HAL
open science

Le diamant dopé au bore pour la bioélectronique: Biocompatibilité et Fonctionnalisation

Charles Agnes

To cite this version:

Charles Agnes. Le diamant dopé au bore pour la bioélectronique: Biocompatibilité et Fonctionnalisation. Matériaux. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT : . tel-00589317

HAL Id: tel-00589317

https://theses.hal.science/tel-00589317

Submitted on 28 Apr 2011

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER – GRENOBLE I

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Ecole Doctorale
Ingénierie – Matériaux Mécanique Energétique Environnement Procédés Production
Spécialité
Matériaux, Mécanique, Génie Civil, Electrochimie

Le diamant dopé au bore pour la bioélectronique : Biocompatibilité et Fonctionnalisation

Présentée par

Charles AGNES

Soutenue le 13 février 2009

Préparée à
l'Institut Néel au Centre National de la Recherche Scientifique à Grenoble
l'Institut Nanosciences et Cryogénie au Commissariat à l'Energie Atomique à Grenoble

JURY

M. Jacques FOULETIER,	Président du Jury
Mme Dominique BALLUTAUD,	Rapporteur
M. Jose Antonio GARRIDO,	Rapporteur
Mme Laurence MORA,	Examinateur
M. Jean-Charles ARNAULT,	Examinateur
M. Philippe BERGONZO,	Examinateur
M. Pascal MAILLEY,	Directeur de thèse
M. Franck OMNES,	Co-Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

à Papi

Même si ces remerciements ont été écrits après la rédaction de ce manuscrit, ils se trouvent finalement au début de mon mémoire de thèse étant donné leur importance à mes yeux.
Effectivement, sans beaucoup d'organismes et de personnes, qui m'ont d'ailleurs fait confiance et cru en moi, je n'aurais pu travailler dans ces conditions et écrire ce manuscrit sereinement.
L'heure est venue alors de rendre hommage à toutes celles et ceux qui se sont impliqués dans ce travail, de près ou de loin, ou qui ont su rendre ces trois années de dur labeur en un véritable plaisir.

Tout d'abord, je tiens à remercier la Région Rhône-Alpes et plus particulièrement le cluster **MACODEV** (Matériaux et Conception pour un Développement durable) pour l'attribution d'une bourse de recherche et pour son soutien financier, sans lesquels ces travaux n'auraient pu avoir lieu.
Je tiens également à remercier l'**Egide** pour m'avoir permis de faire deux séjours, d'une durée totale de trois mois, à l'Université de Mc Gill à Montréal, dans l'équipe de **Maryam Tabrizian**.
Mais aussi, je voulais remercier **Jean-Pierre Travers** (chef du département CEA/DSM/INAC/SPrAM), **Thierry Livache** (chef du laboratoire CEA/DSM/INAC/SPrAM/CREAB) et **Etienne Bustarret** - puis **Etienne Gheeraert** - (chefs du laboratoire CNRS/Institut Néel/SC2G) pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de leur département et laboratoire respectif.

Je tiens ensuite à exprimer ma sincère gratitude envers mes deux directeurs de thèse **Franck Omnès** au CNRS et **Pascal Mailley** au CEA à qui je dois beaucoup, pour leur confiance sans faille qu'ils ont su m'accorder durant ces trois années, pour leur soutien permanent, leurs conseils avisés et leur disponibilité. Même si deux directeurs de thèse situés dans deux laboratoires différents peut paraître quelque fois difficile pour certaines orientations des projets ou des expériences à mener, j'ai eu la chance d'être dirigé par deux directeurs de thèse travaillant vraiment main dans la main, se partageant parfaitement les tâches dans leurs domaines de compétences (la physique et la chimie des matériaux) lors des différents projets que nous avons menés. Je ne les remercierais jamais suffisamment, surtout lors des relectures et de la fameuse aide apportée pour la traduction en anglais du manuscrit.
J'espère que leur collaboration continuera puisqu'ils constituent un couple de directeurs de thèse que n'importe quel thésard pourrait rêver d'avoir, vue leur encadrement aussi irréprochable. Ils m'ont donc beaucoup apporté scientifiquement et même plus que cela, que j'espère pouvoir continuer de travailler avec eux pendant de longs moments.

Je veux également remercier ceux qui ont accepté d'être membres de mon jury de soutenance. Je suis très reconnaissant à **M. Jacques Fouletier** qui m'a fait l'honneur d'être examinateur et président de mon jury. Mes rapporteurs, **Mme Dominique Ballutaud** et **M. Jose Antonio Garrido**, qui ont lu avec beaucoup d'attention respectivement la version française et la version anglaise de mon mémoire de thèse (ou les deux peut être!). Je tenais à les remercier tout particulièrement car même si quelques discussions ont eu lieu avant la soutenance, nous avons pu avoir de nombreux échanges lors des différents congrès auxquels nous avons participé.
Je voulais aussi bien sûr saluer les examinateurs (parisiens), **Mme Laurence Mora**, **M. Philippe Bergonzo** et **M. Jean-Charles Arnault**. Plus particulièrement, je voulais remercier ce dernier qui, non seulement a accepté que je vienne faire des expériences d'XPS, mais surtout, par sa patience inébranlable, il m'a prodigué de précieux conseils et éclaircissements sur les déconvolutions des spectres XPS que nous avions obtenus.

Du fait de son caractère pluridisciplinaire, ma thèse s'est effectuée au sein de deux laboratoires, l'Institut Néel et le CREAB. J'y ai appris à synthétiser le matériau diamant que j'ai ensuite utilisé pour des études de fonctionnalisation (électro-)chimique. Je dois d'autre part avouer que j'ai pu bénéficier, tout au long de ma thèse, de conditions de travail idéales, voire exceptionnelles, avec notamment la mise en place de nombreuses collaborations fructueuses. En particulier avec deux laboratoires, à Mc Gill chez **Maryam Tabrizian** pour des études de biocompatibilité et au CEA de Saclay chez **Philippe Bergonzo** pour des études de caractérisations.
Ainsi, plusieurs domaines scientifiques ont pu être explorés durant ces trois années et je le dois donc à beaucoup de personnes de ces laboratoires.

Au sein de ces laboratoires, je voudrais d'abord commencer par remercier ceux qui m'ont permis de synthétiser mon matériaux de travail, à l'Institut Néel. Effectivement, même si **Franck** m'a beaucoup appris sur la croissance du diamant, je garde en mémoire les longs moments passés avec **Slimane Ghodbane** un ancien thésard et post-doc du laboratoire qui avait la patience de m'expliquer les conditions pour l'obtention de belles couches de diamant polycristallin. Même plus que ça, « **Salim** » m'a également initié à la spectroscopie Raman et à la cathodoluminescence. Pour ces deux méthodes de caractérisation, je tenais à remercier **Alain Deneuville** qui, grâce à sa longue expérience et ses larges connaissances des semi-conducteurs et du diamant en particulier, dont j'ai bénéficiées au début de ma thèse, m'ont beaucoup aidé par la suite pour l'interprétation des spectres obtenus. Je voulais également remercier **Pierre Muret** et **Julien Pernot** pour les différentes tentatives d'explications du transport dans les monocristaux de diamant... comprises que très tardivement.
Enfin, je voulais saluer **Anne-Marie Bonnot**, car elle m'a beaucoup appris sur les nanotubes de carbone, ce qui nous a amené à la fabrication d'un matériau carboné hybride NTC/diamant et même la création de nouveaux sujets de thèse.
Bien sûr, tout cela n'aurait pu être fait sans l'aide incontestable du technicien **Pierre Giroux** et des compagnons de galère post-doc, thésard ou stagiaire: **Salim** (encore lui), **Philipp A.** et **Pierre-Nicolas V.** (mes deux co-bureau du CNRS) pour m'avoir fourni en échantillons poly et monocristallins afin que je puisse faire des études de biocompatibilité à Mc Gill ; et enfin **Sébastien R.** (stagiaire et futur thésard faisant bientôt comme moi les aller-retour entre le CREAB et l'Institut Néel) qui a beaucoup contribué aux dernières expériences que je ne pouvais faire à cause de la rédaction et au dépôt du brevet avec Franck et Pascal.

Tout comme Franck à l'Institut Néel, au SPrAM/CREAB, **Pascal** m'a énormément apporté sur la théorie de l'électrochimie et des nouvelles méthodes de caractérisations électrochimiques. Mais ce que je retiens de Pascal c'est les milles idées par minute qui lui viennent à l'esprit. Cela a beaucoup contribué à apprendre à prendre du recul pour faire les bonnes expériences.
Je tenais de nouveau à remercier **Thierry Livache**, pour sa disponibilité lors des longues discussions passées autour de la fluorescence. Mais aussi, il a beaucoup contribué à mon ouverture d'esprit sur la biologie. Dans ce même domaine, **Yoann Roupioz** ainsi que **Julia** et **Radek** (des thésards) m'ont beaucoup aidé sur les assemblages biologiques que je pouvais faire sur mon matériau d'étude.
Je tenais à saluer **Martial Billon**, **André Roget** et **Frédéric Linker** (un post-doc du LEMOH, un laboratoire étant sur le même étage que le nôtre) pour avoir su répondre à tous mes questionnements au niveau de la chimie organique.
Enfin, je remercie également **Roberto Calemczuk**, **Loïc Leroy** (mon co-bureau au CEA), les techniciens de laboratoire **Sébastien Dumenil** (dit Séb le grand, du CREAB), **Yann Kervela** (du LEMOH) ainsi que les post-docs et thésards: **Émeline**, **Manu**, **Seb** (le petit), **Julia**, **Malika**, **Dayane**, **Radek**, **Sébastien R.**, **Fred**, **Lionel**, **Hadjar**.

Pour les collaborations, je tenais à remercier dans un premier temps nos collègues du CEA de Saclay, avec bien sûr le chef du Laboratoire Capteurs Diamant, **Philippe Bergonzo** qui m'a accueilli dans son laboratoire pour des études de caractérisation XPS avec **Jean-Charles Arnault** et qui m'accueillera prochainement pour des études post-doctorales. Il m'a également fourni des couches de diamant nanocristallin pour des études de biocompatibilité et de fonctionnalisation que je faisais étroitement avec mon binôme thésard de Saclay **Mathias Bonnauron**, qui nous a quittés beaucoup trop tôt...
Dans un second temps, je voulais remercier **Maryam Tabrizian** qui m'a accueilli à l'Université de Mc Gill à Montréal pour que nous fassions des études de culture cellulaire sur nos échantillons diamant. C'était un domaine que je ne connaissais pas du tout et donc toute ma gratitude va envers **Fereshteh Azari** pour sa patience (et il en fallait!) car elle m'a tout montré et expliqué pendant ces trois mois passés. Je voulais saluer également **Line Mongeon** pour la fixation des cellules sur mes échantillons et le MEB environnemental, mais aussi **Lucie Marcotte** pour les études AFM. Enfin, je voulais souligner l'accueil chaleureux (très important au moment de l'hiver, avec le froid et les tempêtes de neige) que ce laboratoire m'a fait et je voulais remercier l'ensemble des post-docs et thésards: **Julien**, **Lidjia**, **Sania**, **Simone**, **Ziyad**, **Nadia**, **Marc**, **Xuyen**, **Jamal**. Plus particulièrement, je voulais saluer ces trois derniers pour m'avoir fait déguster la « poutine », un rituel selon eux avant un bon match de Hockey des « Canadiens » (avec l'accent s'il vous plait !).

Toutes ces personnes ont ainsi beaucoup contribué au bon déroulement de ma thèse et je terminerai enfin cette liste en évoquant mes proches qui m'ont toujours soutenu (surtout moralement au moment de la rédaction) et qui se sont tenus au courant de mes avancées scientifiques. Je pense bien sûr à **ma famille** : mes parents, ma sœur, mes frères et conjoint respectif et ma belle famille. Je deviens ainsi le troisième Dr Agnès de la famille après mon père en médecine et ma sœur en pharmacie. Enfin, merci à **ma femme Julie**, pour ton soutien dans chacune des étapes de notre vie, qui en plus a vécu jours après jours les moments les moins agréables de la rédaction (surtout pendant l'organisation de notre mariage). Merci pour ce Bonheur que tu m'apportes chaque jour.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE **1**

CHAPITRE I : GENERALITES – ETAT DE L'ART **9**

INTRODUCTION 11

A. LA BIOCOMPATIBILITE DU DIAMANT 11
A.1. Introduction 11
A.2. L'hémocompatibilité du diamant 13
A.3. Les cellules adhérentes 14
A.3.a. Les ostéoblastes et les fibroblastes *15*
A.3.b. Les neurones *17*

B. LA FONCTIONNALISATION DU DIAMANT 20
B.1. Le diamant hydrogéné 20
B.2. Oxydation et fonctionnalisation 22
B.2.a. Les différentes voies d'oxydation de la surface du diamant *22*
B.2.b. La fonctionnalisation via les groupements oxydés (C-O par voie chimique) *24*
B.3. La fonctionnalisation des surfaces hydrogénées avec formation de liaisons C-C 27
B.4. La fonctionnalisation des surfaces hydrogénées avec formation d'autres liaisons 32
B.5. Bilan 33

C. APPLICATIONS : DIAGNOSTIQUE ET BIO-DETECTION 35
C.1. Les biopuces 36
C.2. Les biocapteurs 39
C.2.a. Les biocapteurs ampérométriques *39*
C.2.b. Les transistors à effet de champ (FET) *43*

CONCLUSION 45

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 47

CHAPITRE II : LE DIAMANT – SYNTHESE ET CARACTERISATIONS **51**

A. STRUCTURE ET PROPRIETES DU DIAMANT 53

B. LA SYNTHESE DU DIAMANT 56
B.1. La technique HPHT 56
B.2. La technique CVD 57
B.3. Les bâtis de synthèse de l'Institut Néel et du LIST 60
B.3.a. Institut Néel *61*
B.3.b. LIST *63*
B.4. Préparations et conditions de croissance du diamant monocristallin 64
B.4.a. Préparation des substrats de diamant *64*
B.4.b. Conditions de croissance des couches homoépitaxiées selon l'orientation (100) *65*
B.4.c. Conditions de croissance des couches homoépitaxiées selon l'orientation (111) *66*
B.5. Préparations et conditions de croissance du diamant polycristallin 67
B.5.a. Institut Néel *67*
B.5.b. LIST *69*

C. CARACTERISATIONS DES COUCHES DE DIAMANT 70
C.1. La cathodoluminescence (CL) 71
C.2. La microscopie électronique à balayage (MEB) 79
C.3. La spectroscopie à effet Raman 82

CONCLUSION 86

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 87

CHAPITRE III : LA BIOCOMPATIBILITE DES ELECTRODES DE DIAMANT 91

INTRODUCTION 93

A. LE DIAMANT POLYCRISTALLIN 94
A.1. Les différents paramètres d'étude : dopage et rugosité 95
A.1.a. La rugosité de surface 95
A.1.b. Le dopage 97
A.2. Les angles de contact 99
A.3. Adhésion, prolifération et morphologie des cellules 103
A.3.a. L'adhésion cellulaire 103
A.3.b. La prolifération des pré-ostéoblastes 106
A.3.c. Etude morphologique des cellules sur nos échantillons 108

B. LE DIAMANT MONOCRISTALLIN 110
B.1. Les différents paramètres d'études : orientations cristallines, dopage et angles de contact 110
B.1.a. Le dopage 112
B.1.b. Les angles de contact 116
B.2. Adhésion et prolifération des cellules 117
B.2.a. L'adhésion cellulaire 117
B.2.b. La prolifération des pré-ostéoblastes 120

CONCLUSION 123

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 125

CHAPITRE IV : FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DU DIAMANT VIA L'UTILISATION DES SELS DE DIAZONIUM 127

A. LE GREFFAGE DE LA BIOTINE 129
A.1. Un modèle biologique : le couple biotine/avidine 129
A.2. Un greffage multi-étape 132
A.3. L'electrospotting 134
A.4. Greffage et caractérisations des groupements nitrophényles 135
A.4.a. Le greffage 135
A.4.b. Caractérisation XPS 137
A.4.c. Caractérisations structurales (MEB, AFM) 139
A.5. Réductions chimique et électrochimique des nitrophényles – arrimage de la biotine 143
A.5.a. Le carbone vitreux 143
A.5.b. Le diamant 147
A.6. Caractérisation par microscopie de fluorescence 150

B. LE GREFFAGE D'UN COMPLEXE DE RUTHENIUM 155
B.1. Position du problème 155
B.2. Greffage et caractérisation électrochimiques sur or et diamant 158
B.3. Etude XPS du complexe immobilisé sur or 163
B.4. Etude XPS sur diamant nu 170
B.5. Etude XPS du complexe immobilisé sur diamant 172
B.6. Vers le contrôle de l'épaisseur sur diamant 179

CONCLUSION 184

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 185

CHAPITRE V : MATERIAUX COMPOSITES ET NANOSTRUCTURES 189

INTRODUCTION 191

A. SYNTHESE DES NANOTUBES DE CARBONE (NTC) 194

B. CARACTERISATION ET FONCTIONNALISATION DES NTC SUR SUBSTRATS 197
B.1. Nanotubes de carbone sur silicium (NTC/Si) 197
B.2. Nanotubes de carbone sur diamant (NTC/BDD) 199

CONCLUSION 204

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 205

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 207

ANNEXES 215

ANNEXE A : CULTURE CELLULAIRE 217

ANNEXE B : CARACTERISATIONS XPS ET MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE 221

ANNEXE C : ETUDE XPS DE L'ELECTROLYTE SUPPORT (NBu_4BF_4) 225

COMMUNICATIONS 229

GLOSSAIRE

Synthèse du diamant :

CVD : Chemical Vapour Deposition (dépôt en phase vapeur)
- MPCVD : Micro-Wave Plasma enhanced CVD (CVD assistée par plasma micro-onde)
- HFCVD : Hot Filament CVD (CVD assistée par filament chaud)

HPHT : Haute Pression Haute Température
PD : Pâte Diamantée
TMB : TriMéthyl Borane

Matériaux :

Diamant :

BDD : Boron Doped Diamond (diamant dopé bore)
- F-BDD : Fluorinated BDD (BDD avec une surface fluorée)

SCD : Single Crystalline Diamond (diamant monocristallin)
- B-SCD : Boron doped SCD (SCD dopé au bore)

PCD : PolyCrystalline Diamond (diamant polycristallin)
- B-PCD : Boron doped PCD (PCD dopé au bore)

UNCD : Ultra-Nano Crystalline Diamond (diamant ultra-nanocristallin)
NCD : Nanocrystalline Diamond (diamant nanocristallin)
- NID-NCD : Non Intentionally Doped NCD (NCD non intentionnellement dopé)
- B-NCD : Boron doped NCD (NCD dopé au bore)

µCD : microCrystalline Diamond (diamant microcristallin)
- NID-µCD : Non Intentionally doped µCD (µCD non intentionnellement dopé)
- B-µCD : Boron doped µCD (µCD dopé au bore)

p^+ : diamant lourdement dopé au bore
p^- : diamant faiblement dopé au bore

Autres :

GC : Glassy Carbon (carbone vitreux)
HOPG : Highly Oriented Pyrolytic Graphite (graphite hautement orienté)
NTC : NanoTubes de Carbone

FET : Field Effect Transistor (transistor à effet de champ)
- ISFET : Ion Sensitive FET
- SGFET : Solution Gate FET
- ENFET : ENzyme Modified FET

Caractérisations :

AFM : Atomic Force Microscopy (microscopie à force atomique)
CL : CathodoLuminescence
MEB : Microscopie Electronique à Balayage

RMN : Resonance Magnétique Nucléaire
rms : root mean square (valeur efficace)
SIMS : Secondary Ion Mass Spectroscopy
XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy
UV : Ultra-Violet

Electrochimie :

CP : ChronoPotentiométrie
DPV : Differential Pulse Voltammetry (voltammétrie pulsée différentielle)
EIS : Electrochemical Impedance Spectroscopy (spectroscopie électrochimique d'impédance)
VC : Voltampérométrie Cyclique
CE : Counter Electrode (contre électrode)
Ref : Reference Electrode (électrode de référence)
WE : Working Electrode (électrode de travail)

Molécules :

ACN : Acétonitrile
APDEMS : AminoPropylDiEthoxyMethylSilane
APTES : AminoPropylTriEthoxySilane
BSA : Bovine Serum Albumin (albumine de sérum bovin)
DMF : DiMéthylFormamide
DNA : DesoxyriboNucleic Acid (ADN : Acide DésoxyriboNucléique)
- ss DNA : single stranded DNA (simple brin d'ADN)
- ds DNA : double stranded DNA (double brin d'ADN)

DNPH : DiNitroPhényl Hydrazyne
EDC : 1-Ethyl-3-[3-Diméthylaminopropyl]Carbodiimide hydrochloride
EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique
GOx : Glucose Oxydase
HRP : Horse Radish Peroxidase (peroxydase de raifort)
NBu_4BF_4 : Tétrabutylammonium (NBu_4) tétrafluoroborate (BF_4)
ODN : Oligomère DésoxyriboNucléique ou oligonucléotide
OPD : Ortho-Phénylène Diamine
PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate)
PEG : PolyEthylène Glycol
PTFE : PolyTétraFluoroEthylène
SAM : Self-Assembled Monolayer (monocouche auto-assemblée)
SAPE : StreptAvidine-R-PhycoErythrine
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
Sulfo-NHS : sulfo-N-HydroxySulfosuccinimide
THF : TétraHydroFurane

Acides Aminés :

Ala : Alanine
Asn : Asparagine
Ser : Sérine
Thr : Thréonine
Tyr : Tyrosine
Da : dalton, unité de masse molaire généralement utilisée pour les protéines, 1 Da = 1 $g.mol^{-1}$

Laboratoires :

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CREAB : Chimie de la Reconnaissance et d'Etude des Assemblages Biologiques
IN : Institut Néel
INAC : Institut NAnosciences et Cryogénie
LIST : Laboratoire d'Intégration des Systèmes et des Technologies
SPrAM : Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires

INTRODUCTION GENERALE

De nombreux travaux sont actuellement axés sur l'étude du comportement de la surface d'un matériau en interaction avec son micro-environnement. En effet, une forte attention est portée sur l'interface entre les matériaux et la matière biologique. Ces études ont mené à la possibilité d'élaborer des structures hybrides qui ont finalement un intérêt dans divers champs d'applications tels que le photovoltaïque, l'électronique, l'électrochimie, la bioélectronique… Ce dernier champ d'applications est d'ailleurs très largement attendu par le domaine environnemental mais aussi médical pour la réalisation de nouveaux procédés d'analyses qui permettraient d'intervenir rapidement *in situ*.

En ce qui concerne la matière biologique, des protéines, des oligonucléotides et même des cellules vivantes sont très intéressantes pour réaliser des structures hybrides. Cependant, cette matière nécessite un environnement physiologique favorable et d'un minimum de biocompatibilité du substrat.

Dans un premier temps, il est nécessaire de vérifier cet aspect biologique du matériau. Dans un second temps, ces matières biologiques doivent être immobilisées sur la surface du matériau de manière stable pour des utilisations à long terme. Le choix d'un matériau, vérifiant ces deux critères, est donc primordial pour réaliser de telles structures.

Un vaste choix peut être fait dans les matériaux avec : les métaux, les isolants et les semi-conducteurs.

Les métaux sont généralement utilisés en tant qu'électrode pour l'électrochimie. Néanmoins, les métaux se corrodent, se dissolvent et, même si l'immobilisation de matière

biologique est possible, la stabilité à long terme est problématique. Ainsi, ils ne constituent pas forcément un environnement physiologique favorable et peuvent se révéler toxiques.

En revanche, les isolants tels que le quartz ou le verre constituent de très bons supports pour les systèmes biologiques. Mais les méthodes de transductions utilisées sont majoritairement optiques ou basées sur la microscopie de fluorescence : ces systèmes ne sont donc pas intégrables.

Enfin, les semi-conducteurs présentent la caractéristique de combiner les effets des métaux et des isolants, en faisant évoluer le taux de dopage. Les semi-conducteurs constituent donc une classe de matériaux de choix pour la réalisation de telles structures. Ainsi, de nombreux travaux ont été dédiés aux semi-conducteurs dans les différents domaines scientifiques (physique, chimie et biologie) pour les comprendre et les utiliser.

Il existe trois grandes classes de semi-conducteurs, en fonction de la classification périodique des éléments : les II-VI, les III-V et ceux de la colonne IV.

Voici quelques exemples de ces semi-conducteurs en fonction de leur maturité technologique, du contrôle du dopage, de la biocompatibilité et de la stabilité chimique de surface (tableau 1).

Tableau 1 : Comparaison de différents semi-conducteurs vis-à-vis de l'interfaçage direct avec des systèmes biologiques[*].

