasers et le besoin de s'en protéger. Cette notion est basée sur l'emploi de protections faisant appel à des effets optiques non-linéaires pour se prémunir d'éblouissements accidentels ou délibérés. Dans ce cadre, les suspensions de nanotubes de carbone se sont révélés être de très bon candidats. En effet, sous l'impact d'une impulsion laser les nanotubes génèrent des bulles pouvant diffuser le faisceau incident et en conséquence, le rendre moins dangereux.

Ce domaine de recherche avait été abordé au laboratoire pendant la thèse de Cécilia Ménard qui a mis en œuvre différentes stratégies pour optimiser les performances des nanotubes en tant que limiteurs optiques.¹ Nous avons approfondi cette thématique en développant d'autres voies d'élaboration d'hybrides pour la limitation optique. Dans un premier temps, nous avons fonctionnalisé les nanotubes avec des motifs capables de se décarboxyler et de générer précocement des bulles sous l'effet d'une impulsion laser. Dans une deuxième approche, nous avons associés les nanotubes avec des fullerènes servant déjà de référence, dans ce domaine, en tant qu'absorbeur saturable inverse. En effet, la combinaison de deux limiteurs optiques différents a déjà été étudiée pour améliorer les propriétés individuelles des deux entités. Suivant cette même stratégie, nous avons testé les propriétés de limitation optique des nanotubes recouverts de nanoparticules d'or dont la méthode de synthèse a été décrite dans le chapitre II.

Les expériences de limitation optique et pompe-sonde en régime nanoseconde ont été réalisées en collaboration avec Bertrand Cao et Didier Riehl du Centre d'Expertise Parisien de la DGA au sein du Département Laser, Optique et Thermo-optique (LOT) à Arcueil. Les tests pompe-sonde en régime picosonde ont été réalisés en collaboration avec Jacques Delaire au laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM) à l'École Normale Supérieure de Cachan.

II. Limitation optique

II.1. Le risque laser

Depuis leur apparition, les lasers se sont développés à une vitesse impressionnante et sont devenus des outils incontournables du monde moderne. On les trouve aussi bien pour des utilisations civiles (scanners de supermarché, pointeurs laser, télémétrie, génie civil,...) que dans des applications militaires (télémétrie, détection d'optiques pointées, désignation laser, imagerie active). Cet essor qui est positif du point de vue de la technologie contribue malheureusement à l'augmentation en parallèle du risque laser. En effet, ces sources de

lumière cohérente peuvent éblouir voire aveugler. Ce risque peut être soit accidentel soit lié à une agression délibérée si le laser est détourné de son usage premier.

L'œil humain est un capteur très performant mais aussi très fragile. Le système cornée-cristallin joue le rôle d'une loupe et focalise donc directement sur la rétine l'impulsion laser arrivant sur la cornée (pour $400 \text{ nm} < \lambda < 1400 \text{ nm}$). Les lésions rétinienne étant toujours irréversibles, il est nécessaire de développer des systèmes de protection capable de parer à toutes les menaces.^{2,3}

II.2. Comportement d'un limiteur optique

Une protection idéale doit être capable de répondre à l'étendue du risque, en étant efficace vis-à-vis de toutes les sources laser existantes (lasers accordables en longueur d'onde ou émettant simultanément à plusieurs longueurs d'onde). Le comportement idéal d'un système limiteur optique est représenté sur la Figure V-1 où l'énergie transmise est représentée en fonction de l'énergie incidente du laser (ou de sa fluence).

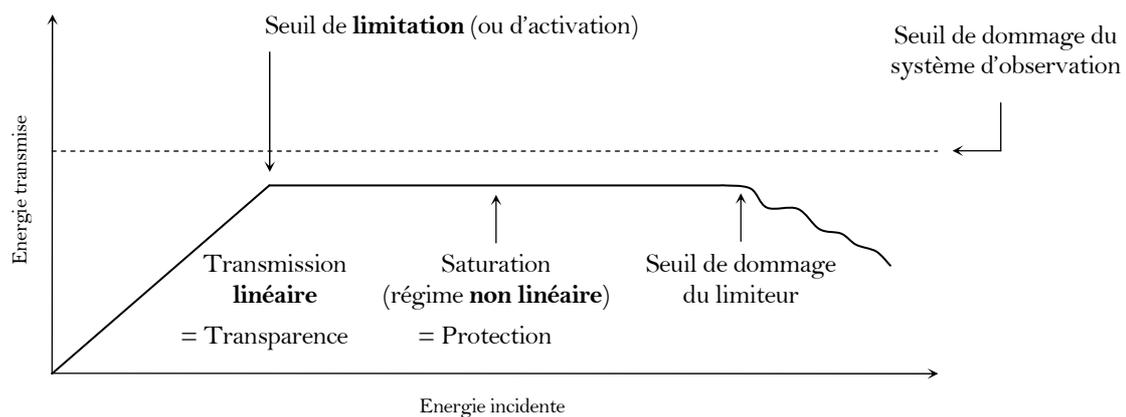


Figure V-1 : Principe de fonctionnement d'un limiteur optique

Ainsi, une protection idéale doit :

- être efficace sur une large bande spectrale, sur tout le spectre visible et proche infrarouge, dans le domaine de transparence des milieux oculaires (400 à 1400 nm),
- être efficace sur une large bande temporelle, du laser impulsionnel picoseconde au laser continu, et par conséquent posséder un temps de réponse suffisamment rapide,
- posséder une colorimétrie neutre, *i.e.* préservant la vision des couleurs, et posséder une transmission linéaire élevée et être ainsi transparent à faible fluence,
- posséder un seuil de dommage élevé, pour pouvoir jouer son rôle de protection même face à une impulsion laser de forte puissance,
- être efficace même face à une cadence de tir élevée.

Les systèmes de protection actuels ne répondent que partiellement à tous ces critères. Dans la section suivante, nous présenterons les grandes classes de protection, qui se distinguent par leur mode d'activation : passif, actif (ou déclenché) et autodéclenché.

II.3. Types de Protection

II.3.1. Protections passives

Le moyen le plus simple de se prémunir d'une agression laser de longueur d'onde donnée est de placer un filtre adapté devant le système à protéger. Bien que ce type de filtres permanents soit très efficace lorsque la longueur d'onde du laser est connue ils deviennent obsolètes vis-à-vis de lasers accordables en longueur d'onde. De plus, du fait de leur faible transmission, ils altèrent le domaine de sensibilité spectrale ainsi que la vision des couleurs du système d'observation.

II.3.2. Protections déclenchées

Une des solutions à ce problème consiste à utiliser une protection qui ne se déclenche qu'en cas de besoin. Le principe repose sur l'activation d'une protection adéquate dès qu'un seuil caractéristique d'une agression laser est enregistré par un détecteur. Cette protection est désactivée dès lors que le signal issu du détecteur retombe en deçà de ce seuil.

Cependant, ce type de protection comporte plusieurs inconvénients : l'encombrement du système de détection, l'impossibilité d'observation tant que la protection est activée et le temps d'activation de la protection (de l'ordre de la milliseconde pour une valve à cristaux liquides) qui est nettement insuffisant face à un laser impulsionnel nanoseconde.

II.3.3. Protections auto-activées

Afin de parer ces menaces lasers impulsionnelles, et ce sur une large bande spectrale, il apparaît nécessaire de développer des protections constituées d'un ou de plusieurs matériaux photoactivés par l'impulsion laser elle-même, ceci permet d'obtenir un temps de réponse beaucoup plus court. Ces protections auto-activées reposent sur des mécanismes d'optique non linéaire (absorption, diffusion, réfraction) présents dans les matériaux photoactivables. C'est le cas, entre autres, des nanotubes de carbone et des fullerènes dont les propriétés seront détaillées dans la suite de ce chapitre.

III. Nanotubes de carbone et limitation optique

III.1. Propriétés optiques des nanotubes de carbone

En 1998, l'équipe de Sun a rapporté l'utilisation des nanotubes de carbone comme limiteur optique potentiel.⁴ Leur étude a permis de déterminer qu'ils offraient une protection large bande reposant sur un mécanisme d'optique non linéaire. Très neutre colorimétriquement et performantes du domaine temporel nanoseconde jusqu'à microseconde, les suspensions de nanotubes s'avèrent être plus efficaces dans le domaine visible que d'autres matériaux carbonés, comme les fullerènes (C₆₀) et les suspensions de noir de carbone constitués de nanoparticules sphériques carbonées.^{5,6} Ils présentent en outre l'avantage d'être légèrement plus performants dans le domaine infrarouge que le noir de carbone, tandis que le fullerène C₆₀ est totalement inefficace au-delà de 650 nm. Cette particularité rend les nanotubes particulièrement attractifs pour des applications en limitation optique.

III.2. Mécanisme de la limitation optique des nanotubes de carbone

Le mécanisme d'optique non linéaire par lequel fonctionnent les solutions de nanotubes a été identifié comme étant la diffusion.^{2,7-9} Ce même phénomène a été mis en évidence pour les suspensions de particules de noir de carbone.^{5,10,11}

Cet effet est généralement observé pour un milieu hétérogène contenant des particules absorbantes de petite taille. De ce fait, ce milieu hétérogène diffuse faiblement le rayonnement incident : il est transparent. Quand l'intensité du rayonnement incident augmente un changement de phase intervient au niveau des particules et/ou du milieu environnant. Il en résulte alors une forte diminution de la transmission.

Pour les nanotubes de carbone, le mécanisme de diffusion est différent suivant la puissance de l'impulsion laser utilisée (Schéma V-1). A faible fluence, les nanotubes vont chauffer et transférer cette chaleur au solvant environnant. Cela va entraîner la nucléation de bulles qui vont pouvoir diffuser le faisceau laser incident. A forte fluence, un phénomène supplémentaire apparaît avec la sublimation des nanotubes. Des bulles de vapeurs de carbone sont alors formées de manière explosive avec un temps de croissance de l'ordre de la nanoseconde. Ces bulles vont à leur tour diffuser l'impulsion laser de la même manière que les bulles de vapeur de solvant.

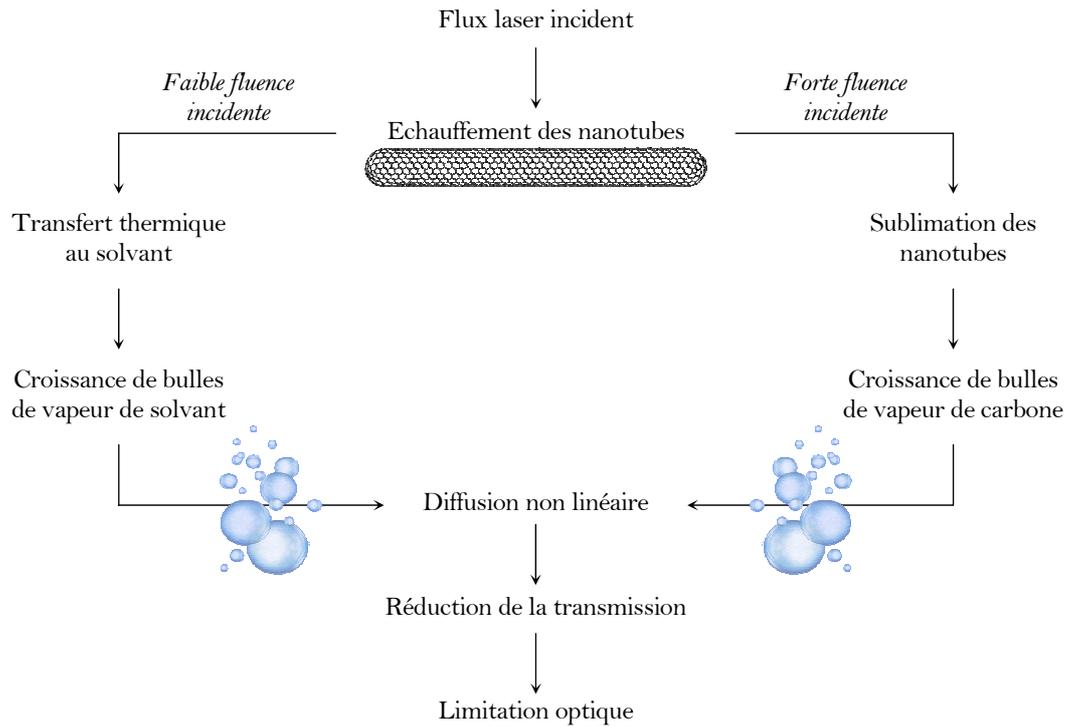


Schéma V-1 : Mécanismes de diffusion non linéaire dans les suspensions de nanotubes de carbone

L'un des paramètres limitant pour ce mécanisme est le solvant.¹² En effet, les solvants favorables à la nucléation de bulles de vapeur sont ceux ayant une grande conductivité thermique, un faible point d'ébullition, une faible viscosité et une faible chaleur latente de vaporisation. Un solvant de choix est le chloroforme.

Néanmoins, les nanotubes présentent l'inconvénient de ne pas être solubles dans les solvants. Ils s'agrègent pour former des fagots *via* des interactions de van der Waals et par conséquent se déposent par floculation. L'un des moyens d'y remédier est de les fonctionnaliser. En plus de les rendre solubles le greffage de différentes molécules à leur surface peut constituer une voie d'optimisation de leurs performances. Dans ce but, plusieurs systèmes à base de nanotubes de carbone ont déjà été étudiés.

III.3. Systèmes existants à base de nanotubes pour la limitation optique

La première équipe à avoir dérivatisé des nanotubes pour les solubiliser et ensuite les tester en limitation optique est celle de Sun en 2000.¹³ Ils reportent la fonctionnalisation covalente de nanotubes, *via* les acides carboxyliques de surface, avec de l'octadécylamine ainsi qu'un polymère (PEI : propionyléthylèneimine). Ces nanotubes ne présentent pas d'avantages significatifs par rapport aux nanotubes natifs si ce n'est qu'il est plus aisé de travailler avec une solution stable.

Par contre, l'équipe de Guo a montré que les performances de limitation optique de nanotubes fonctionnalisés avec un polymère conjugué (PVK : polyvinylcarbazole) étaient meilleures que celles de nanotubes dérivatisés avec un polymère peu conjugué.¹⁴ Les auteurs ont postulé que l'amélioration des propriétés de limitation optique est certainement corrélée à un transfert de charge photoinduit entre le PVK et les nanotubes.

Par la suite, Cécilia Ménard a développé une stratégie visant à associer les nanotubes de carbone avec un second limiteur optique.^{1,15,16} Dans ce but, des nanotubes fonctionnalisés avec des absorbeurs à deux photons (A2P) ont été synthétisés puis testés. Bien que ces nanotubes fonctionnalisés n'aient pas montré d'amélioration, il a été mis en évidence qu'un simple mélange de nanotubes solubles et d'A2P permettait l'observation d'un effet cumulatif des deux entités.

En suivant le même principe, deux équipes ont associé les nanotubes de carbone avec des porphyrines,^{17,18} qui sont des absorbeurs saturables inverse (ASI) et présentent l'avantage d'être performants à des concentrations plus faibles que celles requises pour les A2P. Que les porphyrines soient greffées de manière covalente ou simplement en mélange avec les nanotubes, une nette amélioration des propriétés de limitation optique des nanotubes a été rapportée.

Les différentes stratégies que nous avons envisagées suivent un schéma équivalent. Nous avons associés les nanotubes avec des entités capables d'améliorer leurs propriétés intrinsèques de limitation optique et/ou de les compléter. Dans un premier temps, nous décrirons les essais effectués dans le but d'amplifier le phénomène induisant la limitation optique, *i.e.* la formation de bulles. Cette partie est développée dans la section suivante.

IV. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone avec des motifs décarboxylables

Comme nous l'avons évoqué, à faible fluence, les nanotubes transfèrent la chaleur vers le solvant générant ainsi des bulles, tandis qu'à forte fluence, un phénomène supplémentaire apparaît : des bulles de vapeur se créent par sublimation du carbone, ce qui peut conduire, à très forte fluence, à la formation d'un plasma. La formation de ces bulles est à l'origine du mécanisme de diffusion non linéaire.

Lors de recherches conduites sur des suspensions de particules de noir de carbone McEwan et *coll.* ont observé que les performances de ces solutions étaient meilleures dans une eau saturée en dioxyde de carbone.¹⁹ Suite à cette observation, nous nous sommes proposés de concevoir un nanoobjet original à base de nanotubes susceptible de générer des

bulles de CO₂ *in situ* en amont de la réponse habituelle des nanotubes. Le cumul des deux effets devrait permettre de diminuer le seuil de limitation des nanotubes.

La stratégie que nous avons adoptée repose sur la fonctionnalisation des nanotubes avec des entités capables de libérer des bulles de dioxyde de carbone dans le milieu. Deux approches ont été envisagées où le CO₂ peut être libéré soit photochimiquement, soit thermiquement.

IV.1. Stratégies de décarboxylation

IV.1.1. Photodécarboxylation

Les esters de Barton sont connus pour être photosensibles et se décarboxyler spontanément sous irradiation lumineuse.²⁰ Nous nous sommes donc proposés de greffer des motifs thiopyridone sur les nanotubes. Deux voies de synthèses différentes ont été suivies : *via* les acides carboxyliques, générés par oxydation des nanotubes, mais également à partir d'acides préalablement greffés sur toute la surface des tubes *via* une chaîne alkyle (Figure V-2).

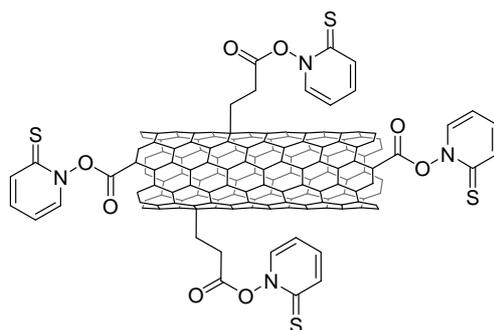


Figure V-2 : Nanotubes fonctionnalisés avec des esters de Barton

Cependant, les esters de Barton sont trop instables et se décomposent trop rapidement en présence de lumière. Nous n'avons donc pas pu effectuer de tests en limitation optique sur ces nanotubes fonctionnalisés.

La deuxième approche mise en œuvre repose sur la fonctionnalisation de nanotubes avec une entité capable de se décarboxyler thermiquement.

IV.1.2. Décarboxylation thermique

Parmi les composés qui présentent ce type de réactivité, la famille des β -cétoacides est particulièrement attractive car ces molécules ont la capacité de se décarboxyler facilement (vers 50-60°C) avec libération concomitante de CO₂.²¹

La formation d'une liaison hydrogène intramoléculaire permet la création d'un état de transition cyclique à six centres du β -cétoacide **V-1** (Schéma V-2).²² Par induction

thermique, un réarrangement à six électrons fournit du CO_2 et un énol **V-2**. L'équilibre de tautomérie conduit à la cétone **V-3** qui est le composé carbonylé le plus stable.

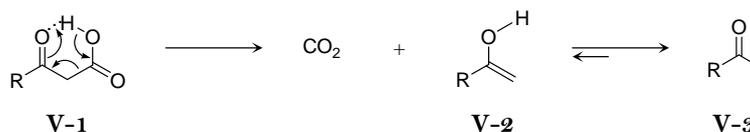


Schéma V-2 : Décarboxylation de motifs β -cétoacides

Deux paramètres permettent d'espérer que l'utilisation de tels motifs induise une réponse en limitation optique antérieure à celle provoquée par la formation de bulles due à l'échauffement des nanotubes par l'impulsion laser. D'un part la température de décarboxylation thermique des motifs β -cétoacides est inférieure au point d'ébullition du chloroforme (62°C). D'autre part, d'après les travaux de Huang et *coll.*, la barrière d'activation permettant la décarboxylation de l'acide formylacétique a été estimée à $28,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ et à $23,3 \text{ kcal.mol}^{-1}$ pour l'acide acétoacétique (respectivement $\text{R} = \text{H}$ et CH_3 sur le Schéma V-2).²³ Il en résulte que le seuil d'activation des nanotubes fonctionnalisés devrait être diminué par la décarboxylation précoce du cétoacide.

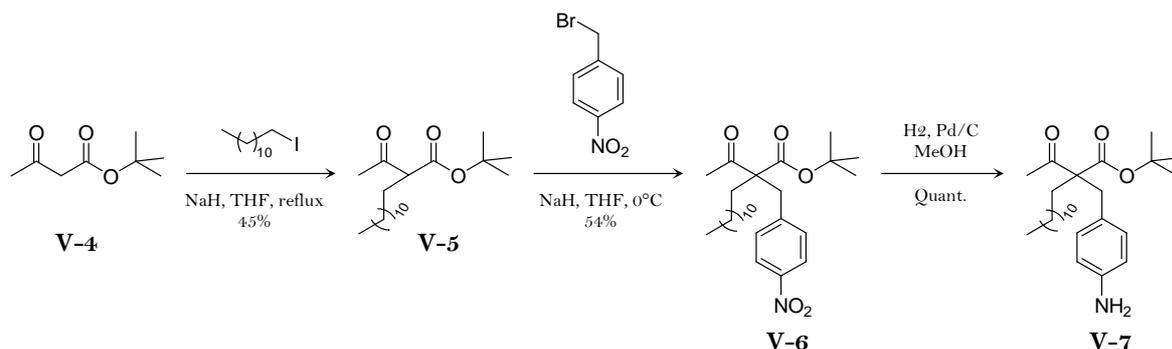
IV.2. Obtention des nanotubes thermodécarboxylables

IV.2.1. Synthèse d'un motif β -cétoacide greffable

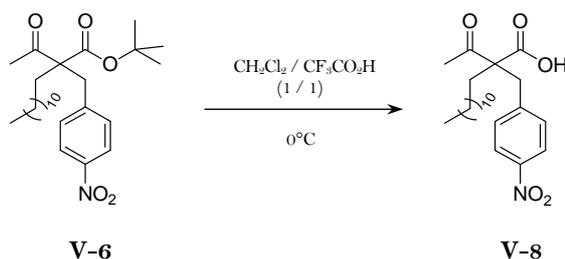
La conception de la structure de la molécule **V-7** (Schéma V-3) greffable repose sur la présence de trois fonctions :

- un motif β -cétoacide pour la formation de bulles
- une longue chaîne alkyle pour assurer la solubilité des nanotubes dans le chloroforme
- un groupement aniline permettant la fonctionnalisation des nanotubes en utilisant la méthode développée par Tour et *coll.*

La synthèse du motif greffable **V-7** a été effectuée en 3 étapes à partir du *tert*-butylacétoacétate **V-4**. Dans un premier temps ce dernier a été métallé par de l'hydrure de sodium, puis de l'iodododécane a été ajouté pour donner le composé **V-5** avec 45% de rendement. La sélectivité de cette étape est en faveur du produit mono-alkylé **V-5**. Le même type de séquence réactionnelle a été appliqué pour l'introduction du fragment aromatique *p*-nitrobenzyle avec un rendement de 54%. Enfin, le groupement nitro du composé **V-6** a été réduit par hydrogénation catalytique en présence de Pd/C et l'aniline **V-7** a été obtenue.

Schéma V-3 : Synthèse de la molécule **V-7** décarboxylable

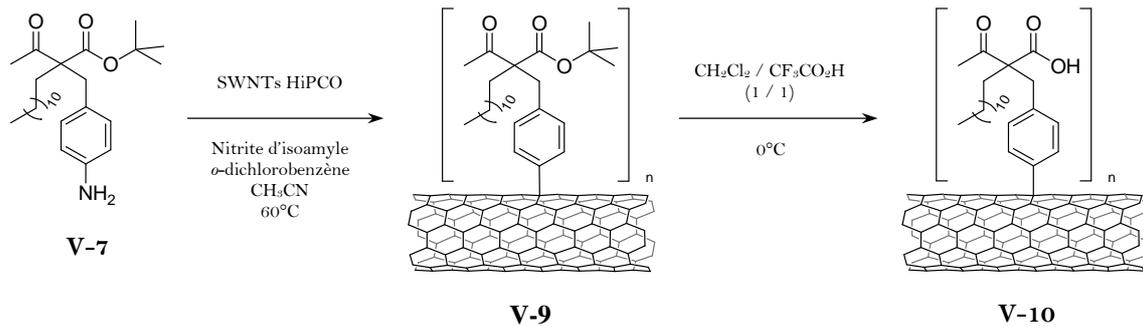
A ce stade du travail, nous avons voulu tester les conditions de déprotection de l'ester *tert*-butylique. Un traitement de **V-6** par une solution d'acide trifluoroacétique (5% dans CH_2Cl_2) pendant 12h permet de libérer la fonction carboxylique (Schéma V-4). Dans nos conditions réactionnelles, le produit formé est stable et nous n'observons pas de décarboxylation spontanée. Cependant, sur colonne de silice, le β -cétoacide **V-8** tend à évoluer lentement avec perte de CO_2 . La relative fragilité du β -cétoacide substitué nous a conduit à envisager la déprotection de l'ester en dernière étape de synthèse après greffage sur les nanotubes de carbone.

Schéma V-4 : Modèle pour la déprotection de l'acide carboxylique sur la molécule **V-6**

IV.2.2. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone et caractérisation

La séquence réactionnelle mise en œuvre est représentée sur le Schéma V-5. Pour obtenir les nanotubes **V-9** le sel de diazonium du composé β -cétoester **V-7** a été généré *in situ* à 60°C en présence de nitrite d'isoamyle. La caractérisation des nanotubes **V-9** obtenus a été réalisée par spectroscopie de diffusion Raman, par absorption UV-Vis-NIR et ATR-IR. Il a effectivement été constaté une augmentation du rapport I_D/I_G (0,09 à 0,27) en Raman ainsi qu'une disparition des absorptions de van Hove des nanotubes natifs en absorption UV-Vis et la présence de bande caractéristique de fonction cétone (1705 cm^{-1}) en ATR-IR.

L'étape de déprotection des nanotubes **V-9** en présence d'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane a été confirmé par ATR-IR. L'analyse des nanotubes **V-10** a montré l'apparition d'une bande large (3234 cm^{-1}) attestant de la formation d'acides carboxyliques.

Schéma V-5 : Fonctionnalisation des nanotubes avec le motif β -cétoester **V-7** et déprotection

Les nanotubes thermodécarboxylables **V-10** ont ensuite été testés en limitation optique.

IV.3. Limitation optique

Les tests de limitation optique consistent à mesurer la transmission des échantillons irradiés par un faisceau laser de durée d'impulsion et de longueur d'onde définies, en fonction de la fluence incidente du laser. Deux paramètres principaux, donnés par la courbe de limitation optique (Figure V-3), permettent de définir l'efficacité d'un limiteur optique :

- Le seuil de limitation optique représenté par le point d'inflexion de la courbe entre les régimes linéaire et non-linéaire.
- Le facteur d'atténuation représenté par le rapport entre la transmission linéaire (T_L) et la transmission non-linéaire (T_{NL}) à une fluence incidente donnée.

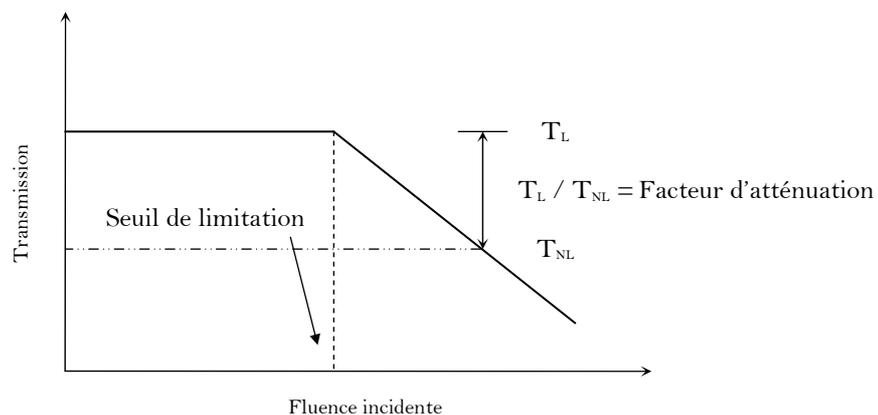
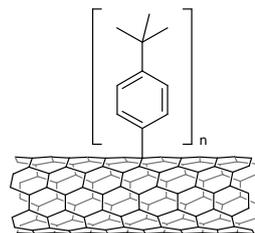


Figure V-3 : Courbe classique de limitation optique

Afin de pouvoir mettre en évidence l'influence des motifs décarboxylables sur les performances des nanotubes **V-10** il est nécessaire de comparer les résultats de limitation optique obtenus avec ceux de nanotubes solubles mais non décarboxylables. Nous avons donc préparé comme nanotubes solubles de référence des nanotubes fonctionnalisés dans les

mêmes conditions que celles utilisées précédemment (Schéma V-5). Un motif *tert*-butylaryle a été utilisé pour induire une solubilité des nanotubes dans le chloroforme (Figure V-4).



V-11

Figure V-4 : Nanotubes HiPCO solubles de référence

Les courbes de limitation optique sont représentées sur la Figure V-5. Elles ont été obtenues pour des impulsions laser de 4 ns à 532 nm et dans le chloroforme. Pour que des performances satisfaisantes soient obtenues et que l'ergonomie de l'observation soit préservée, la transmission linéaire des échantillons est ajustée à 70% à 532 nm. Au préalable, nous nous sommes également assurés que la fonctionnalisation ne perturbait pas les propriétés intrinsèques de limitation optique des nanotubes. Ceci a été effectué par comparaison entre des nanotubes natifs et les nanotubes de référence V-11.

La détermination du seuil de limitation ainsi que du facteur d'atténuation se fait graphiquement. Etant donné que le seuil n'est pas marqué par une réelle rupture de pente entre le régime linéaire et non-linéaire, sa valeur est estimée en assimilant la partie du régime non-linéaire à une droite.

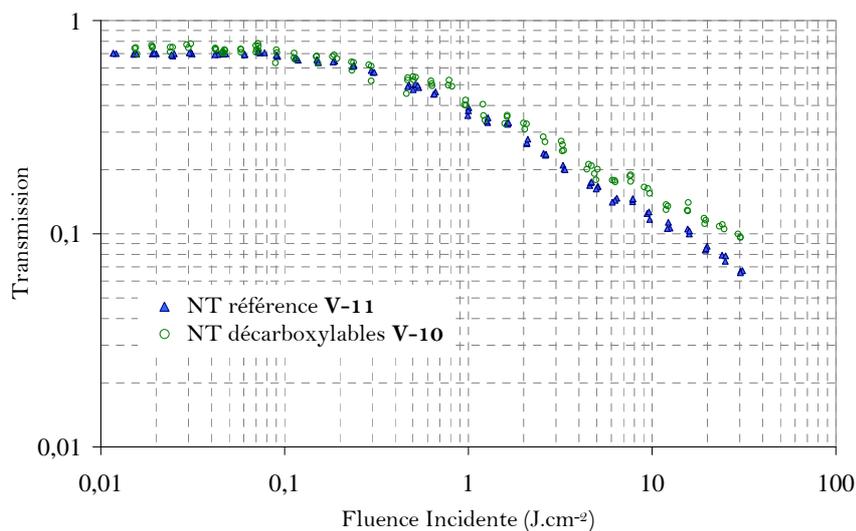


Figure V-5 : Courbes de limitation optique des nanotubes de référence V-11 et des nanotubes décarboxylables V-10 à 532 nm, avec des impulsions de 4 ns

Les paramètres principaux de la limitation optique sont résumés dans le Tableau V-1.

Echantillon (532nm, 4 ns)	Seuil de limitation (mJ.cm ⁻²)	Transmission à 10 J.cm ⁻² (%)	Facteur d'atténuation à 10 J.cm ⁻²
NT référence V-11	150	13	5,4
NT décarboxylables V-10	150	16	4,7

Tableau V-1 : Valeurs des paramètres de limitation optique des nanotubes de référence **V-11** et des nanotubes décarboxylables **V-10**

Nous pouvons constater que les performances des nanotubes décarboxylables **V-10** sont légèrement inférieures à ceux des nanotubes de référence **V-11**. Le seuil de limitation des deux échantillons est, quant à lui, identique. Cela signifie que la décarboxylation des motifs β -cétacides n'a pas eu l'effet escompté avec la génération de bulles en amont de la réponse conventionnelle. Pour déterminer s'il y a effectivement production de bulles en plus de celles dues à l'échauffement des nanotubes, nous avons procédé à des expériences pompe-sonde.

IV.4. Expériences pompe-sonde nanoseconde

Les expériences pompe-sonde permettent d'étudier la dynamique des effets non-linéaires mis en jeu. Par conséquent, si un phénomène additionnel a lieu, comme la formation précoce de bulles, alors il sera possible de le visualiser. Le principe repose sur le suivi de la variation de la transmission d'un échantillon pendant une impulsion laser et quelques dizaines de nanosecondes après. Dans ce cas, le faisceau laser impulsionnel joue le rôle de la pompe à l'origine de la limitation optique et la transmission est mesurée par un faisceau laser continu peu intense jouant le rôle de sonde.

IV.4.1. Nanotubes thermodécarboxylables

Pour réaliser ces expériences et pouvoir visualiser les premiers effets générés, il est nécessaire de choisir une fluence incidente du faisceau pompe faible. Si une intensité trop forte est appliquée le phénomène dû aux grosses cavités gazeuses de carbone risque de masquer la formation de bulles précoces. Une fluence de 13 mJ.cm⁻² a donc été utilisée avec une durée d'impulsion de 4 ns (Figure V-6). Nous avons conservé les nanotubes solubles **V-11** comme référence.

Après le passage de l'impulsion (Figure V-6, courbe (a)), la réponse des nanotubes n'est pas immédiate. Ce décalage est dû au temps de nucléation et de croissance des bulles de solvant suite à l'échauffement des nanotubes. Nous pouvons constater que la transmission de la sonde à travers la solution de nanotubes thermodécarboxylables **V-10** (Figure V-6, courbe (c)) n'est modifiée que très légèrement par rapport à la solution de nanotubes de référence **V-11** (Figure V-6, courbe (b)). Afin d'induire une plus forte décarboxylation et observer un effet plus prononcé, l'énergie du faisceau laser pompe a été augmentée.

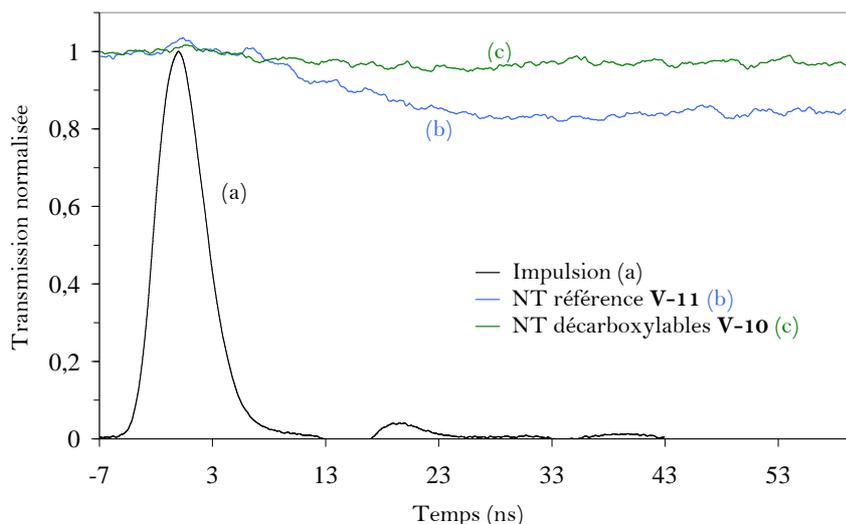


Figure V-6 : Évolution de la transmission de la sonde à une longueur d'onde de 633 nm, suite à une impulsion du faisceau pompe (a) de 4 ns pour une fluence de $13 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, pour les nanotubes de référence **V-11** (b) et pour les nanotubes **V-10** (c)

Cependant, en utilisant une fluence de $57 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$, une plus grande différence a été observée entre la solution de référence et les nanotubes fonctionnalisés. D'une part, la transmission des nanotubes **V-10** ne diminue que très peu et d'autre part, leur seuil de limitation est supérieur à celui des nanotubes de référence **V-11**.

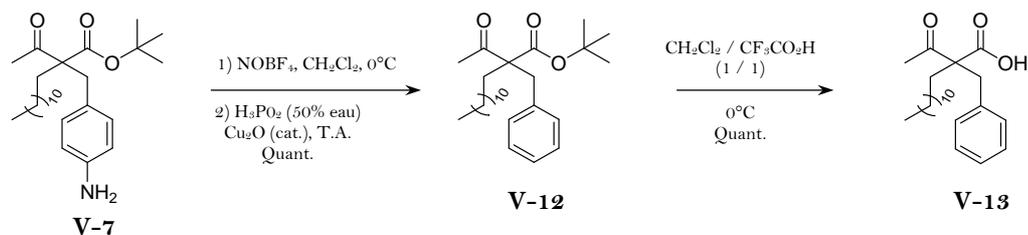
Cette efficacité plus faible peut être le résultat ou la combinaison de plusieurs facteurs :

- L'énergie nécessaire pour la décarboxylation pourrait être trop élevée.
- Le phénomène de décarboxylation et/ou la diffusion des bulles créées seraient trop lents.
- La concentration en motifs β -cétoacides sur les nanotubes est possiblement trop faible pour pouvoir générer suffisamment de bulles.
- Les fonctions greffées à la surface des nanotubes pourraient s'opposer au transfert de chaleur vers le solvant Il a en effet été montré que la conductivité thermique des nanotubes est affaiblie par une fonctionnalisation covalente de leur paroi.²⁴

Dans le but de vérifier quelle est l'énergie nécessaire à la décarboxylation du motif β -cétoacide, nous avons effectué des expériences pompe-sonde sur ce motif seul en solution.

IV.4.2. Motif β -cétoacide

Dans un premier temps nous avons synthétisé, à partir du β -cétoester **V-7**, le β -cétoacide **V-13** (Schéma V-6) de structure identique à celle du motif greffé sur les nanotubes **V-10**.

Schéma V-6 : Synthèse du substrat **V-13** greffé sur les nanotubes **V-10**

L'amine **V-7** a été transformée par action du tétrafluoroborate de nitrosonium pour donner le sel de diazonium correspondant. Ce dernier est réduit *in situ* par de l'acide hypophosphoreux en présence d'une quantité catalytique d'oxyde de cuivre (I). Le composé **V-12** obtenu est déprotégé dans un mélange d'acide trifluoroacétique et de dichlorométhane pour former le produit **V-13**. Dans un deuxième temps, nous avons mené les expériences pompe-sonde, dans les mêmes conditions que précédemment, sur le composé **V-13**. Ces tests ont été effectués pour une large gamme de fluences afin de pouvoir déterminer l'énergie nécessaire pour visualiser l'effet de la décarboxylation.

Deux résultats importants ont pu être notés. Le premier est que la transmission de la sonde à travers la solution du β -cétoacide **V-13** est effectivement modifiée, *i.e.* la décarboxylation a lieu *in situ*. Le second est que ce phénomène n'a été observé que pour des fluences supérieures à 400 mJ.cm^{-2} et que le mécanisme de formation des bulles est plus lent que celui résultant du transfert de chaleur des nanotubes au solvant.

Aussi, il est possible que le β -cétoacide **V-13**, mis en mélange avec les nanotubes, puisse se décarboxyler à des fluences plus faibles. En effet, un mélange permet d'utiliser une forte concentration de motifs décarboxylables et de favoriser une proximité avec les nanotubes lors de l'échauffement de ceux-ci par l'impulsion laser.

IV.4.3. Mélange en solution des nanotubes solubles avec le β -cétoacide

Pour réaliser les expériences pompe-sonde nous avons utilisé les nanotubes solubles de référence **V-11** pour constituer le mélange. Le mélange a été réalisé pour une concentration de 200 g/L du β -cétoacide **V-13** avec $4,8 \text{ }\mu\text{g}$ de nanotubes **V-11** pour un volume total de $200 \text{ }\mu\text{L}$.

Que ce soit à faible ou forte fluence nous n'avons pas observé de gain de performances entre la solution "mélange" et les nanotubes **V-11** seuls pour une concentration égale en nanotubes ($T = 82\%$). Une interprétation possible à ces résultats est que le transfert de chaleur des nanotubes vers le β -cétoacide ne permet pas une complète et forte décarboxylation de ce dernier. Par conséquent, le phénomène additionnel de croissance de bulle serait masqué par celui résultant de l'échauffement du solvant *via* les nanotubes.

IV.5. Conclusion

La première approche envisagée pour optimiser les propriétés optiques non linéaires des nanotubes a été de les fonctionnaliser avec des motifs décarboxylables. Notre stratégie reposait sur la formation de bulles de CO₂ en amont de la réponse conventionnelle des nanotubes et en conséquence abaisser le seuil de limitation optique des nanotubes.

Cependant, les tests réalisés n'ont pas indiqué une amélioration des performances des nanotubes. Une concentration trop faible de motifs β -cétoacide à la surface des nanotubes ainsi qu'une énergie trop forte pour observer leur décarboxylation semblent être les principales causes impliquées.

V. Association de nanotubes de carbone avec des fullerènes

Les nanotubes de carbone sont un matériau très efficace en limitation optique du domaine du visible jusque dans le proche infrarouge et pour des impulsions laser relativement longues (de la microseconde à la nanoseconde). Du fait que le temps de croissance des bulles est de l'ordre de la nanoseconde, les nanotubes se révèlent être inefficaces à des régimes subnanoseconde. Il apparaît donc intéressant de coupler des matériaux faisant intervenir des mécanismes physiques différents et complémentaires pour améliorer leurs propriétés individuelles de limitation optique.

Une étude ayant déjà été menée au laboratoire sur l'association de nanotubes avec des A2P nous avons choisi d'utiliser les absorbeurs saturables inverses (ASI). Les matériaux ASI sont des molécules organiques dont les familles les plus efficaces sont celles des phthalocyanines,^{25,26} des porphyrines²⁷ et des fullerènes.^{6,28-30} Bien que la bande spectrale d'efficacité de ces matériaux ne soit pas très large, ils possèdent un large domaine temporel et des seuils de limitation bas. Ainsi, la combinaison de ce type de matériaux avec les nanotubes laisse présager des propriétés de limitation optique efficaces sur une large bande spectrale, pour des impulsions allant du domaine microseconde à subpicoseconde.^{17,18}

Les fullerènes, peu chers et d'une grande pureté, sont devenus les ASI de référence pour les expériences de limitation optique. Nous avons opté pour une association des fullerènes avec les nanotubes.

V.1. Propriétés des fullerènes

Les fullerènes (ou C₆₀) fonctionnent selon un mécanisme d'absorption saturable inverse. Un absorbant saturable inverse est caractérisé par une probabilité plus forte des états excités (S₁ et T₁) d'absorption d'un photon par rapport à l'état fondamental S₀. Ainsi, une impulsion

intense va peupler les niveaux excités, fortement absorbants, qui de ce fait vont limiter l'impulsion laser.

La structure électronique des ASI peut être représentée selon le diagramme simplifié de Jablonski (Figure V-7). La relaxation du niveau excité S_1 vers le fondamental S_0 peut se faire directement de façon radiative ou bien *via* l'état excité T_1 (*intersystem crossing*) mais avec une constante de temps beaucoup plus grande (transition interdite). Le temps de désexcitation peut ainsi varier d'une valeur comprise entre 10 ps et quelques nanosecondes ($S_1 \rightarrow S_0$) jusqu'à quelques dizaines de microsecondes ($T_1 \rightarrow S_0$). Ce mécanisme est donc efficace pour se protéger des lasers impulsionnels picoseconde jusqu'à microseconde.

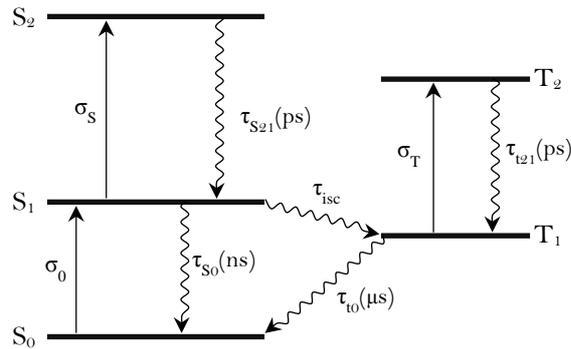


Figure V-7 : Diagramme simplifié de Jablonski des niveaux électroniques d'un ASI

Bien qu'ils ne soient performants que dans le visible, les fullerènes présentent l'avantage de posséder un seuil de limitation peu élevé (typiquement 10 mJ.cm^{-2}). De plus, ils sont performants pour de faibles concentrations. Cependant, les fullerènes sont insolubles dans la plupart des solvants organiques (excepté le toluène), comme les nanotubes, il est donc nécessaire de les fonctionnaliser pour faciliter leur utilisation dans des solvants comme le chloroforme.

Afin d'essayer d'améliorer encore les performances des nanotubes en limitation optique, nous les avons associés de manière covalente avec les fullerènes. L'avantage serait de disposer d'une nanostructure unique, soluble dans le chloroforme et possédant un potentiel intéressant en limitation optique par cumul des réponses des deux limiteurs. De cette combinaison est également attendu un éventuel effet de synergie entre les deux entités par un possible transfert de charge. Les résultats obtenus seront comparés avec ceux des nanotubes de référence en mélange avec des fullerènes solubilisés dans le chloroforme.

V.2. Dérivatisation des nanotubes avec les fullerènes

V.2.1. Synthèse des fullerènes greffables

La structure du dérivé fullerène **V-20** utilisé pour la fonctionnalisation des nanotubes est représentée sur le Schéma V-7. Le fullerène comporte un motif aryldiazonium pour

pouvoir être greffé sur les nanotubes ainsi qu'une longue chaîne alkyle pour conférer une solubilité satisfaisante aussi bien aux fullerènes qu'aux nanotubes. Ce travail a été initié par Thomas Bark au cours d'un stage post-doctoral.

La synthèse a été réalisée en 6 étapes à partir de l'acide *p*-aminophénylacétique **V-14**. Dans un premier temps, l'amine **V-14** a été transformée en l'azoture correspondant **V-15** *via* un intermédiaire diazonium. Pour pouvoir coupler ce motif sur le fullerène, la réaction de Bingel (cyclopropanation) a été utilisée.³¹ Cette réaction nécessite au préalable une bromation en α de l'acide **V-15** réalisée dans les conditions de Wohl-Ziegler. Avant l'étape de couplage, le bromoacide **V-16** a été estérifié en présence de décahexanol. Le précurseur **V-19** du diazonium **V-20** a été préparé en deux étapes par la réaction de Bingel sur les fullerènes puis par réduction du groupement azoture. Cette dernière a été effectuée en présence de *tert*-butylphosphine et par clivage acide de l'intermédiaire phosphine imide. Enfin, la synthèse du diazonium **V-20** a été accomplie en présence de tétrafluoroborate de nitrosonium.

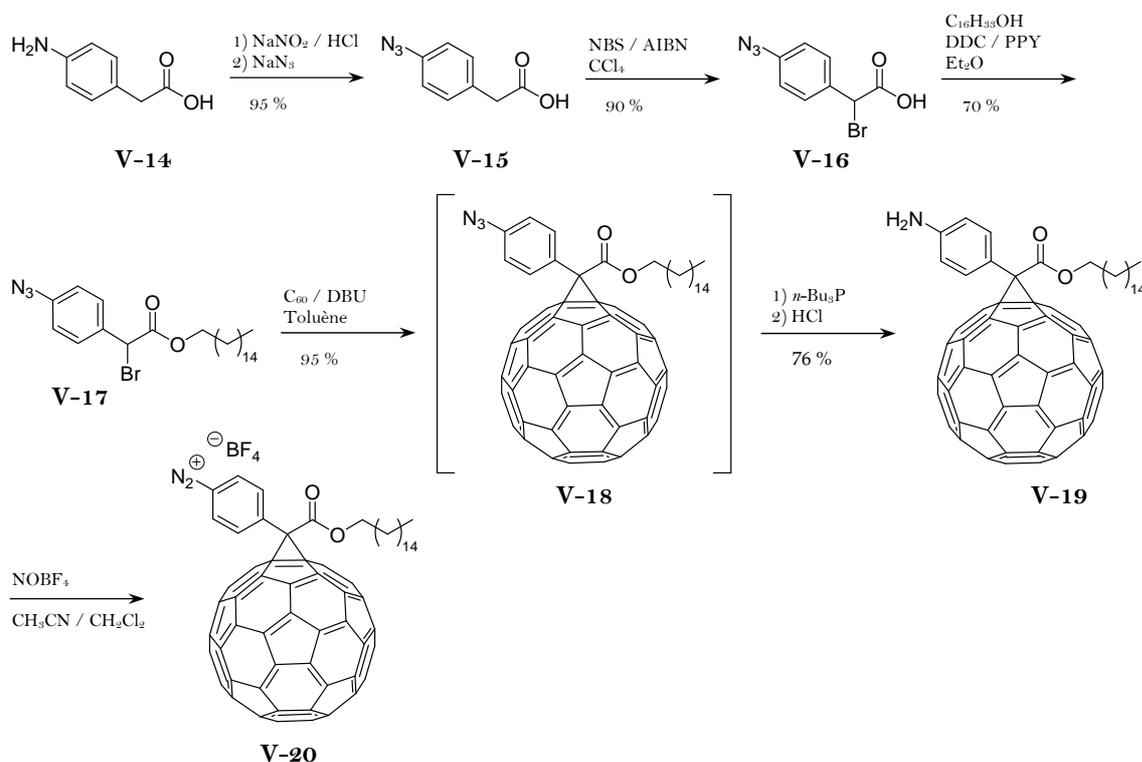
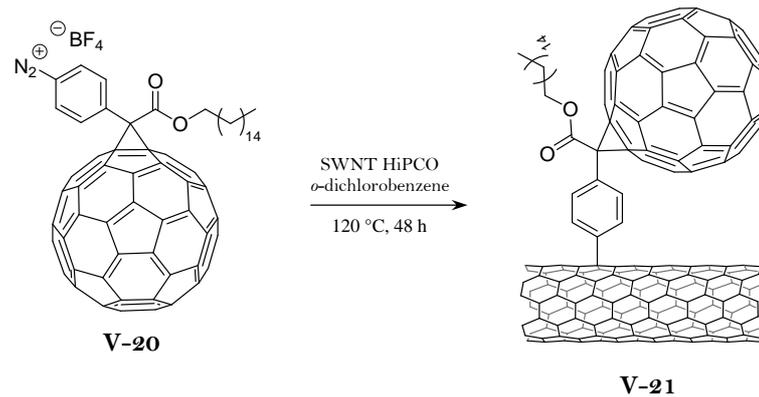


Schéma V-7 : Synthèse du dérivé diazonium-fullerène **V-20** greffable

V.2.2. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone et caractérisation

Le principe de la fonctionnalisation repose sur la méthode développée par Tour. Cependant, le sel de diazonium a été préparé séparément afin de s'assurer de sa stabilité et éviter toute polymérisation. La synthèse de l'hybride NT-Fullerène **V-21** a été réalisée par addition du sel de diazonium **V-20** et chauffage pendant 48h (Schéma V-8).

Schéma V-8 : Fonctionnalisation des nanotubes avec les fullerènes **V-20**

Le caractère covalent de la liaison a été déterminé par spectroscopie de diffusion Raman et UV-Vis-NIR. L'augmentation du rapport I_D/I_G entre les nanotubes natifs et les nanotubes fonctionnalisés est faible et par conséquent peu significative (Figure V-8). Cependant, l'analyse du RBM et de la bande G' montre un déplacement de ces bandes vers les grands nombres d'onde (significatif d'une modification de la surface des nanotubes) qui appuie la l'hypothèse du caractère covalent du greffage. Ces résultats sont confirmés par la disparition des bandes caractéristiques de van Hove des nanotubes natifs en UV-Vis-NIR.

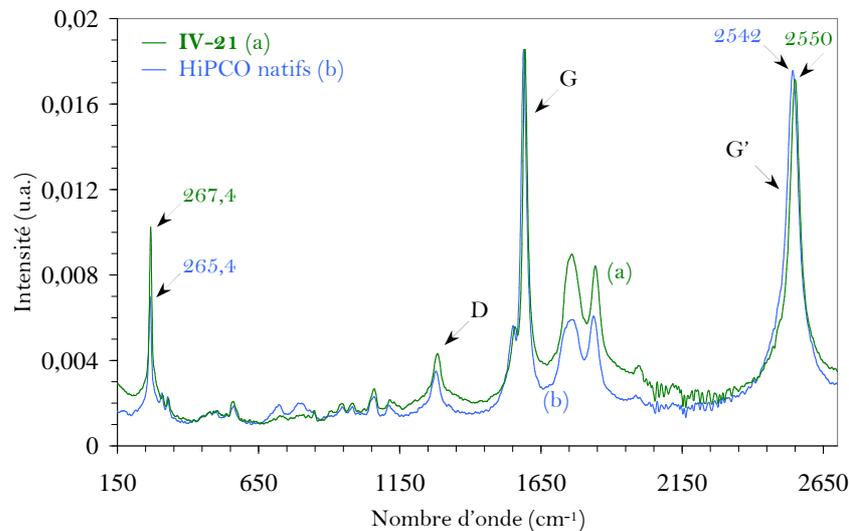
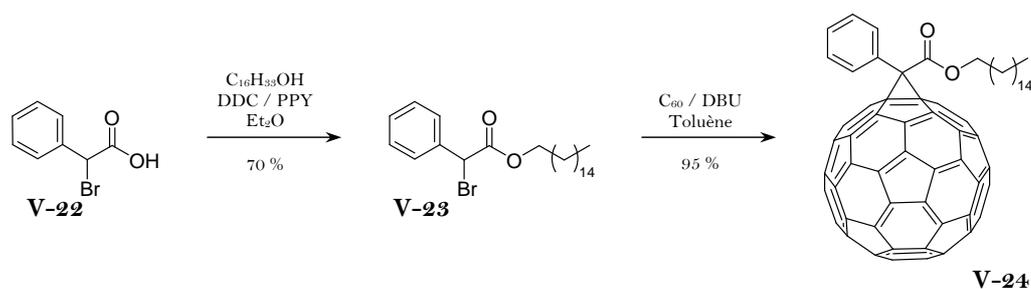


Figure V-8 : Spectres de diffusion Raman des nanotubes fonctionnalisés V-21 (a) et des nanotubes HiPCO natifs (b) dans le DMF

V.3. Limitation optique

Les fullerènes C_{60} natifs n'étant pas solubles dans le chloroforme, nous avons préparé un analogue du fullerène greffable **V-20** afin de pouvoir l'utiliser comme référence lors des mesures de limitation optique. Les fullerènes ont été fonctionnalisés dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment pour la préparation de **V-19**.

Schéma V-9 : Synthèse des fullerènes solubles de référence **V-24**

V.3.1. Nanohydride “nanotube-fullerène”

Les fullerènes sont connus pour avoir un maximum d'efficacité aux alentours de 530 nm, *i.e.* à leur maximum d'absorption. Nous avons donc dans un premier temps effectué les tests de limitation optique à 532 nm, avec des impulsions de 3 ns. Pour réaliser ces tests, nous avons comparé différentes solutions : les nanotubes fonctionnalisés **V-21**, les nanotubes de référence **V-11** seuls ou en mélange avec les fullerènes de référence **V-24** à une concentration de 50 mg.mL⁻¹ et les fullerènes de référence **V-24** seuls. La transmission linéaire des différentes solutions été préalablement ajustée à 70% à la longueur d'onde du laser utilisée.

Ces premiers tests n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une amélioration des performances des nanotubes fonctionnalisés **V-21** aussi bien par rapport aux nanotubes de référence **V-11** seul qu'en mélange avec les fullerènes de référence **V-24**. Nous avons donc “scanné” différentes longueurs d'onde d'excitation en se déplaçant du visible vers l'infrarouge où se situe le maximum d'absorption de l'état triplet du fullerène. Les résultats les plus probants, obtenus à 730 nm, sont présentés sur la Figure V-9.

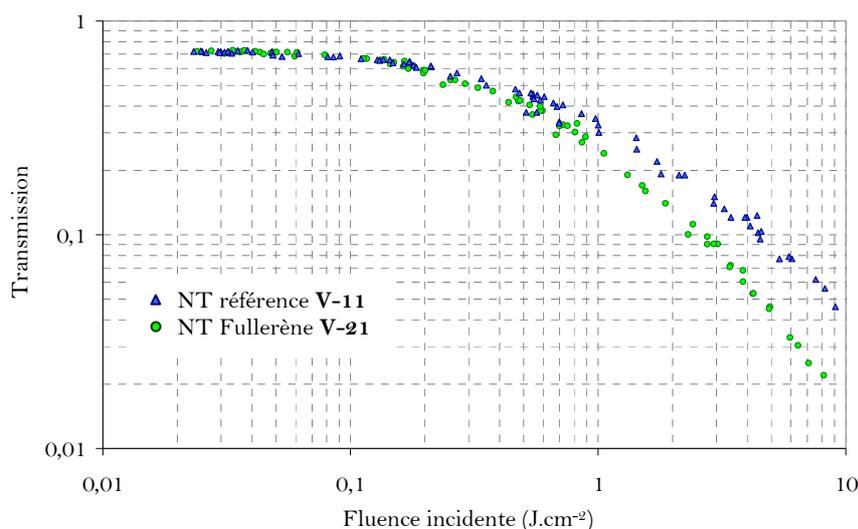


Figure V-9 : Courbes de limitation optique des nanotubes de référence **V-11** (HiPCO-tBu) et des nanotubes fonctionnalisés **V-21** (NT-Fullerène) à 730 nm, avec des impulsions de 3 ns

Les principales caractéristiques de limitation optique sont résumées dans le Tableau V-2. Les performances des nanotubes fonctionnalisés **V-21** sont meilleures aussi bien par rapport au nanotube de référence qu'à la solution "mélange". Le facteur d'atténuation des nanotubes **V-21** a en effet quasiment triplé par rapport aux nanotubes de référence. Quant au seuil d'activation, il reste faible et sensiblement le même que celui des nanotubes de référence.

Echantillon (730 nm, 3 ns)	Seuil de limitation (mJ.cm ⁻²)	Transmission à 10 J.cm ⁻² (%)	Facteur d'atténuation à 10 J.cm ⁻²
NT référence V-11	150	4,2	17,1
NT Fullerène V-21	150	1,5	48

Tableau V-2 : Récapitulatif des propriétés de limitation optique des nanotubes de référence **V-11** (HiPCO-tBu) et des nanotubes fonctionnalisés **V-21** (NT-Fullerène)

L'écart de performances entre les deux types de tubes est visible pour toutes les longueurs d'onde testées entre 640 et 800 nm. Cette amélioration n'est cependant pas due à la seule présence des fullerènes. En effet, si les fullerènes **V-24** sont mis en mélange avec les nanotubes de référence **V-11** solubles alors très peu de différence est observée avec les performances des nanotubes **V-11** seuls. Par conséquent, une interprétation possible de cette amélioration serait un transfert de charge entre le nanotube et le fullerène lorsqu'ils sont liés de manière covalente. Aussi, afin de compléter et de confirmer les mesures de limitation optique nous avons effectué des expériences pompe-sonde en régime picoseconde. En effet, cette technique permet de détecter de manière plus fine la participation des fullerènes pour les performances de limitation des nanotubes **V-21**.

V.4. Expériences pompe-sonde picoseconde

Afin de pouvoir évaluer la contribution des fullerènes sur les performances des nanotubes fonctionnalisés **V-21** en limitation optique, nous avons testé les fullerènes de référence **V-24** que nous avons comparé avec les nanotubes fonctionnalisés **V-21** et les nanotubes de référence **V-11**. La transmission linéaire des différentes solutions a été ajustée à 70% à 532 nm. L'évolution de la transmission de la sonde a été réalisée pour une durée d'impulsion de la pompe de 35 ps à 532 nm avec une fluence incidente de 30 mJ.cm⁻² (Figure V-10).