Semi-conducteurs	Maturité technologique et contrôle du dopage	Biocompatibilité	Stabilité chimique
Si (IV)	++	0	+
SiC (IV)	+	+	++
Diamant (IV)	0	++	++
AlGaAs (III-V)	++	-	-
AlGaN (III-V)	+	+	++
ZnCdSeS (II-VI)	+	0	+

Selon les propriétés intrinsèques de ces différents semi-conducteurs telles que la biocompatibilité et la stabilité chimique, le diamant constitue un des semi-conducteurs les plus intéressants pour réaliser des structures hybrides. Toutefois, celui-ci n'est pas arrivé à maturité technologique, et notamment, le dopage du diamant n'est pas totalement sous

[*] M. Stutzmann, J. A. Garrido, M. Eickhoff, M. S. Brandt, *Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science* **2006**, *203*, 3424.

contrôle. En effet, nous sommes actuellement aux prémisses de la maîtrise de la synthèse de ce matériau et globalement, le dopage de type *p* n'est bien maîtrisé qu'avec un seul élément, le bore. Son incorporation peut atteindre 1,5 10^{22} B.cm^{-3}. Lorsque celle-ci est supérieure à 3 10^{20} B.cm^{-3}, du fait de la relativement faible énergie d'ionisation du bore dans le diamant ($E_i[B]$ ~ 0,37 eV), le diamant a un comportement métallique : il peut servir d'électrode pour l'électrochimie. En revanche, le dopage de type *n* est plus difficile : l'azote a une énergie d'ionisation trop importante ($E_i[N]$ ~ 1,7 eV), ce qui le rend inutilisable pour ce type de dopage. Le phosphore possède une énergie d'ionisation beaucoup plus faible que l'azote ($E_i[P]$ ~ 0,57 eV), néanmoins, il n'a pas encore été démontré la possibilité d'obtenir un matériau de comportement métallique de type *n* en utilisant ce dopant.

Ainsi, beaucoup de verrous technologiques restent encore à lever. Cela provient du fait que le diamant est un matériau « jeune », comparé au silicium. Même si de nombreux travaux restent à accomplir quant au développement technologique du diamant, celui-ci demeure un matériau d'avenir grâce à ses propriétés intrinsèques.

L'objectif de la présente thèse consiste à utiliser ce matériau, le diamant, en tant que support pour la réalisation de biocapteurs. J'ai donc mené ces études dans le cadre d'une collaboration entre deux laboratoires à Grenoble :

- dans l'équipe Semi-Conducteurs à Grand Gap (SC2G) dirigée par Etienne Bustarret[*], au CNRS, à l'Institut Néel, avec Franck Omnès,
- et dans l'équipe Chimie de la Reconnaissance et d'Etude des Assemblages Biologiques (CREAB) dirigée par Thierry Livache, au CEA, à l'Institut Nanosciences et Cryogénie (INAC), dans le département Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires (SPrAM), avec Pascal Mailley.

Au sein du premier laboratoire, j'ai synthétisé des couches de diamant monocristallin et polycristallin (avec des tailles de grains micrométriques). Puis, ces échantillons ont été utilisés dans le second laboratoire pour des études de fonctionnalisation de surface afin de réaliser des biocapteurs.

[*] Equipe maintenant dirigée par Etienne Gheeraert

Il est à noter qu'aucune recherche sur la fonctionnalisation de surface du diamant n'avait été effectuée dans ces deux laboratoires. Il a donc été nécessaire de mettre en œuvre des études de fonctionnalisation et mettre en place des collaborations avec différents laboratoires afin de caractériser finement les couches organiques sur mes substrats de diamant. Ces études ont pu être réalisées avec Jean-Charles Arnault au LIST (CEA de Saclay), équipe dirigée par Philippe Bergonzo. D'autre part, des échantillons nanocristallins synthétisés dans ce même laboratoire par Mathias Bonnauron ont été utilisés pour des études de biocompatibilité des électrodes de diamant. En effet, j'ai pu effectuer deux séjours d'une durée totale de trois mois, au sein du laboratoire de Maryam Tabrizian à l'Université de McGill à Montréal, pour réaliser des études de biocompatibilité des électrodes de diamant polycristallin (micro et nanocristallin) et monocristallin avec Fereshteh Azari.

Les travaux entrepris dans ces quatre laboratoires, dont les domaines scientifiques diffèrent (physique [synthèse et caractérisations], chimie et biologie), ont permis de mettre en avant les différents aspects primordiaux pour réaliser un biocapteur (biocompatibilité, fonctionnalisation du diamant). Je montrerai donc l'aspect pluridisciplinaire de cette thèse au travers des résultats obtenus et présentés dans ce manuscrit.

Dans un chapitre introductif, je présenterai l'état de l'art quant aux aspects biologiques et chimiques de la surface du diamant. Tout d'abord, je traiterai tous les travaux qui ont permis de déterminer que le diamant intrinsèque est biocompatible. Je montrerai qu'il existe peu d'articles faisant part de cet état du diamant. Puis, j'étudierai en détail les différentes méthodes de fonctionnalisation de la surface du diamant et j'essayerai de comparer leur stabilité chimique. Enfin, je montrerai que certaines voies ont permis de réaliser des biopuces et des biocapteurs sur diamant.

Après ce premier chapitre, je présenterai dans le chapitre II la synthèse des couches de diamant polycristallin élaborées à l'Institut Néel et au LIST, mais aussi la synthèse des échantillons monocristallins élaborés à l'Institut Néel. Puis, dans ce même chapitre, je détaillerai les différentes méthodes de caractérisations physiques développées à l'Institut Néel qui permettent d'examiner les différents paramètres importants pour les études menées dans les chapitres ultérieurs.

Le chapitre III sera consacré aux résultats que j'ai obtenus à l'Université de McGill sur la biocompatibilité des électrodes de diamant polycristallin dans un premier temps, et de diamant monocristallin dans un second temps.

Ensuite, dans le chapitre IV qui constitue le cœur de ce manuscrit, j'étudierai les résultats obtenus quant à la fonctionnalisation du diamant par voie électrochimique utilisant les sels de diazonium. Je montrerai dans un premier temps, le greffage local d'une molécule d'intérêt biologique, la biotine, avec un suivi de cette fonctionnalisation par différentes méthodes de caractérisation. Dans un second temps, j'exposerai mes résultats sur l'immobilisation d'un complexe métallique sur la surface du diamant caractérisé via différentes méthodes (physiques et électrochimiques).

Enfin, le chapitre V sera consacré à la formation d'un matériau composite original, diamant/nanotubes de carbone pouvant être intéressant pour la réalisation de biocapteur. J'ai eu l'opportunité de synthétiser des nanotubes de carbone avec Anne-Marie Bonnot dans l'équipe SC2G sur mes échantillons de diamant, je me suis donc également axé sur cette voie. Ainsi, je présenterai des résultats préliminaires sur la fonctionnalisation par la biotine des nanotubes de carbone, qui ont crû sur des substrats de silicium et de diamant polycristallin. Cependant, je montrerai que de nombreux travaux sont encore à réaliser et de nombreuses questions restent en suspens.

Nous pouvons remarquer que ce manuscrit ne fait pas mention de la réalisation d'un biocapteur. En effet, un biocapteur n'a pas été réalisé avec la voie de fonctionnalisation utilisée et étudiée dans le chapitre IV. En revanche, un biocapteur ampérométrique enzymatique a été réalisé par le biais d'une méthode de fonctionnalisation de la surface du diamant qui est aujourd'hui en cours de brevet.

CHAPITRE I :

GENERALITES – ETAT DE L'ART

Introduction

Ce chapitre introductif a pour but essentiel de faire le point sur l'état de l'art en matière d'études de biocompatibilité, de fonctionnalisation de surface par des biomolécules, qui constituent le cœur de l'effort accompli au cours de la thèse. Il fait également le point sur l'utilisation actuelle du diamant dans les technologies de biopuces et de biocapteurs, soulignant l'intérêt très particulier et unique que présente ce matériau pour ces applications.

A. La biocompatibilité du diamant

A.1. Introduction

Par définition, on appelle biomatériau un matériau d'origine naturelle ou artificielle, que l'on peut mettre au contact de milieux biologiques sans y produire de perturbation et de modification notable sur le plan chimique et/ou métabolique. En particulier, les biomatériaux sont d'un intérêt très fondamental dans le domaine biomédical, car ils permettent dans ce secteur d'applications de concevoir de nombreux dispositifs implantables *in vivo* (prothèses, capteurs, électrodes …) dans des utilisations directes « embarquées » pour le diagnostic ou la thérapie invasives, au contact intime de zones sensibles du corps humain traditionnellement intolérantes à la plupart des implants.

Les milieux biologiques *in vivo*, qui correspondent à la réalité métabolique d'ensemble des organismes vivants, sont complexes. Nous pouvons les classer selon deux catégories, les milieux circulants, et non circulants.

- Les milieux circulants comme le sang contiennent des plaquettes, des protéines (albumine, collagène, globuline, lipoprotéines…), et des cellules comme les globules rouges et les globules blancs (macrophages et lymphocytes). Le matériau d'implant, en contact avec ce milieu, doit bien entendu avant tout éviter la coagulation s'il est inséré à l'intérieur de la circulation sanguine.

- Les milieux non circulants sont d'abord représentés quant à eux par les tissus de soutien tels que la peau, l'os, impliquant des cellules « passives » (fibroblastes, ostéoblastes…). Il existe aussi des cellules « actives » comme les neurones. En opposition avec les milieux circulants, ces cellules adhèrent à la surface des matériaux et assurent leur fonction après adhésion et interconnexion.

Plusieurs exemples peuvent être cités :

- Pour des prothèses de hanche, le matériau d'implant doit posséder de bonnes propriétés mécaniques, proches de celles de l'os, pour permettre le transfert des contraintes entre l'os et la prothèse. Il doit également avoir des bonnes propriétés tribologiques car il est soumis aux frottements au niveau de l'articulation. Les microparticules issues de l'érosion mécanique ne doivent pas provoquer de réactions inflammatoires, ni déclencher d'allergies. De plus, le matériau doit favoriser la recolonisation par le tissu osseux en contact direct avec la prothèse.
- Sur un autre registre, un vaisseau sanguin artificiel ne doit pas favoriser la condensation de plaquettes et la formation de phlébite empêchant la circulation du sang.
- Enfin, pour la réalisation de biocapteurs dans le cadre d'applications *in vitro*, notons que les enzymes immobilisées sur la surface du matériau ne doivent pas être altérées par le matériau lui-même, qui doit également pour sa part pouvoir conserver son activité électrique en régime de fonctionnement normal.

Nous voyons donc que la biocompatibilité d'un matériau dépend en grande partie de la façon dont il interagit avec les milieux avec lesquels il se trouve en contact.

Nous donnons ci-après, à titre d'exemple, quelques biomatériaux qui sont très utilisés pour:

- la locomotion (prothèses, plaques, vis…) : le titane et ses alliages, les aciers…
- le système cardiovasculaire (valves, cathéters…) : les aciers, le PTFE, les poly-uréthanes…
- les électrodes implantables (électro-myographie, neurostimulation…) : le platine, l'oxyde d'iridium, le nitrure de titane…

Le carbone amorphe est aussi un matériau utilisé pour la réalisation de valves. En effet, le carbone amorphe s'est révélé être un matériau biocompatible et intéressant puisque ce

dernier possède une dureté assez importante, proche de celle du diamant. Le carbone amorphe est en fait un matériau composé de carbones hybridés sp^2 et sp^3 à différentes concentrations, avec un réseau contenant de l'hydrogène. Il diffère du diamant qui n'est composé que de carbones hybridés sp^3.

Très peu de travaux (moins de dix) ont été publiés sur la biocompatibilité du diamant à l'heure actuelle. Or, celui-ci possède de très bonnes propriétés de surface, très favorables dans ce domaine. Il est en effet chimiquement inerte, et présente différents types de terminaisons de surface (hydrogénées ou oxygénées). Elles influent sur l'équilibre lipophile-hydrophile de la surface et donc sur la mouillabilité de celle-ci, laquelle est un paramètre qui joue un rôle tout particulièrement important sur l'adhésion cellulaire.

A.2. L'hémocompatibilité du diamant

Le caractère biocompatible d'un matériau en contact avec le sang est appelé hémocompatibilité. Le diamant est hémocompatible s'il y a simultanément absence de coagulation du sang et absence de rejet du matériau.

Les premiers travaux menés sur la biocompatibilité du diamant datent de 1994. Tang et al. ont testé *in vitro*, mais aussi *in vivo* par contact direct avec le sang, l'adhésion de protéines et de globules blancs *[1]*. Ce n'est que douze ans plus tard qu'Okroj et al. ont complété ces travaux par des tests *in vitro* d'adhésion de plaquettes de sang humain *[2]*.

Pour vérifier l'absence de la coagulation, des plaquettes et des fibrinogènes ont été cultivés *in vitro* sur diamant nanocristallin (NCD) et microcristallin (µCD) respectivement. Les fibrinogènes sont des protéines du plasma sanguin qui se transforment en fibrine lors de la coagulation sanguine. Dans les deux cas, par comparaison avec des matériaux biocompatibles (le titane) ou non (l'acier inoxydable), une très faible adhésion des plaquettes et des fibrinogènes a été observée sur la surface des échantillons. Ainsi, la coagulation du sang ne se produit pas sur la surface du diamant : il y a une diminution notable du risque de phlébite.

Pour compléter ces travaux quant à l'hémocompatibilité du diamant, Tang et al. ont vérifié l'absence du rejet du matériau *[1]*. Ces travaux consistent à vérifier l'absence ou la

faible adsorption des globules blancs et plus spécifiquement des macrophages. Les globules blancs luttent contre les bactéries et virus à l'origine des infections. Les macrophages sont des variétés de globules blancs de grande taille qui ont la propriété de s'adsorber et de détruire les grosses particules comme les cellules abîmées ou âgées, mais aussi des éléments étrangers. Lors de tests *in vitro* du diamant en contact avec des globules blancs, une adsorption mineure de ces derniers a été observée sur les échantillons. Ainsi, le diamant ne semble pas être rejeté par les globules blancs.

Au vue de ces résultats encourageants quant à l'hémocompatibilité du diamant, des tests *in vivo* ont été menés. Des échantillons de diamant ont été implantés pendant sept jours dans l'abdomen de souris, en contact du péritoine (tissu très vascularisé). La réponse inflammatoire a été observée en étudiant les interactions matériau-tissu. Finalement, le nombre de macrophages sur les échantillons de diamant était très faible, comme pour le titane (un matériau considéré comme biocompatible), alors que la surface du cuivre présentait une densité de macrophages élevée. De plus, le cuivre était partiellement corrodé. La morphologie des macrophages sur diamant et titane était aussi similaire, les cellules étaient hémisphériques, sans ponts entre elles, indiquant donc la faible adhésion de celles-ci sur ces deux matériaux.

En conclusion de ces résultats, il apparaît donc que les diamants NCD et µCD intrinsèques constituent de très bons matériaux en tant que revêtement pour réaliser des valves de cœur artificiel et même des endoprothèses vasculaires puisqu'ils sont hémocompatibles.

A.3. Les cellules adhérentes

Lors de la réalisation d'une prothèse osseuse, le matériau utilisé doit posséder de bonnes propriétés mécaniques et tribologiques, et doit également favoriser la recolonisation du tissu osseux en contact direct avec la prothèse.

Nous allons alors présenter des études qui ont été menées visant la mise en contact du diamant avec des cellules adhérentes « passives », telles que des ostéoblastes et les fibroblastes. Les premières sont des cellules régénératrices de tissu 'durs' alors que les secondes régénèrent les tissus 'mous'. En effet, les ostéoblastes sont des cellules chargées de

la synthèse du tissu osseux et les fibroblastes permettent le renouvellement du collagène et des fibres.

Par ailleurs, dans le cas de la réalisation d'électrodes implantables pour la neurostimulation, ces électrodes sont mises en contact avec des neurones. Ces cellules sont « actives », elles possèdent une activité synaptique et permettent le transfert des informations. Cependant, les neurones sont très sensibles à l'environnement.

A.3.a. Les ostéoblastes et les fibroblastes

Le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces des échantillons est un paramètre important pour l'adhésion des cellules. Kalbacova et al. ont ainsi étudié ce caractère en modifiant les groupements de surfaces du diamant *[3, 4]*. En effet, le diamant peut être soit hydrogéné soit oxydé de manière artificielle (chimie et plasma d'oxygène), donc hydrophobe ou hydrophile respectivement. Des ostéoblastes ont alors été cultivés sur des échantillons nanocristallins (NCD), avec ces différents caractères mais aussi avec différentes rugosités (de 10 à 40 nm rms). Il est important de noter que la gamme de rugosité de surface étudiée est très faible vis-à-vis de la taille des cellules (environ 20 µm de diamètre).

Avec les échantillons hydrogénés, quelle que soit la rugosité, une très faible quantité d'ostéoblastes a été observée à la surface, contrairement aux échantillons qui ont été oxydés. Une faible augmentation du nombre de cellules a été observée avec la rugosité de surface *[3]*.

Afin de mettre en évidence ces résultats, la surface des échantillons a été structurée avec des zones hydrophiles et hydrophobes *[4]*. La figure I-1 montre que les cellules s'adsorbent majoritairement sur les zones hydrophiles. La structuration de surface permet donc de créer des zones particulières d'adhésion des cellules. Cependant, nous pouvons remarquer la présence de quelques cellules sur les zones hydrophobes qui font des ponts entre les zones hydrophiles. Même si le nombre de cellules sur les parties hydrophobes est très faible, la question de la stabilité du diamant hydrogéné se pose lorsque celui-ci est en contact à l'air ou avec l'eau. En effet, de récents travaux ont démontré que le diamant s'oxydait en surface de manière naturelle *[5]*. Ainsi, pour des utilisations à long terme du diamant, il serait peut être préférable de greffer des molécules à caractère hydrophobe qui, malgré l'oxydation de surface, empêcheraient l'adhésion cellulaire.

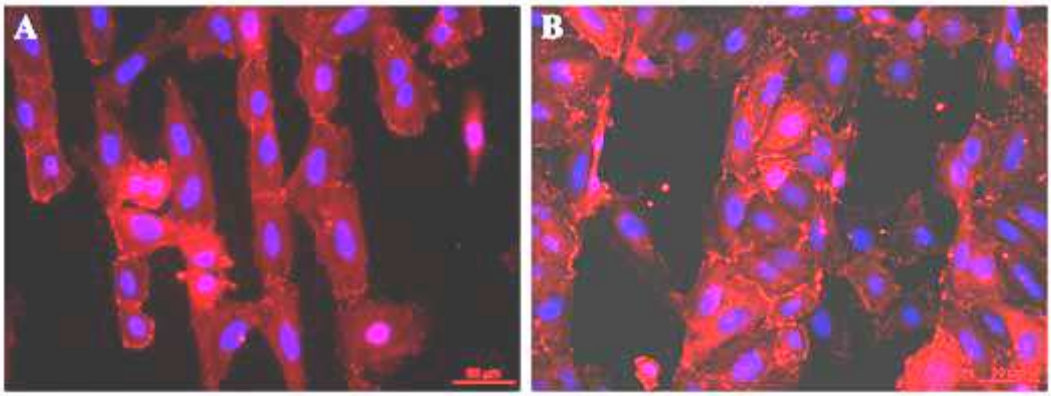


Figure I-1 : Résultats de la prolifération d'ostéoblastes pendant 48h sur diamant NCD structuré par des bandes oxydées ou hydrogénées de a) 30 µm ou b) 100 µm de largeur. Point focaux d'adhésion (en rouge) et noyaux (en bleu) sont caractérisés par fluorescence [4]. Barre d'échelle : 100 µm.

Nous pouvons observer sur cette figure que les cellules possèdent des formes polygonales sur les zones hydrophiles, indiquant une bonne adhésion, alors que sur les zones hydrophobes, celles–ci sont sphériques. De plus, nous pouvons distinguer les noyaux des cellules (en bleu) et notamment la présence de fibres d'actine au sein des cellules (en rouge). L'actine est une protéine qui traduit une forte adhésion des cellules sur la surface.

Le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces constitue donc un paramètre primordial pour la bonne adhésion des cellules.

Toutefois, il a été démontré que l'adhésion cellulaire était plus importante quand les surfaces possédaient des groupements carboxyliques (COOH) ou aminés (NH_2), les surfaces porteuses de groupements hydroxyles (OH) ayant un comportement opposé *[6]*.

Chong et al., en 2007, ont travaillé sur des échantillons ultra-nanocristallins (UNCD) et microcristallins (µCD) *[7]*. Il faut noter que pour les échantillons UNCD la hauteur des motifs est d'environ 90 nm alors qu'elle est d'environ 160 nm pour les échantillons µCD. Ainsi, même si cette gamme de rugosité est plus importante que celle étudiée par Kalbacova et al., celle-ci reste encore une fois faible comparée à la taille des cellules *[3]*.

Chong et al. ont modifié la surface par fonctionnalisation avec des fonctions carboxyles (COOH). Ils ont cultivé des fibroblastes sur ce type d'échantillon puis ont comparé les résultats avec ceux qui étaient obtenus sur des échantillons hydrogénés et oxydés par un traitement UV *[7]*. Finalement, le nombre de fibroblastes et leur force d'adhésion

restent importants sur les échantillons de diamant oxydés sous UV et ceux possédant des carboxyles, contrairement aux échantillons hydrogénés. Ceci corrobore les résultats obtenus par Kalbacova et al. *[4]*. En revanche, la densité cellulaire est plus importante sur les échantillons UNCD vis-à-vis des échantillons µCD. Nous pouvons formuler l'hypothèse que pour les UNCD, la surface spécifique est plus importante, la densité de fonctions oxydées l'est aussi : cela augmente donc le nombre de points d'attache pour les cellules.

Dans cette même étude, les fonctions carboxyles ont servi à greffer sur la surface des bras PEG (polyéthylène glycol). Ces bras sont connus pour diminuer l'adsorption non spécifique des protéines et des cellules *[8]*. En diminuant la densité des bras PEG sur la surface, ils ont pu observer une augmentation de la densité des cellules.

Enfin, les fonctions carboxyles ont été utilisées pour greffer sur la surface des protéines de la matrice extracellulaire, servant alors de substrat pour la migration cellulaire. Les auteurs ont fonctionnalisé la surface par la laminine, une glycoprotéine possédant un groupement polysaccharide associé à une chaine polypeptide, avant de mettre en culture des cellules. Une bonne adhérence de celles-ci associée à de nombreuses connexions intercellulaires ont pu être observées.

Ainsi, ces travaux ont pu démontrer que les terminaisons de surface du diamant jouent un rôle important quant à l'adhésion cellulaire. Cependant, celles-ci ont toutes été obtenues par des voies artificielles, or, qu'en est-il du diamant oxydé de manière naturelle *[5]* ?

A.3.b. Les neurones

La fixation contrôlée des neurones sur les surfaces solides présentent aussi un fort intérêt en médecine puisque de nombreux travaux cherchent à les immobiliser sur différents supports pour réaliser des réseaux de cellules de géométrie contrôlée et ainsi permettre de réaliser l'étude fondamentale de leurs interconnexions.

Specht et al. ont été les premiers à immobiliser des neurones de manière locale sur diamant monocristallin hydrogéné ou oxydé *[9]*. Ils ont utilisé un tampon (« stamp ») en PDMS pour déposer localement la laminine. Quel que soit l'état d'oxydation de la surface, il n'a pas été observé de différence d'adsorption de la laminine.

Puis, après culture des neurones, nous pouvons distinguer (figure I-2) que ces derniers suivent parfaitement le réseau préétabli par la laminine.

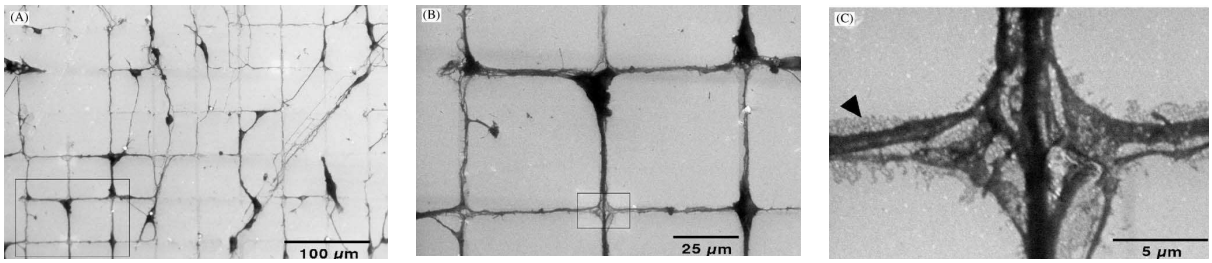


Figure I-2 : Images MEB obtenues à différents grossissements d'un réseau de neurones qui ont crû sur un réseau de laminine déposé sur diamant monocristallin par « stamping » [9].

Nous pouvons toutefois observer quelques défauts sur la figure I-2a, mais ils ont sans doute été provoqués lors de l'étape de structuration.

Ariano et al. ont aussi observé ce phénomène d'adsorption quel que soit l'état d'oxydation de surface du diamant monocristallin *[10]*. Pour cela, ils ont utilisé la laminine mais aussi des polypeptides, telles que la poly-lysine et la poly-ornithine. Cependant, lorsque la surface n'est pas prétraitée par la laminine ou des peptides, très peu de neurones adhèrent à la surface. Ainsi, il est important de déposer sur la surface de diamant des molécules de la matrice extra cellulaire pour permettre aux neurones de s'adsorber.