Dans le cas des nanotubes de référence seuls (Figure V-10, courbe b), la perturbation de la sonde commence avec un retard de quelques centaines de picosecondes qui correspond au temps caractéristique de croissance des bulles diffusantes. Les effets thermiques ne contribuent donc à réduire la transmission de la sonde que bien après le passage de l'impulsion pompe. Par contre, la transmission de la sonde traversant la solution de fullerène

de référence **V-24** (courbe d) est plus rapidement atténuée, la réponse d'un ASI étant quasi-instantanée. Enfin, lorsque la même expérience est menée sur les nanotubes fonctionnalisés **V-21**, nous observons un cumul des deux effets décrits ci-dessus avec une chute de la transmission de la sonde de manière très rapide suivie de la nucléation de bulle de solvant. Nous pouvons également remarquer que la chute de la transmission est totale par rapport aux deux autres solutions

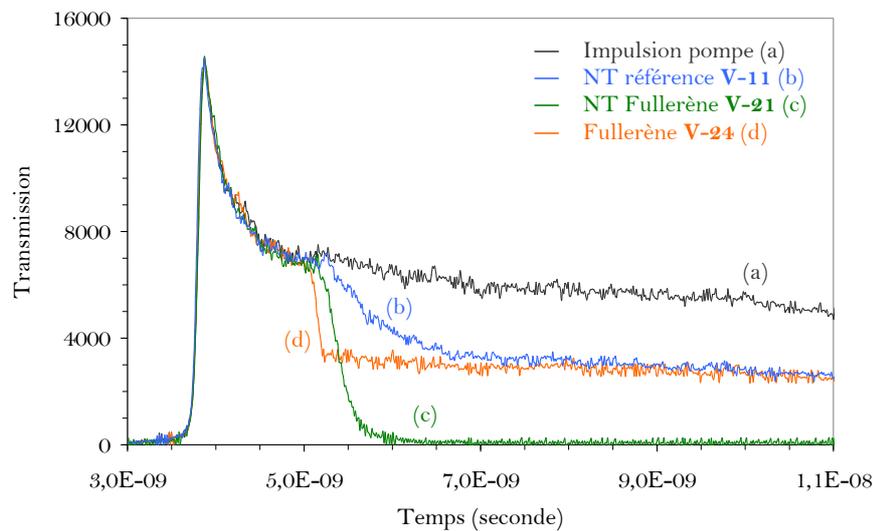


Figure V-10 : Évolution de la transmission de la sonde à une longueur d'onde de 450 nm, suite à une impulsion du faisceau pompe à 532 nm (a) de 35 ps pour une fluence de 30 mJ.cm^{-2} , pour les nanotubes de référence **V-11** (b), pour les nanotubes fonctionnalisés **V-21** (c) et les fullerènes de référence **V-24** (d)

V.5. Conclusion

Les essais de limitation optique réalisés avec les nanotubes fonctionnalisés de manière covalente avec des fullerènes ont permis de mettre en évidence une nette amélioration des performances dans le proche infrarouge. Par comparaison avec une solution contenant des nanotubes et des fullerènes rendu soluble dans le chloroforme nous avons pu également démontrer un effet coopératif dû à la liaison covalente entre les deux entités. Ainsi, le gain observé dans le proche infrarouge pourrait être attribué à un transfert électronique du nanotube vers le fullerène.

VI. Association des nanotubes de carbone avec des nanoparticules d'or

L'utilisation d'agrégats métalliques et plus particulièrement de nanoparticules d'or pour la limitation optique est relativement récente.³²⁻³⁵ Dans le but d'obtenir un effet coopératif entre plusieurs limiteurs optiques, ces dernières ont été associées aussi bien avec

des fullerènes,³⁶ qu'avec des nanotubes.^{37,38} Quels que soient les cas, une amélioration des performances de limitation optique a effectivement été rapportée.

Dans ce contexte, nous avons voulu adapter la technique développée dans le chapitre II sur la déposition de nanoparticules à la surface des nanotubes aux nanoparticules d'or.

VI.1. Propriétés optiques des nanoparticules d'or

Sous certaines conditions, une onde lumineuse incidente sur une nanoparticule d'or peut se coupler avec un mode d'excitation collective des électrons libres du métal. La lumière va alors se propager le long de l'interface entre la particule et le milieu environnant. Cette onde de surface est appelée plasmon par assimilation du gaz d'électrons libres à un plasma. Ce phénomène est résonnant et ce traduit dans le cas de l'or par la présence d'une bande d'absorption centrée vers 530 nm. La position de cette bande varie entre autres en fonction de la taille des nanoparticules.

Le nuage électronique de la nanoparticule, lorsqu'il est excité, va transférer son énergie au solvant environnant et induire sa vaporisation. Ce phénomène, est en partie à l'origine du mécanisme de limitation optique. En effet, ce dernier se décompose en deux temps :

- un mécanisme rapide qui atteint son amplitude maximale en moins d'une nanoseconde pour une fluence relativement élevée et qui provoque la vaporisation des nanoparticules.
- un mécanisme lent qui résulte d'un transfert de chaleur de la particule au solvant avec la création de bulles de vapeur de solvant. Ce mécanisme est le seul observé pour des fluences faibles.

Des études ont montré que l'une des conditions à remplir pour optimiser les propriétés des nanoparticules d'or en limitation optique était de maîtriser leur taille. Il existe en effet une taille optimale des nanoparticules pour diffuser le faisceau.^{33,39} Si le diamètre des nanoparticules est inférieur à 2 nm, alors le mode plasmon disparaît et ne peut donc plus être photoexcité. Pour des tailles relativement petites mais supérieures à 2 nm, seul le mécanisme lent est observé, la dissipation de l'énergie étant alors très efficace. La taille optimale a été estimée pour un diamètre de 25 nm par l'équipe de Gao en 2007.⁴⁵

VI.2. Combinaison de nanotubes MWNTs et de nanoparticules d'or

Les mécanismes de limitation optique des nanotubes et des nanoparticules sont relativement similaires. Les deux reposent sur le principe de diffusion non linéaire du faisceau laser par changement de phase, *i.e.* avec la création de bulles servant de centres diffusants. Quel serait alors l'avantage de les coupler ensemble ? Un rapprochement spatial entre les

deux entités pourrait notamment favoriser un recouvrement et un couplage des modes plasmons respectifs provenant des nanoparticules et des nanotubes. Cela induirait alors une montée en température beaucoup plus rapide des nanoparticules et abaisserait ainsi le seuil de limitation de l'ensemble.

Dans le but de synthétiser ces nanoobjets, nous avons adopté la méthode décrite dans le chapitre II. Nous nous sommes limités pour ces essais aux nanotubes entourés du lipide PCP (II-8) en comparaison avec les nanotubes natifs. Les nanoparticules ont été synthétisées en utilisant la réduction du sel HAuCl_4 par irradiation γ .

VI.2.1. Synthèse et caractérisation des hybrides "nanotube-Au"

Afin de s'adapter à des conditions classiques de réduction de sels d'or, nous avons utilisé une concentration de $4 \cdot 10^{-4}$ M pour une dose d'irradiation de 2 kGy et avec toujours une faible quantité d'isopropanol (0,01 M) pour piéger les radicaux hydroxyle. Les résultats des échantillons testés en limitation optique sont présentés dans le Tableau V-3

Les nanoparticules obtenues sont relativement petites ($\phi < 10$ nm) mais avec une distribution assez large. Nous pouvons observer que le lipide PCP induit une organisation plus homogène et un taux de chargement meilleur que pour les nanotubes natifs. Il est aussi à noter que les nanoparticules déposés sur les nanotubes sont stables dans le temps et ne s'agrègent pas à la surface des nanotubes.

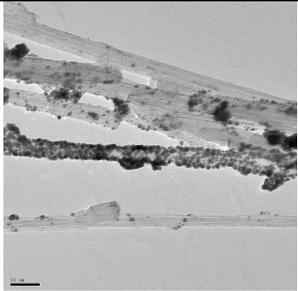
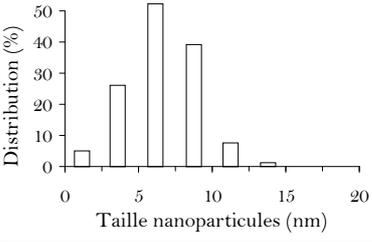
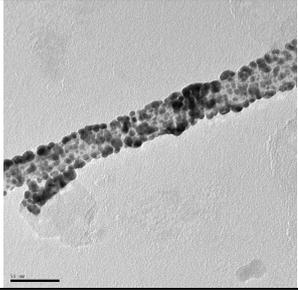
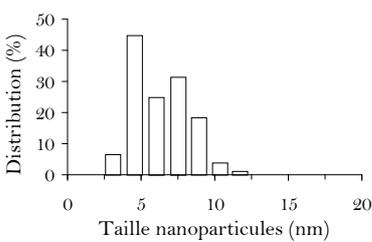
Analyse Echantillon	Image MET	Taille & Distribution (nm)	Recouvrement & Organisation
MWNT Natif + HAuCl_4			Recouvrement faible et pas d'organisation.
MWNT-PCP (II-8) + HAuCl_4			Recouvrement moyen et sans organisation.

Tableau V-3 : Analyse des échantillons avec le sel HAuCl_4 réduit par irradiation γ

Le profil du spectre obtenu par analyse ICP-MS des deux échantillons de nanotubes correspond bien à celui attendu pour des nanoparticules d'or (Figure V-11).

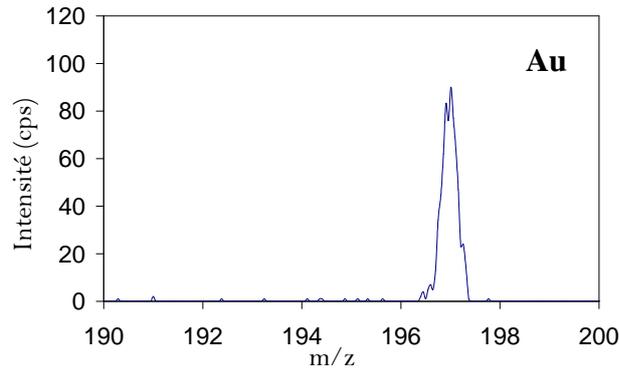


Figure V-11 : Spectre ICP-MS des MWNTs natifs en présence de nanoparticules d'or

VI.2.2. Caractérisation par absorption UV-Visible

Le spectre d'absorption UV-Vis des hybrides "NT-Au" en solution nous permet de visualiser de la présence de nanoparticules d'or. En effet, la résonance plasmonique de surface des nanoparticules d'or est caractérisée par la présence d'une bande d'absorption située vers 570 nm (Figure V-12, courbe a). Normalement cette dernière devrait se situer vers 530 nm (courbe b) pour des nanoparticules seules en solution et ayant un diamètre équivalent. Le changement de comportement montre qu'il y a interaction entre les nanotubes et les nanoparticules.

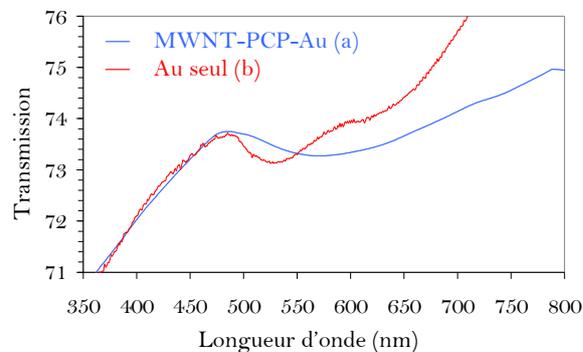


Figure V-12 : Spectres UV-Vis des nanotubes MWNT-PCP-Au (a) et des nanoparticules d'or seules (b)

VI.3. Limitation optique

Les courbes de limitation optique ont été réalisées à différentes longueurs d'onde comprises entre 532 et 790 nm. Dans un souci de clarté nous ne montrerons que les résultats obtenus à 590 nm avec des impulsions de 3 ns (Figure V-13). Les principales caractéristiques de limitation optique sont résumées dans le Tableau V-4.

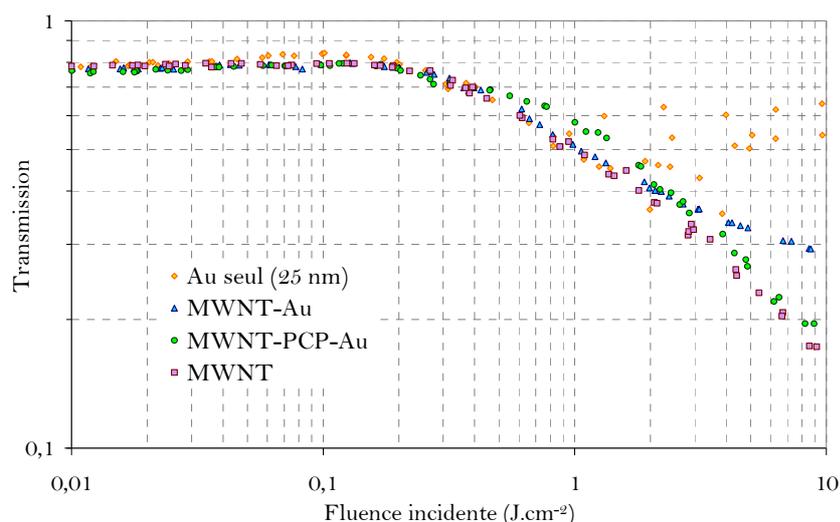


Figure V-13 : Courbes de limitation optique des nanotubes MWNT, des nanotubes fonctionnalisés MWNT-PCP-Au, des nanotubes MWNT-Au et de l'or seul à 590 nm, avec des impulsions de 3 ns

Echantillon (590 nm, 3 ns)	Seuil de limitation (mJ.cm ⁻²)	Transmission à 10 J.cm ⁻² (%)	Facteur d'atténuation à 10 J.cm ⁻²
MWNT	200	16	5
Au seul	200	nd	nd
MWNT-PCP-Au	200	16	5
MWNT-Au	200	28	2,9

Tableau V-4 : Récapitulatif des propriétés de limitation optique des échantillons testés

Lors des essais, nous avons remarqué que l'or seul était plus performant vers 590 nm. Cela s'explique du fait que l'échantillon était composé de deux populations de nanoparticules. L'une avec des particules de petites tailles correspondant à la bande UV à 530 nm (Figure V-12, courbe b) et l'autre avec des particules plus grosses correspondant à l'épaule centré vers 600 nm (courbe b). Or, étant donné que les grosses particules limitent plus que les petites, l'effet de limitation optique est donc plus accentué à la longueur d'onde permettant de les exciter.

De manière générale, les nanotubes natifs ont les mêmes performances que lorsqu'ils sont recouverts d'or. En effet, les seuils d'activation sont proches et les facteurs d'atténuation du même ordre de grandeur. Il n'y a donc pas d'effet cumulatif ou coopératif entre l'or et les nanotubes (Figure V-13). Dans le cas des nanotubes MWNT-PCP-Au, ils ne sont aussi efficace que les nanotubes natifs qu'aux alentours de 600 nm. Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que le lipide, en plus de jouer un rôle d'isolant, va apporter une masse morte à l'échantillon. Cela est compensé par les nanoparticules d'or à 590 nm qui sont au maximum de leur efficacité.

VII. Conclusion

Les nanotubes de carbone font partie des matériaux les plus performants pour des applications en limitation optique. Cependant, face à une probabilité grandissante d'agression laser il est toujours important d'optimiser les différents systèmes existants pour les rendre plus performants. Pour les nanotubes, une optimisation récurrente vise à les solubiliser dans des solvants de bas point d'ébullition.

La première approche que nous avons abordée est basée sur le principe de limitation optique des nanotubes. Les mécanismes mis en jeu pour diffuser le faisceau laser reposent sur la formation de bulles de vapeur. Nous avons donc voulu greffer sur le nanotube une entité capable de se décarboxyler sous irradiation lumineuse et de solubiliser les nanotubes. Si la formation de bulles de CO_2 est suffisamment précoce cela pourrait permettre de diminuer le seuil d'activation des nanotubes. Néanmoins, les résultats n'ont pas permis de mettre en évidence une amélioration significative des performances de limitation des nanotubes.

Une autre voie d'optimisation repose sur l'association des nanotubes avec un limiteur optique complémentaire. Cela permet d'étendre le domaine de performances temporel et/ou spectral des nanotubes. Dans cette optique nous avons choisi de greffer de manière covalente sur les nanotubes un fullerène. Les résultats observés ont mis en avant une synergie des deux espèces lorsque l'ensemble était irradié dans le rouge avec une augmentation significative du facteur d'atténuation. Nous avons également montré que cet effet coopératif était dû au greffage covalent et donc à une proximité entre le nanotube et le fullerène.

Enfin, en gardant la stratégie d'association de deux limiteurs optiques, nous avons utilisé la méthode développée de déposition de nanoparticules pour absorber de l'or à la surface des nanotubes. Le recouvrement des modes plasmons des nanoparticules et des nanotubes aurait pu permettre d'abaisser le seuil d'activation par une réponse plus rapide. Cependant, les performances observées ne se sont pas révélées meilleures que celles des nanotubes seuls.

VIII. Bibliographie

- ¹ Ménard-Moyon, C. *Nanotubes de carbone: Applications à la limitation optique, la nanoélectronique et développement de nouvelles méthodes de fonctionnalisation*, Thèse de Doctorat, Université Paris XI, **2005**.
- ² Vivien, L. *Etude des propriétés optiques non linéaires des nanotubes de carbone pour la limitation optique*, Thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique, **2001**.
- ³ Izard, N. *Nanotubes de carbone: Systèmes pour la limitation optique*, Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, **2004**.
- ⁴ Sun, X.; Yu, R. Q.; Xu, G. Q.; Hor, T. S. A.; Ji, W. *Appl. Phys. Lett.* **1998**, *73*, 3632.
- ⁵ Mansour, K.; Soileau, M. J.; van Stryland, E. W. *J. Optic. Soc. Am. B* **1992**, *9*, 1100.
- ⁶ Tutt, L. W.; Kost, A. *Nature* **1992**, *356*, 225.
- ⁷ Vivien, L.; Riehl, D.; Hache, F.; Anglaret, E. *Physica B* **2002**, *323*, 233.
- ⁸ Vivien, L.; Riehl, D.; Delouis, J.-F.; Delaire, J. A.; Hache, F.; Anglaret, E. *J. Optic. Soc. Am. B* **2002**, *19*, 208.
- ⁹ Vivien, L.; Lancon, P.; Riehl, D.; Hache, F.; Anglaret, E. *Carbon* **2002**, *40*, 1789.
- ¹⁰ Riehl, D.; Fougéanet, F. *Nonlinear Opt.* **1999**, *21*, 435.
- ¹¹ James, D. B.; McEwan, K. J. *Nonlinear Opt.* **1999**, *21*, 377.
- ¹² Liu, L.; Zhang, S.; Qin, Y.; Guo, Z. X.; Ye, C.; Zhu, D. *Synthetic metals* **2003**, *135-136*, 853.
- ¹³ Riggs, J. E.; Walker, D. B.; Carroll, D. L.; Sun, Y. P. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 7071.
- ¹⁴ Wu, W.; Zhang, S.; Li, Y.; Li, J.; Liu, L.; Qin, Y.; Guo, Z. X.; Dai, L.; Ye, C.; Zhu, D. *Macromolecules* **2003**, *36*, 6286.
- ¹⁵ Izard, N.; Ménard, C.; Riehl, D.; Doris, E.; Mioskowski, C.; Anglaret, E. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *391*, 124.
- ¹⁶ Riehl, D.; Izard, N.; Vivien, L.; Anglaret, E.; Doris, E.; Ménard, C.; Mioskowski, C.; Porres, L.; Mongin, O.; Charlot, M.; Blanchard-Desce, M.; Anemian, R.; Mulatier, J.-C.; Barsu, C.; Andraud, C. *Proc. SPIE* **2003**, *5211*, 124.
- ¹⁷ NiMhuircheartaigh, E. M.; Giordani, S.; Blau, W. J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 23136.
- ¹⁸ Guo, Z.; Du, F.; Ren, D.; Chen, Y.; Zheng, J.; Liu, Z.; Tian, J. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3021.
- ¹⁹ McEwan, K. J.; Madden, P. A. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 8748.
- ²⁰ Barton, D. H. R.; Crich, D.; Motherwell, W. B. *Tetrahedron* **1985**, *41*, 3901.
- ²¹ Arnold, R. T.; Elmer, O. C.; Dodson, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1950**, *72*, 4359.
- ²² Bach, R. D.; Canepa, C. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 6346.
- ²³ Huang, C. L.; Wu, C. C.; Lien, M. H. *J. Phys. Chem. A* **1997**, *101*, 7867.
- ²⁴ Padgett, C. W.; Brenner, D. W. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 1051.
- ²⁵ Yu, J. J.; Wang, L. M.; Wang, Q.; Ng, M.; Yu, L. P. *Nonlinear Opt. Phys. Mater.* **2000**, *9*, 289.
- ²⁶ Coulter, D. R.; Miskowski, V. M.; Perry, J.; Wei, T. H.; Stryland, E. W. V.; Hagan, D. J. *Proc. SPIE* **1989**, *1105*, 42.
- ²⁷ Sun, W.; Byeon, C. C.; Lawson, C. M.; Gray, G. M.; Wang, D. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, *77*, 1759.
- ²⁸ Sun, Y. P.; Riggs, J. E.; Liu, B. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 1268.
- ²⁹ Sun, Y. P.; Lawson, G. E.; Riggs, J. E.; Ma, B.; Wang, N.; Moton, D. K. *J. Phys. Chem. A* **1998**, *102*, 5520.
- ³⁰ Riggs, J. E.; Sun, Y. P. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 485.
- ³¹ Bingel, C. *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 1957.
- ³² François, L. *Mécanisme de la limitation optique des agrégats métalliques synthétisés par voie radiolytique*, Thèse de Doctorat, Université Paris XI, **2000**.
- ³³ François, L.; Mostafavi, M.; Belloni, J.; Delouis, J. F.; Delaire, J.; Feneyrou, P. *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 6133.
- ³⁴ Nashold, K. M.; Sher, A.; Sharpless, R. L.; Walter, D. P. *Nonlinear Opt.* **2001**, *27*, 101.
- ³⁵ Philip, R.; Majumdar, S.; Ramachandran, H.; Sandhyarani, N.; Pradeep, T. *Nonlinear Opt.* **2001**, *27*, 357.
- ³⁶ Qu, S.; Du, C.; Song, Y.; Wang, Y.; Gao, Y.; Liu, S.; Li, Y.; Zhu, D. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *356*, 403.
- ³⁷ Chin, K. C.; Gohel, A.; Chen, W. Z.; Elim, H. I.; Ji, W.; Chong, G. L.; Sow, C. H.; Wee, A. T. S. *Chem. Phys. Lett.* **2005**, *409*, 85.
- ³⁸ Zhang, Y.; Zhang, Y.; Yuan, P.; Sun, X.; Xu, J.; Zhu, J. *Chinese Opt. Lett.* **2005**, *3*, 292.
- ³⁹ Gao, Y.; Chang, Q.; Ye, H.; Jiao, W.; Li, Y.; Wang, Y.; Song, Y.; Zhu, D. *Chem. Phys.* **2007**, *336*, 99.

CHAPITRE VI

Nanotubes de carbone et aptamères pour le ciblage de cellules tumorales

I. Introduction

Les nanotubes de carbone sont de plus en plus exploitées pour des applications biomédicales dans les domaines de la vectorisation, des senseurs biochimiques ou comme marqueurs cellulaires et agents de contraste pour l'imagerie diagnostique. Dans ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'utilisation des nanotubes de carbone comme outil pour le ciblage de cellules tumorales. Cette approche ouvre également la voie à l'imagerie moléculaire ainsi qu'à la vectorisation de médicaments.

Pour ce faire, nous avons associé les nanotubes avec une classe émergente d'outils thérapeutique et diagnostique : les aptamères. Le complexe résultant a ensuite été testé *in vitro* en présence de cellules tumorales. Un des intérêts dû à l'utilisation des nanotubes repose sur le fait qu'il est possible de greffer plusieurs entités sur leur surface et qu'ils puissent être utilisés comme support pour de la multiprésentation.

L'aptamère utilisé a été découvert par l'équipe de Frédéric Ducongé et Bertrand Tavitian du Laboratoire d'Imagerie Moléculaire Expérimentale (LIME) du CEA à Orsay et les tests cellulaires ont été effectués en collaboration avec Carine Pestourie du même service.

II. Généralités sur les aptamères

Les acides nucléiques, outre leur rôle de stockage et de transfert de l'information génétique, sont impliqués dans de nombreux processus de régulation au sein de la cellule. Une de leurs fonctions est basée sur leur capacité à former des structures tridimensionnelles capables de s'associer et d'interagir avec une grande diversité de cibles.

Les ARN (Acides Ribonucléique) sont caractérisés par leur capacité à former de nombreuses structures principalement par des liaisons hydrogène. Cette diversité leur permet également d'interagir spécifiquement à la manière d'un anticorps avec un grand nombre de cibles comme les protéines.¹ Néanmoins, il est impossible de prédire les structures tridimensionnelles à partir de l'enchaînement primaire en acides nucléique et donc les propriétés qui en découlent. Cependant, des stratégies de synthèse combinatoire peuvent permettre de sélectionner des structures d'acides nucléiques selon un critère donné.

Pour ce faire, une méthode a été développée en 1990 par plusieurs laboratoires en associant la synthèse aléatoire d'oligonucléotides, suivie d'une sélection et d'une amplification *in vitro*.²⁻⁹ Différents noms ont été attribués à ce principe de sélection : génétique *in vitro*,⁵ SELEX (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*)⁴ et évolution moléculaire dirigée.¹⁰ Les séquences issues de ce processus de sélection d'acides nucléiques ont été baptisées aptamères par Ellington et Szostak.² Cette dénomination provient du latin "*aptus*" signifiant "être apte à".

II.1. Principe général de la sélection d'aptamères

Le principe général de la technique de sélection-évolution *in vitro* d'acides nucléiques a été décrit à de très nombreuses reprises.¹¹⁻¹³ Il repose toujours sur le même principe (Schéma VI-1).

Une population d'oligonucléotides dénommés "candidats", est obtenue par synthèse combinatoire et comprend une séquence aléatoire obtenue en se plaçant dans des conditions qui permettent d'introduire, avec la même probabilité, une adénine, une thymine, une guanine ou une cytosine à chaque position. Ainsi, pour une séquence de n nucléotides, il y a donc 4^n oligonucléotides possibles. Cette séquence aléatoire est encadrée par deux séquences constantes indispensables aux différentes étapes enzymatiques faisant partie intégrante du processus de sélection.

Cette population aléatoire (généralement $10^{13} - 10^{15}$ séquences différentes) est ensuite incubée avec la cible désirée (étape 1). Les séquences répondant aux critères de sélection (affinité pour la cible choisie, activité catalytique,...) sont conservées tandis que les autres sont éliminées (étape 2). Les candidats répondant au crible de sélection sont séparés des autres (étape 3), puis amplifiés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - étape 4 - pour servir à un nouveau cycle de sélection. La plupart des polymérase bactériennes utilisées lors de l'étape d'amplification sont connues pour engendrer naturellement un fort taux de mutations. Celles-ci permettent d'introduire de la diversité dans les aptamères sélectionnés et peuvent permettre de créer de meilleurs aptamères qui n'étaient pas présents dans la banque d'origine.

Les tours successifs de sélection sont soumis à une pression de plus en plus forte représentée aussi bien par des conditions de lavage plus drastiques^{14,15}, que par une diminution du temps d'incubation¹⁰ ou par la concentration en candidats et/ou en cible.^{12,16,17} Au cours des différents cycles réalisés, la population évolue vers les séquences qui résistent le mieux à la pression de sélection et la séquence la plus adaptée - l'aptamère - peut ainsi être isolée (étape 5).

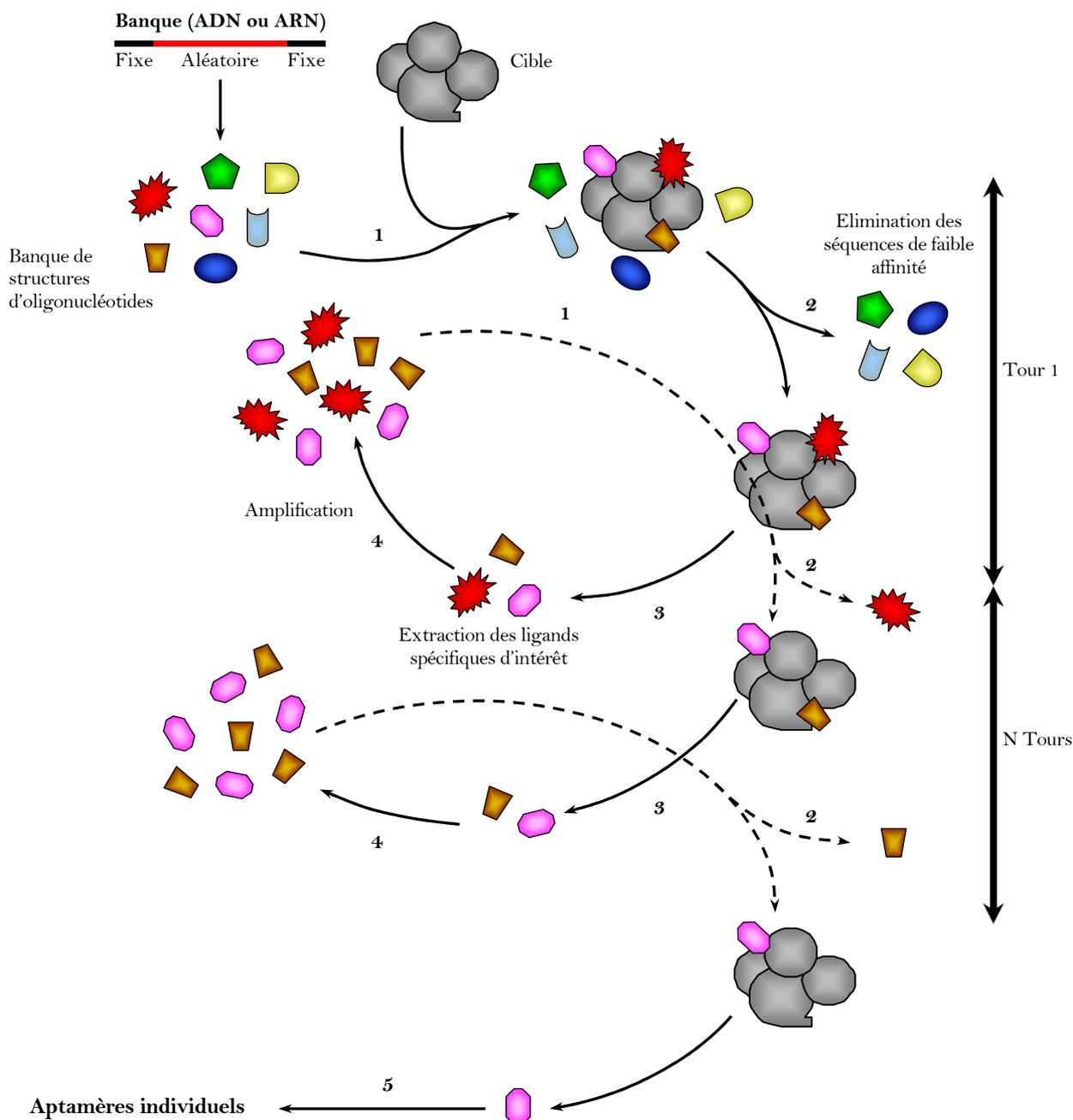


Schéma VI-1 : Principe général de la sélection d'aptamères par Evolution Systématique de Ligands par amplification EXponentielle (SELEX).

II.2. Principaux avantages des aptamères

Ces propriétés particulières d'association des aptamères à leurs cibles font de ces molécules des agents thérapeutiques capables de rivaliser avec les anticorps, voire même de les surpasser pour certaines applications (Tableau VI-1).

Comme les anticorps, ils adoptent des structures tridimensionnelles leur permettant de s'associer à leurs cibles. Cependant, dans le cas des aptamères, cette association semble beaucoup plus spécifique. En effet, certains aptamères sont capables de spécificité vis-à-vis de

molécules de structures très proches. Autre avantage non négligeable dont disposent les aptamères, ils ne sont pas immunogènes même à des doses 1000 fois supérieures aux doses thérapeutiques.^{18,19} L'ensemble de ces propriétés font des aptamères des candidats de choix tant pour des applications diagnostiques que thérapeutiques.²⁰⁻²³

	Aptamères	Anticorps
Affinité	De l'ordre de la centaine de nM au pM	De l'ordre de la centaine de nM au pM
Processus de sélection	Réalisé <i>in vitro</i>	Nécessite un système biologique
Cibles possibles	Toutes	Difficulté d'obtenir des anticorps dirigés contre des toxines (non tolérés par les animaux) ou contre des cibles non immunogéniques
Condition de sélection	Fixées par l'expérimentateur selon l'application envisagée	Limité aux conditions physiologiques
Activité	Pas de variabilité entre différents lots du fait de la synthèse chimique	Variation d'activité entre deux lots
Propriétés pharmacocinétiques	Modifiées à la demande	Difficiles à modifier
Modifications chimiques possibles	Grande variété	Limité
Stabilité thermique	Changement de conformation réversible au retour à la température optimale	Molécules sensibles aux variations de températures, dénaturation
Temps de stockage	Illimité	Limité
Immunogénicité	Non démontrée	Significative
Méthode d'inhibition d'activité	Possibilité de développer des antidotes spécifiques de chaque aptamère	Aucune

Tableau VI-1 : Propriétés comparées des aptamères et des anticorps²³

II.3. Aptamère dirigé contre la protéine Ret

La protéine Ret est un récepteur membranaire tyrosine kinase (RTK). Ces récepteurs sont impliqués dans les voies de signalisation cellulaire qui gouvernent de nombreux processus fondamentaux comme la prolifération, la migration, le métabolisme, la différenciation, la survie et la communication entre cellules. De fait, l'activité des RTK est fortement contrôlée *via* l'interaction avec de nombreux ligands (facteurs de croissance, hormones). Toutefois, des mutations ou des altérations d'expression de ces récepteurs peuvent entraîner des activations anormales et transformer ces protéines en puissants facteurs d'oncogenèse. De telles altérations ont été retrouvées dans la majeure partie des cancers et les RTK ou leurs ligands sont donc des cibles très attrayantes.²⁴

Jusqu'ici, les sélections d'aptamères ont principalement été réalisées *in vitro* contre une seule cible purifiée. Cependant, certaines protéines, notamment les protéines membranaires, ont des structures natives difficiles à conserver hors de leur environnement cellulaire naturel. Par exemple, les modifications post-traductionnelles ou les interactions avec d'autres protéines sont difficile à reproduire *in vitro*. Pour pallier ce problème, l'équipe de Bertrand Tavitian et Frédéric Ducongé (CEA/LIME) a développé une méthode combinant plusieurs stratégies de Selex™, comprenant notamment des étapes de sélection sur cellules vivantes pour isoler des aptamères dirigés contre le marqueur tumoral Ret.²⁵⁻²⁸

Parmi tous les aptamères qui ont été identifiés, un aptamère (dénommé D4) a été jugé particulièrement intéressant. Celui-ci, composé de 98 nucléotides, interagit fortement avec Ret ($K_d = 30$ nM) et peut donc être utilisé pour le diagnostic de cancers par imagerie moléculaire. Dans l'optique d'une transposition *in vivo* cet aptamère a déjà été modifié chimiquement pour augmenter, entre autre, sa résistance vis-à-vis des nucléases responsables de la dégradation des acides nucléiques naturels. En effet, contrairement aux anticorps, les aptamères sont de petites macromolécules qui peuvent être facilement modifiées chimiquement.

Cependant, cette petite taille induit un faible temps de rétention sanguine de l'aptamère ainsi qu'une concentration locale diluée au niveau des cellules. Ces conditions ne sont pas idéales du point de vue pharmacocinétique. Un des moyens d'y remédier serait de greffer plusieurs aptamères sur un même "objet" non immunogène. Cela reviendrait à multimériser l'aptamère et ainsi augmenter sa concentration locale et son temps de rétention.

III. Stratégie adoptée

L'une des stratégies déjà abordée pour augmenter la taille de l'aptamère est de le coupler avec du polyéthylène glycol (PEG). Le PEG est un polymère neutre qui est connu pour augmenter la stabilité des oligonucléotides et peut ainsi améliorer les propriétés pharmacocinétiques de l'aptamère. Une autre solution innovante pour cette application repose sur l'utilisation de nanotubes de carbone.

En effet, les nanotubes présentent l'avantage de ne pas être immunogène et par conséquent de pouvoir être utilisés pour des applications *in vivo*.²⁹ Les nanotubes de carbone ont ainsi été utilisés aussi bien pour la vectorisation de xénobiotiques,²⁹⁻³⁶ de gènes³⁷⁻⁴⁰ que de peptides.⁴¹ Ils se sont également révélés efficaces pour le ciblage de cellules tumorales. Trois approches ont été récemment décrites dans ce dernier cas :

- L'équipe de Dai a fonctionnalisé des SWNTs avec un phospholipide comportant un motif PEG ainsi que de l'acide folique. L'ensemble, marqué par

un motif fluorescent, est capable de cibler les récepteurs folate surexprimés à la surface de cellules cancéreuses.⁴²

- La même équipe a aussi fonctionnalisé des SWNTs par une chaîne polyéthylène glycol couplé avec un peptide RGD (Arginine – Glycine - Acide Aspartique) capable de cibler des protéines réceptrices transmembranaires (les intégrines) présentes également à la surface de certaines cellules tumorales.⁴³
- L'équipe de Scheinberg a, quant à elle, greffé de manière covalente un anticorps monoclonal (le rituximab) utilisé dans le traitement de certains lymphomes.⁴⁴

Dans les deux dernier cas, la détection a été effectuée par l'utilisation d'un radiomarqueur, le ⁶⁴Cu dans le premier cas et le ¹¹¹In dans le deuxième.

Enfin, deux équipes ont décrit l'élaboration de biosenseurs à base de nanotubes de carbone et d'aptamères. D'une part pour la reconnaissance de la thrombine⁴⁵ et d'autre part, pour la détection de l'immunoglobuline E.⁴⁶ Il a ainsi été démontré que, même greffé sur les nanotubes, l'aptamère gardait une forme fonctionnelle pour détecter une protéine cible.

Le procédé mis en œuvre pour notre étude repose donc sur la fonctionnalisation de nanotubes de carbone par des aptamères *via* une molécule bifonctionnelle. Les aptamères pouvant être facilement modifiés par voie chimique, une fonction thiol a été rajoutée pour interagir avec la molécule bifonctionnelle.

Pour mener une étude préliminaire nous avons utilisé une séquence plus courte de l'aptamère D4 (plus facile à synthétiser) possédant 36 nucléotides (D4-36SH). Cette séquence a été sélectionnée pour garder le domaine responsable de l'interaction envers la cible. La stratégie mise en place pour estimer l'affinité et la spécificité de l'aptamère réduit repose principalement sur deux pré-requis :

- la comparaison entre l'aptamère D4-36SH et un aptamère de contrôle non spécifique des récepteurs Ret, nommé DSA-36SH, synthétisé avec les mêmes nucléotides que le D4-36SH mais dans un ordre aléatoire.
- le marquage au ³²P des aptamères pour permettre une quantification par comptage par scintillation (cristal solide) des radiations Cérenkov produit par les particules β du ³²P.

IV. Association d'aptamères et de nanotubes de carbone

La stratégie adoptée pour greffer les aptamères (D4-36SH et DSA-36SH) sur la surface des nanotubes repose sur l'utilisation d'une molécule bifonctionnelle constituée d'une

part, d'un groupement pouvant être couplé avec un aptamère et d'autre part, d'un motif polyaromatique capable de se π -stacker sur la surface des nanotubes de carbone.

IV.1. Dérivatisation de nanotubes de carbone MWNTs

IV.1.1. Synthèse d'une molécule bifonctionnelle

L'étude menée a été effectuée avec des aptamères modifiés chimiquement et portant une fonction thiol. Nous avons donc conçu une molécule avec un groupement maléïmide connu pour se coupler facilement avec des fonctions thiol libre ainsi qu'un motif pyrène pour interagir avec la surface des nanotubes. La molécule désirée **VI-3** a été synthétisée en deux étapes à partir de l'acide pyrènebutyrique **VI-1**.

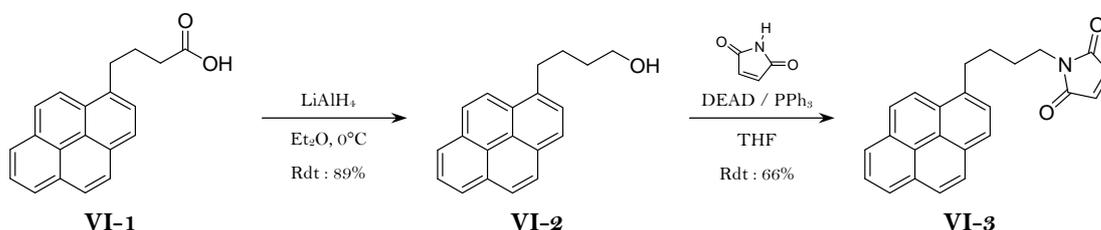


Schéma VI-2 : Synthèse d'un dérivé pyrène maléïmide **VI-3**

Dans un premier temps, l'acide pyrènebutyrique **VI-1** a été réduit en alcool correspondant **VI-2** en présence d'hydrure de lithium aluminium avec un rendement de 89%. Ensuite, l'alcool a été substitué par un motif maléïmide dans les conditions de la réaction de Mitsunobu pour donner le produit **VI-3** avec un rendement de 66% sous forme de cristaux jaune.

IV.1.2. Fonctionnalisation des nanotubes MWNTs

La méthode de fonctionnalisation des nanotubes de carbone MWNTs repose sur l'adsorption par π -stacking de composés polyaromatique. Le contrôle du greffage et du taux de recouvrement a été effectuée par analyse du surnageant d'un mélange de nanotubes et de dérivé pyrène par spectroscopie d'absorption UV-Vis (*cf* partie III.1.4. du chapitre III).

Les nanotubes étant utilisés *in fine* en milieu physiologique il est nécessaire de conférer aux nanotubes une relative solubilité aqueuse. Pour ce faire, nous avons co-adsorbé avec le dérivé pyrène **VI-3**, l'acide pyrènebutyrique **VI-1** en utilisant un mélange équimolaire des deux composés.

Pour déterminer la quantité de motif maléïmide disponible à la surface des nanotubes, nous avons supposé que les dérivés pyrène (**VI-1** et **VI-3**) se fixaient par π -stacking avec un taux de chargement similaire. Ainsi, l'analyse spectroscopique du surnageant a permis de

déterminer une concentration de 9,15 nmol de fonction maléimide par milligramme de nanotube. Ces nanotubes ont ensuite été utilisés pour greffer les aptamères à leur surface.

IV.2. Couplage d'aptamères aux nanotubes fonctionnalisés

Le procédé mis en œuvre pour coupler de manière covalente les aptamères (D4-36SH ou DSA-36SH) aux nanotubes est basé sur une addition 1,4 de type Michaël de la fonction thiol sur le maléimide. Les hybrides "nanotube-aptamère" sont obtenus en faisant réagir 1 nmol d'aptamère (dans 60 μL de tampon SSC (*Saline Sodium Citrate*)) pour 2 nmol de maléimide ($\sim 200 \mu\text{g}$ de nanotube dans 10 μL de DMSO) pendant 1 nuit à 60°C.

Les nanotubes ont été purifiés en utilisant un système de filtration par centrifugation (centricon YM30). La quantité d'aptamères restante sur les nanotubes a été dosée par comptage par scintillation (cristal liquide) des radiations Cérenkov produit par les particules β du ^{32}P .

Ainsi, pour les nanotubes fonctionnalisés avec l'aptamère D4-36SH, une quantité de 1 pmol d'aptamère pour 4,7 pmol de maléimide a été récupérée. Pour les nanotubes de référence fonctionnalisés avec l'aptamère DSA-36SH, une quantité de 1 pmol d'aptamère pour 3,8 pmol de maléimide a été obtenue.

V. Résultats

Pour effectuer les essais de "binding" nous avons utilisé des cellules de phéochromocytome exprimant une forme mutée du récepteur Ret (PC12NEM2A). Cette mutation est responsable de l'apparition de néoplasies endocriniennes multiples de type II (forme héréditaire du cancer médullaire de la thyroïde) chez les patients atteints.

Dans un premier temps, les cellules sont incubées avec une gamme de concentration croissante de nanotubes fonctionnalisés par la séquence réduite D4-36SH. Après 20 minutes d'incubation, les cellules sont lavées 5 fois par une solution tampon puis une lyse cellulaire est effectuée avant qu'un comptage en Cérenkov ne soit réalisé. A partir de l'activité détectée il est ainsi possible de déterminer la quantité d'aptamère retenue sur les cellules ainsi que par microgramme de protéines en effectuant un test colorimétrique BCA^a (Figure VI-1, courbe a). Nous pouvons remarquer que, plus la concentration initiale de nanotubes fonctionnalisés, et donc d'aptamère, est grande, plus la quantité d'aptamère retenue sur les cellules est élevée. Il y a donc bien une reconnaissance du complexe MWNT-D4-36 par les cellules.

^a Le test BCA (*Bicinchoninic Acid*) repose sur deux réactions. La réduction d'ions Cu^{2+} en Cu^+ par les liaisons peptidiques. La quantité de Cu^+ formée est proportionnelle à la quantité de protéines présentes en solution. Enfin, deux molécules d'acide bicinchoninique chélate un ion Cu^+ pour former un complexe fortement absorbant à 562 nm.

Nous avons voulu par la suite contrôler la spécificité du *binding* de ce complexe pour ces cellules. Pour ce faire, nous avons effectué la même expérience mais avec les nanotubes fonctionnalisés par la séquence contrôle non affine DSA-36SH. Le signal obtenu dans ce cas est nettement plus faible (d'un facteur 5, courbe b). Il y a donc bien une reconnaissance spécifique des nanotubes MWNT-D4-36 pour les protéines Ret des cellules testées.

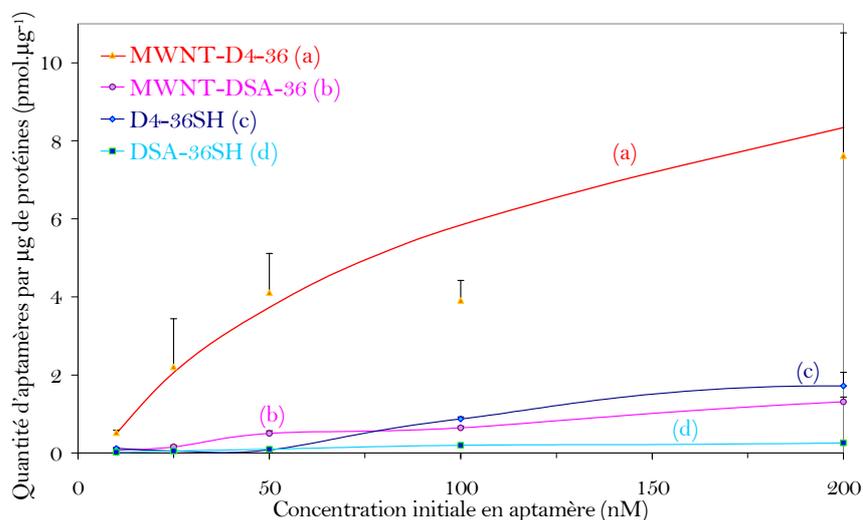


Figure VI-1 : Représentation de l'affinité pour les cellules PC12NEM2A des échantillons de nanotubes fonctionnalisés avec l'aptamère D4-36SH (a), de nanotubes fonctionnalisés avec la séquence contrôle DSA-36SH (b), de l'aptamère D4-36SH (c) et de la séquence contrôle DSA-36SH (d)

A titre de comparaison, les mêmes expériences ont ensuite été reproduites pour les aptamères seuls (courbes c et d). Tout d'abord, nous pouvons noter que l'aptamère D4-36 n'est pas trop court pour se lier aux cellules et qu'un effet de plateau est obtenu à forte concentration. Ce dernier met en évidence une saturation des récepteurs Ret par l'aptamère D4-36 et par conséquent une reconnaissance spécifique de ces derniers. En effet, par comparaison avec le profil du signal correspondant à la séquence contrôle (DSA-36) seule en solution, nous pouvons remarquer qu'il n'y a pas d'effet de plateau et que le signal est nettement plus faible (d'un facteur 5).

Au regard de ces résultats, les nanotubes permettent l'obtention d'une réponse plus intense. Pour une même concentration initiale d'aptamère, une quantité plus importante s'associe aux cellules. Ce phénomène peut s'expliquer par le greffage de plusieurs aptamères sur un même support donnant ainsi un effet de multiprésentation. De cette façon, si un aptamère, fixé sur un nanotube, se décroche de la protéine cible alors son voisin peut le remplacer instantanément. Cela pourrait être donc interprété comme une augmentation de l'avidité de l'aptamère pour la protéine. Une autre explication possible serait que comme *a priori* un nanotube porte plusieurs aptamères marqués, il suffit que l'un d'entre eux s'accroche pour que le signal soit multiplié par le nombre d'aptamères accrochés.

Cependant, ce résultat n'explique pas pourquoi à forte concentration les récepteurs ne sont pas saturés par le complexe MWNT-D4-36. Une des hypothèses émises repose sur l'internalisation et l'accumulation des nanotubes dans les cellules. Deux mécanismes sont décrits dans la littérature pour expliquer ce phénomène. Les équipes de Dai et Weissman soutiennent un mécanisme d'endocytose des nanotubes pour justifier l'internalisation des nanotubes.^{35,42,47-51} Néanmoins, ce mécanisme n'est peut-être pas le seul à avoir lieu. En effet, Bianco et *coll.* ont remarqué qu'en présence d'un inhibiteur d'endocytose (l'azoture de sodium) et à 4°C, les nanotubes sont tout de même internalisés dans la cellule. Cela signifierait que les nanotubes peuvent pénétrer dans la cellule par un mécanisme spontané en se comportant comme une aiguille.^{31,41,52}

VI. Conclusion et perspectives

Le ciblage de cellules cancéreuses présente un intérêt aussi bien diagnostique que thérapeutique. Ce domaine est en pleine évolution notamment depuis l'utilisation des nanotubes de carbone comme outil de vectorisation. Ces derniers ont par ailleurs été couplés aussi bien avec des anticorps qu'avec des peptides pour cibler des cellules tumorales mais, à notre connaissance, ils n'ont jamais été associés avec des aptamères dans ce but.

La méthode que nous avons développée pour greffer les aptamères sur les nanotubes repose sur leur fonctionnalisation par une molécule bifonctionnelle composée d'un motif pyrène pour l'interaction avec les nanotubes et d'un motif maléimide. Celui-ci intervient dans le couplage covalent avec un aptamère comprenant une fonction thiol.

L'aptamère utilisé est dirigé contre les récepteurs Ret surexprimés à la surface de certaines cellules cancéreuses. L'étude préliminaire *in vitro* que nous avons réalisée a montré que les "nanotubes-aptamères" se fixaient de manière sélective sur les cellules. Néanmoins, un effet inattendu a été observé avec une quantité croissante d'aptamères retenue sur les cellules en fonction de la quantité d'aptamères ajoutée. Ce phénomène pourrait s'expliquer par une internalisation des nanotubes de carbone dans les cellules.

Plusieurs expériences sont également envisagées dans un futur proche pour approfondir cette étude et élaborer un outil à base de nanotubes de carbone pour l'imagerie moléculaire *in vivo* et la vectorisation de médicaments. Ces expériences reposent sur une double fonctionnalisation des nanotubes avec l'aptamère d'une part pour l'adressage et un marqueur d'autre part pour la détection. Deux marqueurs se distinguent : l'Alexa Fluor® pour une détection par microscopie de fluorescence et le Fluor 18 pour une détection par Tomographie d'Emission de Positons (TEP). Cette dernière méthode est particulière attrayant étant donné qu'elle permet d'établir le profil pharmacocinétique complet du ligand

de manière non invasive et quantitative. Elle permet également d'étudier en parallèle la biodistribution *in vivo* des "nanotubes-aptamères".

VII. Bibliographie

- ¹ Cech, T. R. *Nature* **2004**, *428*, 263.
- ² Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *346*, 818.
- ³ Robertson, D. L.; Joyce, G. F. *Nature* **1990**, *344*, 467.
- ⁴ Tuerk, C.; Gold, L. *Science* **1990**, *249*, 505.
- ⁵ Green, R.; Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* **1990**, *347*, 406.
- ⁶ Thiesen, H. J.; Bach, C. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 3203.
- ⁷ Blackwell, T. K.; Kretzner, L.; Blackwood, E. M.; Eisenman, R. N.; Weintraub, H. *Science* **1990**, *250*, 1149.
- ⁸ Blackwell, T. K.; Weintraub, H. *Science* **1990**, *250*, 1104.
- ⁹ Pollock, R.; Treisman, R. *Nucleic Acids Res.* **1990**, *18*, 6197.
- ¹⁰ Joyce, G. F. *Sci. Am.* **1992**, *267*, 90.
- ¹¹ Osborne, S. E.; Matsumura, I.; Ellington, A. D. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 5.
- ¹² Schneider, D. J.; Feigon, J.; Hostomsky, Z.; Gold, L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 9599.
- ¹³ Fitzwater, T.; Polisky, B. *Methods Enzymol.* **1996**, *267*, 275.
- ¹⁴ Huizenga, D. E.; Szostak, J. W. *Biochemistry* **1995**, *34*, 656.
- ¹⁵ Marro, M. L.; Daniels, D. A.; McNamee, A.; Andrew, D. P.; Chapman, T. D.; Jiang, M. S.; Wu, Z.; Smith, J. L.; Patel, K. K.; Gearing, K. L. *Biochemistry* **2005**, *44*, 8449.
- ¹⁶ Pan, W.; Craven, R. C.; Qiu, Q.; Wilson, C. B.; Wills, J. W.; Golovine, S.; Wang, J. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*.
- ¹⁷ Wang, J.; Jiang, H.; Liu, F. *RNA* **2000**, *6*, 571.
- ¹⁸ Eyetech Study Group *Retina* **2002**, *22*, 143.
- ¹⁹ Eyetech Study Group *Ophthalmology* **2003**, *110*, 979.
- ²⁰ Brody, E. N.; Gold, L. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 5.
- ²¹ Hesselberth, J.; Robertson, M. P.; Jhaveri, S.; Ellington, A. D. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2000**, *74*, 15.
- ²² Cerchia, L.; Hamm, J.; Libri, D.; Tavitian, B.; de Franciscis, V. *FEBS Lett.* **2002**, *528*, 12.
- ²³ Nimjee, S. M.; Rusconi, C. P.; Sullenger, B. A. *Annu. Rev. Med.* **2005**, *56*, 555.
- ²⁴ Gschwind, A.; Fischer, O. M.; Ullrich, A. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 361.
- ²⁵ Tavitian, B.; Duconge, F.; Libri, D.; de Franciscis, V.; Cerchia, L. *Aptamers selected from live tumor cells and the use thereof*; Patent WO2005093097, **2004**.
- ²⁶ Cerchia, L.; Duconge, F.; Pestourie, C.; Boulay, J.; Aissouni, Y.; Gombert, K.; Tavitian, B.; de Franciscis, V.; Libri, D. *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e123.
- ²⁷ Pestourie, C.; Tavitian, B.; Ducongé, F. *Biochimie* **2005**, *87*, 921.
- ²⁸ Pestourie, C.; Cerchia, L.; Gombert, K.; Aissouni, Y.; Boulay, J.; de Franciscis, V.; Libri, D.; Tavitian, B.; Ducongé, F. *Oligonucleotides* **2006**, *16*, 323.
- ²⁹ Bianco, A. *Expert Opin. Drug Delivery* **2004**, *1*, 57.
- ³⁰ Bianco, A.; Kostarelos, K.; Prato, M. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 674.
- ³¹ Wu, W.; Wieckowski, S.; Pastorin, G.; Benincasa, M.; Klumpp, C.; Briand, J.-P.; Gennaro, R.; Prato, M.; Bianco, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 6358.
- ³² Klumpp, C.; Kostarelos, K.; Prato, M.; Bianco, A. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 404.
- ³³ Lacerda, L.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1460.
- ³⁴ Liu, Z.; Sun, X.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H. *ACS Nano* **2007**, *1*, 50.
- ³⁵ Feazell, R. P.; Nakayama-Ratchford, N.; Dai, H.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 8438.
- ³⁶ Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40*.
- ³⁷ Singh, R.; Pantarotto, D.; McCarthy, D.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Partidos, C. D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A.; Kostarelos, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 4388.
- ³⁸ Gao, L.; Nie, L.; Wang, T.; Qin, Y.; Guo, Z.; Yang, D.; Yan, X. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 239.
- ³⁹ Kam, N. W. S.; Liu, Z.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12492.
- ⁴⁰ Pantarotto, D.; Singh, R.; McCarthy, D.; Erhardt, M.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5242.
- ⁴¹ Pantarotto, D.; Briand, J.-P.; Prato, M.; Bianco, A. *Chem. Commun.* **2004**, 16.
- ⁴² Kam, N. W. S.; O'Connell, M.; Wisdom, J. A.; Dai, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2005**, *102*, 11600.
- ⁴³ Liu, Z.; Cai, W.; He, L.; Nakayama, N.; Chen, K.; Sun, X.; Chen, X.; Dai, H. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2*, 47.
- ⁴⁴ McDevitt, M. R.; Chattopadhyay, D.; Kappel, B. J.; Jaggi, J. S.; Schiffman, S. R.; Antczak, C.; Njardarson, J. T.; Brentjens, R.; Scheinberg, D. A. *J. Nuclear Med.* **2007**, *48*, 1180.
- ⁴⁵ So, H. M.; Won, K.; Kim, Y. H.; Kim, B. K.; Ryu, B. H.; Na, P. S.; Kim, H.; Lee, J. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 11906.
- ⁴⁶ Maehashi, K.; Katsura, T.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Matsumoto, K.; Tamiya, E. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 782.
- ⁴⁷ ShiKam, N. W.; Jessop, T. C.; Wender, P. A.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6850.

⁴⁸ Kam, N. W. S.; Dai, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6021.

⁴⁹ Kam, N. W. S.; Dai, H. *Phys. Stat. Sol. (b)* **2006**, *243*, 3561.

⁵⁰ Cherukuri, P.; Bachilo, S. M.; Litovsky, S. H.; Weisman, R. B. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15638.

⁵¹ Cherukuri, P.; Gannon, C. J.; Leeuw, T. K.; Schmidt, H. K.; Smalley, R. E.; Curley, S. A.; Weisman, R. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 18882.

⁵² Cai, D.; Mataraza, J. M.; Qin, Z.-H.; Huang, Z.; Huang, J.; Chiles, T. C.; Carnahan, D.; Kempa, K.; Ren, Z. *Nat. Methods* **2005**, *2*, 449.

Conclusion Générale

Tout au long de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés à la construction d'objets hybrides à base de nanotubes de carbone dont les champs d'application impliquent aussi bien leurs caractéristiques électroniques que structurelles. Cinq thématiques ont été abordées au cours de cette étude.

- L'utilisation des nanotubes pour la construction d'électrodes dans les piles à combustible semble particulièrement prometteuse. En effet, les nanotubes possèdent une très grande surface spécifique sur laquelle il est possible de déposer des nanoparticules de catalyseur. Cela permet, pour une même quantité de catalyseur, d'augmenter considérablement la surface de catalyseur disponible pour la réaction. Le fait que les nanotubes soient conducteurs est également un atout.

Dans un premier temps, nous avons synthétisé différents lipides possédant des têtes pyridinium ou NTA afin de les utiliser comme lien entre les nanotubes et les nanoparticules et servir ainsi à stabiliser l'édifice final. Nous avons montré que les lipides avaient la faculté de pouvoir s'auto-organiser sous formes d'anneaux fortement adsorbés à la surface des nanotubes. Pour les deux métaux utilisés, platine et palladium, la stratégie mise en œuvre a permis d'obtenir une répartition homogène de fines nanoparticules pour les nanotubes fonctionnalisés.

Nous avons ensuite testé les nanoobjets synthétisés pour l'oxydation du méthanol et de l'éthanol. Les expériences réalisées ont mis en évidence l'influence des lipides avec l'obtention de performances nettement supérieures à celles usuellement décrites dans la littérature pour des systèmes similaires.

- L'élaboration de nanobiosenseur pour le développement de nouvelles méthodes diagnostiques et thérapeutiques. Les nanotubes, compte tenu de leurs propriétés électroniques, sont idéaux pour la mise au point de tels systèmes. Notre projet repose sur une approche universelle *bottom up* de la partie senseur.

La stratégie que nous avons adoptée est basée sur la fonctionnalisation des nanotubes avec une molécule bifonctionnelle capable d'interagir d'une part avec les nanotubes et d'autre part avec l'étiquette histidine présente dans la plupart des protéines recombinantes. Nous avons montré qu'il était alors possible d'accrocher spécifiquement un scFv, jouant le rôle d'antigène, sur les nanotubes. Nous avons également vérifié que ce système était efficace pour détecter de manière distincte l'anticorps correspondant.

- La conception d'un agent clivant de l'ADN. Le nanotube de carbone est le partenaire idéal pour la construction d'hybrides donneur-accepteur. Il est également connu pour interagir par des interactions hydrophobes avec l'ADN. Nous avons décidé de combiner ces deux caractéristiques pour concevoir un nouvel agent clivant de l'ADN. Le principe repose sur l'association des nanotubes avec un dérivé de l'acridine, un intercalant de l'ADN.

Parmi les différentes approches mises en œuvre, certaines ont mis en évidence une coupure de l'ADN induite par irradiation lumineuse. Cependant, l'effet observé s'est avéré peu reproductible. Nous avons alors élargi notre étude en explorant les propriétés photophysiques d'un tel système et mis en évidence la formation d'un exciplexe. Lorsque les nanotubes sont fonctionnalisés avec un motif acridinium, un transfert de charge a pu être mis en évidence par une forte atténuation de l'émission de fluorescence et la présence d'un signal radicalaire en spectroscopie RPE, caractéristique du radical acridinium.

- L'utilisation de nanotubes de carbone modifiés pour la limitation optique. En effet, cela fait partie des propriétés intrinsèques mais peu étudiées des nanotubes. Pourtant ils font partie des limiteurs optiques les plus performants et fonctionnant par diffusion non linéaire. Lorsqu'une solution de nanotubes est irradiée, ils provoquent la formation de bulles qui vont diffuser le rayonnement laser. Dans ce contexte, nous avons développé différentes approches pour améliorer les propriétés intrinsèques des nanotubes.