Une étude complémentaire et importante sur l'activité synaptique des neurones a été réalisée par Ariano et al. *[10]*. Deux électrodes ont alors été connectées à deux neurones interconnectés. Une électrode stimule un neurone tandis que l'autre électrode permet l'enregistrement du signal généré par le deuxième neurone. L'existence d'un transfert de l'information bioélectrique permet de conclure que ceux-ci gardent leur activité synaptique quand ils ont adhéré à la surface du diamant.

Notons enfin que tout récemment, des projets ont vu le jour pour la réalisation de rétines artificielles en diamant. Les recherches ainsi entreprises sur les réseaux de neurones *in vitro* et qui viennent d'être décrites y trouvent de la sorte tout leur sens.

Pour résumer, nous avons vu que le diamant constitue un matériau de choix pour diverses applications médicales puisqu'il est biocompatible. Quelques paramètres influent sur l'adhésion des cellules, comme la rugosité mais surtout l'état de surface de ceux-ci. Les surfaces oxydées permettent une meilleure adhésion cellulaire puisqu'elles sont hydrophiles. Cependant, dans le cas de la rugosité nous avons pu voir que tous ces travaux ont étudié des gammes faibles de rugosité. De plus, les surfaces ont toutes été oxydées de manière artificielle. Nous pouvons alors poser deux questions :

- Quelle est l'influence de la rugosité de surface du diamant lorsque celui-ci possède des tailles de motif de l'ordre de la taille des cellules ?
- L'adhésion cellulaire sur diamant oxydé naturellement est-elle équivalente à celle sur diamant oxydé de manière artificielle ?

D'autre part, tous ces travaux n'ont traité que du diamant intrinsèque. Et cela laisse donc ouverte au moins deux questions très importantes en ce qui concerne le diamant dopé au bore :

- Qu'en est-il du diamant lourdement dopé au bore lorsque celui-ci est utilisé comme électrode ?
- Quel est exactement l'effet du bore sur l'adhésion cellulaire ?

Nous essaierons de répondre à ces questions dans le chapitre III.

B. La fonctionnalisation du diamant

Pendant longtemps, la surface du diamant était considérée comme chimiquement inerte à la plupart des réactifs. Sa modification de surface était même vue comme impossible comparée à d'autres semi-conducteurs.

Ces quinze dernières années, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension de la chimie de surface du diamant. Cela a permis de développer de méthodes robustes quant à l'introduction de différents groupes fonctionnels sur la surface du diamant. Ces méthodes sont basées sur la chimie, la photochimie, et dans le cas des électrodes de diamant sur l'électrochimie. Les techniques traitées ici, ont été adaptées sur diamant sur la base de leur développement sur silicium ou sur carbone vitreux.

B.1. Le diamant hydrogéné

Le diamant après synthèse, sorti du bâti, possède une surface hydrogénée, il est alors très hydrophobe.

Lorsque le diamant est lourdement dopé au bore ([B] > 3 10^{20} B.cm^{-3}), il possède un comportement métallique, et peut servir d'électrode pour l'électrochimie. Au travers de l'étude de l'électrolyse d'une solution aqueuse d'acide sulfurique (H_2SO_4), un très faible courant de fond ainsi qu'une large fenêtre électrochimique de 3,5 V ont été démontrés (figure I-3) *[11]*. Ces électrodes peuvent réduire à des bas potentiels et même oxyder à des hauts potentiels des composés que certaines électrodes conventionnelles telles que l'or, le platine, le carbone vitreux ne peuvent atteindre. Elles demeurent alors très intéressantes à des fins environnementales puisque cela leur permet de réduire les nitrates et d'oxyder les composés organiques qui polluent les eaux sans attaquer l'eau.

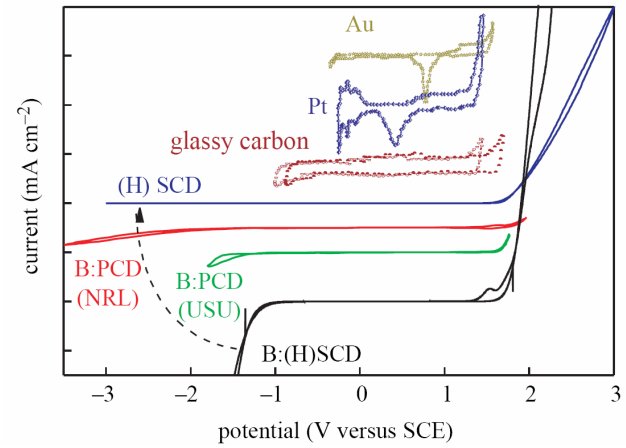


Figure I-3 : Comparaison des voltampérométries cycliques (VC) de différentes électrodes (diamants, or, platine et carbone vitreux) pour l'électrolyse de l'eau dans une solution à 0,5M H_2SO_4. VC de différentes électrodes de diamant : deux électrodes de diamant polycristallin dopé au bore (B:PCD) et deux électrodes de diamant monocristallin dopé (B:SCD) ou non (SCD) [11].

Néanmoins, même si pendant très longtemps, la surface hydrogénée du diamant était considérée comme très stable, de récents travaux ont démontré que celle-ci s'oxydait naturellement à l'air et se stabilisait au bout d'une semaine (figures I-4a et I-4b). Ceci mène alors à une baisse de la réactivité de la surface avec une diminution très rapide de la constante de transfert de charge k_0 (figure I-4c).

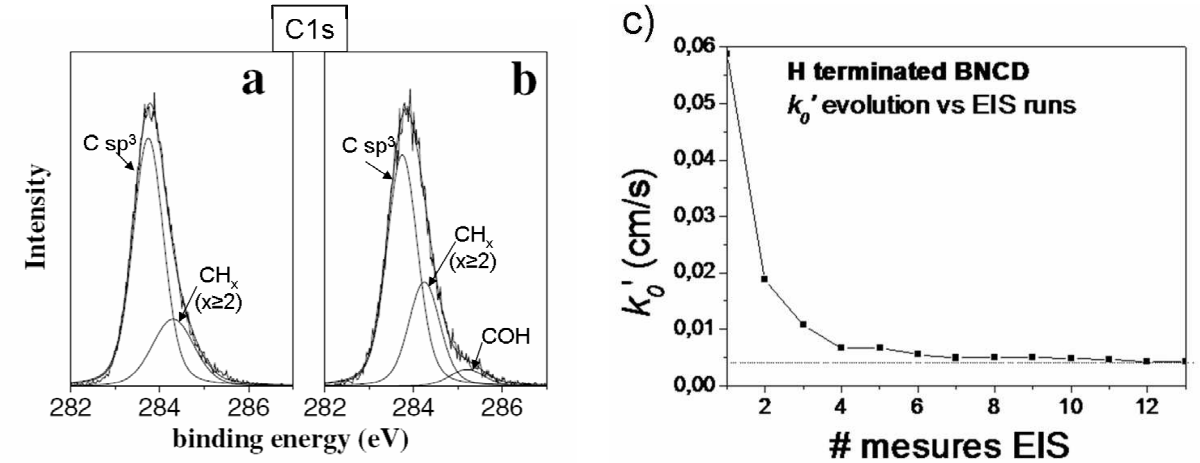


Figure I-4 : Etudes XPS de la zone spectrale C1s d'électrodes de diamant NCD a) avant (sortie du bâti) et b) après vieillissement à l'air. c) Evolution du coefficient de transfert de charge en fonction du nombre de caractérisations par spectroscopie électrochimique d'impédance (EIS) [5].

Des traitements (électro-)chimiques permettent d'« activer » les électrodes pour les stabiliser mais aussi pour obtenir des très bons k_0 *[5]*.

Ces traitements génèrent finalement des terminaisons oxydées de surface qui peuvent alors servir de fonctions primaires pour la fonctionnaliser (figure I-5). Toutefois, il existe des méthodes artificielles d'oxydation de la surface du diamant qui permettent d'augmenter la densité de certaines fonctions.

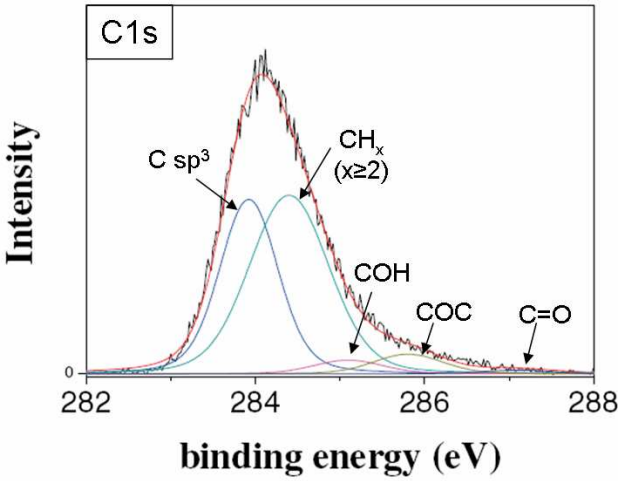


Figure I-5 : Etude XPS de la zone spectrale C1s d'électrodes de diamant NCD après traitement électrochimique [5].

B.2. Oxydation et fonctionnalisation

B.2.a. Les différentes voies d'oxydation de la surface du diamant

Le diamant peut présenter diverses terminaisons de surfaces (figure I-6). Celles-ci sont caractérisables via différentes techniques telles que l'infra rouge, la spectroscopie Auger, la spectroscopie XPS… Cette dernière caractérisation peut distinguer les différents groupements de surface présents en fonction du décalage énergétique du carbone par rapport à la composante principale du diamant.

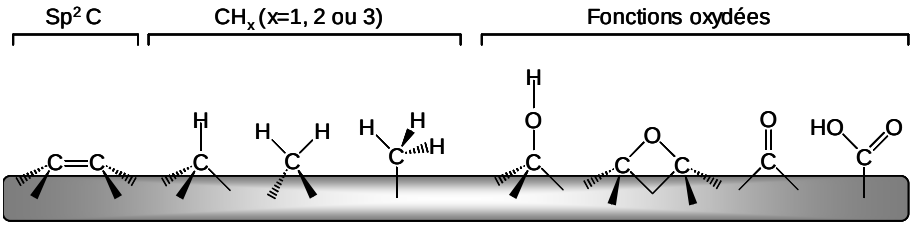


Figure I-6 : Terminaisons de surface du diamant.

Diverses procédures ont été mises en œuvre afin d'oxyder la surface du diamant avec une fonction majoritaire.

Certains groupements sont plus intéressants que d'autres vis-à-vis de la fonctionnalisation comme les hydroxyles (COH), les carbonyles (C=O) ou les carboxyles (COOH). En effet, ceux-ci sont assez réactifs contrairement aux ponts éthers (COC), très stables. En revanche, même si de nombreux travaux ont été menés pour obtenir des hydroxyles ou des carbonyles, il en existe peu sur l'obtention de carboxyles. En fait, ces derniers sont présents en faible quantité sur la surface engendrant alors une faible compacité de molécules greffées.

Les carbonyles peuvent être obtenus selon diverses méthodes telles que :

- le procédé thermique sur diamant monocristallin (100) *[12]*
- le plasma d'oxygène *[13]*
- l'anodisation du diamant polycristallin qui génère majoritairement des fonctions carbonyles de surface selon les facettes (100) *[14]*

Les hydroxyles peuvent aussi être obtenus par des procédés électrochimiques et ils sont majoritaires selon l'orientation (111) *[15]*.

En revanche, d'autres méthodes existent pour générer ces groupements mettant en jeu l'oxygène singulet *[16]* ou par photochimie sous dioxygène *[17]* ou sous ozone *[18]*.

Ces modifications de surface ont été utilisées dans le cas de l'étude de la biocompatibilité du diamant. En effet, celles-ci oxydent les surfaces et les rendent hydrophiles *[3, 4, 7]*.

Ainsi, il existe différentes voies permettant d'oxyder la surface du diamant pour la densifier avec tel ou tel groupement. Néanmoins, l'orientation cristalline possède un rôle important.

B.2.b. La fonctionnalisation via les groupements oxydés (C-O par voie chimique)

A ma connaissance, il existe uniquement un article qui traite de la fonctionnalisation de fonctions primaires carbonyles. Notsu et al. ont ainsi immobilisé la DNPH (2,4-dinitrophénylhydrazine), un produit généralement utilisé comme test caractéristique des aldéhydes et des cétones en chimie organique (figure I-7) *[14]*.

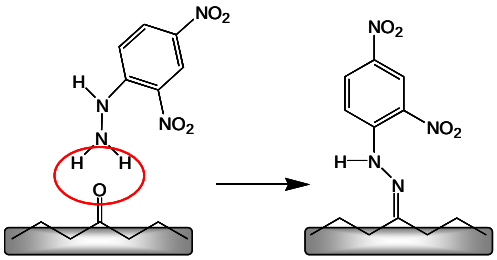


Figure I-7 : Schéma de fonctionnalisation de la surface du diamant par réaction entre la DNPH et les carbonyles de surface.

Nous pouvons voir que cette réaction génère à la surface une liaison C=N-N, et la question de la stabilité de celle-ci se pose.

Ce procédé ouvre toutefois une voie pour l'immobilisation de différentes molécules possédant une fonction hydrazine.

Les fonctions hydroxyles sont les fonctions oxydées les plus utilisées pour greffer des primaires d'arrimage et de nombreux travaux existent quant à leur utilisation. En effet, deux stratégies de fonctionnalisation utilisant les hydroxyles de surface sont très répandues : la silanisation et l'estérification. Une troisième voie est récemment apparue, elle est basée sur la chimie des phosphates et de leur pouvoir de complexation de l'ion zirconium.

Cette fonction hydroxyle s'obtient aussi sur silicium et cela a permis de générer des SAMs (self-assembled monolayers) par silanisation. Ainsi, tous les travaux établis sur silicium ont été adaptés sur diamant.

La silanisation consiste à faire réagir par voie chimique des silanes avec les hydroxyles. Le silane le plus couramment utilisé est l'APTES (aminopropyltriethoxysilane, figure I-8) *[19]*.

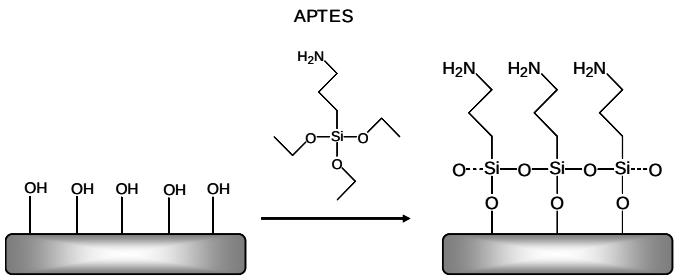


Figure I-8 : Schéma illustrant la réaction de silanisation de la surface oxydée de diamant avec l'APTES.

Cette technique de fonctionnalisation présente l'avantage de générer à la surface une grande quantité de fonctions amines qui peuvent servir de primaires d'arrimage pour l'immobilisation de peptides (figure I-9) *[20]* et de protéines *[21]*. Toutefois, l'utilisation de l'APTES peut générer des structures multicouches, contrairement à l'APDEMS (aminopropyldiethoxymethylsilane) *[22]*.

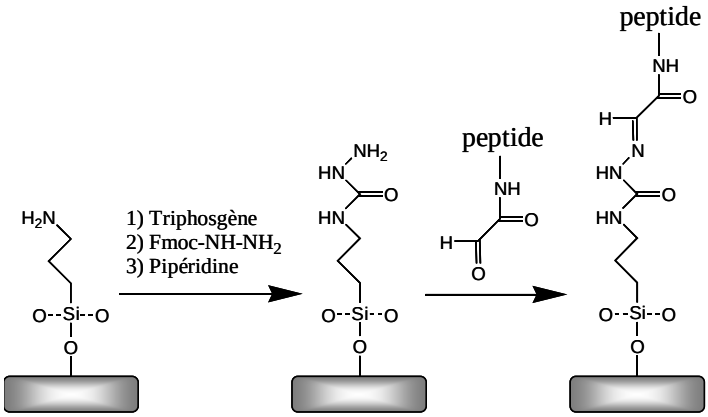


Figure I-9 : Greffage de peptides sur diamant après silanisation (figure I-8).

L'estérification est une autre méthode utilisant les hydroxyles. Comme pour la DNPH sur les carbonyles, cette réaction s'appuie sur la chimie organique. En effet, cette réaction consiste à faire réagir des molécules contenant un groupement carboxyle terminal (COOH) avec les hydroxyles de surface (COH). Des fonctions esters sont alors générées. Delabouglise et al. ont pu alors, par cette méthode, immobiliser une molécule d'intérêt biologique, la biotine (figure I-10) *[16]*.

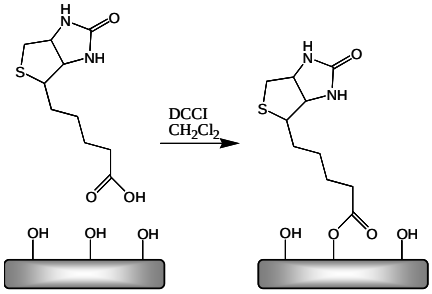


Figure I-10 : Schéma illustrant la réaction d'estérification de la surface hydroxylée de diamant par la biotine.

Cette expérience a permis d'immobiliser la protéine cible de la biotine, l'avidine. Par ailleurs, du fait de la grande affinité entre ces molécules (biotine/avidine), ce couplage peut servir de lien générique pour l'immobilisation de nombreuses biomolécules commerciales conjuguées à l'avidine telles que des enzymes.

La dernière méthode de fonctionnalisation des surfaces de diamant hydroxylées utilise la chimie des phosphates et les propriétés complexantes du phosphate greffé *[23]*. En effet, la surface est d'abord phosphatée, puis un complexe de zirconium est généré à la surface qui peut être alors fonctionnalisée par différents groupements possédant un ligand terminal comme une fonction carboxylate (figure I-11).

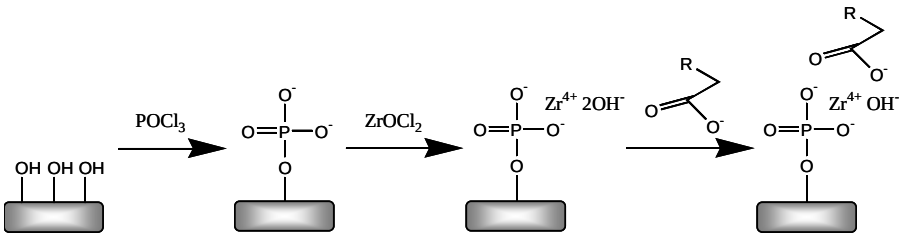


Figure I-11 : Chimie des phosphates et du zirconium sur surface hydroxylées de diamant.

Néanmoins, cette liaison n'est pas très stable, elle se clive en présence d'EDTA qui possède une meilleure affinité pour la complexation du zirconium.

Ainsi, nous venons de présenter la possibilité d'immobiliser des primaires sur diamant, par différentes voies chimiques, en utilisant les fonctions oxydées de surface générées artificiellement. Cependant, même si une liaison covalente est générée à l'interface, les molécules greffées ne sont pas immobilisées de manière stable et les liens peuvent se cliver dans des milieux agressifs. Par exemple, l'ester s'hydrolyse dans des milieux acides ou basiques.

Des travaux ont alors été mis en œuvre afin de fonctionnaliser la surface via des liaisons carbone-carbone, par définition très stables.

B.3. La fonctionnalisation des surfaces hydrogénées avec formation de liaisons C-C

Alors que la fonctionnalisation via les oxydes de surface ne s'effectue que par voie chimique, il existe d'autres stratégies de fonctionnalisation générant des liaisons C-C. La photochimie ainsi que l'électrochimie sont les voies les plus prometteuses. Elles ont d'ailleurs été très développées depuis ces trois dernières années.

Le diamant polycristallin hydrogéné génère des trous à sa surface quand il est illuminé dans l'UV (254 nm de longueur d'onde). Ces trous sont chargés positivement, ils constituent alors une cible parfaite pour une attaque nucléophile par les alcènes, également activés. Ainsi, pendant l'irradiation avec des alcènes, ces derniers se greffent sur la surface selon un procédé qui est finalement mal compris.

Le groupe de Hamers est le premier à utiliser cette méthode pour fonctionnaliser la surface du diamant *[24]*, démontrant la possibilité de greffer une monocouche de fonctions amines en grande quantité. Ces amines doivent cependant être protégées pendant l'irradiation afin de ne pas être détériorées (figure I-12a). Pour éviter une étape de déprotection, des fonctions carboxyles peuvent être utilisées à la place des amines (figure I-12b) *[25]*.

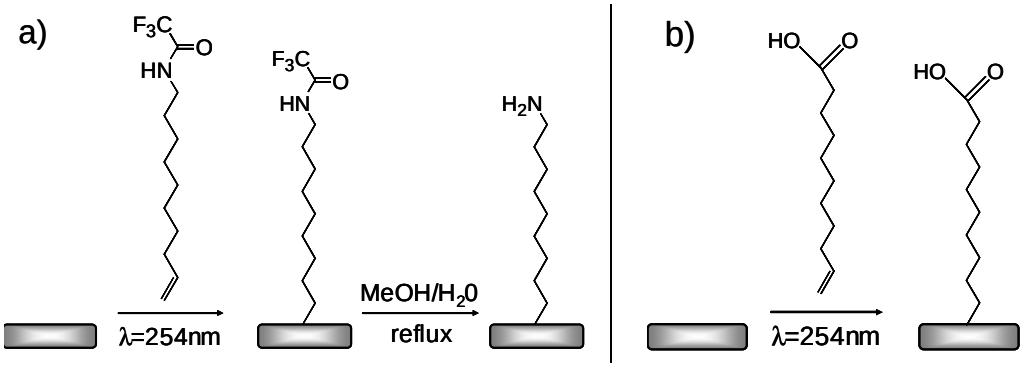


Figure I-12 : Chaines aliphatiques a) aminée ou b) carboxylée immobilisées sur la surface hydrogénée du diamant par photochimie.

Même si cette stratégie est très attrayante (localisation), son défaut principal réside dans la durée d'activation : il faut environ 6 heures pour obtenir une monocouche compacte.

La fonctionnalisation générant des fonctions carboxyles a également été mise en œuvre afin de promouvoir la culture cellulaire sur diamant *[7]*. En effet, ces groupements rendent les surfaces hydrophiles améliorant ainsi l'adhésion cellulaire. Par ailleurs, ces mêmes fonctions ont été utilisées pour le greffage de bras PEG qui a contrario empêchent l'adhésion cellulaire.

L'électrochimie constitue une alternative pour générer des liaisons C-C et celle-ci est beaucoup plus rapide (de l'ordre de la seconde). Le diamant lourdement dopé au bore est alors nécessaire pour se comporter comme une électrode. Kuo et al. *[26]* se sont appuyés sur les travaux menés sur carbone vitreux par l'équipe de Pinson qui utilise les sels de diazonium *[27]*. En effet, par réduction électrochimique, les sels de diazonium forment des radicaux au voisinage de la surface qui réagissent avec elle pour former une liaison C-C (figure I-13). Néanmoins, cette voie électrochimique ne forme pas sur la surface une monocouche comme par photochimie, mais un film épais.

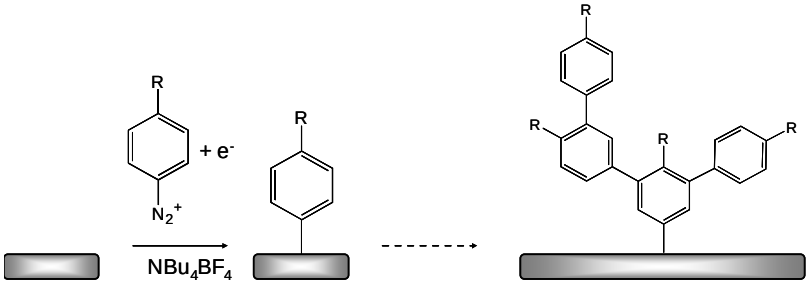


Figure I-13 : Fonctionnalisation de la surface du diamant via l'électrochimie des sels de diazonium. Formation de multicouche.

Dans la majorité des cas, le groupement R est un groupement nitro (NO_2), qui peut être réduit en fonction amino (NH_2) (figure I-14). La surface est alors décorée par des fonctions amines susceptibles de subir des étapes postérieures de greffage. Ces travaux seront détaillés dans le chapitre IV.

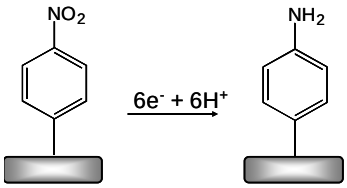


Figure I-14 : Réduction des fonctions nitrophényles en aminophényles.

En fait, pendant sept ans, cette voie a été écartée jusqu'à ce qu'en 2006, Wang et Carlisle l'ont à nouveau utilisée pour greffer une enzyme, la glucose oxydase *[28]*. Par ailleurs, Lud et al. ont aussi utilisé les sels de diazonium mais sans électrochimie *[29]*. Ils ont utilisé les propriétés réductrices du diamant fortement hydrogéné pour fonctionnaliser la surface avec une monocouche compacte. Cependant, comme pour la photochimie, cette dernière n'est obtenue qu'au bout de 73 heures de greffage.

Ces deux stratégies (photochimie et réduction électrochimique des sels de diazonium) permettent finalement de densifier la surface par des fonctions amines. De nombreux groupes les ont alors utilisées pour immobiliser soit des oligonucléotides (ODNs) (figure I-15a) *[24, 30, 31]*, soit des enzymes (figure I-15b) *[28, 32, 33]*.