Etant donné que le principe de limitation repose sur la formation de bulles, nous avons basé notre première approche sur le greffage d'entités décarboxylables : les β -cétoacides. Bien que ces substances soient capables de former des bulles de CO_2 , nous n'avons pas réussi à mettre en évidence un cumul des effets qui aurait permis d'abaisser le seuil de limitation optique.

Ensuite, nous avons fonctionnalisé les nanotubes avec des fullerènes. Leur mécanisme de limitation est l'absorption saturable inverse et pourrait avoir un effet de synergie avec celui des nanotubes. En effet, nous avons pu observer une nette amélioration des performances des nanotubes.

Finalement, ayant développé une méthode de déposition de nanoparticules, nous avons testé en limitation optique l'association de nanoparticules d'or et de nanotubes. Ces deux entités fonctionnent selon le même procédé de diffusion. Cependant le couplage de leurs modes plasmons pourrait permettre l'obtention d'une réponse plus rapide. Néanmoins, cette approche n'a montré aucun gain de performance.

- Le développement d'un vecteur ciblé à base de nanotubes de carbone. Ils peuvent effectivement être fonctionnalisés pour délivrer des médicaments avec une concentration locale très élevée. Cette étude a consisté à développer un outil capable de cibler des cellules tumorales pour de potentielles applications d'imagerie médicale et de vectorisation.

Notre stratégie s'appuie sur le greffage de séquences de nucléotides, appelées aptamères, capable de cibler spécifiquement des protéines réceptrices se trouvant à la surface de cellules cancéreuses. Pour cela nous avons utilisé une molécule bifonctionnelle permettant de jouer le rôle de relais entre le nanotube et l'aptamère. Les tests d'incubation avec les

cellules tumorales ont permis de mettre en évidence une plus forte accumulation d'aptamères lorsque ces derniers étaient liés aux nanotubes.

En conclusion, ce travail de thèse nous a permis d'utiliser un large panel de méthode de fonctionnalisation des nanotubes de carbone pour concevoir et synthétiser des hybrides trouvant des applications tant dans le domaine de la catalyse que de l'optique ou de la biologie.

Partie Expérimentale

Généralités

Analyse thermogravimétrique (ATG)

L'appareil utilisé est un TGA 92 de la société SETARAM. Le programme de température est le suivant : de 150 à 800°C avec une montée en température de 10°C/min, palier de 30 min à 800°C. Descente en température : 25°C/min.

Chromatographie sur colonne

Elles sont réalisées en utilisant du gel de silice Merck (230-400 mesh). Le mélange d'éluant est précisé pour chaque purification.

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les plaques utilisées sont de type Silice Merck 60 F₂₅₄ d'épaisseur 0,25 mm sur support de verre. Les révélations sont effectuées par des rayonnements ultraviolets à 254 nm et/ou 365 nm, ainsi que par immersion dans une solution éthanolique 5% d'acide phosphomolybdique ou de permanganate de potassium. Le facteur de rétention frontale (Rf) est indiqué, ainsi que la nature de l'éluant utilisé.

Expériences pompe-sonde

Régime picoseconde : le laser est une source Nd:YAG émettant à 1064 nm et délivrant des impulsions de 30 ps à une fréquence de répétition de 10 Hz. Le faisceau laser est séparé en deux composantes d'intensité quasi-identique par une lame séparatrice. L'une, après doublage de fréquence pour passer à 532 nm, sert de faisceau pompe. L'autre est focalisée sur une électrode de tungstène, provoquant l'arrachement d'ions métalliques, sous atmosphère de xénon à une pression de 2 bars. Le plasma ainsi créé émet alors un éclair de lumière blanche d'une durée de vie de 50 ns qui est utilisé comme faisceau sonde.

Régime nanoseconde : le faisceau pompe est un laser Nd:YAG émettant à 532 nm. (profil temporel : monomode, largeur 5 ns à 50% du maximum et 8,5 ns à 1/e²). Faisceau sonde : hélium-néon continu émettant à 633 nm.

Limitation optique

Les expériences ont été réalisées soit avec un laser OPO pompé par un Nd:YAG, à 532 nm, avec une durée d'impulsion de 3 ns, soit avec un laser Nd:YAG doublé, émettant à 532 nm, avec une durée d'impulsion de 15 ns. La cavité de ce laser n'étant pas injectée par un Nd:YAG continu, une compétition entre plusieurs modes a lieu, élargissant la durée d'impulsion.

Microscopie électronique en transmission

Les clichés ont été réalisés sur un microscope Philips CM 12 dont la tension d'accélération des électrons est de 100 kV. Les grilles de microscopie sont en cuivre 300 mesh recouvertes d'un film de carbone.

Nanotubes de carbone

Les nanotubes de carbone monofeuillets synthétisés par la méthode HiPCO proviennent de la société CNI (Carbon Nanotechnologies Incorporated, Etats-Unis, www.cnanotech.com). Les nanotubes présentent un diamètre compris entre 0,7 et 1,4 nm et contiennent de 11% de catalyseur.

Les nanotubes de carbone MWNTS synthétisés par la méthode de l'arc électrique proviennent de la société n-Tec (Norvège). La pureté est supérieure à 95%. Le diamètre des nanotubes est de 25 nm en moyenne.

Photochimie

Les réactions photochimiques sont initiées à l'aide des lampes suivantes :

- UV Heraeus à moyenne pression de mercure couvrant une large gamme de longueur d'onde, munie d'un tube à immersion en quartz et d'un tube de réfrigération en quartz ou en verre.,
- UV Heraeus à basse pression de mercure (254 nm),
- Fisher Bioblock Scientific monochromatique (365 nm).

Points de fusion

Ils ont été mesurés sur un appareil Büchi 535.

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ^1H et ^{13}C ont été enregistrés sur un spectromètre à ondes pulsées BRUKER AVANCED 400 dont les fréquences de résonance du proton et du carbone sont 400,133 MHz et 100,624 MHz, respectivement.

Les déplacements chimiques sont exprimés en partie par million (ppm) par rapport au solvant de référence pour la RMN ^1H et ^{13}C .

La numérotation utilisée pour l'attribution des différents signaux correspond à celle indiquée sur la structure du produit et ne suit pas nécessairement les règles de nomenclature.

Le déplacement chimique (δ) en ppm est suivi entre parenthèses de la multiplicité du signal, de l'intégration, de la constante de couplage (en Hertz) si elle est mesurable et de l'attribution (C_{arom} pour les carbones aromatiques et H_{arom} pour les protons correspondants).

Les multiplicités des signaux sont indiquées à l'aide des lettres suivantes :

s : singulet

q : quadruplet

d : doublet

quint : quintuplet

t : triplet

m : massif

Résonance paramagnétique électronique (RPE)

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre RPE BRUKER ES-300 avec une cavité standard TE102 équipé d'un cryostat (oxford Instrument) à hélium liquide et d'un fréquence mètre (Hewlett Packard model 5350B)

Le logiciel de traitement des spectres est BRUKER Win-Epr.

Solvants anhydres

Les expériences sensibles à l'humidité et/ou à l'air ont été réalisées dans des montages secs (chauffés sous vide) sous atmosphère d'azote ou d'argon séché sur chlorure de calcium et gel de silice.

Les solvants anhydres sont soit achetés, soit préparés par distillation sous azote en présence de leur agent de dessiccation respectif (sodium/benzophénone pour l'éther diéthylique et le THF, hydrure de calcium pour le dichlorométhane). Le chlorure de thionyle est distillé avant chaque utilisation. La triéthylamine est distillée puis stockée sur KOH.

Sonication

La dispersion par sonication est réalisée à l'aide d'une sonde à ultrasons Branson Sonifier 450 (60 W, 20 kHz) ou d'un bain à ultrasons Branson 5210 (19 W, 47 kHz).

Spectroscopie de diffusion Raman

Raman IR : les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker modèle RFS100 utilisant la ligne fondamentale d'un laser Nd :YAG continu à 1064 nm. La résolution de l'appareil est de 4 cm^{-1} et sa précision atteint 1 cm^{-1} .

Raman visible : les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Jobin-Yvon T64000 utilisant les raies lasers à 488, 514,5 et 647,1 nm d'un laser continu Ar/Kr. La résolution de l'appareil est de 4 cm^{-1} et sa précision peut atteindre 1 cm^{-1} .

Spectroscopie de fluorescence

Les mesures de fluorescence ont été effectuées sur un appareil SPEX Fluorolog-II (source : lampe Xénon Ozone Free de 250 W) ainsi que sur un appareil SPEX FluoroMax-3 de chez Horiba Jobin-Yvon.

Déclin de fluorescence

Les cinétiques de déclin de fluorescence ont été mesurées avec un appareil de comptage de photon corrélé en temps et couplé avec un laser Ti:saphire picoseconde délivrant des pulses de 1,3 ps à une fréquence de 82 MHz.

Spectrométrie de masse (SM)

Basse résolution :

En mode électrospray couplé au temps de vol, les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Mariner™ ESI TOF (PerSeptive Biosystems).

Haute résolution :

Les spectres de masse haute résolution ont été effectués par le Laboratoire de Spectrométrie de Masse de l'ICSN.

En mode MALDI-TOF, les spectres ont été réalisés en mode réflectron positif, sur un spectromètre Voyager-DE STR (PerSeptive Biosystems). En mode électrospray, les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre à temps de vol (LCT de Micromass®, UK), muni d'une source électrospray (source Z-spray) en mode positif.

Spectroscopie infrarouge FT-IR (Fourier Transformed Infrared)

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Perkin-Elmer System 2000 FT-IR. Le traitement des spectres est effectué avec le programme IR Data Manager. Les échantillons liquides sont placés entre deux pastilles de NaCl. Une pastille de KBr est préparée pour les échantillons solides. Les nombres d'onde des bandes IR sont exprimés en cm^{-1} à leur maximum d'intensité. Dans la description des spectres, l'intensité et le type de raies sont indiqués à l'aide des abréviations suivantes : F, m, f signifiant respectivement raie forte, moyenne et faible.

Spectroscopie infrarouge de réflexion totale atténuée ATR-IR (Attenuated Total Reflectance Infrared)

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Vertex 70 (IRTF) Bruker muni d'une platine "Miracle" Pike avec mono-réflexion sur diamant et un détecteur MCT (Mercure, Cadmium, Tellure) refroidi à l'azote liquide. Les spectres ont été enregistrés avec 256 scans dans la gamme $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ avec une résolution de 2 cm^{-1} . Le rapport bruit sur signal est de 0,25/1000. Le logiciel d'acquisition et de traitement est "OPUS". Les nanotubes sont déposés sur le diamant et comprimés sur ce dernier.

Spectroscopie UV-Vis

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectromètre VARIAN CARRY 50 Scan UV-Vis, à l'aide du logiciel Cary Win UV.

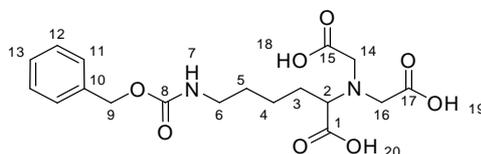
Spectroscopie UV-Vis-NIR

Les spectres d'absorption UV-Vis-NIR ont été réalisés sur un spectromètre Perkin-Elmer UV/VIS/NIR Lambda 900 et l'enregistrement des spectres avec le logiciel UV-Winlab. L'appareil est muni de deux lampes, l'une pour l'intervalle spectral de 1800 à 860 nm et l'autre pour l'intervalle de 860 à 300 nm.

I. Synthèse organique

I.1. Résultats expérimentaux du chapitre II

Acide 6-benzyloxycarbonylamino-2-(bis-carboxyméthyl-amino)-hexanoïque, **II-1**



A une solution d'acide bromoacétique (2,1 g ; 15,1 mmoles ; 4,1 éq.) dans 8 mL d'hydroxyde de sodium 2M à 0°C est ajoutée, goutte à goutte, une solution de N⁶-carbobenzyloxy-L-lysine (1 g ; 3,6 mmoles ; 1 éq.) dans 20 mL d'une aqueuse d'hydroxyde de sodium 2M. Le mélange est agité pendant 2 heures à température ambiante puis chauffé à 50°C pendant 19 heures. Le milieu réactionnel est neutralisé à 0°C avec de l'acide chlorhydrique concentré (36%). Le précipité obtenu est filtré et séché sous vide. 1,15 g du composé **II-1** sont obtenus sous la forme d'une poudre blanche.

Formule brute : C₁₈H₂₄N₂O₈

M = 396,4 g.mol⁻¹

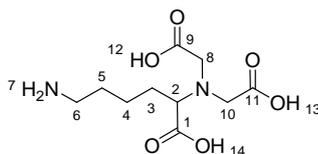
Rendement : 80%

RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm) : 7,37-7,22 (m, 5H, H₁₁ à 13) ; 4,99 (s, 2H, H₉) ; 3,50 (m, 4H, H_{14,16}) ; 3,38 (t, 1H, H₂, J₂₋₃=7,4 Hz) ; 2,96 (m, 2H, H₆) ; 1,63-1,27 (m, 6H, H₃ à 5).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm) : 173,7 (1C, C₁) ; 173,9 (2C, C_{15,17}) ; 156,1 (1C, C₈) ; 137,3 (1C, C₁₀) ; 128,4 (2C, C_{12,13}) ; 127,8 (1C, C₁₁) ; 65,1 (1C, C₂) ; 64,4 (1C, C₉) ; 53,4 (2C, C_{14,16}) ; 29,1 (2C, C_{3,5}) ; 23,0 (1C, C₄).

SM (ESI+) : m/e : 397 [M+H]⁺

IR (KBr, cm⁻¹) : 3364 (F) ; 3042 (f) ; 2935 (f) ; 1721 (F) ; 1523 (f) ; 1278 ; 1131 ; 1013 ; 905 ; 742 ; 683.

Acide 6-amino-2-(bis-carboxyméthyl-amino)-hexanoïque, **II-2**

A une solution d'acide **II-1** (1 g ; 2,52 mmoles ; 1éq.) dans 50 mL de MeOH est additionnée du palladium sur charbon (100 mg ; 10% de Pd). La solution est purgée 3 fois avec de l'azote puis 3 fois avec de l'hydrogène et est agitée sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante pendant 12 heures. Le précipité formé est filtré, lavé au MeOH puis dilué dans l'eau. Le catalyseur est éliminé par filtration du précipité dissout dans l'eau. Le filtrat est ensuite évaporé à sec sous pression réduite. 496 mg du composé **II-2** sont obtenus sous forme d'une poudre blanche.

Formule brute : $C_{10}H_{18}N_2O_6$

M = 262,3 g.mol⁻¹

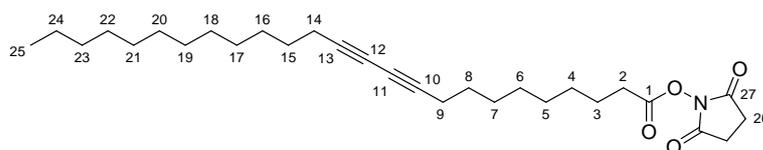
Rendement : 75%

RMN ¹H (D₂O, δ en ppm) : 3,94 (m, 5H, H_{2,8,10}) ; 2,99 (t, 2H, H₆, J₆₋₅=7,2 Hz) ; 1,95-1,56 (m, 6H, H_{3 à 5}).

RMN ¹³C (D₂O, δ en ppm) : 172,4 (1C, C₁) ; 170,7 (2C, C_{9,11}) ; 67,9 (1C, C₂) ; 55,4 (2C, C_{8,10}) ; 39,5 (1C, C₆) ; 26,6 (2C, C_{3,5}) ; 23,4 (1C, C₄).

SM (ESI+) : m/e : 263 [M+H]⁺, 285 [M+Na]⁺

IR (KBr, cm⁻¹) : 3498 (F) ; 3324 (m) ; 2996 (m) ; 2975 (f) ; 1750 (F) ; 1634 ; 1401 ; 1263 ; 1159 ; 984 ; 876 ; 751.

Pentacosa-10, 12-diynoate de 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yle, **II-3a**

A une solution d'acide 1-pentacosa-10,12-diynoïque (500 mg ; 1,33 mmoles ; 1 éq.) dans 50 mL de CH_2Cl_2 anhydre est additionnée de l'EDCI (384 mg ; 1,5 éq.) et du NHS (230 mg ; 1,5 éq.). Le mélange est agité une nuit sous azote à température ambiante puis traité avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 et les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. 630 mg du composé **II-3a** sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

Formule brute : $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{NO}_4$

M = 471,7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

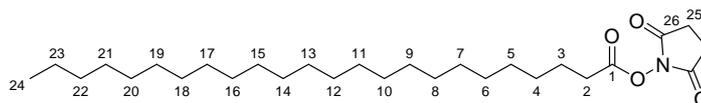
Rendement : Quantitatif

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 2,90-2,80 (m, 4H, H_{26}) ; 2,60 (t, 2H, H_2 , $J_{2-3}=7,2$ Hz) ; 2,24 (t, 4H, $\text{H}_{9,14}$, J_{9-8} et $J_{14-15}=7,2$ Hz) ; 1,73 (quint, 2H, H_3 , $J_{3-4,2}=7,2$ Hz) ; 1,51 (quint, 2H, H_4 , $J_{4-5,3}=7,2$ Hz) ; 1,41-1,26 (m, 28H, H_5 à 8 et H_{15} à 24) ; 0,88 (t, 3H, H_{25} , $J_{24-25}=7,2$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 170,3 (2C, C_{27}) ; 168,2 (1C, C_1) ; 78,4 (1C, C_{13}) ; 77,5 (1C, C_{10}) ; 65,8 (2C, $\text{C}_{11,12}$) ; 32,1 (1C, C_2) ; 31,3-27,8 (16C, C_4 à 8 et C_{15} à 23 et C_{26}) ; 25,1 (1C, C_3) ; 22,2 (1C, C_{24}) ; 19,3 (2C, $\text{C}_{9,14}$) ; 13,6 (1C, C_{25}).

SM (ESI+) : m/e : 472 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3496 (f) ; 3335 (f) ; 2911 (F) ; 2873 (F) ; 2227 (f) ; 1821 (F) ; 1783 (F) ; 1732 (F) ; 1453 (m) ; 1356 (m) ; 1298 ; 1248 ; 1193 ; 1058 ; 989 ; 805 ; 648.

Tétracosanoate de 2,5-dioxo-pyrrolidin-1-yle, **II-3b**

A une solution d'acide tétracosanoïque (400 mg ; 1,08 mmoles ; 1 éq.) dans 50 mL de CH_2Cl_2 anhydre est additionnée de l'EDCI (312 mg ; 1,5 éq.) et du NHS (187 mg ; 1,5 éq.). Le mélange est agité une nuit sous azote à température ambiante puis est traité avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 et les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. 503 mg du composé **II-3b** sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

Formule brute : $\text{C}_{28}\text{H}_{51}\text{NO}_4$

M = 465,7 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

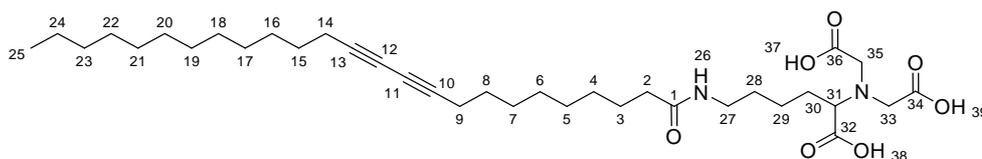
Rendement : Quantitatif

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 2,87-2,83 (m, 4H, H_{25}) ; 2,60 (t, 2H, H_2 , $J_{2-3} = 7,6$ Hz) ; 1,73 (quint, 2H, H_3 , $J_{3-4,2} = 7,6$ Hz) ; 1,58 (m, 2H, H_{23}) ; 1,42-1,25 (m, 38H, H_4 à H_{22}) ; 0,88 (t, 3H, H_{24} , $J_{24-23}=6,8$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 169,8 (2C, C_{26}) ; 167,2 (1C, C_1) ; 31,3 (1C, C_2) ; 29,8-25,4 (20C, C_3 à C_{22}) ; 24,8 (2C, C_{25}) ; 22,8 (1C, C_{23}) ; 14,1 (1C, C_{24}).

SM (ESI+) : m/e : 466 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 488 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 2992 (F) ; 2865 (F) ; 1852 (F) ; 1791 (F) ; 1461 (m) ; 1381 (m) ; 1308 ; 1153 ; 1098 ; 966 ; 726.

Acide 2-(bis-carboxyméthyl-amino)-6-pentacosà-10,12-diynoïlamino-hexanoïque, **II-4a**

A une solution de l'ester **II-3a** (500 mg ; 1,06 mmoles ; 1 éq.) dans 10 mL de DMF anhydre est ajoutée une solution de l'amine **II-2** (306 mg ; 1,1 éq.) dans 10 mL de DMF contenant 2 mL de triéthylamine et quelques gouttes d'eau (jusque complète solubilisation de l'amine). Le mélange est agité à température ambiante pendant 12 heures. Après évaporation sous pression réduite, le résidu est repris dans 10 mL d'eau et la solution est acidifiée, avec une solution aqueuse à 10% d'acide chlorhydrique, jusqu'à précipitation d'un solide blanc. Ce dernier est récupéré par centrifugation et lavé à l'eau avant d'être séché sous vide en présence de P₂O₅. 656 mg du composé **II-4a** sont obtenus sous forme de solide blanc.

Formule brute : C₃₅H₅₈N₂O₇

M = 618,9 g.mol⁻¹

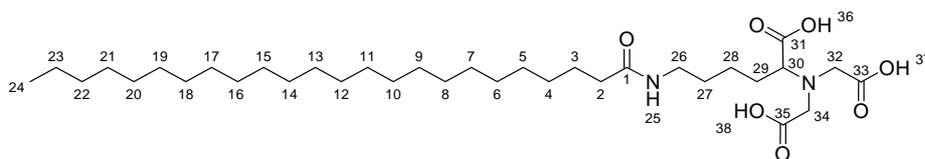
Rendement : 85%

RMN ¹H (DMSO-d₆, δ en ppm) : 7,70 (t, 1H, H₂₆, J₂₆₋₂₇=5,4 Hz) ; 3,48 (m, 4H, H_{33,35}) ; 3,33 (t, 1H, H₃₁, J₃₁₋₃₀=7,2 Hz) ; 2,98 (m, 2H, H₂₇) ; 2,27 (t, 4H, H_{9,14}, J₁₄₋₁₅ et J₉₋₈=6,8 Hz) ; 2,01 (t, 2H, H₂, J₂₋₃=7,6 Hz) ; 1,59-1,24 (m, 38H, H₂₄ à 15 et H₈ à 3 et H₂₈ à 30) ; 0,85 (t, 3H, H₂₅, J₂₅₋₂₄=6,6 Hz).

RMN ¹³C (DMSO-d₆, δ en ppm) : 173,8 (1C, C₃₂) ; 173,0 (2C, C_{34,36}) ; 169,8 (1C, C₁) ; 79,3-78,6 (3C, C_{10,13,31}) ; 65,3 (2C, C_{11,12}) ; 53,2 (2C, C_{33,35}) ; 35,4 (1C, C₂₇) ; 31,3 (1C, C₂) ; 29,2-27,7 (18C, C₃ à 8 et C₁₅ à 23 et C₂₈ à 30) ; 22,1 (1C, C₂₄) ; 18,3 (2C, C_{9,14}) ; 14,0 (1C, C₂₅).

SM (ESI-) : m/e : 617 [M-H]⁺

IR (KBr, cm⁻¹) : 3280 (m) ; 2951 (F) ; 2861 (F) ; 2234 (f) ; 1721 (F) ; 1653 (F) ; 1453 (m) ; 1316 (F) ; 1181 ; 656.

Acide 2-(bis-carboxyméthyl-amino)-6-tétracosanoylamino-hexanoïque, **II-4b**

A une solution de l'ester **II-3b** (140 mg ; 0,3 mmoles ; 1 éq.) dans 10 mL de DMF anhydre est ajoutée une solution de l'amine **II-2** (91 mg ; 1,2 éq.) dans 10 mL de DMF contenant 2 mL de diisopropyléthylamine et quelques gouttes d'eau (jusque complète solubilisation de l'amine). Le mélange est agité à température ambiante pendant 12 heures. Après évaporation sous pression réduite, le résidu est repris dans 10 mL d'eau et la solution est acidifiée, avec une solution aqueuse à 10% d'acide chlorhydrique, jusqu'à précipitation d'un solide blanc. Ce dernier est récupéré par centrifugation et lavé à l'eau avant d'être séché sous vide en présence de P₂O₅. 169 mg du composé **II-4b** sont obtenus sous forme de solide blanc.

Formule brute : C₃₄H₆₄N₂O₇

M = 612,9 g.mol⁻¹

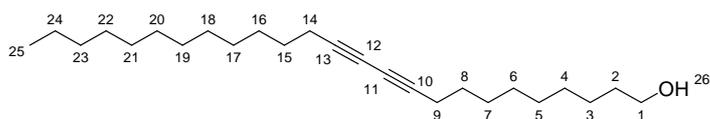
Rendement : 92%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 4,26-4,07 (m, 5H, H_{30,32,34}) ; 3,18 (m, 2H, H₂₆) ; 2,28 (t, 2H, H₂, J₂₋₃=7,2 Hz) ; 1,53 (m, 6H, H_{3,27,29}) ; 1,18-1,07 (m, 42H, H_{4 à 23} et H₂₈) ; 0,76 (t, H₂₄, J₂₄₋₂₃=6,8 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 174,2 (1C, C₃₁) ; 173,5 (2C, C_{33,35}) ; 170,3 (1C, C₁) ; 79,1 (1C, C₃₀) ; 53,5 (2C, C_{32,34}) ; 35,6 (1C, C₂₆) ; 30,9 (1C, C₂) ; 28,6-26,4 (23C, C_{3 à 22} et C_{27 à 29}) ; 21,8 (1C, C₂₃) ; 13,6 (1C, C₂₄).

SM (ESI-) : m/e : 611 [M-H]⁺

IR (KBr, cm⁻¹) : 3312 (m) ; 2940 (F) ; 2883 (F) ; 1745 (F) ; 1698 (F) ; 1521 (m) ; 1297 (F) ; 1152 ; 687.

Pentacos-10,12-diyn-1-ol, **II-6**

A une suspension de LiAlH_4 (760 mg ; 20 mmoles ; 1,5 éq.) dans 100 mL d' Et_2O anhydre à 0°C est additionnée goutte à goutte par canulation une solution de l'acide pentacos-10, 12-diynoïque (5 g ; 1 éq.) dans 100 mL d' Et_2O anhydre. Le mélange est agité à température ambiante pendant 12 heures. Le milieu est hydrolysé par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 8%. La phase organique est récupérée puis lavée avec une solution saturée de NaHCO_3 . Les phases aqueuses sont extraites avec un volume d' Et_2O et les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. 2,9 g du composé **II-6** sont obtenus sous la forme d'un solide jaune.

Formule brute : $\text{C}_{25}\text{H}_{44}\text{O}$

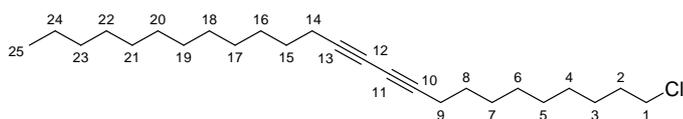
M = 360,6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : 60%

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 3,64 (t, 2H, H_1 , $J_{1-2}=6,6$ Hz) ; 2,24 (t, 4H, $\text{H}_{9,14}$, J_{8-9} et $J_{14-15}=7$ Hz) ; 1,58-1,26 (m, 34H, H_2 à 8 et H_{15} à 24) ; 0,88 (t, 3H, H_{25} , $J_{25-24}=7,2$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 77,8 (2C, $\text{C}_{10,13}$) ; 65,7-65,1 (2C, $\text{C}_{11,12}$) ; 62,3 (1C, C_1) ; 31,8-28,3 (15C, C_2 et C_4 à 8 et C_{15} à 23) ; 24,6 (1C, C_3) ; 22,6 (1C, C_{24}) ; 19,1 (2C, $\text{C}_{9,14}$) ; 14,1 (1C, C_{25}).

SM (ESI+) : m/e : 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$

1-Chloro-pentacos-10,12-diyne, **II-7**

A une solution de l'alcool **II-6** (4 g ; 11.1 mmoles ; 1 éq.) dans la pyridine anhydre (1,8 mL ; 2 éq.) est ajoutée du chlorure de thionyle (3,2 mL ; 4 éq.) à température ambiante sous azote. Le milieu est agité pendant 12 heures. Le milieu est traité par une solution aqueuse saturée de NaCl₂. La phase aqueuse est extraite 2 fois avec du CH₂Cl₂ et les phases organiques sont réunies, séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/ACOEt : 9/1) et le composé **II-7** est récupéré sous forme d'une poudre beige.

Formule brute : C₂₅H₄₃Cl

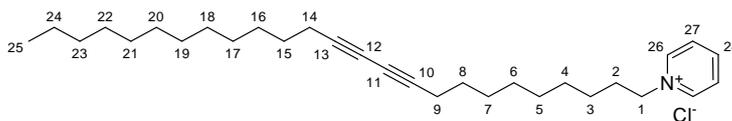
M = 379,1 g.mol⁻¹

Rendement : 73%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 3,52 (t, 2H, H₁, J₁₋₂=6,8 Hz) ; 2,23 (t, 4H, H_{9,14}, J₈₋₉ et J₁₄₋₁₅=6,8 Hz) ; 1,78 (quint, 2H, H₂, J₂₋₃=6,8 Hz) ; 1,54-1,26 (m, 32H, H₃ à 8 et H₁₅ à 24) ; 0,88 (t, 3H, H₂₅, J₂₅₋₂₄=6,8 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 77,3 (2C, C_{10,13}) ; 65,3 (2C, C_{11,12}) ; 45,0 (1C, C₁) ; 32,6-28,2 (15C, C₂ et C₄ à 8 et C₁₅ à 23) ; 26,8 (1C, C₃) ; 22,6 (1C, C₂₄) ; 19,1 (2C, C_{9,14}) ; 14,1 (1C, C₂₅).

SM (ESI+) : m/e : 380 [M+H]⁺

Chlorure de 1-pentacosa-10,12-diynyl-pyridinium, **II-8**

Une solution de **II-7** (1,6 g; 4,2 mmoles) dans 30 mL de pyridine fraîchement distillée est chauffée à 100°C pendant 20 heures sous azote. Du charbon actif est ajouté à température ambiante et le milieu est agité pendant 30 minutes avant d'être chauffé pendant 1 heure à 80°C. La solution est filtrée à chaud sur célite et le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu est dilué dans un faible volume de CH₂Cl₂ et versé dans un grand volume d'Et₂O. Un précipité beige est observé. Il est récupéré par centrifugation et séché sous vide. 1,64 g du composé **II-8** sont obtenus sous forme d'une poudre beige.

Formule brute : C₃₀H₄₈ClN

M = 458,2 g.mol⁻¹

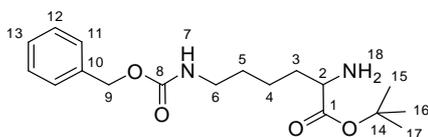
Rendement : 85%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 9,58 (m, 2H, H₂₆) ; 8,51 (m, 1H, H₂₈) ; 8,15 (m, 2H, H₂₇) ; 5,05 (m, 2H, H₁) ; 2,24 (m, 4H, H_{9,14}) ; 2,04 (m, 2H, H₂) ; 1,54-1,19 (m, 32H, H_{3 à 8} et H_{15 à 24}) ; 0,88 (t, 3H, H₂₅, J₂₅₋₂₄=6,4 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 151,6 (1C, C₂₈) ; 146,6 (2C, C₂₆) ; 135,3 (2C, C₂₇) ; 77,5 (2C, C_{10,13}) ; 72,4 (1C, C₁) ; 65,2 (2C, C_{11,12}) ; 31,9-28,0 (16C, C_{2 à 8} et C_{15 à 23}) ; 22,7 (1C, C₂₄) ; 19,3 (2C, C_{9,14}) ; 14,2 (1C, C₂₅).

SM (ESI+) : m/e : 422 [M-Cl]⁺

I.2. Résultats expérimentaux du chapitre III

Ester tert-butylique de l'acide 2-amino-6-benzyloxycarbonylamino-hexanoïque, **III-1**

A une solution de 2-méthylpropène (800 mg ; 14,26 mmoles ; 4 éq.), obtenue par condensation à -78°C du gaz correspondant, est additionnée une solution de *N*⁶-carbobenzyloxy-L-lysine (1 g ; 3,6 mmoles, 1 éq.) dans 20 mL de dioxane et 1 mL d'acide sulfurique concentré. Le milieu est ensuite agité à reflux du 2-méthylpropène pendant 8 heures avec un montage surmonté d'un condensateur. La solution est concentrée sous pression réduite. 811 mg du composé **III-1** sont obtenus sous la forme d'une huile.

Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_4$

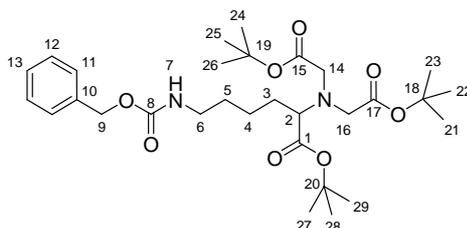
M = 336,4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : 67%

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 7,36 (m, 5H, H_{11} à H_{13}) ; 5,15 (m, 2H, H_9) ; 4,89 (m, 1H, H_7) ; 3,25 (t, 1H, H_2 , $J_{2-3}=6,8$ Hz) ; 3,18 (m, 2H, H_6) ; 1,81-1,36 (m, 15H, H_3 à H_5 et H_{15} à H_{17}).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 176,1 (1C, C_1) ; 157,4 (1C, C_8) ; 135,8 (1C, C_{10}) ; 128,5-128,1 (5C, C_{11} à C_{13}) ; 81,2 (1C, C_{14}) ; 67,0 (1C, C_2) ; 66,1 (1C, C_9) ; 41,7 (1C, C_6) ; 35,4 (1C, C_3) ; 29,2 (1C, C_5) ; 27,5 (3C, C_{15} à C_{17}) ; 22,3 (1C, C_4).

SM (ESI+) : m/e : 337 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 359 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Ester tert-butylique de l'acide 6-benzyloxycarbonylamino-2-(bis-tert-butoxycarbonylméthyl-amino)-hexanoïque, **III-2**

A une solution de l'amino ester **III-1** (600 mg ; 1,8 mmoles, 1 éq.) dans 30 mL de DMF est ajoutée de la triéthylamine (2,5 mL ; 10 éq.) et du bromoacétate de *tert*-butyle (6,6 mL ; 25 éq.). La solution est agitée sous azote à 80°C pendant 12 heures puis évaporée avant d'être repris avec 30 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec de l'eau et une solution saturée de NaCl et les phases aqueuses sont extraites une fois avec du CH₂Cl₂. Les phases organiques sont réunies, séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous pression réduite. 1 g du composé **III-2** est obtenu sous la forme d'une huile.

Formule brute : C₃₀H₄₈N₂O₈

M = 564,7 g.mol⁻¹

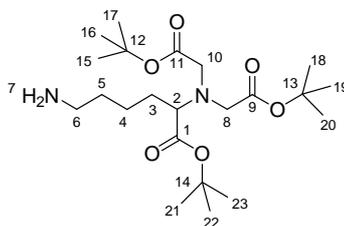
Rendement : 80%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 7,31 (m, 5H, H₁₁ à 13) ; 5,2 (m, 1H, H₇) ; 5,08 (s, 2H, H₉) ; 3,46-3,45 (m, 4H, H_{14,16}) ; 3,30 (t, 1H, H₂, J₂₋₃=7,4 Hz) ; 3,19 (m, 2H, H₆) ; 1,66-1,43 (m, 33H, H₃ à 5 et H₂₁ à 29).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 172,2 (1C, C₁) ; 170,5 (2C, C_{15,17}) ; 156,3 (1C, C₈) ; 136,7 (1C, C₁₀) ; 128,3-127,7 (5C, C₁₁ à 13) ; 80,9 (1C, C₂₀) ; 80,5 (2C, C_{18,19}) ; 66,2 (1C, C₂) ; 64,9 (1C, C₉) ; 53,7 (2C, C_{14,16}) ; 40,6 (1C, C₆) ; 30 (1C, C₅) ; 29 (1C, C₃) ; 27,9 (9C, C₂₁ à 29) ; 22,8 (1C, C₄).

SM (ESI+) : m/e : 565 [M+H]⁺

Ester tert-butylique de l'acide 6-amino-2-(bis-tert-butoxycarbonylméthyl-amino)-
hexanoïque, **III-3**



A une solution l'acide **III-2** (0,5 g ; 0,89 mmoles ; 1éq.) dans 20 mL de MeOH est additionnée du palladium sur charbon (50 mg ; 10% de Pd). La solution est purgée 3 fois avec de l'azote puis 3 fois avec de l'hydrogène et est agitée sous atmosphère d'hydrogène à température ambiante pendant 12 heures. 287 mg du composé **III-3** sont obtenus sous forme d'une huile claire.

Formule brute : $C_{22}H_{42}N_2O_6$

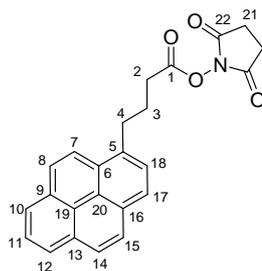
M = 430,6 g.mol⁻¹

Rendement : 75%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 4,02 (m, 2H, H₇) ; 3,44 (m, 4H, H_{8,10}) ; 3,30 (t, 1H, H₂, J₂₋₃=7,6 Hz) ; 2,77 (m, 2H, H₆) ; 1,68-1,43 (m, 33H, H_{3 à 5} et H_{15 à 20}).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 172,0 (1C, C₁) ; 170,7 (2C, C_{9,11}) ; 81,1 (1C, C₁₄) ; 80,8 (2C, C_{11,13}) ; 64,7 (1C, C₂) ; 53,6 (2C, C_{8,10}) ; 39,6 (1C, C₆) ; 29,7 (1C, C₅) ; 26,9 (1C, C₃) ; 22,7 (1C, C₄).

SM (ESI+) : m/e : 431 [M+H]⁺

4-(pyrène-1-yl)butanoate de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yle, **III-4**

A une solution d'acide 1-pyrènebutyrique (313 mg ; 1,09 mmoles ; 1 éq.) dans 30 mL de CH_2Cl_2 anhydre est additionnée de l'EDCI (312 mg ; 1,5 éq.) et du NHS (187 mg ; 1,5 éq.). Le mélange est agité une nuit sous azote à température ambiante. Le milieu est traité avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 et les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. 418 mg du composé **III-4** est obtenu sous forme d'un solide blanc.

Formule brute : $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{NO}_4$

M = 385,4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : Quantitatif

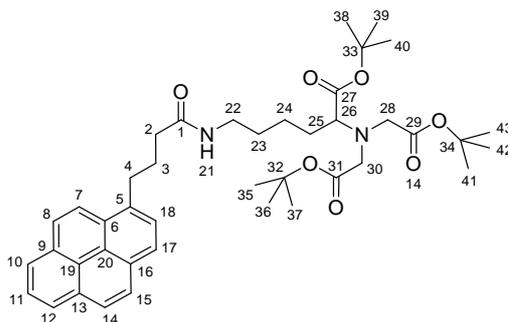
RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 8,31-7,88 (m, 9H, H_{arom}) ; 3,48 (t, 2H, H_4 , $J_{4-3} = 7,6$ Hz) ; 2,85 (m, 4H, H_{21}) ; 2,75 (t, 2H, H_2 , $J_{2-3} = 7,2$ Hz) ; 2,31 (quint, 2H, H_3 , $J_{3-2} = 7,2$ Hz et $J_{3-4} = 7,6$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 170,5 (2C, C_{21}) ; 168,7 (1C, C_1) ; 136,2-123,5 (16C, C_5 à C_{20}) ; 31,4 (1C, C_2) ; 30,1 (1C, C_4) ; 26,6 (1C, C_3) ; 25,4 (1C, C_{22}).

SM (ESI+) : m/e : 386 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3070 (f) ; 2920 (f) ; 1939 ; 1877 ; 1812 ; 1756 ; 1703 ; 1528 ; 1448 ; 1075 ; 743.

Ester tert-butylique de l'acide 2-(bis-tert-butoxycarbonylméthyl-amino)-6-(4-pyrène-1-ylbutanamido)-hexanoïque, **III-5**



A une solution de l'ester **III-4** (100 mg ; 0,26 mmoles ; 1 éq.) dans 30 mL de CH₂Cl₂ anhydre est ajoutée l'amine **III-3** (134 mg ; 1,2 éq.) et 2 mL triéthylamine anhydre. Le mélange est agité à température ambiante pour une nuit sous azote. Une solution aqueuse saturée en NaCl est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec un volume de CH₂Cl₂ et les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt / cyclohexane : 40/60). 155 mg du composé **III-5** sont obtenus sous forme d'une huile jaune.

Formule brute : C₄₂H₅₆N₂O₇

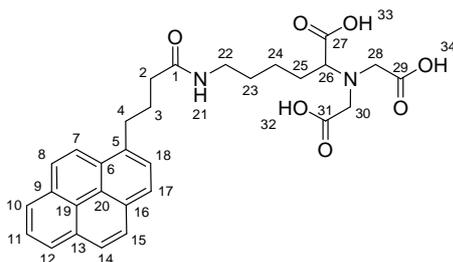
M = 700,9 g.mol⁻¹

Rendement : 85%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 8,31-7,84 (m, 9H, H_{arom}) ; 6,20 (m, 1H, H₂₁) ; 3,46 (m, 4H, H_{28,30}) ; 3,37 (t, 2H, H₂₆, J₂₆₋₂₅=8 Hz) ; 3,32 (t, 2H, H₄, J₄₋₃=7,4 Hz) ; 3,23 (m, 2H, H₂₂) ; 2,33 (t, 2H, H₂, J₂₋₃=7,4 Hz) ; 2,2 (quint, 2H, H₃, J_{3-2,4}=7,4 Hz) ; 1,65-1,36 (m, 33H, H_{23 à 25} et H_{35 à 43}).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 172,9 (1C, C₁) ; 169,8 (3C, C_{27,29,31}) ; 136,1-123,4 (16C, C_{5 à 20}) ; 80,4 (3C, C_{32 à 34}) ; 66,5 (1C, C₂₆) ; 53,9 (2C, C_{28,30}) ; 37,6 (1C, C₂₂) ; 31,1 (1C, C₂) ; 30,6 (1C, C₄) ; 30,2 (1C, C₂₅) ; 29,3 (1C, C₂₃) ; 27,9 (9C, C_{35 à 43}) ; 27,2 (1C, C₃) ; 23,2 (1C, C₂₄).

SM (ESI+) : m/e : 701 [M+H]⁺

Acide 2-(bis-carboxyméthyl-amino)-6-(4-pyrène-1-yl)-butanamide, **III-6**

A une solution du composé **III-5** (150 mg ; 0,21 mmoles ; 1 équ.) dans 10 mL de CH_2Cl_2 anhydre est ajoutée 2 mL d'acide trifluoroacétique. La solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures sous azote puis concentrée sous pression réduite. Le brut obtenu est propre. 103 mg du composé **III-6** sont obtenus sous forme d'un solide jaune.

Formule brute : $\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_7$

M = 532,6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

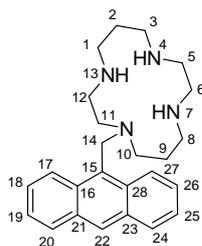
Rendement : 92%

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 8,30-7,80 (m, 9H, H_{arom}) ; 3,51 (m, 4H, $\text{H}_{28,30}$) ; 3,35 (m, 4H, $\text{H}_{4,26}$) ; 3,12 (t, 2H, H_{22} , $J_{22-23}=6,6$ Hz) ; 2,28 (t, 2H, H_2 , $J_{2-3}=7,2$ Hz) ; 2,12 (m, 2H, H_3), 1,75-1,36 (m, 6H, H_{23} à 25).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 173,2 (1C, C_1) ; 169,8 (3C, $\text{C}_{27,29,31}$) ; 135,8-123,4 (16C, C_5 à 20) ; 64,5 (1C, C_{26}) ; 54,6 (2C, $\text{C}_{28,30}$) ; 38,6 (1C, C_{22}) ; 32,1 (1C, C_2) ; 31,1 (1C, C_4) ; 30,3 (1C, C_{25}) ; 27,9 (1C, C_{23}) ; 27,2 (1C, C_3) ; 25,1 (1C, C_{24}).

SM (ESI+) : m/e : 533 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 555 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3343 (F) ; 3046 (f) ; 2932 (f) ; 1942 ; 1865 ; 1826 ; 1751 ; 1643 ; 1532 ; 1473 ; 1224 ; 832 ; 742.

1-Anthracèn-9-ylméthyl-1, 4, 8, 11-tetraaza-cyclotétradécane, **III-7**

A une solution de 1, 4, 8, 11-tetraaza-cyclotétradécane (250 mg ; 1,25 mmoles ; 4 éq.) dans 30 mL de THF est ajoutée une solution de 9-chlorométhyl anthracène (70,5 mg ; 1éq.) dans 20 mL de toluène. La solution est agitée et chauffée à 65°C pendant 2 jours. Le brut est évaporé sous pression réduite. Le produit désiré est obtenu par précipitation dans l'EtOH à froid avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique (10% dans l'eau). Il est récupéré par centrifugation puis séché sous vide. 100 mg du composé **III-7** sont obtenus sous forme d'une poudre jaune clair.

Formule brute : $C_{25}H_{34}N_4$

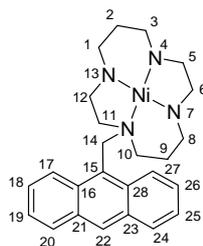
M = 390,6 g.mol⁻¹

Rendement : Quantitatif

RMN ¹H (D₂O, δ en ppm) : 8,36 (s, 1H, H₂₂) ; 8,03 (d, 2H, H_{17,27}, J₁₇₋₁₈ et J₂₇₋₂₆=8,8 Hz) ; 7,95 (d, 2H, H_{20,24}, J₂₀₋₁₉ et J₂₄₋₂₅=8,4 Hz) ; 7,65 (t, 2H, H_{18,26}, J₁₈₋₁₇ et J₂₆₋₂₇=8,8 Hz et J₁₈₋₁₉ et J₂₆₋₂₅=6,8 Hz) ; 7,53 (t, 2H, H_{19,25}, J₁₉₋₂₀ et J₂₅₋₂₄=8,4 Hz et J₁₉₋₁₈ et J₂₅₋₂₆=6,8 Hz) ; 4,79 (s, 2H, H₁₄) ; 3,53 (m, 6H, H_{5,6,12}) ; 3,31 (m, 6H, H_{1,3,8}) ; 3,2 (m, 4H, H_{10,11}) ; 2,1 (m, 4H, H_{2,9}).

RMN ¹³C (D₂O, δ en ppm) : 130,9-126,7 (14C, C₁₅ à 28) ; 65,3 (1C, C₁₄) ; 55,3 (1C, C₁₀) ; 53,2 (1C, C₁₁) ; 46,3-42,8 (6C, C_{1,3,5,6,8,12}) ; 24,1 (1C, C₉) ; 22,3 (1C, C₂).

SM (ESI+) : m/e : 391 [M+H]⁺

Complexe de nickel du composé **III-7**, **III-8**

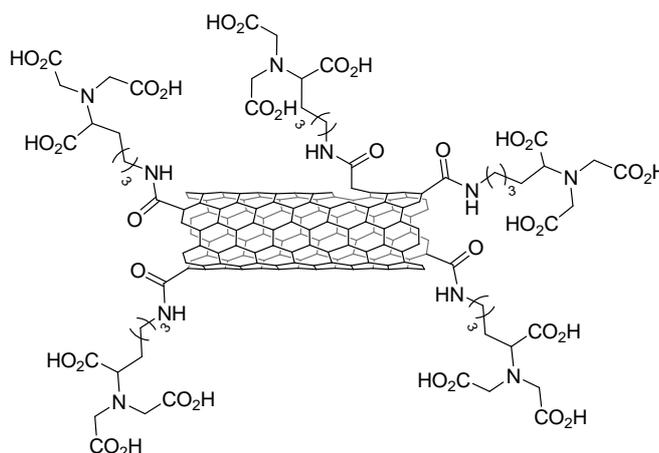
A une solution du composé **III-7** (20 mg ; 0,05 mmoles ; 1 éq.) dans 2 mL d'eau est ajoutée des cristaux de NiSO₄, 7H₂O (14,4 mg, 1 éq.). La solution est agitée pendant 30 minutes. Le produit formé **III-8** est soluble dans l'eau et identifié directement par RMN.

Formule brute : C₂₅H₃₄N₄Ni

M = 447,3 g.mol⁻¹

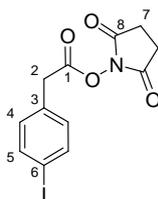
Rendement : Quantitatif

RMN ¹H (D₂O, δ en ppm) : 8,41 (s, 1H, H₂₂) ; 8,04 (d, 2H, H_{17,27}, J₁₇₋₁₈ et J₂₇₋₂₆=8,8 Hz) ; 7,94 (d, 2H, H_{20,24}, J₂₀₋₁₉ et J₂₄₋₂₅=8,4 Hz) ; 7,55 (t, 2H, H_{18,26}, J₁₈₋₁₇ et J₂₆₋₂₇=8,8 Hz et J₁₈₋₁₉ et J₂₆₋₂₅=6,8 Hz) ; 7,44 (t, 2H, H_{19,25}, J₁₉₋₂₀ et J₂₅₋₂₄=8,4 Hz et J₁₉₋₁₈ et J₂₅₋₂₆=6,8 Hz) ; 4,79 (s, 2H, H₁₄) ; 3,27-2,9 (m, 16H, H_{1,3,5,6,8,10,11,12}) ; 1,85 (m, 4H, H_{2,9}).

Nanotubes de carbone MWNTs (n-Tec) fonctionnalisés avec **II-2**, **III-14**

Une suspension de 6 mg de nanotubes de carbone MWNTs (n-Tec) dans 15 mL d'acide sulfurique concentré et 5 mL d'acide nitrique (69%) est soniquée puis chauffée à 100°C pendant 24 heures. 60 mL d'eau sont ensuite ajoutés au mélange à 0°C. La suspension est filtrée sur une membrane Millipore® (Mitex™ PTFE, Ø = 5 µm). Le solide est lavé abondamment à l'eau, puis avec une solution d'acide chlorhydrique 10%. Il est ensuite séché sous vide dans un dessiccateur en présence de P₂O₅. Du chlorure de thionyle (2 mL) fraîchement distillé, ainsi que du DMF (50 µL) sont additionnés au solide résultant. La suspension est chauffée à 70°C pendant 24 heures. Le mélange est ensuite centrifugé (9000 tours/min, 5 min) et le culot séché sous vide. Le solide résultant est ajouté à l'amine **II-2** (200 mg) et le mélange est chauffé pendant 48 heures. Le milieu est ensuite dispersé dans de l'éthanol (6 mL) dans un bain à ultrasons (19 W), puis centrifugé (9000 tours/min, 5 min). La séquence de lavage est répétée 5 fois. Le solide est séché sous vide. 9,2 mg des nanotubes **III-14** sont obtenus sous la forme d'un solide noir.

ATR-IR (cm⁻¹): 2959 et 2921 (m, ν C-H alkyle); 1750-1700 (F, ν C=O acide)

2-(4-iodophényl)acétate de 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl, **III-15**

A une solution d'acide 4-iodophénylacétique (1,1 g ; 3,82 mmoles ; 1 éq.) dans 30 mL de CH_2Cl_2 anhydre est additionnée de l'EDCI (1,2 g ; 1,5 éq.) et du NHS (720 mg ; 1,5 éq.). Le mélange est agité une nuit sous azote à température ambiante. Le milieu est traité avec de l'eau. La phase aqueuse est extraite au CH_2Cl_2 et les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. 1,5 g du composé **III-15** sont obtenus sous forme d'un solide blanc.

Formule brute : $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{INO}_4$

M = 359,1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

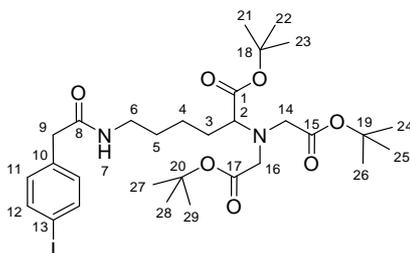
Rendement : Quantitatif

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 7,68 (d, 2H, H_5 , $J_{4-5}=8,4$ Hz) ; 7,08 (d, 2H, H_4 , $J_{4-5}=8,4$ Hz) ; 3,87 (s, 2H, H_2) ; 2,82 (s, 4H, H_7).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 178,6 (1C, C_1) ; 170,5 (2C, C_8) ; 139,4 (2C, C_5) ; 132,4 (1C, C_3) ; 131,2 (2C, C_4) ; 91,3 (1C, C_6) ; 39,4 (1C, C_2) ; 24,8 (2C, C_7).

SM (ESI+) : m/e : 360 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Ester tert-butyle de l'acide 2-(bis-tert-butoxycarbonylméthyl-amino)-6-[2-(4-iodophényl)-acétamido]-hexanoïque, **III-16**



A une solution du iodo ester **III-15** (890 mg ; 2,48 mmoles ; 1 éq.) dans 30 mL de CH_2Cl_2 anhydre est ajoutée l'amine **III-3** (1,4 g ; 1,3 éq.) et de la diisopropyléthylamine anhydre (1,5 mL ; 3,5 éq.). Le mélange est agité à température ambiante pour une nuit sous azote. Une solution aqueuse saturée en NaCl est ajoutée. La phase aqueuse est extraite avec un volume de CH_2Cl_2 et les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt / cyclohexane : 30/70). 1,2 g du composé **III-16** sont obtenus sous forme de huile jaune clair.

Formule brute : $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{IN}_2\text{O}_7$

M = 674,6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

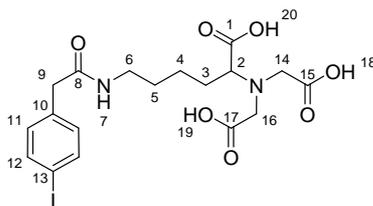
Rendement : 72%

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 7,62 (d, 2H, H_{12} , $J_{12-11}=8,0$ Hz) ; 7,05 (d, 2H, H_{11} , $J_{11-12}=8,0$ Hz) ; 6,21 (m, 1H, H_7) ; 3,48 (s, 2H, H_9) ; 3,44-3,42 (m, 4H, $\text{H}_{14,16}$) ; 3,27 (m, 2H, H_6) ; 3,15 (m, 1H, H_2) ; 1,62 (m, 2H, H_3) ; 1,53-1,43 (m, 31H, $\text{H}_{4,5}$ et H_{21} à 29).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 171,6 (1C, C_8) ; 169,5 (3C, $\text{C}_{1,15,17}$) ; 139,4 (2C, C_{12}) ; 135,2 (1C, C_{10}) ; 130,9 (2C, C_{11}) ; 81,1 (3C, C_{18} à 20) ; 73,5 (1C, C_2) ; 56,7 (2C, $\text{C}_{14,16}$) ; 43,3 (1C, C_9) ; 38,1 (1C, C_6) ; 30,6 (1C, C_4) ; 29,2 (1C, C_5) ; 27,9 (10C, C_3 et C_{21} à 29) ; 23,2 (1C, C_4).

SM (ESI+) : m/e : 675 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Acide 2-(bis-carboxyméthyl-amino)-6-[2-(4-iodophényl)-acétamido]-hexanoïque, **III-17**



A une solution du iodo ester **III-16** (1 g ; 1,48 mmoles ; 1 éq.) dans 20 mL de CH_2Cl_2 anhydre est ajoutée 5 mL d'acide trifluoroacétique. La solution est agitée à température ambiante pendant 2 heures sous azote puis concentrée sous pression réduite. Le brut obtenu est propre. 667 mg du composé **III-17** sont obtenus sous forme d'un solide beige visqueux.

Formule brute : $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{IN}_2\text{O}_7$

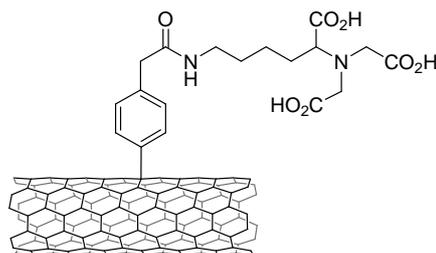
M = 506,3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : 89%

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 7,64 (d, 2H, H_{12} , $J_{12-11}=8,2$ Hz) ; 7,09 (d, 2H, H_{11} , $J_{11-12}=8,2$ Hz) ; 4,27-4,06 (m, 5H, $\text{H}_{2,14,16}$) ; 3,47 (s, 2H, H_9) ; 3,21 (m, 2H, H_6) ; 1,57 (m, 6H, $\text{H}_{3,4,5}$).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 171,8 (1C, C_8) ; 169,5 (3C, $\text{C}_{1,15,17}$) ; 139,6 (2C, C_{12}) ; 135,1 (1C, C_{10}) ; 131,2 (2C, C_{11}) ; 74,8 (1C, C_2) ; 57,7 (2C, $\text{C}_{14,16}$) ; 43,3 (1C, C_9) ; 38,2 (1C, C_6) ; 30,8 (1C, C_4) ; 29,1 (1C, C_5) ; 28,2 (10C, C_3) ; 23,1 (1C, C_4).

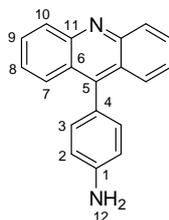
SM (ESI+) : m/e : 507 $[\text{M}+\text{H}]^+$

Nanotubes MWNTs (n-Tec) fonctionnalisés avec **III-17**, **III-18**

De l'ammoniac gaz est condensé (~ 40 mL) dans un ballon contenant 20 mg de MWNTs (1,67 mmoles de carbone) à -78°C . La solution est homogénéisée en utilisant de manière rapide un bain sonicant. Puis du lithium est ajouté (30 mg, 2,6 éq.) et la solution devient bleue. Après 20 minutes d'agitation, l'iodure d'aryle **III-17** (170 mg, 0,2 éq.) est additionné et le milieu réactionnel est encore agité une heure à -78°C . Deux additions supplémentaires d'iodure d'aryle **III-17** (170 mg, 0,2 éq.) sont effectuées sur une période de 4 heures. Enfin, la réaction est laissée remonter à température ambiante avec un système de distillation pour 2 heures. Après évaporation de l'ammoniaque les nanotubes sont lavés successivement avec du MeOH, de l'eau, du DMF, de l'acétone et de l'éther.

ATR-IR (cm^{-1}): 2972 et 2941 (m, $\nu_{\text{C-H alkyle}}$); 1750-1700 (F, $\nu_{\text{C=O acide}}$)

I.3. Résultats expérimentaux du chapitre IV

9-(4-Aminophényl)acridine, **IV-2**

A une solution d'acridine (1,57 g ; 9,2 mmoles ; 1 éq. ; *prélevée en boîte à gants*) dans 25 mL d'EtOH est bullée de l'acide chlorhydrique gazeux pendant 15 minutes jusqu'à observation d'une coloration brune de la solution et apparition d'un précipité. Le milieu est évaporé sous pression réduite. Au solide résultant est ajouté, *en boîte à gants*, de l'aniline (1,68 mL ; 2 éq.) et de l'AgCl (3,96 g ; 3 éq.). Le milieu est chauffé à 130°C pendant 14 heures sous une forte agitation magnétique. Le solide noir résultant est lavé abondamment avec de l'Et₂O. Le solide est ensuite dissous dans 50 mL d'une solution d'acide chlorhydrique à 10%. La phase aqueuse est extraite 4 fois avec de l'Et₂O. Le pH des phases aqueuses réunies est ajusté 8,5 à l'aide d'une solution aqueuse d'ammoniaque (28%). Le précipité jaune formé est filtré sur une membrane Millipore® (Mitex™ PTFE, Ø = 5 µm). Le solide est lavé avec de l'eau, puis séché sous vide dans un dessiccateur en présence de P₂O₅. 1,7 g du composé **IV-2** sont obtenus sous la forme d'une poudre jaune brun. Le produit peut-être recristallisé à chaud dans une solution d'éthanol pour fournir des cristaux bruns.

Formule brute : C₁₉H₁₄N₂

M = 270,3 g.mol⁻¹

Rendement : 50%

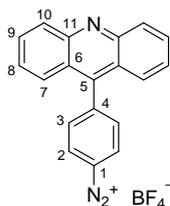
CCM : R_f = 0,20 (AcOEt / cyclohexane : 20 / 80)

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 8,26 (d, 2H, H₁₀, J₁₀₋₉=8,8 Hz) ; 7,84 (d, 2H, H₇, J₇₋₈=8,8 Hz) ; 7,76 (m, 2H, H₉) ; 7,42 (m, 2H, H₈) ; 7,24 (d, 2H, H₃, J₃₋₂ = 6,4 Hz) ; 6,91 (d, 2H, H₂, J₂₋₃=6,4 Hz) ; 3,93 (s, 2H, H₁₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 148,8-146,6 (3C, C_{1,5,11}) ; 131,7-125,3 (7C, C_{3 à 10}) ; 114,8 (1C, C₂).

SM (ESI+) : m/e : 271 [M+H]⁺

IR (NaCl, cm⁻¹) : 3463 (f) ; 3316 (m) ; 3208 (m) ; 3037 (f) ; 1630 (F) ; 1604 (m) ; 1515 (m) ; 1412 (m) ; 1288 (m) ; 821 (m) ; 760 (F).