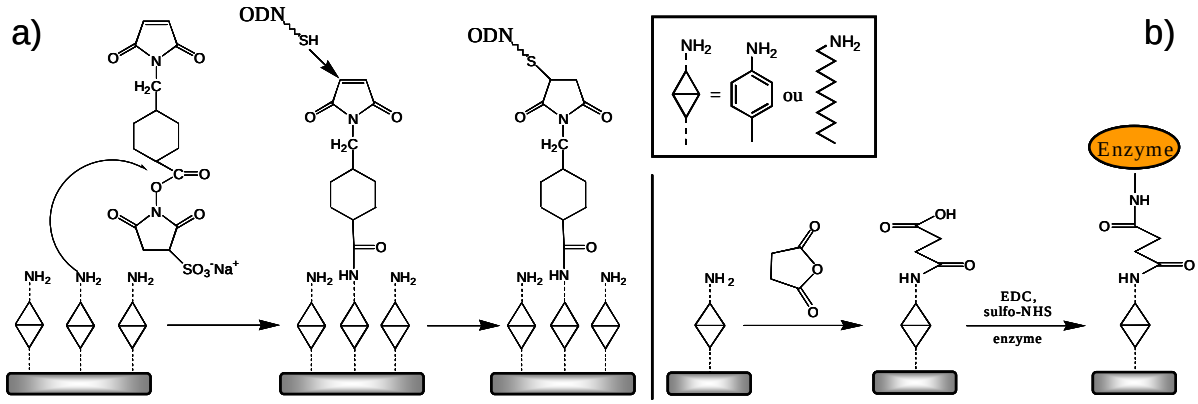


Figure I-15 : Schémas réactionnels pour l'immobilisation a) d'ODNs ou b) d'enzymes après fonctionnalisation par photochimie (figure I-12a) ou par électrochimie (figures I-13 et I-14) de la surface du diamant.

Ces deux méthodes de fonctionnalisation permettent de greffer des oligonucléotides sur la surface du diamant de manière covalente, via des liaisons C-C avec la surface (figure I-15a). La stabilité de l'arrimage des oligonucléotides sur diamant via la photochimie a été étudiée et comparée avec d'autres matériaux fonctionnalisés avec des ODNs via des cycles d'hybridation/dénaturation des ODNs (figure I-16a) *[24]*. Nous pouvons distinguer que la fluorescence n'évolue pas sur diamant après trente cycles, contrairement à celle sur or et silicium. Ainsi, le diamant constitue un très bon matériau pour la réalisation de biopuces réutilisables.

De plus, le groupe de Nebel a confronté ces deux méthodes de greffage photochimique et électrochimique. En utilisant la pointe d'un AFM, il a comparé les forces nécessaires pour arracher le film d'oligonucléotides arrimés sur la surface soit via les sels de diazonium, soit via la photochimie (figure I-16b) *[31]*.

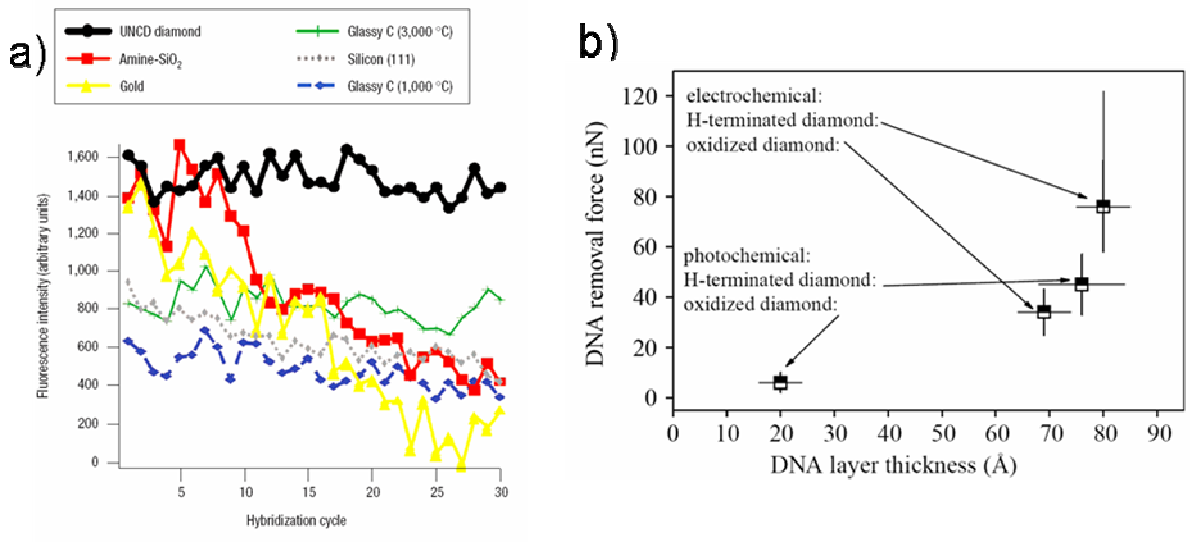


Figure I-16 : a) Etude par microscopie de fluorescence de la stabilité après 30 cycles d'hybridation/dénaturation d'ODNs immobilisés sur différents matériaux. L'immobilisation d'ODNs (figure I-15a) sur diamant UNCD a été effectuée après fonctionnalisation de primaires d'arrimage par photochimie (figure I-12a) [24]. b) Comparaison des forces nécessaires pour détacher l'ODN immobilisé après photochimie (figure I-12a) ou après électrochimie (figures I-13 et I-14) sur des surfaces de diamant hydrogénées ou oxygénées [31].

Nous pouvons voir que l'état d'oxydation de la surface joue un rôle important quant à la force d'adhésion des molécules. L'arrimage est ainsi plus stable lorsque la surface est hydrogénée. Mais aussi, les sels de diazonium permettent d'obtenir des liens plus forts avec la surface. Ce phénomène est peut-être dû à une stabilisation par les cycles benzéniques.

Parallèlement à ces deux voies, il en existe une, chimique, qui permet d'obtenir des liaisons C-C. Cette voie a été adaptée au diamant sur la base de son développement sur le silicium *[34]*. Elle consiste à utiliser la reconstruction de la surface du diamant monocristallin (100). En effet, celle-ci présente des dimères, avec des doubles liaisons (C=C), lorsque le monocristal est chauffé à haute température dans le vide. Il est alors possible d'effectuer des cycloadditions de types Diels Alder [4+2] ou des cycloadditions [2+2] (figure I-17).

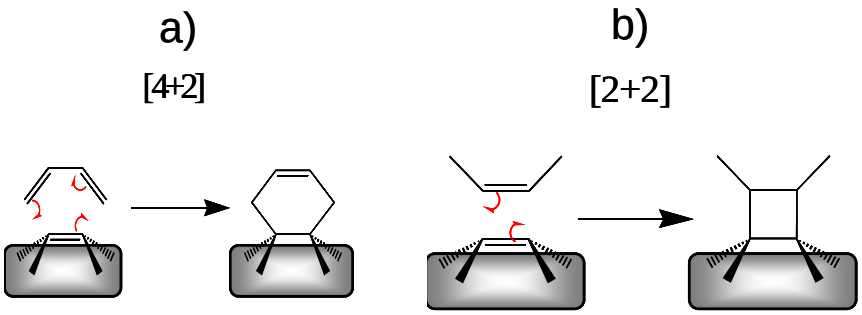


Figure I-17 : Schémas de principe de cycloadditions de types a) Diels Alder [4+2] ou b) [2+2].

Hovis et al. ont alors greffé du cyclopentène par cycloaddition [2+2] (figure I-18) *[35]*.

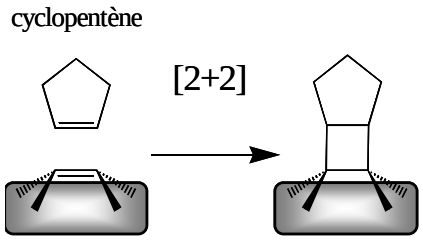


Figure I-18 : Fonctionnalisation par cycloaddition [2+2] du cyclopentène sur la surface reconstruite de diamant monocristallin (100) [35].

En fonctionnalisant les cyclopentènes par des fonctions amines par exemple, cette voie peut permettre d'introduire des primaires d'arrimage pour des molécules biologiques. Pourtant, il semble que la densité surfacique de cyclopentènes greffés sur la surface du diamant soit faible comparée aux mêmes travaux sur silicium.

Finalement, nous venons de montrer qu'il existe quatre méthodes qui permettent de fonctionnaliser la surface du diamant avec la génération de liaisons C-C. Deux de celles-ci ont été très développées ces dernières années (la photochimie et l'électrochimie avec les sels de diazonium), et elles ont finalement permis d'immobiliser des molécules biologiques. Leur intérêt sera développé dans la partie I.C..

B.4. La fonctionnalisation des surfaces hydrogénées avec formation d'autres liaisons

D'autres fonctions peuvent aussi être incorporées sur la surface du diamant. Elles peuvent alors modifier ses propriétés interfaciales. En effet, la surface peut être halogénée et devient par conséquent fortement hydrophobe.

De plus, la fluorination de surface augmente considérablement la fenêtre électrochimique des électrodes de diamant *[36]*. Elle passe de 3,5 V à 4,5 V et permet donc d'utiliser ces électrodes pour la réduction des nitrates (figure I-19) *[36, 37]*. Cette fluorination de surface se réalise par des traitements thermiques à 470°C dans du F_2 *[38]*.

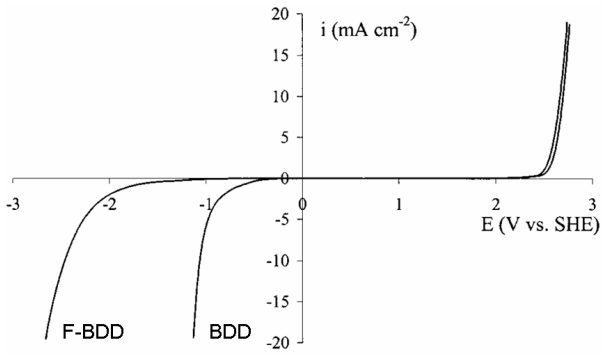


Figure I-19 : Voltampérométries cycliques d'électrodes de diamant (BDD) et d'électrodes de diamant dont la surface a été fluorée (F-BDD). 1 M $HClO_4$ à 25°C, vitesse de balayage 100 mV.s^{-1} [37].

Par ailleurs, la chlorination de surface peut être effectuée par cette même méthode, en présence de Cl_2 *[38]*. Une alternative à la chlorination thermique est réalisée par photochimie dans un milieu Cl_2 gazeux.

Le chlore de surface constitue en fait un intermédiaire réactionnel pour finalement aminer la surface par photochimie dans de l'ammoniac gazeux (figure I-20) *[39]*.

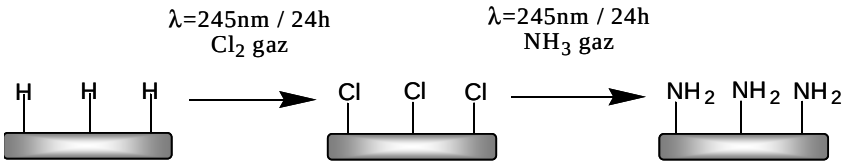


Figure I-20 : Schéma illustrant la modification de surface du diamant avec des fonctions amines par photochimie, après chlorination de celle-ci.

Une surface directement aminée peut aussi être obtenue par plasma dans l'ammoniac.

Cette amination permet alors de greffer des primaires d'arrimage comme des hydrazides (figure I-21a) *[40]*, des aldéhydes via la glutaraldéhyde (figure I-21b) *[41]* ou des carboxyles (figure I-21c) *[42]*.

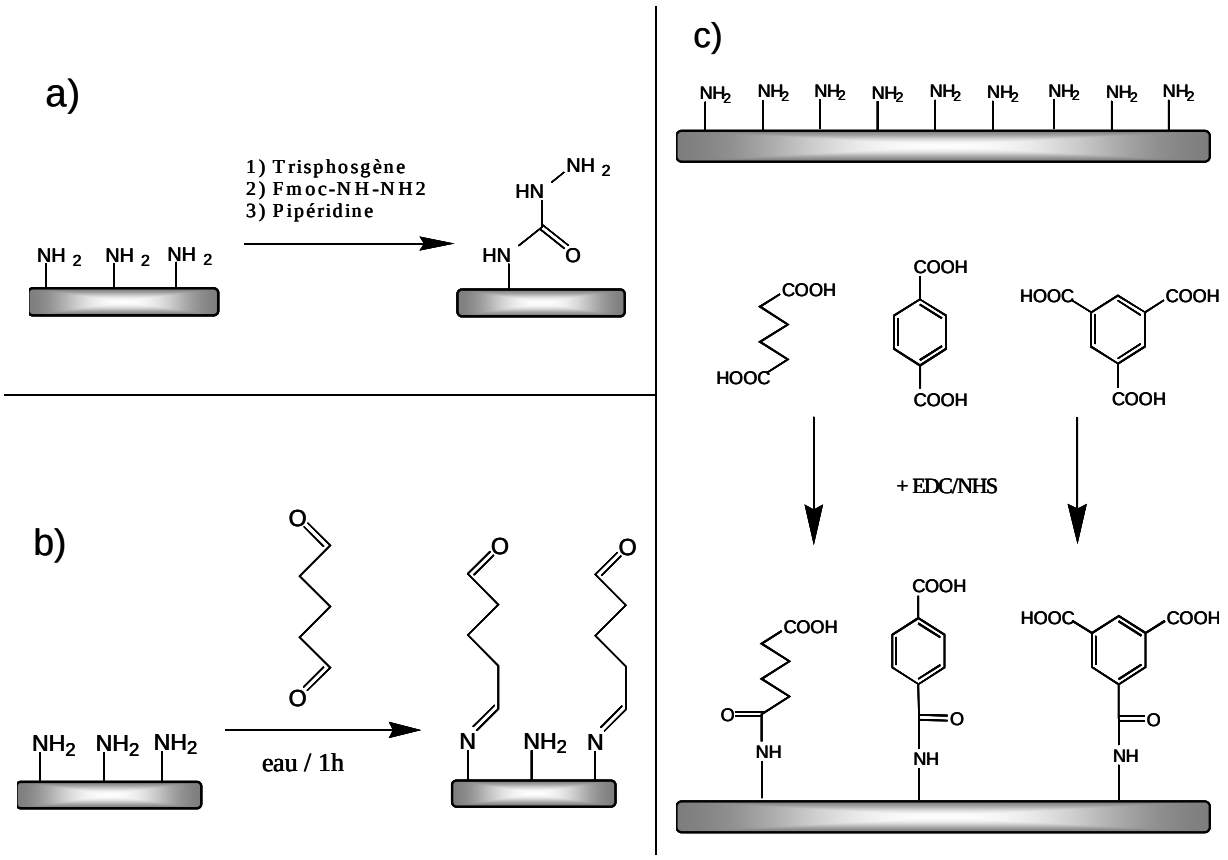


Figure I-21 : Immobilisation de primaires d'arrimage sur la surface aminée pour obtenir les fonctions a) hydrazides, b) aldéhydes et c) carboxyles.

Finalement ces molécules immobilisées sur la surface constituent des intermédiaires pour le greffage de peptides *[40]* ou d'ODNs *[41, 42]*.

B.5. Bilan

Le schéma de la figure I-22 résume l'ensemble des travaux dédiés à la fonctionnalisation de la surface du diamant.

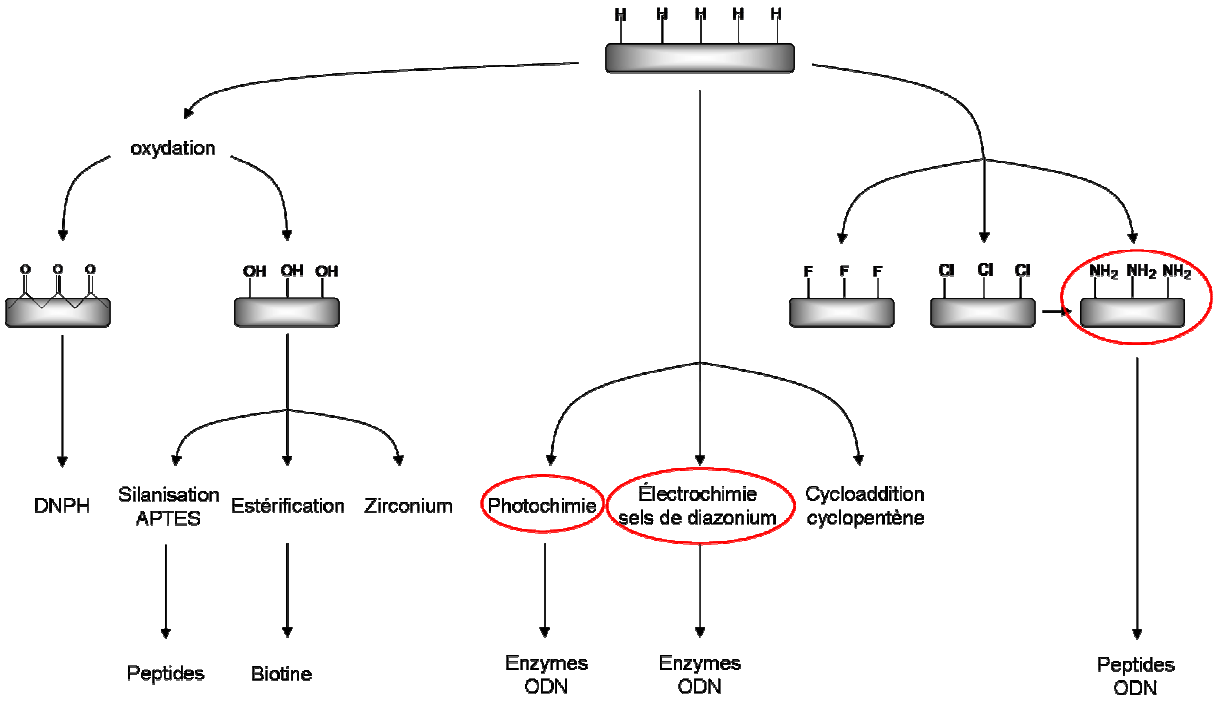


Figure I-22 : Schéma récapitulatif des différentes voies de fonctionnalisation de la surface du diamant pour le greffage d'entités d'intérêt biologique.

Nous avons donc pu voir que toutes ces méthodes de fonctionnalisation génèrent à la surface des primaires d'arrimage. Même si ces derniers sont immobilisés de manière covalente, leur stabilité avec la surface dépend de la voie utilisée. En effet, la silanisation et l'estérification créent des liaisons (carbone-oxygène) moins stables que celles générées par photochimie ou électrochimie (carbone-carbone). Ces deux dernières voies ont d'ailleurs été très étudiées depuis quelques années, mais une autre semble intéressante. Il s'agit de l'immobilisation de primaires après amination de la surface : des liaisons carbone-azote sont alors générées.

Finalement, ces trois méthodes (photochimie, électrochimie et amination) permettent de fonctionnaliser la surface du diamant avec des molécules biologiques telles que des peptides, des ODNs et même des enzymes. Il y a donc possibilité de réaliser des biopuces ou des biocapteurs sur diamant. Cependant, le greffage de ces molécules biologiques s'effectue en plusieurs étapes, au demeurant assez longues, ce qui limite une approche de greffage multiple sur diamant.

C. Applications : diagnostique et bio-détection

Ces deux premières parties nous ont donc permis d'étudier deux aspects importants du diamant. Il constitue un matériau biocompatible, mais aussi, il est fonctionnalisable via différentes techniques. Ainsi, des molécules d'intérêt biologique peuvent être immobilisées sur la surface du diamant sans être altérées par le matériau lui-même ou par le mécanisme de greffage. Il est alors possible d'effectuer des structures hybrides diamant/biomolécules avec la réalisation de biopuces et de biocapteurs.

Les biopuces sont des analyseurs biologiques multiparamétriques et généralement, la détection se fait par lecture indirecte via un marqueur (par exemple par fluorescence). Il est alors entendu que pour une étude multiparamétrique, une miniaturisation s'impose.
A contrario, un biocapteur est une association intime d'un biorécepteur et d'une unité de signalisation, appelée transducteur. Le biorécepteur, par exemple une enzyme, apporte la spécificité et la sensibilité biologique tandis que le transducteur transforme le signal de reconnaissance et délivre un signal interprétable, généralement électrochimique. Le biocapteur permet alors une lecture directe et rapide de la reconnaissance biologique. Le diamant, grâce à ses propriétés électrochimiques, pourrait alors constituer un transducteur idéal. En effet, nous avons vu que les électrodes de diamant possèdent une large fenêtre électrochimique couplée à un courant de fond très faible, contrairement à d'autres électrodes comme le carbone vitreux ou l'or (figure I-3), et une vitesse de transfert électronique rapide *[5]*. Il est important de noter que la surface du diamant ne s'encrasse pas au contact de produit organique ou inorganique. On parle alors d' « anti-fouling ». Cette propriété est très importante puisqu'elle évite ainsi de détériorer la réponse électrochimique à long terme.

Même si le biocapteur permet une lecture électrochimique directe et rapide, contrairement à la biopuce, cette dernière est plus sensible lorsque la détection s'effectue par fluorescence (figure I-23).

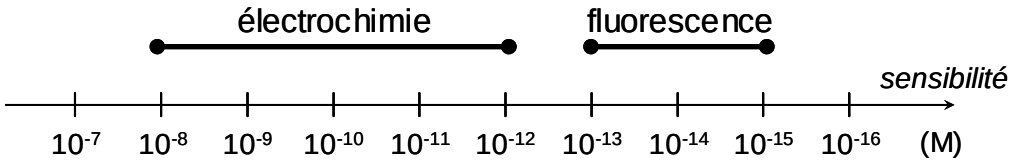


Figure I-23 : Comparaison de la sensibilité électrochimique et de fluorescence (M).

Nous allons alors développer les quelques études qui ont été menées pour la réalisation de biopuces et de biocapteurs.

C.1. Les biopuces

Pour réaliser des biopuces, la miniaturisation passe forcément par une étape de localisation du greffage sur la surface du support pour des études multiparamétriques. Toutefois, toutes les fonctionnalisations de surface étudiées dans la partie I.B. ne permettent pas une localisation directe. En effet, l'utilisation de masque pendant l'étape de photochimie constitue la seule voie directe de localisation. Yang et al. ont été les premiers en 2002 à fonctionnaliser la surface du diamant avec des oligonucléotides (figures I-12a et I-15a) de manière locale, avec des plots de tailles millimétriques *[24]*. Par réaction avec le complémentaire contenant un marqueur fluorescent, la localisation est mise en évidence (figure I-24).

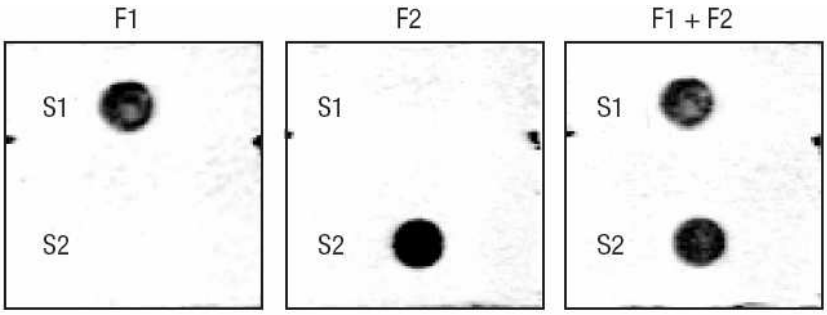


Figure I-24 : Images de fluorescence obtenues après hybridation par le complémentaire correspondant (F1 ou F2), modifié avec un fluorophore, de deux séquences différentes d'ODNs (S1 et S2) greffées sur la surface du diamant (figure I-15a) [24].

Deux ODNs différents (S1 et S2) ont effectivement été greffés à la surface. Nous pouvons distinguer sur la figure I-24 une très bonne spécificité du greffage lorsque les complémentaires correspondants (F1 et/ou F2), modifié avec un fluorophore, sont mis en contact avec la surface fonctionnalisée.

Même si la fonctionnalisation du diamant par voie photochimique permet une bonne spécificité de la reconnaissance moléculaire, cette méthode requière plusieurs étapes d'immobilisation pour chaque séquence d'ODN ce qui rend le procédé long.

En revanche, toutes les autres stratégies de fonctionnalisations telles que l'électrochimie et l'amination de surface requièrent une modification au préalable de celle-ci par lithographie. Par des systèmes de masquage de la surface aminée, un plasma fluor a été effectué pour structurer la surface du diamant avec des zones fluorées et d'autres aminées. Puis, après fonctionnalisation avec des peptides par exemple (figure I-21a), la figure I-25 permet de distinguer des plots d'une centaine de micromètres révélés par un anticorps fluorescent *[40]*.