Tétrafluoroborate de 9-phénylacridinediazonium, **IV-3**

A une solution de nitrosonium de tétrafluoroborate NOBF_4 (526,3 mg ; 4,5 mmoles ; 1,4 éq.) dans 5 mL d'acétonitrile anhydre à -30°C est additionnée, goutte à goutte, une solution de l'amine **IV-2** (870 mg ; 1 éq.) dans un mélange de 5 mL d'acétonitrile anhydre et 1 mL de CH_2Cl_2 anhydre. Le milieu est agité pendant 1 heure à -30°C , puis la réaction est laissée revenir à température ambiante pendant 1 heure. De l' Et_2O est ajouté et un précipité se forme. Celui-ci est filtré sur une membrane Millipore® (Mitex™ PTFE, $\text{Ø} = 5 \mu\text{m}$). Le solide résultant est lavé avec de l' Et_2O et séché sous vide dans un dessiccateur. 1,19 g du produit **IV-3** est obtenu sous la forme d'une poudre jaune.

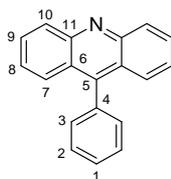
Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{BF}_4\text{N}_3$

M = 369,1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : quantitatif

RMN ^1H (CD_3CN , δ en ppm) : 8,80 (d, 2H, H_{arom} , $J=8,4$ Hz) ; 8,41 (d, 2H, H_{arom} , $J=8,8$ Hz) ; 8,23 (t, 2H, H_9 , $J=7,8$ Hz) ; 8,08 (d, 2H, H_{arom} , $J=8,4$ Hz) ; 7,82 (m, 2H, H_8) ; 7,71 (d, 2H, H_{arom} , $J=8,8$ Hz).

IR (KBr, cm^{-1}) : 3122 (m) ; 3092 (m) ; 3058 (m) ; 2295 (m) ; 1641 (m) ; 1585 (m) ; 1050 (F) ; 758 (m).

9-Phénylacridine, **IV-4**

A une solution de nitrosonium de tétrafluoroborate NOBF_4 (465 mg ; 1,24 mmoles ; 1,4 éq.) dans 10 mL de CH_2Cl_2 anhydre à 0°C est additionnée goutte à goutte une solution de l'amine **IV-2** (810 mg ; 1 éq.) dans 10 mL de CH_2Cl_2 anhydre. Le mélange est agité pendant 1 heure à 0°C . Une solution d'acide hypophosphoreux H_3PO_2 (5 mL ; 50% en masse dans l'eau) est ensuite ajoutée, ainsi qu'une quantité catalytique de Cu_2O . Le milieu est agité pendant 1 heure à température ambiante. Une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 est additionnée. La phase aqueuse est extraite 3 fois au CH_2Cl_2 . Les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. 760 mg du composé **IV-4** sont obtenus sous la forme de cristaux aiguilles jaune pâle. Le produit présente une très bonne pureté qui ne nécessite pas de purification supplémentaire.

Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{N}$

M = 255,3 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : quantitatif

CCM : $R_f = 0,50$ (AcOEt / cyclohexane : 20 / 80)

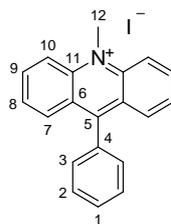
RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 8,29 (d, 2H, H_{10} , $J_{9-10}=8,8$ Hz) ; 7,78 (t, 2H, H_9 , $J_{9-8,10}=7,6$ Hz) ; 7,71 (d, 2H, H_7 , $J_{7-8}=8,8$ Hz) ; 7,58-7,64 (m, 3H, $\text{H}_{1,2}$ et H_3 ou H_8) ; 7,41-7,46 (m, 4H, H_2 et H_3 ou H_8).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 148,5 (2C, C_{11}) ; 135,7 (1C, C_4 ou C_5) ; 130,2-124,9 (16C, C_1 à 3, C_4 ou C_5 , C_6 à 10).

SM (ESI+) : m/e : 256 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 3043; 1539; 1512; 1436; 1412; 756; 703.

Pf : 182,0-183,1 $^\circ\text{C}$

Iodure de 10-méthyl-9-phénylacridinium, **IV-5**

A une solution de iodure de méthyle (10 mL) est ajouté, sous azote, le composé **IV-4** (20 mg ; 0,78 mmoles). Le milieu est agité et chauffé à reflux pendant 3 jours. La solution est refroidie et une partie du volume est évaporée. Le produit désiré est précipité dans 50 mL d'Et₂O. Il est récupéré par centrifugation puis séché sous vide. 23,3 mg du composé **IV-5** sont obtenus sous la forme d'une poudre jaune orangé.

Formule brute : C₂₀H₁₆IN

M = 397,2 g.mol⁻¹

Rendement : 75%

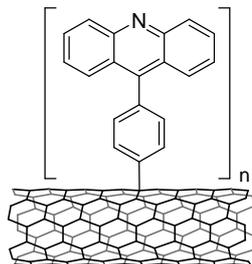
RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 8,90 (d, 2H, H₁₀, J₉₋₁₀=9,2 Hz) ; 8,41 (t, 2H, H₉, J_{9-8,10}=7,6 Hz) ; 7,96 (d, 2H, H₃, J₃₋₂=8,8 Hz) ; 7,78 (t, 2H, H₈, J_{8-9,7}=7,6 Hz) ; 7,70 (m, 3H, H_{1,2}) ; 7,45 (d, 2H, H₇, J₇₋₈=7,6 Hz) ; 5,15 (s, 3H, H₁₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 161,1 (1C, C₅) ; 141,5 (1C, C₄) ; 139,2 (2C, C₁₁) ; 132,9 (1C, C₁) ; 130,4 (2C, C₂) ; 129,9-128,9 (6C, C_{3,8,9}) ; 127,9 (2C, C₆) ; 125,9 (2C, C₇) ; 119,4 (2C, C₁₀) ; 54,2 (1C, C₁₂).

SM (ESI+) : m/e : 270 [M-I]⁺

IR (NaCl, cm⁻¹) : 3484, 1609, 1578, 1550, 1454, 1380, 1251, 1225, 1009, 763

Nanotubes de carbone (HiPCO) fonctionnalisés avec le sel de diazonium de **IV-2** généré in situ, **IV-6**



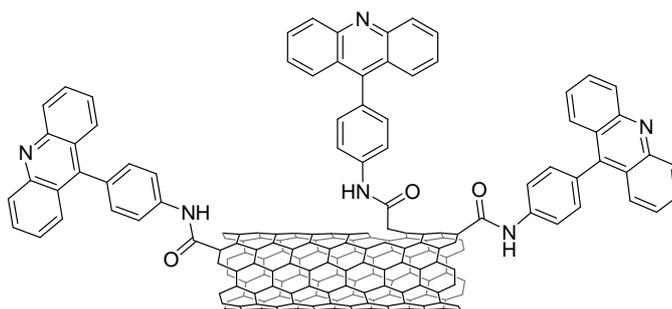
Des nanotubes de carbone HiPCO (1 mg ; 0,083 mmoles de carbone) sont dispersés dans 0,6 mL d'*o*-dichlorobenzène dans un bain à ultrasons (19 W) pendant 30 minutes. A cette suspension est ajoutée une solution de l'amine **IV-2** (106 mg ; 2,95 éq.) dans 0,3 mL d'acétonitrile. De l'azote est ensuite bullé dans le milieu pendant 10 minutes. Puis du nitrite d'isoamyle (21 μL ; 1,9 éq.) est ajouté et le milieu est chauffé à 60°C pendant 14 heures. Après l'ajout d'éthanol, le mélange est centrifugé (9000 tours/min, 10 min) et le surnageant est éliminé. La séquence est répétée 5 fois. Le solide est séché sous vide pour fournir 1,45 mg de **IV-6** sous la forme d'un solide noir.

Raman (1064 nm, ν en cm^{-1}): 268, 1276, 1592, 2543; $I_{\text{D}}/I_{\text{G}} = 0,49$.

(HiPCO natifs (ν en cm^{-1}): 265, 1276, 1592, 2544; $I_{\text{D}}/I_{\text{G}} = 0,11$).

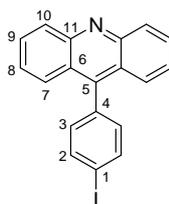
UV-Vis-NIR: disparition des absorptions liées aux transitions électroniques entre singularités de van Hove.

Nanotubes de carbone MWNTs (n-Tec) fonctionnalisés avec l'amine **IV-2**, **IV-8**



Une suspension de 6 mg de nanotubes de carbone MWNTs (n-Tec) dans 15 mL d'acide sulfurique concentré et 5 mL d'acide nitrique (69%) est soniquée puis chauffée à 100°C pendant 24 heures. 60 mL d'eau sont ensuite ajoutés au mélange à 0°C. La suspension est filtrée sur une membrane Millipore® (Mitex™ PTFE, Ø = 5 µm). Le solide est lavé abondamment à l'eau, puis avec une solution d'acide chlorhydrique 10%. Il est ensuite séché sous vide dans un dessiccateur en présence de P₂O₅. Du chlorure de thionyle (2 mL) fraîchement distillé, ainsi que du DMF (50 µL) sont additionnés au solide résultant. La suspension est chauffée à 70°C pendant 24 heures. Le mélange est ensuite centrifugé (9000 tours/min, 5 min) et le culot séché sous vide. Le solide résultant est ajouté à l'amine **IV-2** (100 mg) et le mélange est chauffé pendant 48 heures. Le milieu est ensuite dispersé dans de l'éthanol (6 mL) dans un bain à ultrasons (19 W), puis centrifugé (9000 tours/ min, 5 min). La séquence de lavage est répétée 5 fois. Le solide est séché sous vide. 9,2 mg des nanotubes **V-8** sont obtenus sous la forme d'un solide noir.

Fluorescence : présence d'une bande d'émission centrée à 450 nm et correspondant à l'acridine.

9-(4-Iodophényl)acridine, **IV-10**

A une solution du diazonium **IV-3** (873 mg ; 2,36 mmoles ; 1 équ.) dans 100 mL d'un mélange anhydre acétonitrile / CH_2Cl_2 (3/1) est ajoutée de l'iodure de tétrabutylammonium (960 mg ; 1,1 équ.). Le milieu est agité pendant 2 heures à température ambiante sous azote. La solution est traitée avec de l'eau et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 . Les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. Le résidu est repris dans l'acétone où le produit désiré précipite. Le précipité est filtré et séché sous vide. 720 mg du composé **IV-10** sont obtenus sous forme d'une poudre jaune.

Formule brute : $\text{C}_{19}\text{H}_{12}\text{IN}$

M = 381,2 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

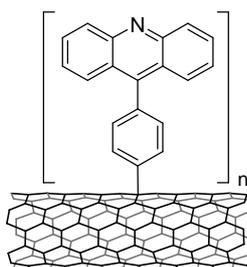
Rendement : 80 %

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 8,32 (d, 2H, H_{10} , $J_{9-10}=8,8$ Hz) ; 7,97 (d, 2H, H_2 , $J_{2-3}=7,2$ Hz) ; 7,80 (t, 2H, H_9 , $J_{9-8,10}=8\text{Hz}$) ; 7,69 (d, 2H, H_7 , $J_{7-8}=8,4$ Hz) ; 7,46 (t, 2H, H_8 , $J_{8-9,7}=7,6$ Hz) ; 7,45 (d, 2H, H_3 , $J_{2-3}=7,2$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 148,2 (1C, C_5) ; 137,5 (2C, C_{10}) ; 135,3 (1C, C_4) ; 132,2 (2C, C_2) ; 130,4 (2C, C_3) ; 129,3 (2C, C_7) ; 126,5, 126,0 (4C, C_8 et C_9) ; 124,8 (2C, C_6) ; 94,5 (1C, C_1).

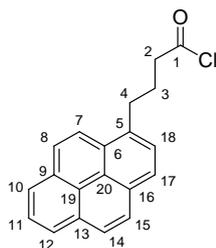
SM (ESI+) : m/e : 382 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR (KBr, cm^{-1}) : 1604; 1587; 1514; 1475; 1434; 1093; 1009; 810; 755.

Nanotubes de carbone MWNTs (n-Tec) fonctionnalisés avec **IV-10**, **IV-11**

De l'ammoniac gaz est condensé (~ 40 mL) dans un ballon contenant 20 mg de MWNTs (1,67 mmoles de carbone) à -78°C . La solution est homogénéisée en utilisant de manière rapide un bain sonicant. Puis du lithium est ajouté (30 mg, 2,6 éq.) et la solution devient bleue. Après 20 minutes d'agitation, l'iodure d'aryle **IV-10** (130 mg, 0,2 éq.) est additionné et le milieu réactionnel est encore agité une heure à -78°C . Deux additions supplémentaires d'iodure d'aryle **IV-10** (130 mg, 0,2 éq.) sont effectuées sur une période de 4 heures. Enfin, la réaction est laissée remonter à température ambiante avec un système de distillation pour 2 heures. Après évaporation de l'ammoniaque les nanotubes sont lavés successivement avec du MeOH, de l'eau, du DMF, de l'acétone et de l'éther.

Fluorescence : présence d'une bande d'émission centrée à 450 nm et correspondant à l'acridine.

Chlorure d'acide 4-(pyrène-1-yl)butanoïque, **IV-13**

A une solution d'acide 1-pyrènebutyrique (780 mg ; 2,71 mmoles ; 1 éq.) dans 50 mL de THF anhydre est additionnée, goutte à goutte, du chlorure d'oxalyle (350 μL ; 1,5 éq.). Le mélange est agité à température ambiante pendant une heure puis évaporé à sec sous pression réduite. 830 mg de composé **IV-13** sont obtenus sous la forme d'une poudre jaune.

Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClO}$

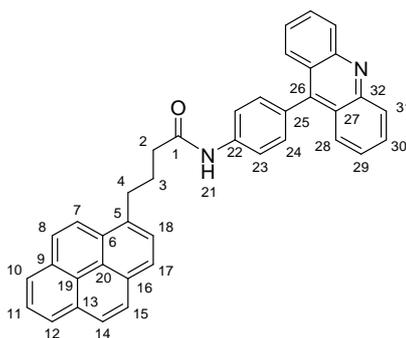
M = 306,8 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : 100%

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 8,24 à 8,00 (m, 8H, H_{arom}) ; 7,81 (d, 1H, H_{18} , $J_{18-17}=7,6$ Hz) ; 3,38 (t, 2H, H_4 , $J_{4-3}=7,6$ Hz) ; 2,99 (t, 2H, H_2 , $J_{2-3}=7,2$ Hz) ; 2,25 (quint, 2H, H_3 , $J_{3-2,4}=7,6$ et 7,2 Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 172,6 (1C, C_1) ; 136,1-123,0 (16C, C_{arom}), 46,3 (1C, C_2), 32,8 (1C, C_4), 25,8 (1C, C_3).

SM (ESI/+) : m/e : 308 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

N-(4-(Acridin-9-yl)phényl)-4-(pyrène-1-yl)butanamide, **IV-14**

A une solution de l'amine **IV-2** (90 mg ; 0,33 mmoles ; 1 éq.) dans 20 mL de THF anhydre est ajoutée une solution du chlorure d'acide **IV-13** (113 mg ; 0,37 mmoles ; 1,1 éq.) dans 20 mL de THF anhydre et 2 mL de triéthylamine. La solution est agitée et chauffée à reflux pendant 24 heures. Le milieu est évaporé sous pression réduite. Le résidu est repris dans 50 mL d'Et₂O et lavé 2 fois avec de l'eau et une solution saturée de NaCl. La phase aqueuse est extraite deux fois à l'Et₂O. Les phases organiques sont réunies puis séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : toluène/MeOH : 95/5). 116 mg du composé **IV-14** sont obtenus sous la forme d'un solide orange foncé.

Formule brute : C₃₉H₂₈N₂O

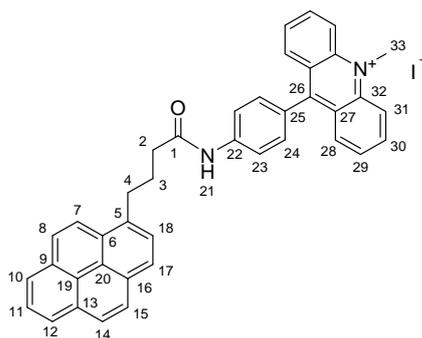
M = 540,7 g.mol⁻¹

Rendement : 65%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 8,37-7,38 (m, 21H, H_{arom}) ; 7,32 (s, 1H, H₂₁) ; 3,53 (t, 2H, H₄, J₄₋₃=7,2 Hz) ; 2,54 (t, 2H, H₂, J₂₋₃=7,2 Hz) ; 2,41 (quint, 2H, H₃, J_{3-2,4}=7,2 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 180,5 (1C, C₁) ; 147,6-120,4 (35C, C_{arom}) ; 37,2 (1C, C₂) ; 32,8 (1C, C₄) ; 27,4 (1C, C₃).

SM (ESI+) : m/e : 541 [M+H]⁺

Iodure de 10-méthyl-9-(4-(4-(pyrène-1-yl)butanamido)phényl)acridinium, **IV-15**

En milieu anhydre, on ajoute le composé **IV-14** (50 mg ; 0,09 mmoles) dans 5 mL de iodure de méthyle. Le milieu est agité et chauffé à reflux pendant 2 jours. La solution est refroidie et une partie du volume est évaporée. Le produit désiré est précipité dans 30 mL d'éther. Il est récupéré par centrifugation puis séché sous vide. 47,3 mg du composé **IV-15** sont obtenus sous la forme d'une poudre jaune orangé.

Formule brute : $C_{40}H_{31}IN_2O$

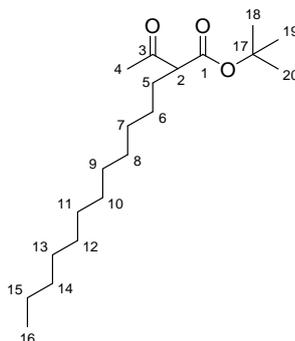
M = 682,6 g.mol⁻¹

Rendement : 75%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 8,48-7,67 (m, 21H, H_{arom}) ; 7,29 (s, 1H, H₂₁) ; 3,36 (t, 2H, H₄, J₄₋₃=7,2 Hz) ; 2,57 (t, 2H, H₂, J₂₋₃=7,2 Hz) ; 2,22 (quint, 2H, H₃, J_{3-2,4}=7,2 Hz).

SM (ESI+) : m/e : 555 [M-I]⁺

I.4. Résultats expérimentaux du chapitre V

Ester *tert*-butylique de l'acide 2-acétyl-tétradécanoïque, **V-5**

A une suspension de NaH (60% dans l'huile ; 253 mg ; 6,3 mmoles ; 2 éq.) dans 5 mL de THF anhydre à 0°C est additionnée, goutte à goutte, du *tert*-butylacétoacétate (524 μ L ; 1 éq.). Le mélange est agité pendant 40 minutes à 0°C, puis du iododécane (700 μ L ; 0,9 éq.) est ajouté goutte à goutte. La solution est chauffée à reflux pendant 14 heures. La réaction est hydrolysée par ajout d'une solution aqueuse saturée de NH₄Cl. La phase aqueuse est extraite 3 fois à l'Et₂O. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt / cyclohexane : 5 / 95). 240 mg du composé **V-5** sont obtenus sous la forme d'une huile incolore.

Formule brute : C₂₀H₃₈O₃

M = 326,5 g.mol⁻¹

Rendement : 45%

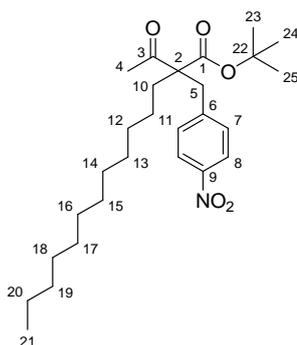
CCM : R_f = 0,40 (AcOEt / cyclohexane : 5 / 95)

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 3,27 (t, 1H, H₂, J₂₋₅=7,6 Hz) ; 2,18 (s, 3H, H₄) ; 1,77 (m, 2H, H₅) ; 1,44 (s, 9H, H₁₈) ; 1,22 (m, 20H, H₆ à ₁₅) ; 0,85 (t, 3H, H₁₆, J₁₆₋₁₅=6,7 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 203,6 (1C, C₃) ; 169,1 (1C, C₁) ; 81,6 (1C, C₁₇) ; 61,0 (1C, C₂) ; 31,9-27,3 (14C, C₄ à ₁₄, C₁₈) ; 22,6 (1C, C₁₅) ; 14,0 (1C, C₁₆).

SM (ESI+) : m/e : 675 [2M+Na]⁺

IR (NaCl, cm⁻¹) : 2925 (F) ; 2855 (F) ; 1738 (F) ; 1716 (F) ; 1459 (m) ; 1368 (m) ; 1250 (m) ; 1145 (F).

Ester tert-butylique de l'acide 2-acétyl-2-(4-nitrobenzyl)-tétradécanoïque, **V-6**

A une suspension de NaH (60% dans l'huile ; 36,1 mg ; 0,90 mmoles ; 1,7 éq.) dans 5 mL THF anhydre à 0°C est additionnée, goutte à goutte, une solution de l'ester **V-5** (177 mg ; 1 éq.) dans 2 mL de THF anhydre. Le mélange est agité pendant 30 minutes à 0°C, puis du bromométhyl-*p*-nitrobenzène (117 mg ; 1 éq.) est ajouté. La solution est agitée pendant 14 heures. La réaction est hydrolysée par ajout d'une solution aqueuse saturée de NH₄Cl. La phase aqueuse est extraite 3 fois à l'Et₂O. Les phases organiques réunies sont séchées sur Na₂SO₄, filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt / cyclohexane : 10 / 90). 134 mg du composé **V-6** sont obtenus sous la forme d'un solide blanc.

Formule brute : C₂₇H₄₃NO₅

M = 461,6 g.mol⁻¹

Rendement : 54%

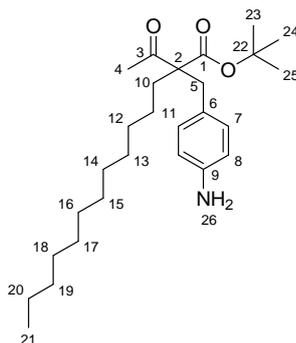
CCM : R_f = 0,40 (AcOEt / cyclohexane : 10 / 90)

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 8,07 (d, 2H, H₈, J₈₋₇ = 8,5 Hz,) ; 7,24 (d, 2H, H₇, J₇₋₈ = 8,5 Hz) ; 3,27 (d, 1H, H₅, J=14,2 Hz) ; 3,10 (d, 1H, H₅, J=14,2Hz) ; 2,10 (s, 3H, H₄) ; 1,71 (m, 2H, H₁₀) ; 1,37 (s, 9H, H₂₃) ; 1,00-1,30 (m, 20H, H₁₁ à 20) ; 0,83 (t, 3H, H₂₁, J₂₁₋₂₀ = 6,7 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 204,5 (1C, C₃) ; 170,4 (1C, C₁) ; 146,8, 145,0 (2C, C₆, C₉) ; 130,9 (2C, C₇) ; 123,2 (2C, C₈) ; 82,5 (1C, C₂₂) ; 65,0 (1C, C₂) ; 36,8 (1C, C₅) ; 31,8-22,6 (15C, C₄, C₁₀ à 20, C₂₃) ; 14,0 (1C, C₂₁).

SM (ESI+) : m/e : 484 [M+Na]⁺ ; 946 [2M+Na]⁺

IR (NaCl, cm⁻¹) : 2926 (F) ; 2854 (F) ; 1726 (F) ; 1712 (F) ; 1605 (f) ; 1523 (F) ; 1458 (f) ; 1369 (m) ; 1347 (F) ; 1255 (f) ; 1149 (F) ; 855 (f) ; 845 (f). 740 (f).

Ester tert-butylique de l'acide 2-acétyl-2-(4-aminobenzyl)-tétradécanoïque, **V-7**

A une solution du nitro ester **V-6** (126 mg ; 0,27 mmoles ; 1 éq.) dans 5 mL de MeOH est ajoutée une quantité catalytique de palladium sur charbon (10 mg ; 10% de Pd). Le mélange est purgé 3 fois avec de l'azote puis 3 fois avec de l'hydrogène et est agité vigoureusement pendant 30 minutes sous atmosphère d'hydrogène. Le milieu est filtré sur célite. Le filtrat est évaporé sous pression réduite. 106 mg de **V-7** sont obtenus sous la forme d'un solide blanc.

Formule brute : $C_{27}H_{45}NO_3$

M = 431,7 g.mol⁻¹

Rendement : quantitatif

CCM : Rf = 0,50 (AcOEt / cyclohexane : 15 / 85)

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 6,83 (d, 2H, H₇, J₇₋₈=8,5 Hz) ; 6,53 (d, 2H, H₈, J₈₋₇=8,5 Hz) ; 3,49 (s, 2H, H₂₄) ; 3,01 (s, 2H, H₅) ; 2,07 (s, 3H, H₄) ; 1,69 (m, 2H, H₁₀) ; 1,42 (s, 9H, H₂₃) ; 1,10-1,30 (m, 20H, H₁₁ à 20) ; 0,86 (t, 3H, H₂₁, J₂₁₋₂₀=6,7 Hz).

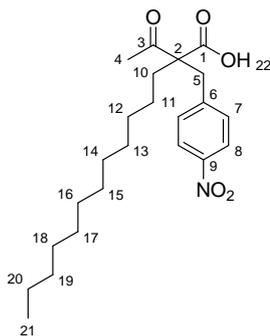
RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 205,8 (1C, C₃) ; 171,2 (1C, C₁) ; 144,9 (1C, C₉) ; 130,6 (2C, C₇) ; 126,2 (1C, C₆) ; 114,9 (2C, C₈) ; 81,6 (1C, C₂₂) ; 65,3 (1C, C₂) ; 36,2 (1C, C₅) ; 31,8-22,6 (15C, C₄, C₁₀ à 20, C₂₃) ; 14,0 (1C, C₂₁).

SM (ESI+) : m/e : 454 [M+Na]⁺

SM haute résolution (ESI/TOF) : pour C₂₇H₄₅NNaO₃ : Calc. : 454,3297

Exp. : 454,3308

IR (NaCl, cm⁻¹) : 3464 (m) ; 3377 (m) ; 2926 (F) ; 2857 (F) ; 1710 (F) ; 1624 (m) ; 1517 (m) ; 1460 (m) ; 1362 (m) ; 1261 (m) ; 1153 (F) ; 840 (m).

Acide 2-(4-nitrobenzyl)-2-acétyltétradécanoïque, **V-8**

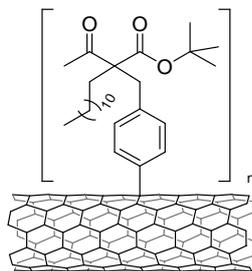
A une solution du nitro ester **V-6** (200 mg ; 0,46 mmoles) dans 3 mL de CH_2Cl_2 anhydre est additionné, à 0°C , de l'acide trifluoroacétique (150 μL). Le milieu est agité à l'abri de la lumière pendant 90 minutes, puis concentré sous flux d'azote à 0°C pour fournir **V-8** sous la forme d'une huile orange. Le produit présente une pureté satisfaisante. Il se dégrade sur colonne de silice en 3-(4-nitrobenzyl)pentadécane-2-one.

Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{NO}_5$

M = 405,5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 8,12 (d, 2H, H_8 , $J_{8-7}=8,5$ Hz) ; 7,30 (d, 2H, H_7 , $J_{7-8}=8,5$ Hz) ; 3,32 (s, 2H, H_5) ; 2,24 (s, 3H, H_4) ; 1,83-1,96 (m, 2H, H_{10}) ; 1,15-1,70 (m, 20H, H_{11} à 20) ; 0,87 (t, 3H, H_{21} , $J_{21-20} = 6,7$ Hz).

Nanotubes de carbone (HiPCO) fonctionnalisés avec le sel de diazonium de **V-7** généré in situ, **V-9**



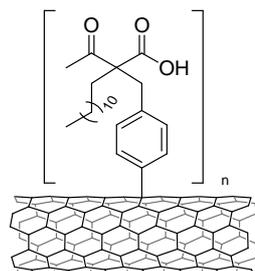
Des nanotubes de carbone HiPCO (1 mg ; 0,083 mmoles de carbone) sont dispersés dans 0,6 mL d'*o*-dichlorobenzène dans un bain à ultrasons (19 W) pendant 30 minutes. A cette suspension sont ajoutés l'amino ester **V-7** (9,8 mg ; 0,3 éq.) et 0,3 mL d'acétonitrile. De l'azote est ensuite bullé dans le milieu pendant 10 minutes. Puis du nitrite d'isoamyle (21 μL ; 0,3 éq.) est ajouté et le milieu est chauffé à 60°C pendant 14 heures. Après addition d'éthanol, le mélange est centrifugé (9000 tours/min, 10 min) et le surnageant éliminé. La séquence est répétée 5 fois. Le solide est séché sous vide pour fournir **V-9** sous la forme d'un solide noir.

Raman (514,5 nm, ν en cm^{-1}): 186, 208, 249, 264, 1336, 1589 ; $I_D/I_G = 0,267$
(HiPCO natifs (ν en cm^{-1}): 187, 207, 249, 262, 1338, 1592 ; $I_D/I_G = 0,096$).

UV-Vis-NIR : disparition des absorptions caractéristiques des nanotubes natifs.

ATR-IR (cm^{-1}): 2960 (m) ; 2914 (m) ; 2850 (m) ; 1660 (m) ; 1627 (m).

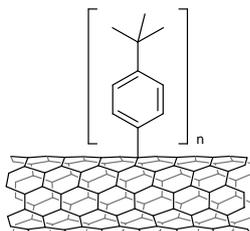
Déprotection de la fonction acide carboxylique des nanotubes fonctionnalisés **V-9**, **V-10**



A une suspension de **V-9** (1 mg) dans 1 mL de CH_2Cl_2 anhydre à 0°C , est additionné de l'acide trifluoroacétique (1 mL). Le mélange est agité à l'abri de la lumière pendant 1h30, puis concentré sous flux à 0°C pour fournir **V-10** sous la forme d'un solide noir.

ATR-IR (cm^{-1}) : 3234 (large) ; 2960 (m) ; 2919 (m) ; 2849 (m) ; 1707 (m).

Nanotubes de carbone (HiPCO) fonctionnalisés avec le sel de 4-*tert*-butylbenzènediazonium généré in situ, **V-11**

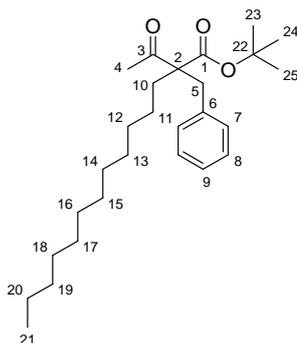


A une suspension de nanotubes de carbone HiPCO (6 mg ; 0,5 mmoles de carbone ; 1 éq.) dans 7,5 mL d'*o*-dichlorobenzène est ajoutée de la 4-*tert*-butylaniline (12 μL ; 0,15 éq.). Le mélange est soniqué pendant 10 minutes dans un bain à ultrasons (19 W). De l'azote est ensuite bullé dans le milieu pendant 10 minutes. Une solution de nitrite d'isoamyle (10 μL ; 0,15 éq.) dans 0,5 mL d'acétonitrile est additionnée. Le milieu est chauffé à 60°C pendant 1h30. Après l'adjonction de DMF, le mélange est filtré sur une membrane Millipore® (Mitex™ PTFE, $\text{\O} = 5 \mu\text{m}$). Le solide est lavé au DMF et à l'éther diéthylique, puis est séché sous vide. 9,6 mg de **V-11** sont obtenus sous la forme d'un solide noir.

Raman (1064 nm, ν en cm^{-1}) : 269, 1276, 1592, 2552 ; $I_{\text{D}}/I_{\text{G}} = 0,39$.

(HiPCO natifs (ν en cm^{-1}) : 266, 1276, 1592, 2544 ; $I_{\text{D}}/I_{\text{G}} = 0,09$).

UV-Vis-NIR : disparition des absorptions caractéristiques des nanotubes natifs.

Ester tert-butylique de l'acide 2-acétyl-2-benzyltétradécanoïque, **V-12**

A une solution de nitrosonium de tétrafluoroborate NOBF_4 (145 mg ; 1,24 mmoles ; 1,4 éq.) dans 10 mL de CH_2Cl_2 anhydre à 0°C est additionnée, goutte à goutte, une solution de l'amino ester **V-7** (400 mg ; 1 éq.) dans 10 mL de CH_2Cl_2 anhydre. Le mélange est agité pendant 1 heure à 0°C . Une solution d'acide hypophosphoreux H_3PO_2 (1 mL ; 50% en masse dans l'eau) est ensuite ajoutée, ainsi qu'une quantité catalytique de Cu_2O . Le milieu est agité pendant 1 heure à température ambiante. Une solution aqueuse saturée de NaHCO_3 est additionnée. La phase aqueuse est extraite 3 fois au CH_2Cl_2 et les phases organiques sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et évaporées sous pression réduite. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : AcOEt / hexane : 4 / 96). 383 mg du composé **V-12** sont obtenus sous la forme d'une huile jaune pâle.

Formule brute : $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$

M = 416,6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : quantitatif

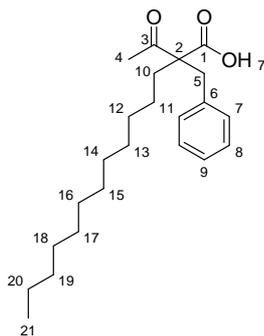
CCM : $R_f = 0,50$ (AcOEt / cyclohexane : 10 / 90)

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 7,22 (m, 3H, H_{ar}) ; 7,08 (d, 2H, $J_{7-8} = 7,6$ Hz, H_{ar}) ; 3,18 (d, 1H, H_5 , $J=14,2$ Hz) ; 3,11 (d, 1H, H_5 , $J=14,2$ Hz) ; 2,12 (s, 3H, H_4) ; 1,73 (m, 2H, H_{10}) ; 1,43 (s, 9H, H_{23}) ; 1,07-1,35 (m, 20H, H_{11} à H_{20}) ; 0,88 (t, 3H, H_{21} , $J_{21-20} = 6,6$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 205,4 (1C, C_3) ; 171,1 (1C, C_1) ; 136,8 (1C, C_6) ; 130-126,7 (5C, C_7 à C_9) ; 81,9 (1C, C_{22}) ; 65,3 (1C, C_2) ; 37,0 (1C, C_5) ; 31,9-22,7 (15C, C_4 , C_{10} à C_{20} , C_{23}) ; 14,1 (1C, C_{21}).

SM (ESI+) : m/e : 439 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

IR (NaCl , cm^{-1}) : 2926 (F) ; 2855 (F) ; 1712 (F) ; 1460 (m) ; 1364 (m) ; 1257 (m) ; 1151 (F) ; 845 (m).

Acide 2-acétyl-2-benzyltétradécanoïque, **V-13**

A une solution de l'ester **V-12** (200 mg ; 0,48 mmoles) dans 3 mL de CH_2Cl_2 anhydre à 0°C , est additionné de l'acide trifluoroacétique (3 mL). Le mélange est agité à l'abri de la lumière pendant 1h30, puis concentré sous flux d'azote à 0°C pour fournir 170 mg de **V-13** sous la forme d'une huile jaune pâle.

Formule brute : $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_3$

M = 360,5 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : quantitatif

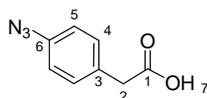
CCM : $R_f = 0,15$ (AcOEt / cyclohexane : 8 / 92)

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 10,80 (s, 1H, H_{22}) ; 7,26 (m, 3H, H_{arom}) ; 7,07 (m, 2H, H_{arom}) ; 3,32 (d, 1H, H_5 , $J=14,2$ Hz) ; 3,20 (d, 1H, H_5 , $J=14,2$ Hz) ; 2,28 (s, 3H, H_4) ; 1,85-2,03 (m, 2H, H_{10}) ; 1,26 (m, 20H, H_{11} à 20) ; 0,88 (t, 3H, H_{21} , $J_{21-20}=6,8$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 211,2 (1C, C_3) ; 178,3 (1C, C_1) ; 134,9 (1C, C_6) ; 129,4-127,5 (5C, C_7 à 9) ; 64,7 (1C, C_2) ; 39,7 (1C, C_5) ; 33,7-22,7 (15C, C_4 , C_{10} à 20 , C_{23}) ; 14,0 (1C, C_{21}).

SM (ESI/TOF) : m/e : 317 $[\text{M}-\text{CO}_2]^+$; 361 $[\text{M}+\text{H}]^+$

IR (NaCl , cm^{-1}) : 3278 (m) ; 2918 (F) ; 2851 (F) ; 1744 (F) ; 1700 (F) ; 1177 (F) ; 699 (F).

Acide 4-azido-phénylacétique **V-15**

A une solution d'acide chlorhydrique concentré (20 mL) et d'eau (10 mL) est ajouté de l'acide 4-amino-phénylacétique (2 g ; 13,23 mmoles ; 1 éq.). A cette suspension est ajoutée, goutte à goutte et à 0°C, une solution de NaNO₂ (1,1 g ; 1,2 éq.) dans 5 mL d'eau. Le milieu est agité pendant 30 minutes puis une spatule d'urée est ajoutée pour éliminer l'excès de NO₂⁻. Après 15 minutes, une solution de NaN₃ (1,72 g ; 2 éq.) dans l'eau est additionnée, goutte à goutte, et la formation lente d'un précipité est observé. La réaction est agitée une nuit à température ambiante et le précipité est isolé par filtration puis lavé avec de l'eau et séché sous air. Le résidu est cristallisé dans l'hexane à chaud, filtré et séché sous vide. 1,71 g du composé **V-15** sont obtenus sous forme d'aiguilles incolores.

Formule brute : C₈H₇N₃O₂

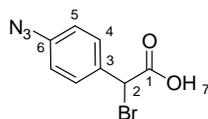
M = 177,1 g.mol⁻¹

Rendement : 73%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 7,26 (d, 2H, H₄, J₄₋₅=6,4 Hz) ; 7,01 (d, 2H, H₅, J₅₋₄=6,4 Hz) ; 3,63 (s, 2H, H₂).

RMN ¹³ (CDCl₃, δ en ppm) : 178,3 (1C, C₁) ; 145,3 (1C, C₆) ; 135,5 (1C, C₃) ; 130,2 (2C, C₅) ; 128,7 (2C, C₄) ; 42,3 (1C, C₂).

SM (ESI+) : m/e : 178 [M+H]⁺

Acide 4-azido-phényl-bromoacétique **V-16**

A une solution de l'azide **V-15** (500 mg ; 2,82 mmoles ; 1 éq.) dans le tétrachlorure de carbone est ajouté du N-bromosuccinimide (502 mg ; 1 éq.) et de l'AIBN (23 mg ; 0,05 éq.) sous azote. Le milieu est chauffé à reflux pendant 2 heures puis est additionné N-bromosuccinimide (252 mg ; 0,05 éq.) et de l'AIBN (23 mg ; 0,05 éq.) et la réaction est encore chauffé à reflux pendant 2 heures. La solution est refroidie puis filtrée. Le résidu est lavé avec du CCl₄ et les filtrats réunis sont lavés avec de l'acide chlorhydrique 2M. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄ et concentrée sous pression réduite. 650 mg du composé **V-16** sont obtenus sous forme d'une huile orange.

Formule brute : C₈H₆BrN₃O₂

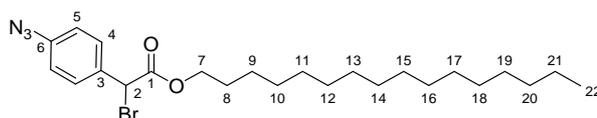
M = 256,1 g.mol⁻¹

Rendement : 90%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 7,55 (d, 2H, H₄, J₄₋₅=8,4 Hz) ; 7,03 (d, 2H, H₅, J₅₋₄=8,4 Hz) ; 5,35 (s, 1H, H₂).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 178,6 (1C, C₁) ; 145,8 (1C, C₆) ; 135,6 (1C, C₃) ; 130,4 (2C, C₅) ; 129,1 (2C, C₄) ; 52,3 (1C, C₂).

SM (ESI/TOF) : m/e : 257 [M+H]⁺

(4-azido-phényl) bromoacétate d'héxadécyle **V-17**

A une solution du bromo azide **V-16** (650 mg, 2,54 mmoles, 1 éq.) dans 20 mL d'Et₂O anhydre est ajouté sous argon du décahexanol (819 mg ; 1,2 éq.), du DCC (757 mg ; 1,3 éq.) et quelques gouttes de 4-pyrrolidinopyridine. Un précipité est formé et la réaction est agitée pendant 2 heures à température ambiante. La solution est filtrée sur célite et lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 95/5). 842 mg du composé **V-17** sont obtenus sous forme d'une huile.

Formule brute : C₂₄H₃₈BrN₃O₂

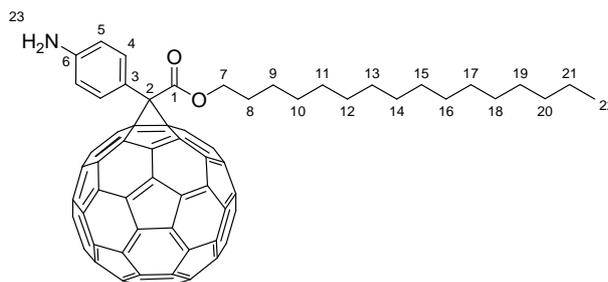
M = 480,5 g.mol⁻¹

Rendement : 69%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 7,55 (d, 2H, H₄, J₄₋₅=8,8 Hz) ; 7,01 (d, 2H, H₅, J₅₋₄=8,8 Hz) ; 5,32 (s, 1H, H₂) ; 4,17 (m, 2H, H₇) ; 1,92-1,34 (m, 28H, H₈ à 21) ; 0,88 (t, 3H, H₂₂, J₂₂₋₂₁=6,4 Hz)

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 168,4 (1C, C₁) ; 141,6 (1C, C₆) ; 132,4 (1C, C₃) ; 130,2 (2C, C₅) ; 129,3 (2C, C₄) ; 66,7 (1C, C₇) ; 55,7 (1C, C₂) ; 34,8-22,7 (14C, C₈ à 21) ; 14,1 (1C, C₂₂).

SM (ESI/TOF) : m/e : 481 [M+H]⁺

1-(4-amino-phényl) cyclopropa-fullerène-1-carboxylate d'héxadécyle **V-19**

A une solution du composé **V-17** (240 mg ; 0,5 mmoles ; 2 éq.) dans 200 mL de toluène, fraîchement distillé, est ajouté du fullerène (200 mg ; 1 éq.) puis du DBU (100 μL ; 2,4 éq.). La solution est agitée pendant 6 heures à température ambiante et le brut est adsorbé sur 30 g de silice. Il est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/toluène : 8/2). L'intermédiaire réactionnel, concentré sous pression réduite, est dilué dans 10 mL de THF anhydre et du Bu_3P (140 μL ; 2 éq.) est additionné. La réaction est agitée pendant 1 heure puis 1 mL d'une solution 6N d'acide chlorhydrique est ajoutée. Après 20 heures à température ambiante la solution est diluée avec du CH_2Cl_2 et lavée avec une solution aqueuse saturée de K_2CO_3 . Les phases organiques réunies sont séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis concentrées sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : toluène). 156 mg du composé **V-19** sont obtenus.

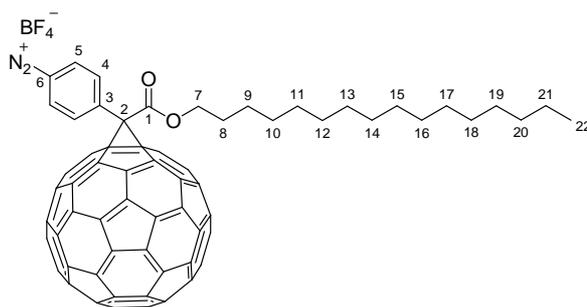
Formule brute : $\text{C}_{64}\text{H}_{49}\text{NO}_2$

M = 864,1 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : 76%

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 7,87 (d, 2H, H_4 , $J_{4-5}=8,4$ Hz) ; 6,82 (d, 2H, H_5 , $J_{5-4}=8,4$ Hz) ; 4,37 (t, 2H, H_7 , $J_{7-8}=6,4$ Hz) ; 3,91 (s, 2H, H_{23}) ; 1,73 (quint, 2H, H_8 , $J_{8-7,9}=6,4$ Hz) ; 1,36-1,25 (m, 26H, H_9 à H_{21}) ; 0,88 (t, 3H, H_{22} , $J_{22-21}=6,4$ Hz)

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 166,7 (1C, C_1) ; 147,5 (1C, C_6) ; 132,5 (2C, C_4) ; 129,3 (2C, C_3) ; 128,7 (2C, C_5) ; 66,9 (1C, C_7) ; 56,2 (1C, C_2) ; 31,9-22,7 (14C, C_8 à C_{21}) ; 14,1 (1C, C_{22}).

Sel tétrafluoroborate de diazonium du composé **V-19**, **V-20**

A une solution de nitrosonium de tétrafluoroborate (8,1 mg ; 0,07 mmoles ; 2 éq.) dans 5 mL d'acétonitrile anhydre à -30°C est additionnée goutte à goutte une solution de **V-19** (30 mg ; 1 éq.) dans un mélange de 5 mL d'acétonitrile anhydre et 1 mL de CH_2Cl_2 anhydre. Le milieu est agité pendant 1 heure à -30°C , puis la réaction est laissée revenir à température ambiante pendant 1 heure. De l' Et_2O est ajouté et un précipité se forme. Celui-ci est filtré sur une membrane Millipore® (Mitex™ PTFE, $\text{Ø} = 5 \mu\text{m}$). Le solide résultant est lavé avec de l' Et_2O et séché sous vide dans un dessiccateur. Le produit **V-20** est obtenu sous la forme d'une poudre.

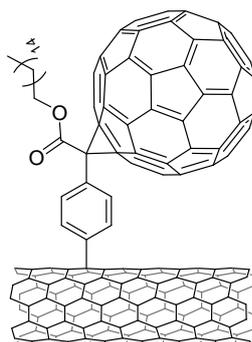
Formule brute : $\text{C}_{64}\text{H}_{47}\text{BF}_4\text{N}_2\text{O}_2$

M = 962,9 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : Quantitatif

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 7,37 (d, 2H, H_5 , $J_{5-4}=7,6 \text{ Hz}$) ; 7,13 (d, 2H, H_4 , $J_{4-5}=7,6 \text{ Hz}$) ; 4,37 (t, 2H, H_7 , $J_{7-8}=6,4 \text{ Hz}$) ; 1,73 (quint, 2H, H_8 , $J_{8-7,9}=6,4 \text{ Hz}$) ; 1,36-1,25 (m, 26H, H_9 à $_{21}$) ; 0,88 (t, 3H, H_{22} , $J_{22-21}=6,4 \text{ Hz}$)

Nanotubes de carbone (HiPCO) fonctionnalisés avec le sel de diazonium **V-20**, **V-21**

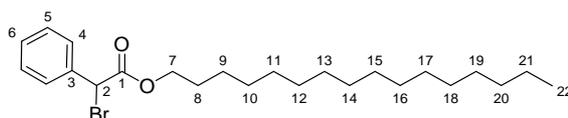


Des nanotubes de carbone HiPCO (4.3 mg ; 0,36 mmoles de carbone) sont dispersés dans 15 mL d'*o*-dichlorobenzène dans un bain à ultrasons (19 W) pendant 30 minutes. A cette suspension sont ajoutés le sel de diazonium **V-20** (35 mg ; 0,1 éq.) et 8 mL d'acétonitrile. Puis le milieu est chauffé à 120°C pendant 48 heures. Après addition d'éthanol, le mélange est centrifugé (9000 tours/min, 10 min) et le surnageant éliminé. La séquence est répétée 5 fois. Le solide est séché sous vide pour fournir **V-21** sous la forme d'une poudre noire.

Raman (1064 nm, ν en cm^{-1}) : 267, 1287, 1594, 2550

(HiPCO natifs (ν en cm^{-1}) : 265, 1287, 1594, 2542).

UV-Vis-NIR : disparition des absorptions caractéristiques des nanotubes natifs.

Bromo-phénylacétate d'héxadécyle **V-23**

A une solution de l'acide 2-bromo-2-phénylacétique (500 mg, 2,33 mmoles, 1 éq.) dans 20 mL d'Et₂O anhydre est ajouté sous argon du décahexanol (676 mg ; 1,2 éq.), du DCC (723 mg ; 1,3 éq.) et quelques gouttes de 4-pyrrolidinopyridine. Un précipité est formé et la réaction est agitée pendant 2 heures à température ambiante. La solution est filtrée sur célite et lavée avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃. La phase organique est séchée sur Na₂SO₄, filtrée puis évaporée sous pression réduite. Le résidu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/AcOEt : 95/5). 717 mg du composé **V-23** sont obtenus sous forme d'une huile.

Formule brute : C₂₄H₃₉BrO₂

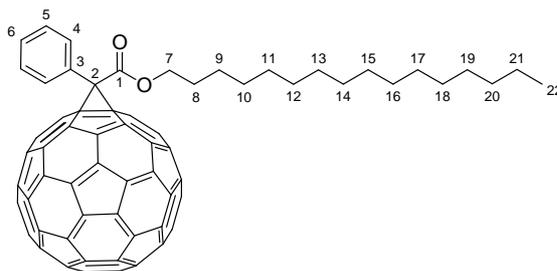
M = 439,5 g.mol⁻¹

Rendement : 70%

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 7,56 (m, 2H, H₅) ; 7,38 (m, 3H, H_{4,6}) ; 5,34 (s, 1H, H₂) ; 4,16 (m, 2H, H₇) ; 1,65 (m, 2H, H₈) ; 1,26 (m, 26H, H_{9 à 21}) ; 0,88 (t, 3H, H₂₂, J₂₂₋₂₁=6,8 Hz).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 168,3 (1C, C₁) ; 135,9 (1C, C₃) ; 129,2-128,6 (3C, C_{4,5,6}) ; 66,6 (1C, C₇) ; 46,9 (1C, C₂) ; 34,9-22,7 (14C, C_{8 à 21}) ; 14,1 (1C, C₂₂).

SM (ESI+) : m/e : 461 [M+Na]⁺

1-phényl-cyclopropa-fullerène-1-carboxylate d'héxadécyle **V-24**

A une solution du composé **V-23** (240 mg ; 0,55 mmoles ; 2 éq.) dans 200 mL de toluène, fraîchement distillé, est ajouté du fullerène (200 mg ; 1 éq.) puis du DBU (100 μ L ; 2,4 éq.). La solution est agitée pendant 6 heures et le brut est adsorbé sur 30 g de silice. Il est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : cyclohexane/toluène : 8/2). 224 mg du composé **V-24** sont obtenus sous forme d'une poudre.

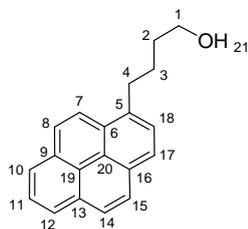
Formule brute : $C_{64}H_{48}O_2$

M = 848,1 $g \cdot mol^{-1}$

Rendement : 95%

RMN 1H ($CDCl_3$, δ en ppm) : 8,12 (m, 2H, H_5) ; 7,55 (m, 3H, $H_{4,6}$) ; 4,37 (m, 2H, H_7) ; 1,71 (m, 2H, H_8) ; 1,25 (m, 26H, $H_{9 \text{ à } 21}$) ; 0,88 (t, 3H, H_{22} , $J_{22-21}=6,8$ Hz).

I.5. Résultats expérimentaux du chapitre VI

4-(Pyrène-1-yl)butan-1-ol, **VI-2**

A une suspension de LiAlH_4 (100 mg ; 2,63 mmoles ; 1,5 éq.) dans 10 mL d' Et_2O anhydre à 0°C est additionnée goutte à goutte par canulation une solution de l'acide 1-pyrènebutyrique (500mg ; 1,73 mmole ; 1 éq.) dans 20 mL d' Et_2O anhydre. Le mélange est agité à température ambiante pendant 12 heures. Le milieu est hydrolysé par une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium 8%. La phase organique est récupérée puis lavée avec une solution saturée de NaHCO_3 . Les phases aqueuses sont extraites avec un volume d' Et_2O et les phases organiques sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées puis évaporées sous pression réduite. 420 mg du composé **VI-2** sont obtenus sous la forme d'un solide jaune.

Formule brute : $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}$

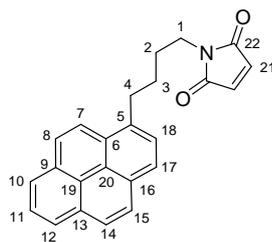
M = 274,4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : 89 %

RMN ^1H (CDCl_3 , δ en ppm) : 8,25-7,82 (m, 9H, H_{arom}) ; 3,64 (t, 2H, H_1 , $J_{1-2} = 6,4$ Hz) ; 3,31 (t, 2H, H_4 , $J_{4-3} = 7,6$ Hz) ; 1,88 (quint, 2H, H_3 , $J_{3-2,4} = 6,4$ et 7,6 Hz) ; 1,67 (quint, 2H, H_2 , $J_{2-1,3} = 6,4$ et 7,6 Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , δ en ppm) : 136,7-123,4 (16C, C_{arom}) ; 62,5 (1C, C_1) ; 32,6 (1C, C_4) ; 27,9 (1C, C_2) ; 25,6 (1C, C_3).

SM (ESI+) : m/e : 275 $[\text{M}+\text{H}]^+$

1-(4-Pyrène-1-yl-butyl)-pyrrole-2,5-dione, **VI-3**

A une solution de l'alcool **VI-2** (200 mg ; 0,73 mmoles ; 1 éq.) dans 20 mL de THF anhydre est additionnée du maléimide (78 mg ; 1,1 éq.) et de la triphénylphosphine (210 mg ; 1,1 éq.). Le mélange est refroidi à 0°C et du DEAD (126 µL ; 1,1 éq.) est ajouté goutte à goutte. Le milieu est agité à température ambiante sous azote pendant 12 heures. Il est ensuite évaporé sous pression réduite et dilué dans 30 mL d'un mélange AcOEt/cyclohexane (40/60). L'oxyde de triphénylphosphine formée précipite et est éliminée par centrifugation. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (éluant : toluène). 170 mg du composé **VI-3** sont obtenus sous la forme d'une poudre jaune.

Formule brute : C₂₄H₁₉NO₂

M = 353,4 g.mol⁻¹

Rendement : 66 %

RMN ¹H (CDCl₃, δ en ppm) : 8,24-7,83 (m, 9H, H_{arom}) ; 6,54 (s, 2H, H₂₁) ; 3,56 (t, 2H, H₄, J₄₋₃ = 7,2 Hz) ; 3,34 (t, 2H, H₁, J₁₋₂ = 7,2 Hz) ; 1,87-1,75 (m, 4H, H_{3,4}).

RMN ¹³C (CDCl₃, δ en ppm) : 170,8 (1C, C₂₁) ; 136,2 (1C, C₅) ; 133,8 (2C, C₂₂) ; 131,4-123,3 (15C, C₆ à C₂₀) ; 37,6 (1C, C₁) ; 32,8 (1C, C₄) ; 28,7 et 28,5 (2C, C_{2,3}).

SM (ESI+) : m/e : 354 [M+H]⁺

II. Biochimie et biologie moléculaire

II.1. Expériences sur les protéines recombinantes correspondant au chapitre III

Composition des tampons et des solutions utilisés

Pour la majeure partie des essais présentés le tampon utilisé pour la mise en contact du scFv avec les nanotubes est composé de 50% en masse de glycérol, 8 M d'urée, 0,3 M de NaCl et 0,1 M d'un mélange de Na_2HPO_4 et NaH_2PO_4 (pH 8,5). Ce tampon sera dénommé tampon de liaison.

Entre chaque étape de mise en contact avec une protéine les nanotubes sont lavés avec un tampon EIA (0,1 M de tampon phosphate de potassium (pH 7,4), 0,1% de BSA, 0,15 M de NaCl et 0,01% de NaN_3).

La révélation finale est réalisée à l'aide du réactif d'Ellman: 0,01M de tampon phosphate de potassium (pH 7,4), $7,5 \cdot 10^{-4}$ M d'acétylthiocholine et $5 \cdot 10^{-4}$ M de DTNB. L'activité catalytique du réactif est alors de 2,5 unité Ellman (U.E.).

Les extraits cytoplasmiques bruts contenant le scFv sont composés de 0,1 M de tampon Tris (pH 8,0), d'urée 8 M et de 10 mM de β -mercaptoéthanol. Ces extraits sont dilués par un facteur 1000 avec le tampon de liaison pour que la concentration finale soit environ de 30 nM.

Exemple de traitement d'un échantillon de nanotubes avec un fragment d'anticorps (scFv)

- Une solution préalablement ajustée en concentration de nanotubes est centrifugée à 13000 tour/min pendant 10 minutes puis le surnageant est enlevé par pipetage.
- Les nanotubes sont alors incubés pendant 3h avec un extrait brut scFv (30 nM) à température ambiante dans 0,4 mL de tampon de liaison sur une roue d'agitation. Certains essais ont été conduits en présence d'une quantité plus ou moins grande d'imidazole (10 et 200 mM) pour respectivement soit favoriser un accrochage spécifique de la protéine soit pour la décrocher.
- Les échantillons sont centrifugés (13000 tr/min, 10 min), les surnageants sont pipetés et remplacés par le même volume de tampon EIA. Les échantillons sont resuspendus *via* l'utilisation d'un vortex. Ce cycle de lavage est effectué deux fois.
- Les NT-scFv sont ensuite incubés pendant 12h avec un anticorps anti-tag (12CA5G4) à 4°C sur une roue d'agitation.

-
- Les échantillons sont centrifugés (13000 tr/min, 10 min), les surnageants sont pipetés et remplacés par le même volume de tampon EIA. Les échantillons sont resuspendus *via* l'utilisation d'un vortex. Ce cycle de lavage est effectué deux fois.
 - La révélation Ellman des échantillons est réalisée en 4 étapes. (i) 0,4 mL de la solution contenant le réactif d'Ellman sont ajoutés aux échantillons préalablement lavés et à sec. (ii) Les échantillons sont agités à température ambiante pendant 15 minutes. (iii) Les échantillons sont centrifugés (13000 tr/min, 10 min) et les surnageants sont récupérés. (iv) Les surnageants sont analysés par une mesure de l'absorbance à 414 nm ce qui permet de remonter aux informations fournies dans le manuscrit.
 - Les échantillons sont centrifugés (13000 tr/min, 10 min), les surnageants sont pipetés et remplacés par le même volume de tampon EIA. Les échantillons sont resuspendus *via* l'utilisation d'un vortex. Ce cycle de lavage est effectué deux fois puis une dernière fois avec le tampon de liaison.
 - Incubation des échantillons pendant 1h avec de l'imidazole 200 mM en tampon de liaison sur une roue d'agitation à température ambiante.
 - Les échantillons sont centrifugés (13000 tr/min, 10 min), les surnageants sont pipetés et remplacés par le même volume de tampon EIA. Les échantillons sont resuspendus *via* l'utilisation d'un vortex. Ce cycle de lavage est effectué deux fois.
 - Révélation Ellman (lecture de la DO à 414 nm) des échantillons.

II.2. Expériences sur les acides nucléiques correspondant au chapitre IV

Lors des expériences réalisées, le plasmide est laissé en contact à 4°C avec les nanotubes fonctionnalisés pendant une nuit après une homogénéisation de la solution par pipetage. Pour les échantillons qui sont irradiés, une lampe de 6W à 365 nm est positionnée à 10 cm des échantillons pendant une heure. Pour observer le degré de dégradation nous avons utilisé un gel d'agarose. Le plasmide non dégradé migrera à sa taille attendue alors que l'ADN dégradé présentera une multitude de tailles ayant un profil caractéristique de sa destruction.

Préparation d'un gel d'agarose

Pour obtenir un gel à 0,9% en teneur d'agarose:

- Peser 450 mg d'agarose
- Ajouter 1 mL de tampon TAE (2M Tris-acétate et 50 mM d'EDTA (pH 8.0)) et 50 mL d'eau pure.
- Chauffer 2 minutes au microonde puis lorsque la solution à légèrement refroidie ajouter 2 μ L de bromure d'éthydiu à 10 mg/mL.
- Couler le gel sur le support délectrophorèse, positionner le peigne et laisser prendre en masse l'agarose en chambre froide.

Préparation et traitement des échantillons

Les ADN plasmidiques utilisés (SPI 3.0 et puc18) ont été purifiés à partir des maxipreps GenElute Plasmid de chez Sigma en suivant les instructions du fournisseur.

Dans chaque puit du gel est généralement déposé 6 μ L de solution dont 1 μ L de solution de dépôt (30% de glycérol contenant du bleu de bromophénol) afin de pouvoir visualiser l'avancement de la migration.

Au final, il faut que 500 ng de plasmides soient déposés dans un puit pour que la révélation du gel par le bromure d'éthydiu soit suffisamment intense. La migration de l'ADN dans le gel d'agarose s'effectue pour un ampérage fixe de 120 mA pendant 2h. La révélation du gel est effectuée sur une plaque UV surmontée d'une caméra CCD.