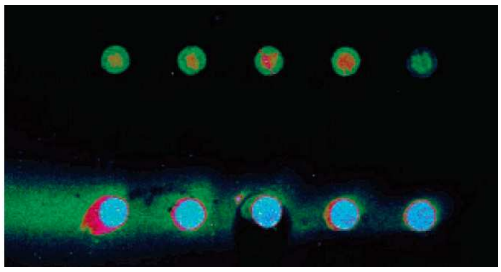


Figure I-25 : Image de fluorescence de plots de peptides FLAG immobilisés sur la surface du diamant selon la figure I-21a. Révélation avec un anticorps anti-peptide FLAG fonctionnalisé avec un fluorophore [40].

La taille des plots a même été diminuée avec la même technique mais pour l'immobilisation d'ODNs (figure I-21c) *[41]*. Des tailles de 10 et 20µm ont été obtenues.

Une autre méthode consiste à microstructurer le diamant avec des zones conductrices, lourdement dopées au bore, et des zones intrinsèques *[43]*. Le groupe de Nebel a pu élaborer un réseau de 35x38 électrodes de 15µm de diamètre (figure I-26a). Puis, par réduction des sels de diazonium sur toutes les électrodes, celles-ci sont alors fonctionnalisées avec des ODNs après plusieurs étapes chimiques (figures I-13 et I-15a), mais de manière collective.

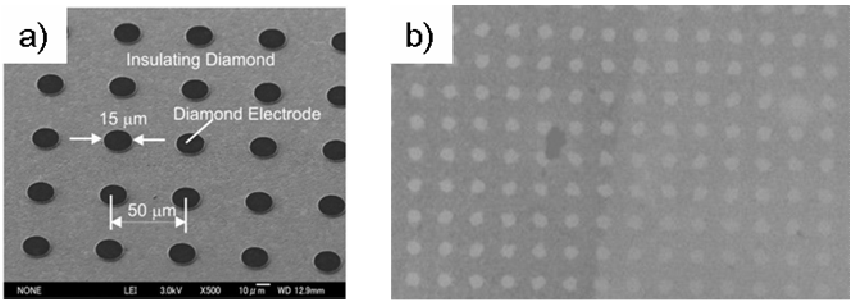


Figure I-26 : a) Image MEB d'un réseau d'électrodes de diamant. Les plots sombres sont les électrodes en BDD alors que les zones plus claires sont du diamant intrinsèque. b) Image de fluorescence après hybridation avec un complémentaire modifié par un fluorophore de ce réseau de microélectrodes fonctionnalisées par des ODNs (figure I-15a) par électrochimie (figures I-13 et I-14) [43].

Nous pouvons distinguer sur la figure I-26b que tous les plots fluorescent après hybridation avec le brin complémentaire modifié par un fluorophore.

Une détection électrochimique a également pu être élaborée par comparaison de la réponse d'une sonde redox en solution, le ferro cyanure ($[Fe(CN)_6]^{4-}$), avant et après hybridation des ODNs immobilisés sur les électrodes nanostructurées (figure I-27). Comme l'ODN est chargé négativement, il génère une répulsion électrostatique des anions de ferro cyanure : ces derniers sont alors partiellement oxydés. Cette répulsion est même renforcée après hybridation avec le brin complémentaire.

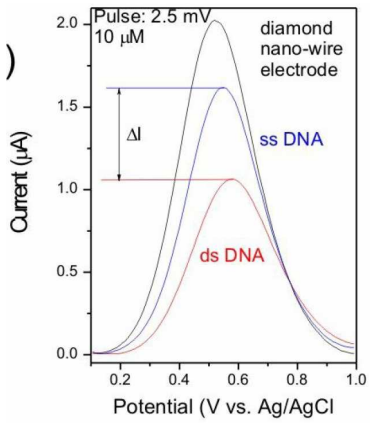


Figure I-27 : Signal obtenu par voltampérométrie par pulse différentiel (DPV) de l'électrode nue, avec l'ODN immobilisé (ss DNA), et avec le complémentaire (ds DNA) [43]. 1mM $[Fe(CN)_6]^{4-}$ dans du PBS, vitesse de balayage : 100 mV.s^{-1}, hauteur du pulse : 2,5 mV.

Par cette étude de réponse de la sonde, la détection limite est atteinte lorsque le complémentaire est à une concentration de 10 pM.

Cependant, malgré la miniaturisation, la localisation, ainsi que la détection électrochimique (plus rapide que la fluorescence) ce dispositif ne permet pas une étude multiparamétrique puisque toutes les électrodes sont interconnectées. Dans la situation où toutes les électrodes seraient indépendantes, il serait possible de fonctionnaliser chacune d'entre elle par des ODNs différents. Mais il faudrait les fonctionnaliser une à une ce qui serait très long et donc pas envisageable dans un procédé industriel.

L'approche de Nebel reste malgré tout très intéressante si les électrodes sont indépendantes, car cela permettrait de réaliser finalement une biopuce avec détection électrochimique. Néanmoins, des recherches sont encore à effectuer quant à la technologie du

diamant pour réaliser des circuits électriques, mais aussi sur la fonctionnalisation pour greffer et localiser les molécules biologiques en une étape.

Ainsi, nous avons vu qu'il existe quelques travaux sur la miniaturisation et la localisation du greffage de molécules biologiques (peptides et ODNs) sur la surface du diamant pour la réalisation de biopuces. Mais, dans la majorité des cas, des étapes de structuration sont nécessaires et elles alourdissent le procédé de fonctionnalisation.

C.2. Les biocapteurs

La réalisation de biocapteurs enzymatiques nécessite un transducteur électriquement actif. Dans ce cas, le diamant doit être utilisé comme une électrode (être lourdement dopé) pour réaliser des biocapteurs ampérométriques ; ou posséder une conductivité de surface (être fortement hydrogéné) pour fabriquer des FET (transistors à effet de champ) afin de concevoir des dispositifs potentiométriques.
D'autre part, pour des utilisations à long terme, les enzymes doivent être immobilisées de manière covalente sur des électrodes.

Nous allons donc étudier ces deux différents types de biocapteurs, ampérométrique et FET qui ont été élaborés sur diamant.

C.2.a. Les biocapteurs ampérométriques

Le principe d'un biocapteur enzymatique ampérométrique est basé sur la communication électrique entre le site actif d'une enzyme immobilisée sur une électrode, et la surface de celle-ci. Par exemple, dans le cas de l'immobilisation de la glucose oxydase (GOx) sur une surface, la GOx catalyse l'oxydation du glucose en solution. L'électrode intercepte alors l'échange électronique et le traduit en un signal quantitatif, directement relié à la concentration du substrat (le glucose) présent en solution. Cette interception peut être obtenue selon trois méthodes qui ont ainsi permis de classer ces biocapteurs selon trois générations (figure I-28).

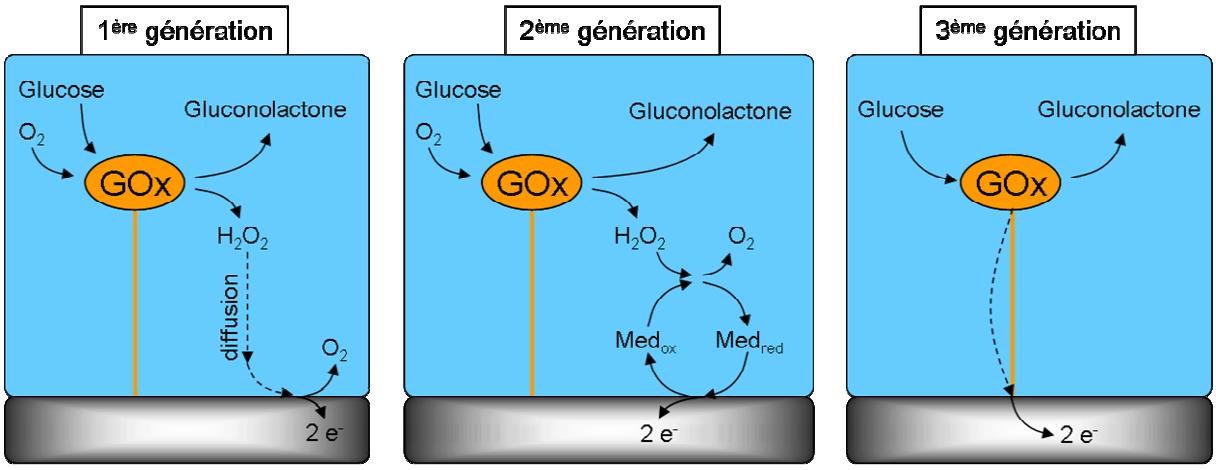


Figure I-28 : Première, deuxième et troisième générations de biocapteurs ampérométriques enzymatiques avec pour exemple l'immobilisation de la glucose oxydase (GOx).

La première et la seconde génération de biocapteur utilise l'oxygène en tant que co-substrat naturel de la GOx. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est produit par la réaction enzymatique et est détecté soit:

- directement au niveau de l'électrode après diffusion (première génération)
- au travers d'un relais d'électrons (un médiateur) qui est détecté à la surface de l'électrode (deuxième génération). Il est important de noter que dans certains cas, ce médiateur peut agir comme un co-facteur et remplacer l'oxygène.

Dans ces deux situations, le transfert électronique s'effectue entre l'enzyme et l'électrode au travers d'une espèce redox active diffusive.

A contrario, la troisième génération de biocapteur est basée sur un transfert électronique direct entre le centre prosthétique de l'enzyme et l'électrode.

Un grand intérêt est porté sur cette dernière génération de biocapteur puisque :

- la réponse électrochimique est indépendante de la fluctuation de concentration du co-facteur
- il n'est pas nécessaire de rajouter un médiateur redox qui peut être nocif pour des applications *in vivo*.

Pour ces trois générations de biocapteur, un courant est mesuré à l'électrode et est dépendant de la concentration du substrat.

En 2006, Wang et Carlisle ont immobilisé la GOx sur la surface du diamant via l'utilisation des sels de diazonium (figures I-13 et I-15b) *[28]*. Ils ont ainsi pu réaliser un biocapteur enzymatique ampérométrique de première génération (figure I-29).

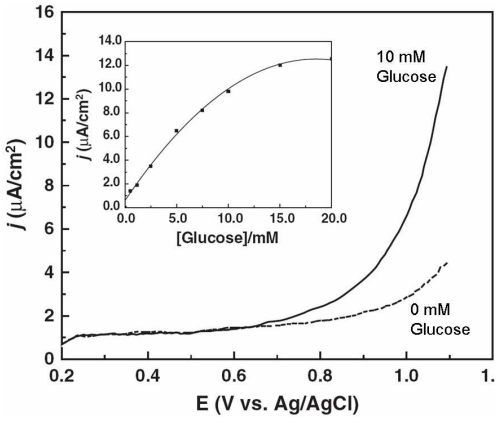


Figure I-29 : Voltampérogrammes d'une électrode de diamant, fonctionnalisée par la glucose oxydase (figure I-15b) par voie électrochimique (figures I-13 et I-14), dans une solution de PBS saturée en oxygène et en présence ou pas de 10mM de glucose. Vitesse de balayage : 50 mV.s^{-1}. L'encadré montre la courbe de densité de courant anodique enregistrée à 1,1 V en fonction de la concentration de glucose [28].

La figure I-29 permet de montrer que le glucose peut être détecté dans des solutions artificielles. La courbe de calibration obtenue à 1,1 V *vs* Ag/AgCl suit la forme classique de Michaelis-Menten avec une partie linéaire pour des concentrations de glucoses comprises entre 0,5 et 5mM.

Il est important de noter que ce biocapteur constitue seulement une preuve de la réalisation d'un tel procédé car il ne peut pas être utilisé dans des milieux biologiques (jus d'orange, sang…) du fait du fort potentiel appliqué. En effet, à 1,1 V *vs* Ag/AgCl, le biocapteur n'est plus sensible puisqu'il oxyde les espèces redox présentes dans le milieu (acide ascorbique, acide urique…).

La fabrication de biocapteurs de troisième génération peut éviter cet inconvénient.

L'équipe de Garrido est finalement la seule à avoir réalisé des biocapteurs enzymatiques ampérométriques de troisième génération sur diamant *[32, 33]*. En effet, la catalase favorisant la dismutation de l'H_2O_2 en O_2 et H_2O (figure I-30a), ainsi qu'une peroxydase (la HRP) catalysant la réduction de l'H_2O_2 (figure I-30b) ont été greffées sur la surface du diamant par photochimie (figures I-12a et I-15b).

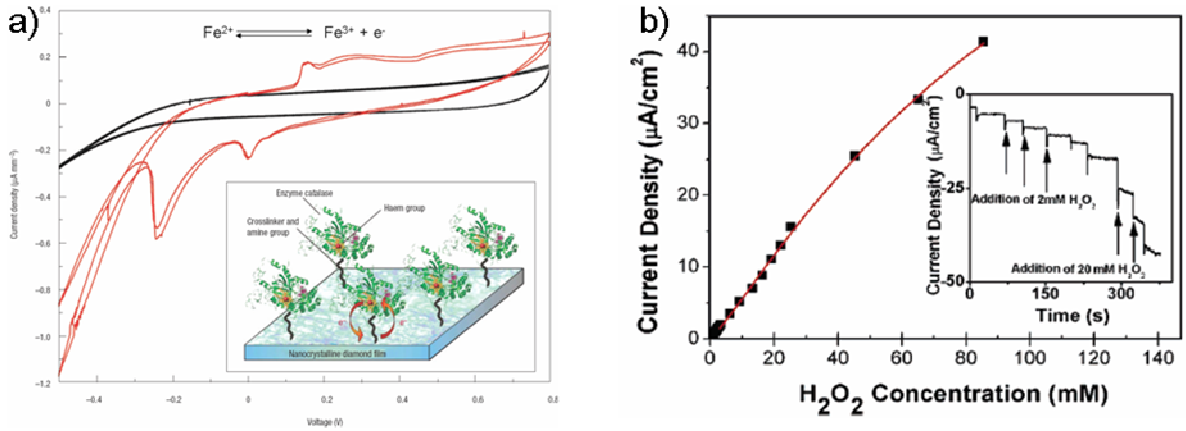


Figure I-30 : a) Voltampérogrammes de l'électrode de diamant non traitée (en noir) et fonctionnalisée par la catalase (en rouge) [32]. b) Courbe de calibration de la densité de courant mesurée en fonction de la concentration d'H_2O_2. Courbe obtenue à partir du biocapteur en diamant sur lequel la HRP est immobilisée. L'encadré représente la réponse de la densité de courant en fonction du temps pour ce biocapteur [33].

Nous pouvons distinguer sur la figure I-30a la présence du couple Fe^{3+}/Fe^{2+} caractéristique du groupement héminique de la catalase. Ainsi, celle-ci est bien immobilisée sur la surface mais surtout elle conserve son activité biologique.

La HRP a également été immobilisée, son centre héminique est aussi détecté du fait de la proximité de son centre prosthétique avec la surface de l'électrode. De plus, par incorporation d'H_2O_2, celui-ci oxyde la HRP et un courant cathodique est directement mesuré à l'électrode (figure I-30b). Nous remarquons que le temps de réponse après injection est très rapide, il est inférieur à cinq secondes. Finalement, la courbe de calibration semble se rapprocher d'une courbe classique de Michaelis-Menten avec une partie linéaire pour des concentrations d'H_2O_2 comprises entre 0,1 mM et 45 mM. Cette partie linéaire est alors beaucoup plus étendue qu'une autre étude réalisée avec la HRP immobilisée via des silanes sur la surface du diamant (quelques mM) *[21]*.

C.2.b. Les transistors à effet de champ (FET)

Les transistors à effet de champ sont des dispositifs électroniques composés d'un canal semi-conducteur connecté par deux électrodes dopées (la source et le drain). Leur particularité est d'utiliser un champ électrique pour contrôler la conductivité du canal dans le semi-conducteur qui est recouvert d'une fine couche isolante en silicium (la grille). La conductivité du canal peut être modifiée par une variation du potentiel d'équilibre quand le canal est plongé dans les solutions ioniques. En rendant la couche sensible aux ions, il est possible de réaliser des ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor). En général, les ISFET sont basés sur la technologie du silicium et la principale utilisation est la mesure du pH des solutions. Néanmoins, pour la réalisation d'ISFET en silicium, il est nécessaire de contrôler le dopage (de la source, du drain et du canal) et de déposer une fine couche isolante de silicium servant de grille.

En 2001, l'équipe de Kawarada a réalisé un FET original sur diamant : un film de diamant intrinsèque hydrogéné, non dopé, connecté à deux électrodes (la source et le drain), représente le canal alors que la solution aqueuse constitue la grille *[44]*. On parle alors de SGFET (Solution Gate Field Effect Transistor). Puis en 2004, la même équipe a immobilisé des enzymes sur la surface active du diamant des SGFET pour réaliser des ENFET (Enzyme Modified FET) sur diamant *[45]*. Les premiers ENFET ont été réalisés par Caras et Janata en 1980 sur silicium *[46]*.

Song et al. sont alors les premiers à fabriquer des ENFET sur diamant. Pour cela, après une amination partielle et oxydation de surface, la glucose oxydase ou l'uréase ont été greffées sur la surface avec du glutaraldéhyde sur les amines de surface (figure I-21b). Lorsque du glucose ou de l'urée ($(NH_2)_2CO$) sont en solution, ces produits réagissent avec l'enzyme qui modifie localement le pH (figure I-31).

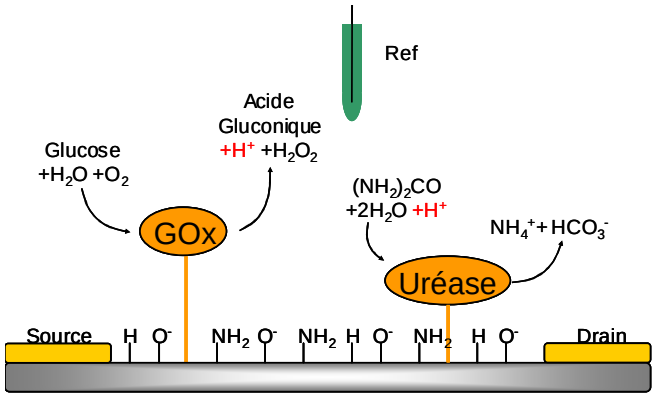


Figure I-31 : SGFET modifié avec la glucose oxydase ou l'uréase [45].

Comme le courant entre la source et le drain dépend directement de la conductivité de surface, celle-ci varie avec les états protonés ou déprotonés des fonctions hydroxyles (OH) ou amines (NH_2) de surface, et donc le courant varie avec le pH.

Pour la glucose oxydase, une protonation des fonctions de surface ($-O^- \rightarrow -OH$, $-NH_2 \rightarrow -NH_3^+$) induit une force électrostatique répulsive qui fait décroître la densité des trous dans le canal de type *p*. Une diminution du courant drain-source est alors observée en fonction de la concentration de glucose avec une partie linéaire entre 0,1 et 10 mmol.l^{-1}.

En revanche, l'uréase basifie le milieu en présence d'urée et donc une augmentation du courant drain-source est observée en fonction de la concentration d'urée avec une partie linéaire entre 1 µmol.l^{-1} et 10 mmol.l^{-1}.

Härtl et al. ont aussi réalisé un ENFET mais avec l'acétylcholine estérase, une enzyme importante pour la transduction du signal post-synaptique de certains neurones (figure I-32) *[47]*. Cette enzyme a été immobilisée soit sur des zones de diamant hydrogéné, par photochimie (figure I-12a), soit sur des zones oxydées, par silanisation (figure I-8), via l'utilisation d'un anhydride succinique (figure I-15b) ou du glutaraldéhyde (figure I-21b).

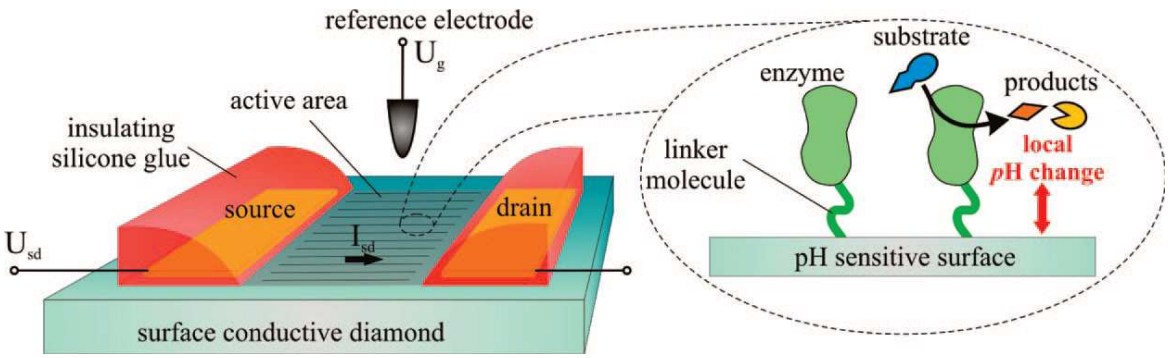


Figure I-32 : Schéma du ENFET en diamant. L'enzyme est greffée sur la surface du diamant constituée de bandes parallèles de 1µm de large, oxydées ou hydrogénées. L'enzyme est immobilisée soit sur les zones oxydées soit sur les zones hydrogénées, en fonction du protocole expérimental. En présence du substrat correspondant à l'enzyme, un changement du pH local est mesuré. La sensibilité au pH de ce SGFET en diamant est utilisée pour quantifier les réactions enzymatiques [47].

Ils en ont déduit que la sensibilité était meilleure lorsque l'enzyme était greffée après silanisation et utilisation de la glutaraldéhyde à des pH de 8.

Conclusion

Nous venons de voir dans ce premier chapitre que le diamant intrinsèque constitue un parfait candidat pour la réalisation de structure hybride diamant/matière biologique.
En effet, ce matériau est biocompatible mais aussi, il peut être fonctionnalisé via différentes méthodes par des molécules d'intérêt biologique pour réaliser des biocapteurs (FET).

En revanche, même s'il est possible de réaliser des biocapteurs ampérométriques enzymatiques sur diamant lourdement dopé au bore, aucun travail n'a été établi sur la biocompatibilité de ces électrodes.

Après avoir décrit la synthèse des électrodes de diamant (chapitre II), nous tâcherons de répondre à cette question (chapitre III) avant d'étudier en détail la fonctionnalisation par voie électrochimique la surface de nos électrodes en diamant (chapitre IV).

Références Bibliographiques

[1] L. Tang, C. Tsai, W. W. Gerberich, L. Kruckeberg, D. R. Kania, *Biomaterials* **1995**, *16*, 483.

[2] W. Okroj, M. Kaminska, L. Klimek, W. Szymanski, B. Walkowiak, *Diamond and Related Materials* **2006**, *15*, 1535.

[3] M. Kalbacova, M. Kalbac, L. Dunsch, A. Kromka, M. Vanecek, B. Rezek, U. Hempel, S. Kmoch, *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics* **2007**, *244*, 4356.

[4] M. Kalbacova, L. Michalikova, V. Baresova, A. Kromka, B. Rezek, S. Kmoch, *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics* **2008**, 1.

[5] E. Vanhove, J. de Sanoit, J. C. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Nesladek, *Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science* **2007**, *204*, 2931.

[6] Y. Arima, H. Iwata, *Journal of Materials Chemistry* **2007**, *17*, 4079.

[7] K. F. Chong, K. P. Loh, S. R. K. Vedula, C. T. Lim, H. Sternschulte, D. Steinmuller, F. S. Sheu, Y. L. Zhong, *Langmuir* **2007**, *23*, 5615.

[8] G. P. Lopez, M. W. Albers, S. L. Schreiber, R. Carroll, E. Peralta, G. M. Whitesides, *Journal of the American Chemical Society* **1993**, *115*, 5877.

[9] C. G. Specht, O. A. Williams, R. B. Jackman, R. Schoepfer, *Biomaterials* **2004**, *25*, 4073.

[10] P. Ariano, P. Baldelli, E. Carbone, A. Gilardino, A. Lo Giudice, D. Lovisolo, C. Manfredotti, M. Novara, H. Sternschulte, E. Vittone, *Diamond and Related Materials* **2005**, *14*, 669.

[11] C. E. Nebel, B. Rezek, D. Shin, H. Uetsuka, N. Yang, *Journal of Physics D-Applied Physics* **2007**, *40*, 6443.

[12] P. John, N. Polwart, C. E. Troupe, J. I. B. Wilson, *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 6600.

[13] C. H. Goeting, F. Marken, A. Gutierrez-Sosa, R. G. Compton, J. S. Foord, *Diamond and Related Materials* **2000**, *9*, 390.

[14] H. Notsu, I. Yagi, T. Tatsuma, D. A. Tryk, A. Fujishima, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2000**, *492*, 31.

[15] H. Notsu, I. Yagi, T. Tatsuma, D. A. Tryk, A. Fujishima, *Electrochemical and Solid State Letters* **1999**, *2*, 522.

[16] D. Delabouglise, B. Marcus, M. Mermoux, P. Bouvier, J. Chane-Tune, J. P. Petit, P. Mailley, T. Livache, *Chemical Communications* **2003**, 2698.

[17] R. Ohta, N. Saito, Y. Inoue, H. Sugimura, O. Takai, *Journal of Vacuum Science & Technology A* **2004**, *22*, 2005.

[18] R. Boukherroub, X. Wallart, S. Szunerits, B. Marcus, P. Bouvier, M. Mermoux, *Electrochemistry Communications* **2005**, *7*, 937.

[19] H. Notsu, T. Fukazawa, T. Tatsuma, D. A. Tryk, A. Fujishima, *Electrochemical and Solid State Letters* **2001**, *4*, H1.

[20] Y. Coffinier, S. Szunerits, B. Marcus, R. Desmet, O. Melnyk, L. Gengembre, E. Payen, D. Delabouglise, R. Boukherroub, *Diamond and Related Materials* **2007**, *16*, 892.

[21] J. Hernando, T. Pourrostami, J. A. Garrido, O. A. Williams, D. M. Gruen, A. Kromka, D. Steinmuller, M. Stutzmann, *Diamond and Related Materials* **2007**, *16*, 138.

[22] J. H. Moon, J. W. Shin, S. Y. Kim, J. W. Park, *Langmuir* **1996**, *12*, 4621.

[23] M. Mazur, P. Krysinski, G. J. Blanchard, *Langmuir* **2005**, *21*, 8802.

[24] W. S. Yang, O. Auciello, J. E. Butler, W. Cai, J. A. Carlisle, J. Gerbi, D. M. Gruen, T. Knickerbocker, T. L. Lasseter, J. N. Russell, L. M. Smith, R. J. Hamers, *Nature Materials* **2003**, *2*, 63.

[25] P. Christiaens, V. Vermeeren, S. Wenmackers, M. Daenen, K. Haenen, M. Nesladek, M. vandeVen, M. Ameloot, L. Michiels, P. Wagner, *Biosensors & Bioelectronics* **2006**, *22*, 170.

[26] T. C. Kuo, R. L. McCreery, G. M. Swain, *Electrochemical and Solid State Letters* **1999**, *2*, 288.

[27] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J. M. Saveant, *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 5883.

[28] J. Wang, J. A. Carlisle, *Diamond and Related Materials* **2006**, *15*, 279.

[29] S. Q. Lud, M. Steenackers, R. Jordan, P. Bruno, D. M. Gruen, P. Feulner, J. A. Garrido, M. Stutzmann, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 16884.

[30] B. Rezek, D. Shin, T. Nakamura, C. E. Nebel, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 3884.

[31] C. E. Nebel, D. C. Shin, B. Rezek, N. Tokuda, H. Uetsuka, H. Watanabe, *Journal of the Royal Society Interface* **2007**, *4*, 439.

[32] A. Hartl, E. Schmich, J. A. Garrido, J. Hernando, S. C. R. Catharino, S. Walter, P. Feulner, A. Kromka, D. Steinmuller, M. Stutzmann, *Nature Materials* **2004**, *3*, 736.

[33] J. Rubio-Retama, J. Hernando, B. Lopez-Ruiz, A. Hartl, D. Steinmuller, M. Stutzmann, E. Lopez-Cabarcos, J. A. Garrido, *Langmuir* **2006**, *22*, 5837.

[34] J. M. Buriak, *Chemical Reviews* **2002**, *102*, 1271.

[35] J. S. Hovis, S. K. Coulter, R. J. Hamers, M. P. D'Evelyn, J. N. Russell, J. E. Butler, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 732.

[36] S. Ferro, A. De Battisti, *Journal of Physical Chemistry B* **2003**, *107*, 7567.

[37] G. Sine, L. Ouattara, M. Panizza, C. Comninellis, *Electrochemical and Solid State Letters* **2003**, *6*, D9.

[38] A. Freedman, *Journal of Applied Physics* **1994**, *75*, 3112.

[39] B. Ohtani, Y. H. Kim, T. Yano, K. Hashimoto, A. Fujishima, K. Uosaki, *Chemistry Letters* **1998**, 953.

[40] Y. Coffinier, S. Szunerits, C. Jama, R. Desmet, O. Melnyk, B. Marcus, L. Gengembre, E. Payen, D. Delabouglise, R. Boukherroub, *Langmuir* **2007**, *23*, 4494.

[41] G. J. Zhang, K. S. Song, Y. Nakamura, T. Ueno, T. Funatsu, I. Ohdomari, H. Kawarada, *Langmuir* **2006**, *22*, 3728.

[42] J. H. Yang, K. S. Song, G. J. Zhang, M. Degawa, Y. Sasaki, I. Ohdomari, H. Kawarada, *Langmuir* **2006**, *22*, 11245.

[43] N. Yang, H. Uetsuka, J. Yu, E. Osawa, N. Tokuda, C. E. Nebel, *Nature Precedings* **2008**.

[44] H. Kawarada, Y. Araki, T. Sakai, T. Ogawa, H. Umezawa, *Physica Status Solidi a* **2001**, *185*, 79.

[45] K. S. Song, M. Degawa, Y. Nakamura, H. Kanazawa, H. Umezawa, H. Kawarada, *Japanese Journal of Applied Physics* **2004**, *43*, L814.

[46] S. Caras, J. Janata, *Analytical Chemistry* **1980**, *52*, 1935.

[47] A. Hartl, B.Baur, M. Stutzmann, J. A. Garrido, *Langmuir* **2008**, *24*, 9898.

CHAPITRE II :

LE DIAMANT – SYNTHESE ET CARACTERISATIONS

A. Structure et propriétés du diamant

Le diamant possède une structure dérivée de la structure cubique à faces centrées, appelée structure diamant (figure II-1). En plus des atomes des coins du cube et du centre de chacune des faces, quatre des huit sites tétraédriques sont occupés par un atome de carbone, ce qui donne huit atomes par maille élémentaire contre quatre pour une structure cubique à faces centrées. Chaque atome est finalement lié à quatre carbones de façon tétraédrique par des liaisons covalentes d'hybridation sp^3, très fortes lui conférant une structure extrêmement rigide.

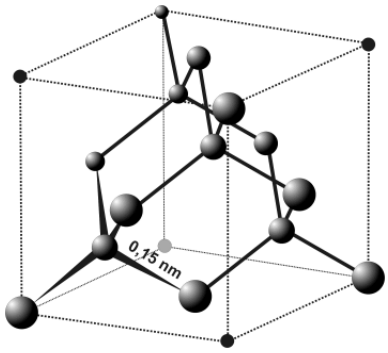


Figure II-1 : Structure cubique du diamant.

Cette structure apporte au diamant deux de ses remarquables propriétés :

- sa dureté, c'est le matériau naturel le plus dur : 10 sur l'échelle de Mohs (échelle de 1 à 10)
- sa conductivité thermique, 20 $W.cm^{-1}.K^{-1}$ *[1]*, ce qui est cinq fois celle du cuivre réputé être un très bon conducteur thermique.

Dans sa forme intrinsèque, le diamant est un semi-conducteur à large bande interdite (5,4 eV à 300 K *[2]*). Il est alors électriquement isolant, mais il peut être dopé et devenir semi-conducteur de type *p [3]*, et même conducteur de comportement métallique lorsqu'il est lourdement dopé au bore. Le tableau II-1 présente quelques caractéristiques électroniques du diamant comparées au silicium, le semi-conducteur le plus utilisé de nos jours dans l'industrie *[4]*.

Tableau II-1 : Comparaison de quelques caractéristiques physico-chimiques et électroniques du silicium et du diamant.

Propriétés	Silicium	Diamant
Largeur de la bande interdite (eV)	1,1	5,4
Température maximale d'utilisation (°C)	250	1000
Point de fusion (K)	1690	3700
Mobilité des électrons à 300K ($cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)	1300	4500
Mobilité des trous à 300K ($cm^2.V^{-1}.s^{-1}$)	450	3800
Champ de claquage (10^6 $V.cm^{-1}$)	0,3	5
Conductivité thermique ($W .cm^{-1}.K^{-1}$)	1,5	20

Ce tableau indique que le diamant est un meilleur candidat que le silicium pour des dispositifs de puissance pouvant fonctionner à haute température. Cependant, les technologies sur silicium sont historiquement plus avancées en comparaison à celles sur diamant.

Lorsque le diamant est lourdement dopé au bore, de type métallique ([B] > $3x10^{20}$ cm^{-3}), il peut être utilisé en tant qu'électrode en électrochimie. Ces électrodes présentent en particulier une fenêtre de potentiel étendue (3,5V, figure II-2) avec un courant résiduel très faible en solution aqueuse *[5]*. Cette large fenêtre électrochimique permet au diamant d'être un parfait candidat pour la réduction des nitrates dans l'eau *[6]* ainsi que l'oxydation des composés organiques.

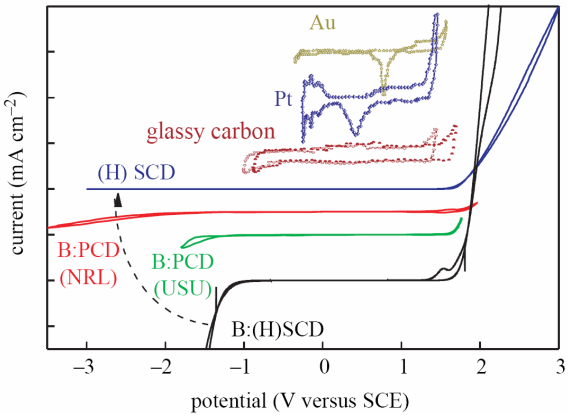


Figure II-2 : Comparaison des voltampérométries cycliques (VC) de différentes électrodes (diamants, or, platine et carbone vitreux) pour l'électrolyse de l'eau dans une solution à 0,5M H_2SO_4. VC de différentes électrodes de diamant : deux électrodes de diamant polycristallin dopé au bore (B:PCD) et deux électrodes de diamant monocristallin dopé (B:SCD) ou non (SCD) [5].

En dehors de ces propriétés remarquables que lui confèrent ce matériau massif, le diamant possède également des propriétés de surface très intéressantes. Celle-ci est chimiquement inerte, elle est résistante aux milieux corrosifs. En effet, la surface du diamant hydrogéné, sorti du bâti de croissance, s'oxyde de manière continue à l'air jusqu'à une stabilisation après une semaine *[7]*. Contrairement au silicium qui est beaucoup plus réactif et qui se passive sur plusieurs couches, la surface du diamant s'oxyde seulement en surface. Cette oxydation induit alors des fonctions telles que des hydroxyles (C-OH), des ponts éther (C-O-C), des carbonyles (C=O) et des carboxyles (COOH) qui peuvent participer à des réactions de chimie organique pour fonctionnaliser la surface du diamant. Il existe aussi d'autres terminaisons de surface sans oxygène telles que les liaisons carbone-carbone de type sp^2 (graphite) et les CH_x, avec x=1, 2 ou 3, se formant pendant la croissance (figure II-3).

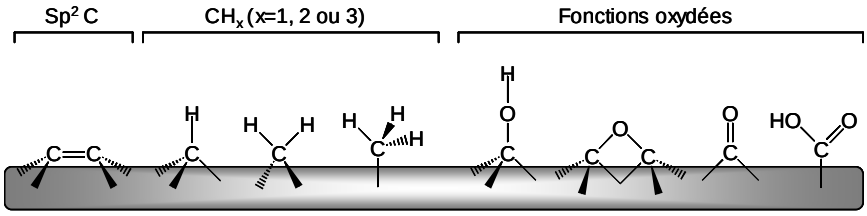


Figure II-3 : Terminaisons de surface du diamant.

Le diamant est réputé être un matériau biocompatible probablement dû à ses propriétés surfaciques. La partie III de ce manuscrit étudie cette dernière propriété très intéressante du diamant.

B. La synthèse du diamant

Il existe deux méthodes de synthèse du diamant : la synthèse dite HPHT (Haute Pression, Haute Température) et la synthèse par CVD (Chemical Vapour Deposition). Après avoir décrit ces deux techniques de production du diamant, nous étudierons la synthèse des échantillons que nous avons utilisés pour les études de biocompatibilité mais aussi pour le greffage de molécules biologiques.

B.1. La technique HPHT

Le diamant naturel se forme dans le manteau terrestre, à des profondeurs de 180 km, où les conditions de pression et de température sont très élevées. Puis, le diamant remonte à la surface lors de puissantes éruptions volcaniques. Sa rareté fait de ce matériau naturel un des plus chers.

Ainsi, les premières synthèses de diamant ont consisté à reproduire des conditions similaires à partir de graphite. Cette technique de production a été appelée HPHT (Haute Pression Haute Température) puisque du graphite est chauffé à des températures de l'ordre de 3300°K sous des pressions de 15GPa. La General Electric Company fut la première industrie à produire du diamant dans ces conditions en 1955 *[8]*. Puis, cette technique a été améliorée par le biais de l'utilisation de catalyseurs métalliques tels que le nickel ou le cobalt permettant ainsi de diminuer les températures (1800°K) et les pressions de synthèse (7GPa).

Le diagramme de phase du carbone (figure II-4) présente les conditions de synthèse du diamant en fonction des températures et des pressions à appliquer *[9]*.

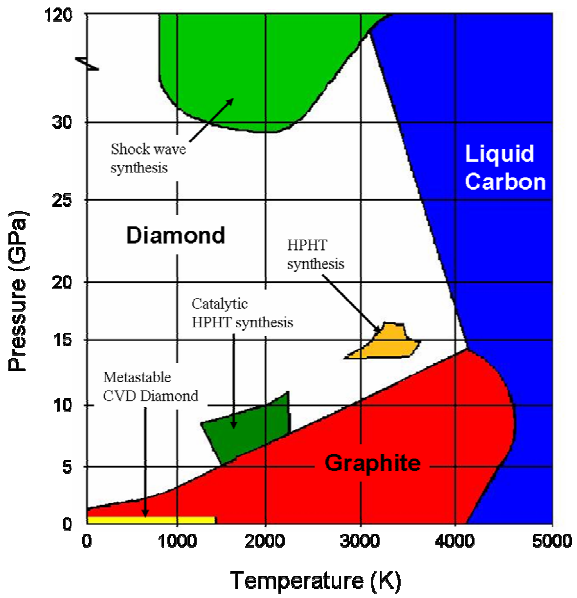


Figure II-4 : Diagramme de phase du carbone [9].

Cette voie de synthèse est aujourd'hui très utilisée dans l'industrie car elle permet d'élaborer des outils de coupe jusqu'aux enclumes en diamant permettant d'atteindre de très fortes pressions. Les applications en sont multiples.

La HPHT est aussi utilisée pour la réalisation de cristaux servant de substrats pour la croissance de couches homoépitaxiées par la technique CVD.

B.2. La technique CVD

Nous pouvons distinguer sur le diagramme de phase du carbone (figure II-4) la présence d'une zone métastable à basse pression et à basse température. La technique CVD (Chemical Vapour Deposition) est apparue. Pour effectuer la croissance du diamant dans ces conditions, une source d'énergie pour l'activation du procédé est nécessaire : soit par un filament de tungstène chauffé (HFCVD, Hot Filament CVD), soit par un plasma qui est généré par des micro-ondes (MPCVD, Microwaves Plasma enhanced CVD). Tous les échantillons utilisés dans ce manuscrit ont été élaborés par MPCVD.

Ces deux sources d'énergie dissocient les précurseurs carbonés, généralement du méthane gazeux (CH_4), formant des radicaux dont le méthyle (CH_3) alors très réactif avec le substrat. Par cette méthode de croissance de diamant, le méthane est mélangé avec du dihydrogène (H_2), essentiellement avec quelques pourcentages de CH_4 dans du H_2. Cette forte concentration d'hydrogène est nécessaire pour deux raisons importantes.

Dans un premier temps, l'hydrogène gazeux se dissocie sous l'action des micro-ondes. Le processus inverse ($H+H \rightarrow H_2$), proche du substrat, lui permet de rester à des hautes températures (environ 1000°C) puisque cette réaction est exothermique.

Dans un second temps, pendant la croissance du diamant, d'autres phases carbonées telles que des phases graphitiques ou amorphes croissent simultanément. L'hydrogène attaque alors les phases sp^2. Les phases diamant, d'hybridation sp^3 sont elles aussi attaquées mais beaucoup moins rapidement. Le résultat global est ainsi un dépôt sélectif de la seule phase diamant à l'état pur.

Les vitesses de croissance des couches de diamant sont plus élevées lorsque le rapport CH_4/H_2 est important *[10]*. Cependant, au-delà d'un certain rapport, l'hydrogène ne peut plus attaquer toutes les phases non-diamant, les couches ont alors une qualité cristalline amoindrie *[11]*.

Le diamant est un semi-conducteur à grand gap qui peut être dopé pendant la croissance. Le dopage *p* par le bore est aisé, et une large gamme dynamique de dopage est accessible (de 10^{16} à 1,5 10^{22} $B.cm^{-3}$). Grâce à la taille de l'atome de bore proche de celle du carbone, le bore s'incorpore facilement et prend la place d'un atome de carbone dans la maille cristalline du diamant. Le bore, appartenant à la colonne III, est un accepteur et capte alors les électrons émis par la bande de valence en y créant des trous. Puis, pour une concentration de bore supérieure à 3.10^{20} $at.cm^{-3}$, le diamant possède un comportement métallique, il devient conducteur, il peut donc servir d'électrode en électrochimie. En effet, dans ce cas, il peut remplacer un métal comme le platine et il garde ses propriétés électrochimiques sans se passiver, contrairement au silicium (figure II-2).

Les gaz permettant la croissance d'échantillons dopés au bore sont généralement le tri-méthyle borane (TMB), utilisé au CEA-LIST, ou le diborane (B_2H_6), utilisé à l'Institut Néel. Ces gaz sont donc ajoutés aux précurseurs (hydrogène et méthane) et sont aussi dissociés par le plasma.

La croissance de diamant par MPCVD s'effectue soit sur des substrats de diamant pour la synthèse de couches monocristallines, soit sur silicium pour des couches polycristallines.

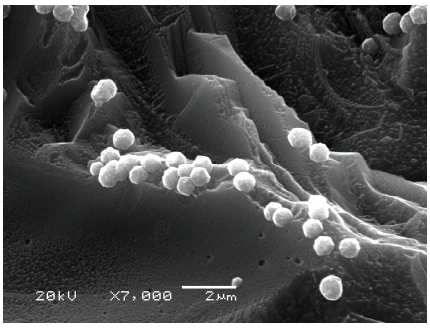
Dans le cas des échantillons monocristallins, une reprise d'épitaxie est élaborée sur un substrat de diamant. Cette homoépitaxie peut se réaliser sur des substrats possédant des

orientations cristallographiques différentes, généralement (100) et (111). Dans ce cas, les conditions de croissances diffèrent.

Pour les échantillons polycristallins, la croissance est menée sur silicium. Ce dernier subit ou non un prétraitement en fonction de la taille des grains de diamant désirée. Nous parlons alors :

- de diamant microcristallin (µCD) quand la taille des grains est de l'ordre du micromètre,
- de diamant nanocristallin (NCD) quand celle-ci est de l'ordre d'une centaine de nanomètres,
- de diamant ultra nanocristallin (UNCD) lorsque les grains ont des tailles inférieures à dix nanomètres.

Le modèle de Volmer-Weber est utilisé pour décrire la synthèse du diamant polycristallin sur des échantillons non-diamant *[12]*. Ce dernier explique que cette synthèse se passe en deux étapes : une étape de nucléation puis la croissance des nucléi. La nucléation est l'étape-clef de cette synthèse puisque les nucléi se forment sur des zones particulières du substrat. Dans le cas de la synthèse de diamant µCD sur un substrat en silicium, ce dernier est rayé à l'aide d'une pâte diamantée, nous parlons alors de « scratching ». La surface est dépolie est présente alors des pointes et des arêtes constituant des sites préférentiels pour la nucléation de grains de diamant (figure II-5). Ce phénomène peut être expliqué par une augmentation des lignes de champ sur ces aspérités par des effets de pointe.



<u>Figure II-5</u> : Image MEB d'un de nos échantillons après interruption du procédé lors de la phase de nucléation. Sites préférentiels de nucléation des cristallites de diamant.

Puis, dès que les nucléi atteignent une taille critique, ces derniers se développent dans les trois dimensions pour finalement coalescer et continuer de croître.

Pour augmenter la vitesse de nucléation, il existe une autre technique, le Bias. Elle consiste à appliquer un champ électrique au début du procédé de synthèse, pendant l'étape de nucléation. Le champ électrique permet d'augmenter considérablement la densité de nucléation. Ainsi, par cette technique, il n'est plus nécessaire de prétraiter le substrat de silicium, et il est possible d'obtenir du diamant NCD voire UNCD pour des temps très courts de croissance. Pour des temps plus longs de croissance, comme les grains croissent de manière colonnaire, leur taille augmente pour former du diamant µCD.

Il est à noter que l'étape de nucléation peut aussi être évitée en introduisant des nanoparticules de diamant sur la surface du substrat lors d'un bain à ultra-sons. Cette méthode est appelée le « seeding ». Le diamant croît alors directement sur ces grains et en fonction du temps de croissance, comme le Bias, du diamant NCD ou µCD peut être synthétisé.

Les substrats de silicium ont été préparés par « scratching » à l'Institut Néel alors que la méthode dite de « seeding » a été utilisée au LIST.

B.3. Les bâtis de synthèse de l'Institut Néel et du LIST

Pendant toute la durée de ma thèse, j'ai synthétisé des échantillons de diamant polycristallin (microcristallin, µCD) et monocristallin afin d'étudier la biocompatibilité de ce matériau et de fonctionnaliser la surface de ceux-ci. Ces échantillons ont été élaborés à l'Institut Néel, au CNRS de Grenoble. Dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Philippe Bergonzo, le LIST (CEA de Saclay), nous avons pu obtenir des échantillons nanocristallins (NCD). Ces derniers ont été synthétisés par Mathias Bonnauron, doctorant au LIST. Ainsi, avec les échantillons microcristallins de l'Institut Néel et les nanocristallins du LIST, nous avons pu mener des études de greffage et de biocompatibilité en fonction de la rugosité et du dopage.

Nous allons maintenant présenter les bâtis de croissance utilisés pour synthétiser de telles couches de diamant.

B.3.a. Institut Néel

L'Institut Néel, anciennement le LEPES, a choisi la technique MPCVD (Dépôt Chimique en phase Vapeur assistée par Plasma Micro-ondes) pour synthétiser des couches de diamant monocristallines et polycristallines. Le choix s'est porté en faveur de cette technique puisqu'elle facilite le dopage *p in situ*.

Un bâti de croissance a été construit en 1992 par Etienne Gheeraert *[13]* à partir d'un modèle japonais du NIRIM (National Institute for Research in Inorganic Materials) *[14]*.
La chambre de croissance est constituée d'un tube en quartz croisant un guide d'onde à l'intérieur duquel est produit un champ électromagnétique à la fréquence de 2,45 GHz. Ce champ est créé par un générateur dont la puissance peut être ajustée entre 0 et 2000 W ; une puissance comprise entre 250 et 350W étant utilisée dans la plupart des cas. Le plasma se forme à l'intersection du guide d'onde et du tube (figure II-6).

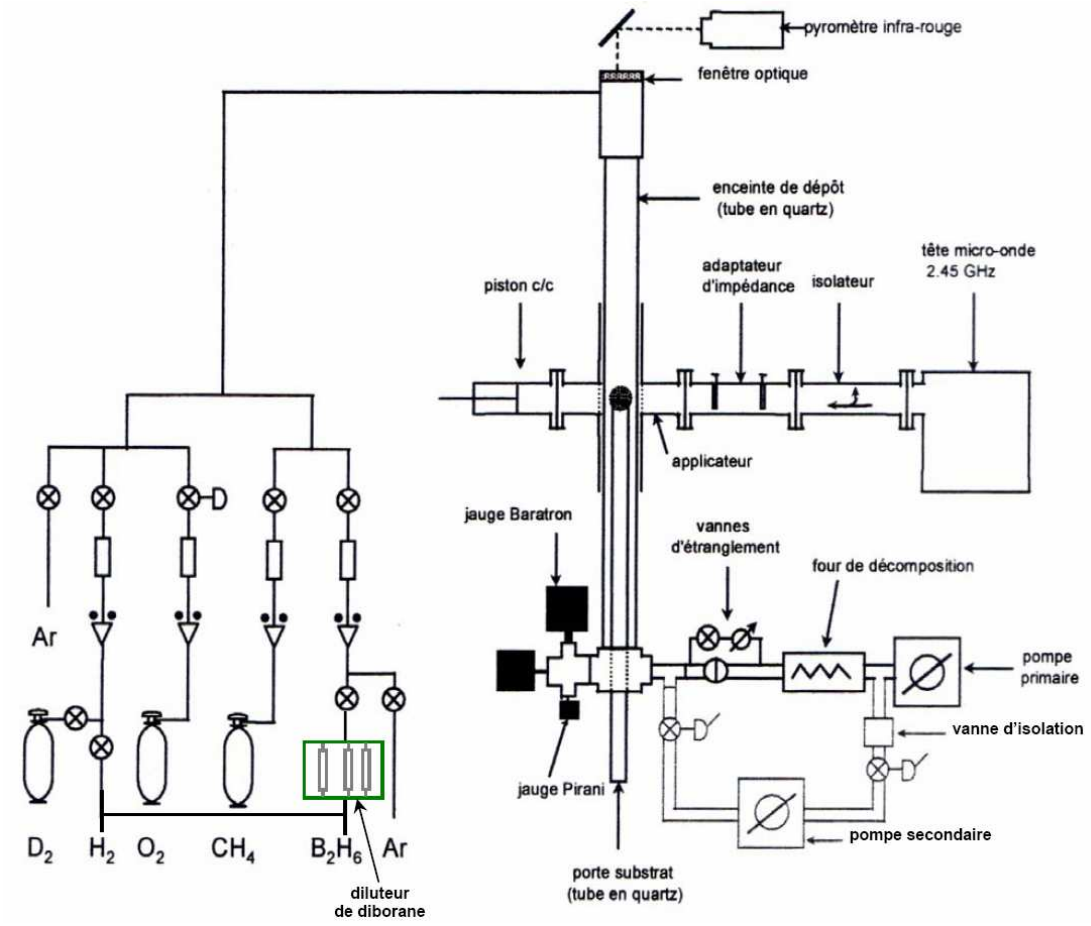


Figure II-6 : Schéma de principe du bâti de croissance (module p) MPCVD à l'Institut Néel.

Le substrat est donc positionné à cette intersection sur un second tube en quartz situé à l'intérieur du premier. Le substrat peut alors être placé selon trois positions vis-à-vis de la boule de plasma : au centre, au contact et en aval de celle-ci (figure II-7). Cette dernière position présente l'avantage de synthétiser des échantillons monocristallins de meilleure qualité cristalline.

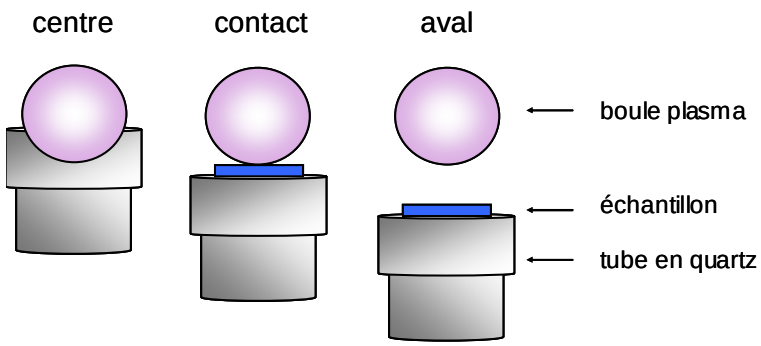


Figure II-7 : Positions possibles de l'échantillon en fonction de la boule de plasma.

La température est un paramètre de croissance important : elle joue un rôle déterminant en ce qui concerne la physico-chimie de la phase gazeuse et sur les phénomènes d'adsorption à la surface. Elle est mesurée au niveau des échantillons au travers d'un hublot par un pyromètre optique situé en haut du tube extérieur. Ainsi, par ajustement de la puissance micro-onde, la température de croissance peut être contrôlée.

Les espèces gazeuses telles que l'hydrogène et le méthane proviennent directement des cylindres et arrivent par le haut du tube. Leur débit est contrôlé par des régulateurs de débit massique. Depuis 2004, un diluteur de diborane a été installé et cela a permis de contrôler en permanence et avec plus de précision la concentration de diborane et donc celle du bore dans les couches.

Le mélange est alors effectué dans le haut du tube et les gaz transfèrent dans l'enceinte de dépôt grâce à un système de pompage primaire situé à l'extrémité basse du tube. La pression est réglée par une vanne d'étranglement placée an amont de la pompe.

Un système de pompage secondaire est aussi installé et ne fonctionne qu'avant l'introduction des gaz. Ce système permet en fait d'améliorer la qualité du vide dans l'enceinte avant la synthèse, jusqu'à des gammes de 10^{-6} torr, afin d'évacuer un maximum de

polluants résiduels dans la chambre. De plus, pour limiter les impuretés, la pureté des gaz contenus dans les cylindres joue un rôle important dans la qualité des couches que nous élaborons. L'hydrogène étant le gaz largement majoritaire, ce dernier possède une pureté garantie par la société Air Liquide de 99,9999% (N60). Malgré cette grande pureté, un purificateur d'hydrogène a été ajouté depuis la fin de l'année 2005 limitant ainsi considérablement les impuretés comme l'azote ou l'eau et augmentant l'efficacité du dopage. Finalement, la seule impureté présente dans nos couches, et en très faible quantité, est le silicium provenant du tube en quartz, lorsque le plasma « lèche » les parois du tube extérieur.

B.3.b. LIST

Le LIST possède plusieurs bâtis de croissance de diamant par MPCVD et chacun est baptisé. Le bâti qui a servi pour synthétiser les couches nanocristallines de diamant est appelé « Baobab ».

Comme pour l'Institut Néel, « Baobab » est un bâti qui a été construit au laboratoire. Toutefois, il possède des caractéristiques différentes de celui que j'ai utilisé à Grenoble. En effet, la chambre de croissance du bâti du LIST est totalement métallique, et ses parois sont refroidies. Cela permet d'avoir une chambre de croissance beaucoup plus grande et donc de synthétiser des échantillons sur des surfaces plus importantes, de l'ordre de quelques pouces (1 pouce = 2,54 cm). D'autre part, à la différence du bâti de l'Institut Néel, la partie supérieure du porte substrat est chauffée. En revanche, la température est mesurée grâce à un pyromètre au travers d'un hublot.

Les gaz utilisés pour la croissance de couches de diamant nanocristallines sont aussi le méthane et l'hydrogène. Cependant, pour les couches dopées, contrairement à l'Institut Néel qui utilise le diborane (B_2H_6), le LIST utilise le triméthylborane (TMB).

B.4. Préparations et conditions de croissance du diamant monocristallin

Les couches minces monocristallines de diamant synthétisées par MPCVD sont déposées par homoépitaxie sur des substrats HPHT de 3x3 mm² ou 2x2 mm² pour les orientations cristallines (100) ou (111), respectivement. Ces substrats sont achetés à la société Sumitomo au Japon, et sont de type Ib. Ils contiennent alors des atomes d'azote à des concentrations de 10^{19} at.cm^{-3} et sont isolants électriquement. Afin d'éliminer les impuretés présentes sur la surface pouvant générer des défauts pendant la croissance, les échantillons sont traités chimiquement selon un protocole comportant plusieurs étapes. Puis, dans le bâti, les échantillons sont placés sur un porte-substrat de silicium, préalablement recouvert d'une couche de diamant polycristallin (afin d'éviter toute contamination provenant du silicium). Enfin, pour la reprise d'épitaxie, les conditions de croissance du diamant monocristallin diffèrent selon l'orientation cristalline (100) ou (111). En effet, même si la température appliquée est équivalente, la pression et le rapport CH_4/H_2 sont différents.

B.4.a. Préparation des substrats de diamant

Dans un premier temps, les substrats sont dégraissés par des bains aux ultra-sons successifs de trichloréthylène, acétone et éthanol absolu. Ils sont ensuite rincés à l'eau ultra-pure (18MΩ) en fontaine débordante avant d'être séchés à l'argon.

Dans un deuxième temps, les substrats sont traités par deux bains d'acides pour éliminer les impuretés métalliques. Le premier bain dans lequel sont plongés les substrats contient les acides perchlorique, sulfurique et nitrique ($HClO_4$: H_2SO_4 : HNO_3) aux proportions volumiques (1 : 3 : 4), pendant 2 heures à 100°C. Le second bain est une solution d'acides fluorhydrique et nitrique (HF : HNO_3) aux proportions volumiques (1 : 1) pendant 1 heure et à 100°C.

Enfin, avant d'introduire les échantillons dans la chambre du bâti, ces derniers sont à nouveau rincés à l'eau ultra-pure et séchés à l'argon.

B.4.b. Conditions de croissance des couches homoépitaxiées selon l'orientation (100)

Toutes les couches synthétisées selon cette orientation cristalline ont crû au centre de la boule plasma (figure II-7). Les conditions de dépôt de celles-ci sont résumées dans le tableau II-2.

Tableau II-2 : Conditions de synthèse des échantillons monocristallins d'orientation (100).

Vide secondaire	t = 12h			
Plasma hydrogène	T = 880°C ; P = 30torr ; t = 2h			
Croissance d'une couche tampon de diamant NID*	T = 830°C ; P = 30torr ; t = 1h ; C/H = 0,5%			
Croissance de diamant dopé bore	T = 830°C ; P = 30torr ; C/H = 4%			
	DMO 677 B/C =0,12ppm t = 1h	Echant 8 B/C =0,12ppm t = 1h	DMO 667 B/C =700ppm t = 1h30	DMO 679 B/C =1100ppm t = 2h30
$[B]_{mesurée}$ (at.cm^{-3})**	« 10^{16}	8×10^{17}	» 3×10^{20}	» 3×10^{20}

* NID : diamant non intentionnellement dopé

** mesures effectuées par SIMS ou par cathodoluminescence

Dans un premier temps, un vide secondaire atteignant les 10^{-6} torr est effectué dans l'enceinte. Puis, avant la croissance, le substrat subit un dernier nettoyage *in situ* par un plasma hydrogène. Pour augmenter la qualité cristalline de la couche de diamant dopé, une couche de diamant intrinsèque de faible épaisseur est élaborée. Il est à noter que la synthèse de diamant selon cette orientation nécessite un rapport méthane/hydrogène dans la phase gazeuse assez important, de 4% car la vitesse de croissance est assez lente suivant cette orientation (~1.5µm/h).

Les conditions pour les 4 échantillons indiqués dans le tableau II-2 présentent des concentrations de diborane et des temps de croissance différents donc des concentrations de bore dans les couches et des épaisseurs différentes. Ces concentrations en bore sont ensuite estimées par cathodoluminescence selon les travaux menés dans l'équipe SC2G *[11]*.

B.4.c. Conditions de croissance des couches homoépitaxiées selon l'orientation (111)

Toutes les couches synthétisées selon cette orientation cristalline ont crû en aval de la boule plasma pour une étude de leur qualité cristalline (figure II-7). Les conditions de dépôt de celles-ci sont résumées dans le tableau II-3.

Tableau II-3 : Conditions de synthèse des échantillons monocristallins d'orientation (111).

Vide secondaire	t = 12h
Plasma hydrogène	T = 850°C ; P = 50torr ; t = 1h
Croissance de diamant dopé bore	T = 840°C ; P = 50torr ; C/H = 0,3% ; t = 4h B/C = 0 (NID*) à 12000ppm

* NID : diamant non intentionnellement dopé

Comme pour l'orientation (100), les substrats subissent au préalable un traitement par plasma hydrogène. A contrario, ces derniers n'ont pas de couche intermédiaire, le film est généré directement sur le substrat. Nous pouvons noter que les conditions diffèrent en deux points vis-à-vis de l'orientation (100). Tout d'abord, la pression appliquée est augmentée, mais aussi, le rapport méthane/hydrogène dans la phase gazeuse est considérablement abaissé dû à une vitesse de croissance plus importante selon cette orientation.

L'étude de cristallinité que nous avons portée s'est effectuée en fonction du dopage de ces couches dont les rapports B/C sont indiqués dans le tableau II-4.

Tableau II-4 : Récapitulatif des échantillons monocristallins d'orientation (111).

échantillons	B/C (ppm)	$[B]_{mesurée}$ (at.cm^{-3})*
DMO 700	NID	$3,3 \times 10^{15}$
DMO 701	0,12	$6,2 \times 10^{17}$
DMO 698	NID	$1,5 \times 10^{20}$
DMO 686	20	4×10^{20}
DMO 687	300	7×10^{20}
DMO 688	800	1×10^{21}
DMO 689	8000	$2,5 \times 10^{21}$
DMO 690	12000	5×10^{21}

* mesures effectuées par SIMS ou par cathodoluminescence (DMO 700 et 701)

Nous pouvons remarquer que 2 échantillons élaborés sans diborane dans la phase gazeuse (DMO 700 et DMO 698) ne possèdent pas la même concentration en bore dans les couches établies. En fait, l'incorporation importante du bore pour DMO 698 résulte de deux phénomènes conjugués. Tout d'abord le bore provient des parois du tube en quartz, déposé lors de synthèses antérieures : il y a un effet mémoire du bâti. Puis, l'incorporation du bore selon cette orientation est beaucoup plus facile.

Ainsi, les deux échantillons DMO 700 et DMO 701 ont été élaborés dans une enceinte neuve par remplacement de tous les tubes, intérieur et extérieur, par des tubes neufs.

B.5. Préparations et conditions de croissance du diamant polycristallin

Les couches de diamant polycristallin sont déposées sur des substrats de silicium lourdement dopées au bore donc conducteurs de type *p*. Cette conductivité du substrat est importante puisqu'elle permet de prendre des contacts sur la face arrière du substrat. La couche de diamant peut être utilisée comme électrode. Ces substrats ont une taille de 12x12 mm² et sont découpés dans un monocristal de silicium orienté selon l'orientation (100). Les deux faces du silicium sont polies, mais avant d'être introduit dans le bâti, le silicium est nettoyé chimiquement et traité mécaniquement.

En fonction de la taille de grain désirée, les bâtis de croissance de l'Institut Néel et du LIST ont été utilisés pour élaborer des couches polycristallines (µCD et NCD). Les préparations des substrats de silicium ainsi que les conditions de croissance sont différentes en fonction du bâti.

B.5.a. Institut Néel

B.5.a.i Préparation des substrats de silicium

Dans un premier temps, les substrats de silicium sont dégraissés par des bains aux ultra-sons successifs de trichloréthylène, acétone et éthanol absolu. Puis, ils sont rincés à l'eau ultra-pure (18MΩ) en fontaine débordante avant d'être séchés à l'argon.

Dans un deuxième temps, le silicium est introduit dans un bain d'acide fluorhydrique (48%) pendant 30 minutes afin d'éliminer la couche d'oxyde (SiO_2) présente à la surface.

Puis, la surface du silicium est dépolie par « scratching » en frottant deux échantillons l'un contre l'autre avec de la pâte diamantée. Cette dernière contient de la poudre de diamant calibrée entre 3 et 45 µm générant une rugosité de la surface de la couche synthétisée plus ou moins importante. Nous avons vu que les pointes et les arêtes créées sur le silicium constituent des sites préférentiels pour la nucléation (figure II-5). Ainsi, plus la pâte diamantée a un faible calibre, plus la densité de nucléation est importante.

Enfin, avant d'être introduit dans le bâti, le substrat est nettoyé dans un bain à ultra-sons d'eau ultra-pure pour retirer la poudre de diamant.

B.5.a.ii Conditions de croissance des couches microcristallines

Toutes les couches microcristallines ont crû au centre de la boule plasma (figure II-7). Les conditions de dépôt de celles-ci sont résumées dans le tableau II-5 :

Tableau II-5 : Conditions de synthèse des échantillons microcristallins élaborés à l'Institut Néel.

Vide secondaire	t = 12h
Pré-plasma hydrogène	T = 890°C ; P = 30torr ; t = 30min
Croissance de diamant dopé bore	T = 890°C ; P = 30torr ; C/H = 0,5% ; t = 24h B/C = 0 (NID*) ou 6000ppm
Post-plasma hydrogène	T = 750°C ; P = 30torr ; t = 1h

* NID : diamant non intentionnellement dopé

Comme pour la croissance de diamant monocristallin, le substrat de silicium subit un plasma d'hydrogène pour nettoyer la surface. Ce plasma permet de retirer la couche de silice qui a pu se créer pendant le dernier nettoyage et le transfert du substrat.

Les conditions de croissance ont été choisies de telles manières à obtenir des couches de diamant de bonne qualité cristalline (avec peu de phase sp^2) et suffisamment épaisses et continues. Pour vérifier toutes ces conditions, chaque couche est caractérisée par spectroscopie Raman et par microscopie électronique à balayage (MEB).

B.5.b. LIST

B.5.b.i Préparation des substrats de silicium

Les substrats de silicium sont tout d'abord dégraissés à l'alcool. Puis, afin de s'affranchir de l'étape de nucléation, les échantillons sont traités par « seeding ». Ils sont incorporés dans une solution contenant de la poudre diamant de diamètre inférieure à 100 nm et, lors d'un bain à ultra-sons, la poudre se dépose sur la surface du silicium.

B.5.b.ii Conditions de croissance des couches nanocristallines

Les conditions de dépôt des couches nanocristallines sont résumées dans le tableau II-6.

Tableau II-6 : Conditions de synthèse des échantillons nanocristallins élaborés au LIST.

Vide secondaire	quelques heures
Pré-plasma hydrogène	
Croissance de diamant dopé bore	T = 760°C ; P = 40torr ; C/H = 0,8% ; t = 7h TMB/CH_4=98ppm
Post-plasma hydrogène	T = 760°C ; P = 40torr ; t = quelques minutes

Nous remarquons que les paramètres de température et le rapport C/H sont différents par rapport à la synthèse de diamant microcristallin de l'Institut Néel. Mais surtout, les temps requis pour obtenir une couche continue sont beaucoup plus faibles au LIST. En effet, l'étape de nucléation est évitée grâce au pré-traitement par « seeding » des échantillons.

Ainsi, plusieurs échantillons polycristallins ont été synthétisés et nous pouvons les classer selon cinq catégories, en fonction du dopage et de la rugosité (tableau II-7).

Tableau II-7 : Récapitulatif des différentes classes d'échantillons polycristallins synthétisés à l'Institut Néel et au LIST en fonction du dopage et de la préparation du substrat.

		Dopage	
		NID	Lourdement dopés
Préparation du substrat de silicium (pâte diamantée)	« Scratching » (PD*=45 µm)	A	C
	« Scratching » (PD*=3 µm)	B	D
	« Seeding »		E

* PD : calibre de la pâte diamantée pour l'étape de « scratching » du substrat de silicium

Ces échantillons ont été nécessaires et cela m'a permis de réaliser une étude de l'effet du bore et de la rugosité sur la biocompatibilité du diamant polycristallin. D'autre part, les échantillons lourdement dopés (catégories C, D et E) ont été largement utilisés en tant qu'électrodes pour la fonctionnalisation de surface via l'électrochimie.

C. Caractérisations des couches de diamant

Pour caractériser les couches de diamant synthétisées pour les études de biocompatibilité et pour le greffage d'entités biologiques sur la surface du diamant, nous nous sommes référencés aux travaux déjà existants menés dans l'équipe « Semi-conducteurs à Grand Gap ». En effet, grâce aux étalonnages réalisés par cette équipe, il est désormais possible par cathodoluminescence et par spectroscopie à effet Raman de quantifier les concentrations de bore dans les couches monocristallines et polycristallines *[11, 15]*. Nous allons alors étudier ces deux méthodes de caractérisation pour déterminer le dopage de ces couches. Elles permettent aussi de renseigner quant à leur qualité cristalline.

Nous étudierons également la microscopie électronique à balayage qui permet de vérifier la continuité des couches polycristallines.

C.1. La cathodoluminescence (CL)

La cathodoluminescence (CL) est une méthode de caractérisation très utile pour l'étude des couches de diamant monocristallines. En effet, cette méthode a permis dans un premier temps d'optimiser la qualité cristalline et la quantification du dopage au bore des couches orientées (100) *[11]*, puis dans un second temps, celles des couches orientées (111) *[15]*. Dans le cadre de la mesure du dopage des échantillons, cette technique présente deux avantages vis-à-vis du SIMS :

- la CL permet de quantifier les atomes de bore participant réellement au dopage (en position substitutionnelle) contrairement au SIMS qui mesure aussi les atomes de bore en position interstitielle, ne participant pas au dopage
- mais surtout, la CL est une technique non destructrice.

De plus, il existe peu de laboratoires possédant un SIMS en France, tandis que l'Institut Néel est équipé pour caractériser nos échantillons par CL.

Le phénomène de cathodoluminescence se produit lorsqu'un semi-conducteur, soumis à un faisceau d'électrons de forte énergie, émet des photons dont les énergies peuvent se situer du proche infrarouge jusqu'à l'ultraviolet profond. La gamme spectrale étudiée pour tous les échantillons synthétisés était de 220 à 760 nm (1,631 à 5,645 eV). Dans cette zone spectrale, plusieurs structures sont réparties et donc plusieurs équipes ont travaillé sur l'identification et l'attribution des différentes composantes obtenues au niveau des spectres de cathodoluminescence.

La figure II-8 présente le spectre large de cathodoluminescence d'une couche de diamant orientée selon l'axe (111), non intentionnellement dopée (DMO 700) avec une tension d'accélération de 30kV. Ce spectre présente deux zones d'énergie : une partie basse et une autre haute en énergie.

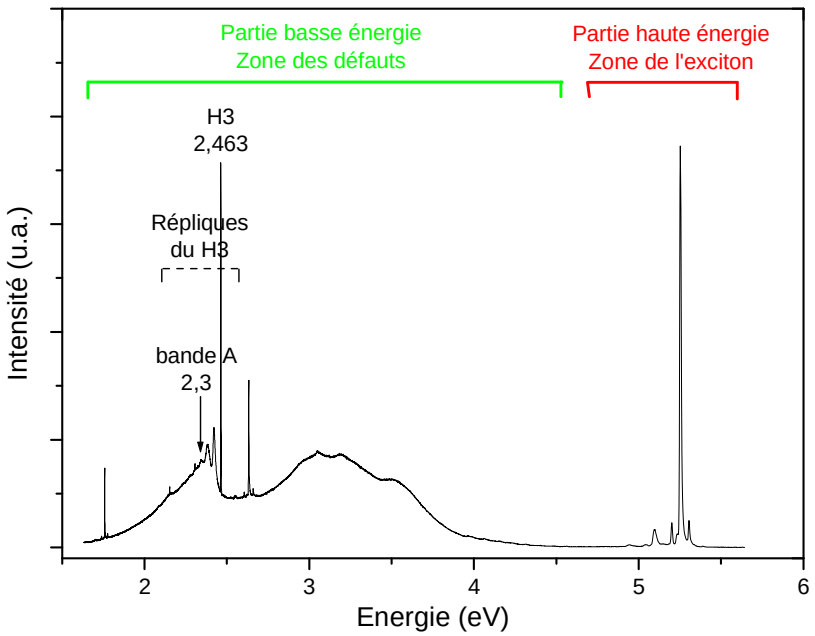


Figure II-8 : Spectre de cathodoluminescence à 30kV de la couche faiblement dopée d'orientation (111) DMO 700.

La partie basse énergie est la zone des défauts provenant de la couche mais aussi du substrat. En effet, en fonction de la tension d'accélération des électrons du faisceau incident, ces derniers pénètrent plus ou moins profondément. Le modèle développé par Kanaya et al. permet d'estimer la profondeur maximale de pénétration L (µm) des électrons accélérés avec un potentiel E_0 (kV), dans un matériau (Z, A, ρ), en utilisant la formule *[16]*:

$$L = 0{,}0276 \frac{A}{\rho . Z^{0{,}889}} E_0^{5/3}$$ *Equation II-1*

avec : Z : numéro atomique

A : masse molaire

ρ : masse volumique

Ainsi, pour le diamant la formule devient :

$$L = 0{,}019 . E_0^{5/3}$$ *Equation II-2*

Par calcul, le tableau II-8 donne les profondeurs sondées en fonction de la tension d'accélération.

Tableau II-8 : Profondeur sondée dans les couches diamant en fonction de la tension d'accélération des électrons du faisceau incident.

E_0 (kV)	2	3,5	5	10	15	20	30
L (µm)	0,060	0,100	0,280	0,880	1,730	2,800	5,490

Nous pouvons remarquer qu'à 30kV, la profondeur sondée est de ~5,5 µm, or les couches homoépitaxiées ont une épaisseur d'environ 1µm. Ainsi, le substrat est aussi caractérisé lors d'une tension d'accélération trop importante. Une composante nette et fine, avec ses répliques, provient du substrat, il s'agit du H3 situé à 2,463 eV. Elle résulte de l'association de deux atomes d'azote et d'une lacune de carbone. Le H3 permet finalement de calibrer les spectres obtenus grâce à la finesse de cette composante. Il est possible de caractériser seulement la couche synthétisée, en diminuant la tension d'accélération des électrons jusqu'à disparition du H3.

Plusieurs types de défauts peuvent aussi être observés sur cette plage du spectre comme les dislocations induites par l'incorporation plus ou moins importante de bore dans les couches. Ainsi, la qualité cristalline des couches peut être caractérisée par la bande « A », située entre 2,3 et 3 eV, et est associée à ces dislocations.

Si cette première zone à basse énergie permet finalement de renseigner sur la qualité cristalline des couches synthétisées, la zone à haute énergie permet en plus de quantifier le dopage.

En effet, comme le diamant est un semi-conducteur, les électrons incidents entrent en collision avec les électrons situés dans la bande de valence (BV). Ces derniers se trouvent excités dans la bande de conduction (BC) créant ainsi des paires électron-trou (excitons). Puis, ces paires se recombinent, on parle de recombinaison excitonique intrinsèque (exciton libre, « Free Exciton », FE) (figure II-9).

Une recombinaison indirecte peut aussi s'effectuer par l'intermédiaire d'états localisés créés dans la bande interdite par l'intermédiaire de dopants, les excitons sont localisés sur les dopants. On parle alors de recombinaison excitonique extrinsèque (exciton lié, « Bound Exciton », BE) (figure II-9).

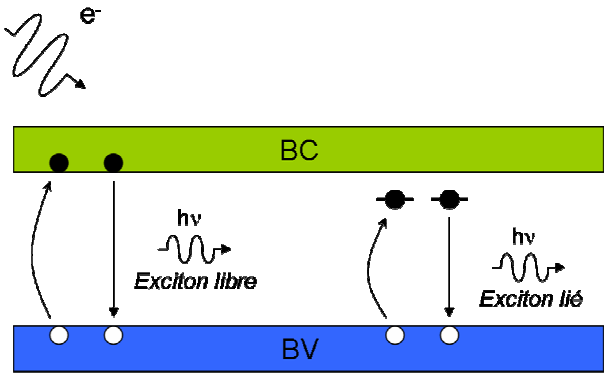


Figure II-9 : Principe de la cathodoluminescence, recombinaison excitonique intrinsèque (exciton libre) et extrinsèque (exciton lié).

Un exciton est une paire neutre formée par un électron et un trou. Elle possède une énergie de liaison E_x située dans la bande interdite. Pour un semi-conducteur dopé, des excitons sont piégés sur les dopants, ils ont alors en plus de leur énergie de liaison E_x, une énergie de localisation E_b.

Dans le cas des semi-conducteurs à bande interdite directe (E_g), les photons émis ont donc des énergies (figure II-10) :

- $E_g - E_x$ pour les recombinaisons des excitons libres
- $E_g - E_x - E_b$ pour les recombinaisons des excitons liés

Le diamant est un semi-conducteur à bande interdite indirecte (E_g), il doit donc y avoir émission d'un phonon, d'énergie $\hbar\omega$ ($\hbar = h/2\pi$ avec h la constante de Planck, et ω la fréquence) pour compenser la différence des vecteurs d'onde ***k*** entre le minimum de la BC et le maximum de la BV. Dans ce cas, les photons émis ont alors des énergies (figure II-10) :

- $E_g - E_x - \hbar\omega$ pour les recombinaisons des excitons libres
- $E_g - E_x - E_b - \hbar\omega$ pour les recombinaisons des excitons liés

Il existe deux types de phonons qui assurent la compensation du vecteur ***k*** : les phonons optiques (les plus fréquents) et les phonons acoustiques qui peuvent être transverses ou longitudinaux.

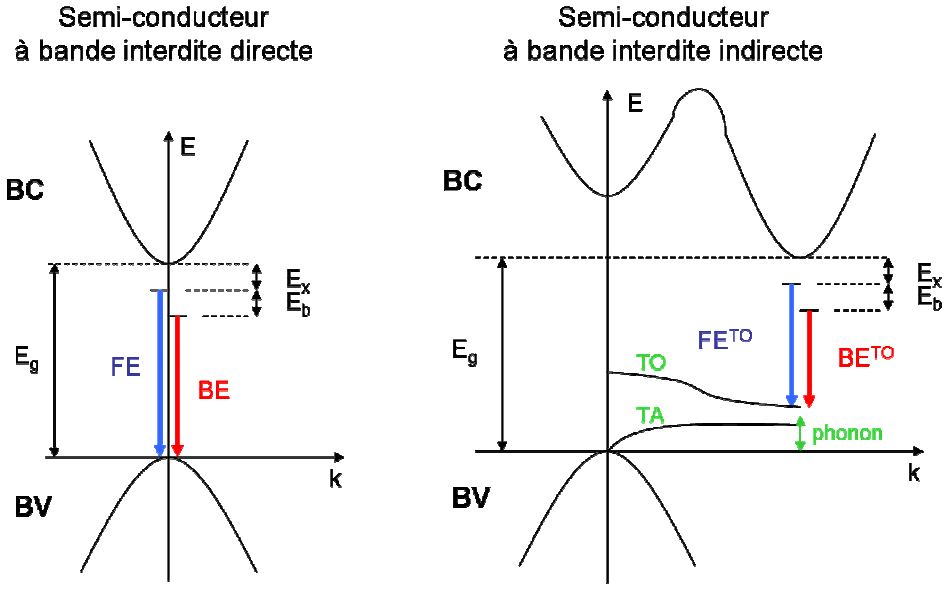


Figure II-10 : Structures de bande de semi-conducteurs à bande interdite directe et indirecte avec les principales recombinaisons excitoniques.

Ces différentes recombinaisons excitoniques, libres et liés, assistées par un phonon sont alors observables lors de l'étude de la zone à haute énergie.

La figure II-11 présente la zone excitonique du même échantillon (DMO 700).

Nous pouvons remarquer la présence de plusieurs composantes avec deux composantes principales : le FE^{TO} et le BE^{TO}.

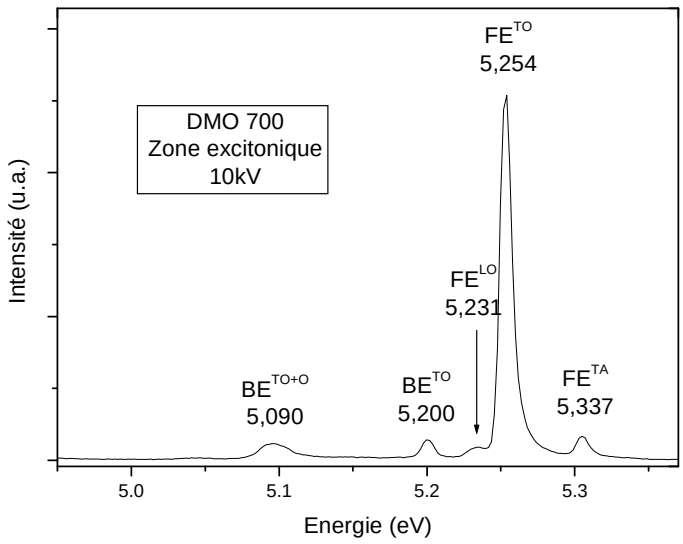


Figure II-11 : Spectre de cathodoluminescence de la zone excitonique de la couche d'orientation (111) faiblement dopée (DMO 700), pris avec une tension d'accélération des électrons à 10kV.

Grâce à ces deux composantes principales, il a été démontré qu'il était possible d'estimer la quantité de bore dans les couches monocristallines en fonction de leur rapport d'intensité ou de leur position. Quatre gammes de concentrations ont été mises en évidence *[11, 15]*:

- faibles [B] $[B] < 1{,}5\ 10^{19}\ cm^{-3}$
- fortes [B] $1{,}5\ 10^{19}\ cm^{-3} < [B] < 3\ 10^{20}\ cm^{-3}$
- lourdes [B] $3\ 10^{20}\ cm^{-3} < [B] < 2\ 10^{21}\ cm^{-3}$
- séparation de phases $2\ 10^{21}\ cm^{-3} < [B]$

La figure II-12 présente la position du BE^{TO} en fonction de ces gammes de dopage pour les orientations cristallines (100) et (111).

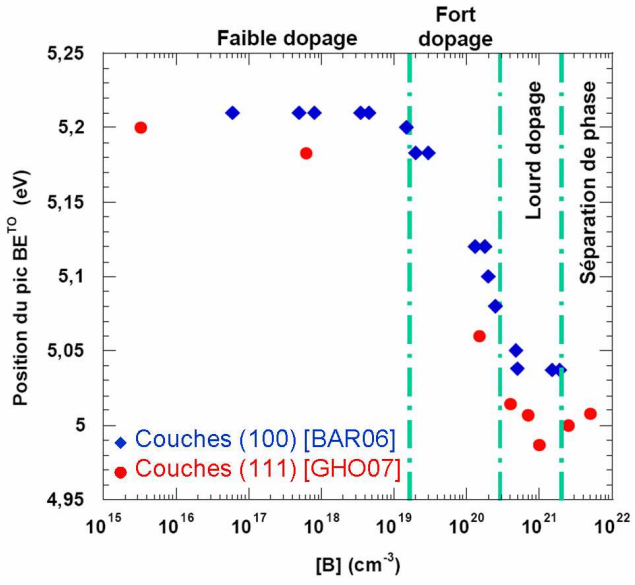


Figure II-12 : Comparaison des positions du BE^{TO} dans les couches homoépitaxiées d'orientation (100) et (111) en fonction du dopage au bore [11, 15].

Il semble que les 2 orientations (100) et (111) suivent la même tendance avec ces différentes concentrations. Cependant, le faible nombre d'échantillons étudiés selon l'axe cristallographique (111) ne permet pas de conclure.

Nous allons donc utiliser les résultats obtenus selon l'axe (100) pour étudier ces différentes zones *[15]*.

Zone de faible dopage :

Dans cette zone, il n'a pas été observé d'évolution du BE^{TO} en fonction de la concentration de bore dans les couches puisqu'il n'y a pas d'interaction électronique entre les atomes de bore. Le BE^{TO} est alors à la position d'environ 5,20 eV. En revanche, Kawarada et al. ont démontré qu'il existait une relation linéaire entre le rapport des intensités du BE^{TO} vis-à-vis du FE^{TO} *[17]*. Kasu et al. se sont alors basés sur ce résultat pour finalement définir une formule pour les couches homoépitaxiées (100) dans le cas de mesures de cathodoluminescence à 13K *[18]* :

$$N_B = 6.10^{16} \frac{I[BE^{TO}]}{I[FE^{TO}]}$$ *Equation II-3*

Avec N_B la concentration effective des atomes de bore accepteurs dans la couche (cm^{-3}).

Ainsi, en appliquant cette formule pour la couche DMO 700 orientée selon l'axe (111), nous pouvons estimer sa concentration en bore à 3,3 10^{15} cm^{-3}. Une telle concentration de bore ne peut être déterminée au SIMS car celle-ci est en dessous de la détection limite située à 2 10^{16} cm^{-3}.

Cette partie haute en énergie permet donc d'estimer la concentration de bore dans les couches grâce au rapport des intensités du BE^{TO} et du FE^{TO}, mais la largeur à mi-hauteur de cette dernière peut aussi donner des informations quant à la qualité cristalline des échantillons. Plus cette largeur est faible, plus l'échantillon est de bonne qualité. La qualité du diamant (100) est connue comme étant meilleure que celle du diamant (111). La largeur à mi-hauteur du FE^{TO} pour une couche de diamant (100) élaborée au centre de la boule de plasma est généralement de 5 meV *[19]*, alors que la meilleure couche (111) possède une largeur à mi-hauteur d'environ 10 meV *[20]*.

La couche étudiée ici, DMO 700, présente une largeur à mi-hauteur du FE^{TO} d'environ 5 meV indiquant la présence d'une faible quantité de défauts ainsi qu'un bon ordre cristallin. Ainsi, la croissance d'une couche de diamant orientée (111) en aval de la boule plasma permet d'améliorer la qualité cristalline de cette dernière.

En revanche, lorsque la concentration de bore augmente dans les couches, cette largeur à mi-hauteur augmente aussi de quelques meV.

Zone de fort dopage :

Au delà de la concentration [B] = 1,5 10^{19} cm^{-3}, la relation de Kasu ne s'applique plus. En effet, une interaction électronique entre les atomes de bore modifie les caractéristiques des excitons libres et liés. Le décalage en énergie de l'excition lié entre 5,20 et 5,03 eV permet alors de déterminer la concentration de bore grâce à des étalonnages élaborés au laboratoire.

Zone de lourd dopage :

Pour des concentrations comprises entre 3 10^{20} cm^{-3} et 2 10^{21} cm^{-3}, la position du BE^{TO} est inchangée, vers 5,03 eV, pour les couches (100) *[21]*, alors qu'elle continue de diminuer pour les couches (111). En revanche, une diminution de l'intensité de ce pic est observée selon les deux orientations.

Zone de séparation de phase :

Cette zone n'est observée que dans le cas des échantillons (111) lors de concentrations supérieures à 2 10^{21} cm^{-3}, sans doute du fait d'une incorporation plus facile du bore selon cette orientation. Il a été observé une augmentation de la position en énergie de la position du BE^{TO}.

Ainsi, nous venons de voir que la cathodoluminescence est une caractérisation très importante pour l'estimation du dopage en bore des couches synthétisées, mais aussi pour vérifier leur qualité cristalline. L'avantage de cette technique par rapport au SIMS réside dans le fait qu'elle est non destructrice, et donc elle permet de ne pas attaquer le matériau et ainsi laisser la possibilité de le fonctionnaliser.

Il est important de noter que cette méthode de caractérisation est aussi applicable au diamant polycristallin, mais de plus amples études ont été menées par spectroscopie à effet Raman pour caractériser ce type d'échantillon. Nous nous sommes alors basés sur cette étude pour étudier le dopage des échantillons polycristallins.

C.2. La microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage est une technique très utile pour caractériser les échantillons polycristallins. Cette technique est basée sur l'émission d'électrons rétrodiffusés et secondaires (figure II-13) lors du balayage par un faisceau d'électrons incidents.

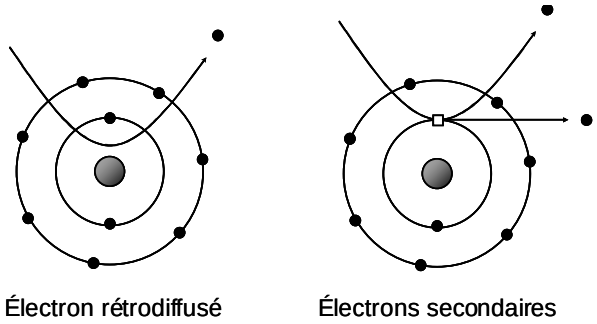


Figure II-13 : Electrons rétrodiffusé et secondaire émis par un atome sous un faisceau d'électrons.

Elle permet d'obtenir alors des images de la surface des échantillons et renseigne sur la continuité des couches polycristallines, leur morphologie, la taille et l'orientation dominante des cristallites.

La continuité des couches est très importante dans notre cas puisque si une couche ne l'est pas, le substrat de silicium est apparent (figure II-14a). Ainsi, pour des études de greffage (électro-)chimique, la maîtrise du greffage n'est pas totale puisque nous sommes en présence de deux matériaux. Nous avons donc caractérisé nos échantillons en électrons secondaires pour obtenir des images topographiques.

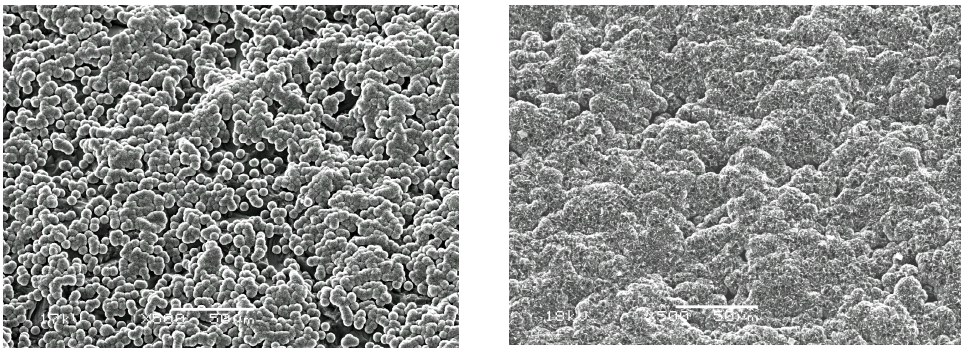


Figure II-14 : Images MEB de couches de diamant polycristallin non continue et continue. Tension d'accélération des électrons : 17 et 18 kV ; barre d'échelle : 50µm.

Nous pouvons observer sur la figure II-15 l'influence sur les couches de diamant de la pâte diamantée utilisée lors du « scratching » des échantillons de silicium avant croissance. Une pâte diamantée de 45 µm (figure II-15a) génère à la surface du silicium une rugosité plus importante comparée à une pâte diamantée de 3 µm (figure II-15b). Ainsi, lors de la croissance du diamant sur ces échantillons la rugosité de la couche suit celle du substrat de silicium prétraité.

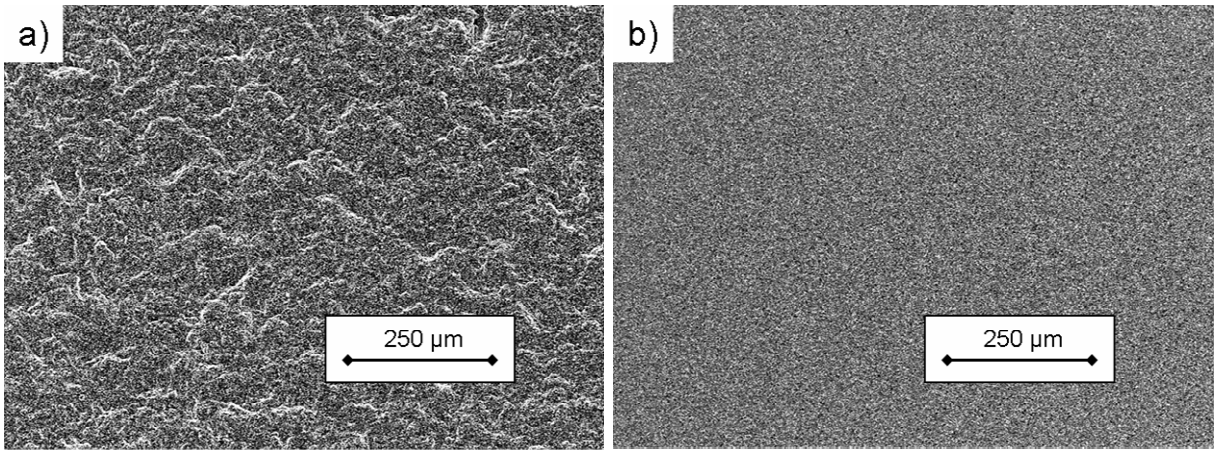


Figure II-15 : Images MEB de couches polycristallines préparées par une attaque du substrat de silicium avec une pâte de diamant à 45µm (a) et 3µm (b). Tension d'accélération des électrons : 20 kV.

De telles surfaces ont été utilisées pour l'étude de la biocompatibilité du diamant pour vérifier l'influence de la rugosité des échantillons sur l'adhésion cellulaire. Mais aussi, cette rugosité de surface joue un rôle particulièrement important lors du greffage électrochimique des surfaces du diamant par electrospotting (chapitre IV). En effet, initialement, les

échantillons étaient préparés avec une pâte de 45 µm (figure II-15a), cependant lors de l'electrospotting nous avions des problèmes d'étanchéité dus à une rugosité trop importante. Une pâte diamantée à 3 µm (figure II-15b) a permis de pallier à ce problème.

En focalisant sur les échantillons, il est possible d'observer la morphologie des couches de diamant. La figure II-16 présente la surface d'une couche de diamant polycristallin lourdement dopée au bore.

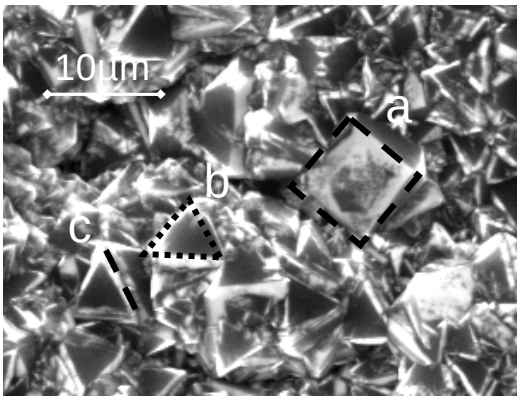


Figure II-16 : Morphologie des couches polycristallines de diamant : a) facette rectangulaire d'orientation (100), b) facette triangulaire d'orientation (111), c) joint de grain. Tension d'accélération des électrons : 20 kV.

Nous pouvons observer que le diamant polycristallin se compose d'un mélange de cristallites (grains), de taille micrométrique et de deux formes géométriques distinctes (figure II-16a et II-16b), séparées par des joints de grain (figure II-16c).

Les cristallites présentent des facettes carrées (figure II-16a) ou triangulaires (figure II-16b) caractéristiques des orientations cristallines (100) et (111) respectivement. En revanche, ces facettes ne sont pas présentent en quantité égale, les facettes triangulaires (111) prédominent. Cet effet provient des conditions de croissance (température du substrat 890°, et concentration de méthane dans la phase gazeuse 0,5%) favorisant la croissance du diamant selon l'orientation (111) vis-à-vis de l'orientation (100) *[22]*. De plus, du fait de la croissance colonnaire du diamant polycristallin, les cristallites carrées (100) atteignent plus difficilement la surface après 24 heures de dépôt et ces dernières sont souvent couvertes par des cristallites triangulaires (111).

Nous pouvons également observer que ces facettes triangulaires sont plus sombres que les facettes carrées. Ce contraste provient de la meilleure conduction dans ces grains orientés selon l'orientation (111) liée à une incorporation du bore plus importante *[23]*.

Les cristallites sont entourées de joints de grain. Ils sont majoritairement constitués de phases de carbones hybridés sp^2 (C=C). Il est à noter que lorsque la taille des cristallites diminue, la quantité de joints de grain est alors plus importante augmentant ainsi la quantité de phase non diamant. Ce phénomène sera vérifié et caractérisé par la spectroscopie à effet Raman.

C.3. La spectroscopie à effet Raman

Cette technique spectroscopique est utilisée pour caractériser nos échantillons diamant après synthèse. En effet, elle permet d'obtenir des informations très importantes sur les couches de diamant dopées au bore dont : la concentration de bore, la qualité cristalline, les phases non diamant. Elle présente de plus l'avantage d'être une méthode de caractérisation non destructrice tout comme la cathodoluminescence. Elle permet alors de caractériser nos échantillons monocristallins et polycristallins. Mais dans notre cas, cette caractérisation a majoritairement était mise à profit pour étudier le niveau de dopage et la qualité cristalline de nos échantillons polycristallins.

La spectroscopie à effet Raman est basée sur la diffusion inélastique par le matériau cible autour de la longueur d'onde incidente des photons émis par un laser. L'échantillon est alors éclairé par une source lumineuse monochromatique de fréquence ν_0. La lumière interagit avec le matériau et notamment avec ses électrons. Ainsi, l'effet Raman fait intervenir trois étapes :

- excitation par la lumière incidente d'un électron du niveau fondamental E_f vers un niveau excité E_e,
- diffusion de l'électron de ce niveau E_e vers un autre état excité $E_{e'}$ avec création (processus Stokes) ou annihilation (processus anti-Stokes) d'un phonon ν_{ph},
- retour de l'électron au niveau fondamental avec émission d'un photon de fréquence ν_d telle que :

$$\nu_d = \nu_0 \pm \nu_{ph}$$

suivant que le processus fait intervenir la création (-) (figure II-17a) ou l'annihilation (+) (figure II-17b) d'un phonon.

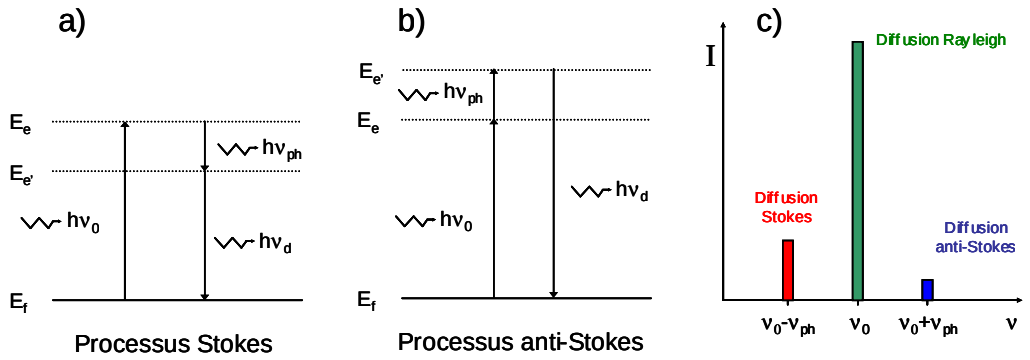


Figure II-17 : Transitions électroniques à l'origine de l'effet Raman : processus Stokes (a) et anti-Stokes (b). Comparaison de l'intensité des raies de ces deux processus (c).

La détection de la lumière diffusée inélastiquement permet d'avoir accès à l'absorption ou à l'émission de phonons (figure II-17c). A température ordinaire, l'absorption d'un phonon étant moins probable que l'émission, le processus anti-Stokes est moins probable que le Stokes, ce qui conduit à une intensité des raies anti-Stokes plus faible. Nous avons alors étudié la diffusion Stokes dans le diamant.

Les spectres Raman ont été enregistrés à température ambiante et à pression atmosphérique sous un microscope optique faisant partie d'un appareillage Raman à simple monochromateur, de modèle Labram Infinity et de marque Jobin & Yvon. En plus de la source laser He-Ne (632,8 nm), cet appareil peut utiliser une source laser externe. Dans notre cas, il s'agit d'un laser He-Cd délivrant une lumière monochromatique dont la longueur d'onde se situe dans l'UV à 325 nm. Les deux sources laser ont été utilisées car elles sont complémentaires l'une de l'autre.

Les structures des spectres Raman du diamant présentent des bandes larges et des pics fins. La position (nombre d'onde, en cm^{-1}) d'une structure donnée, est caractéristique de la fréquence de vibration des atomes. Ainsi, il est possible de déterminer le type d'hybridation des atomes constituant le réseau et son ordre cristallin.

Il existe de nombreux pics, associés à certaines structures et attribués dans la littérature *[15]*, mais seulement deux pics ont servi pour effectuer notre étude. Il s'agit du pic à 1332 cm^{-1} et du pic à 1580 cm^{-1}.

Le pic à 1332 cm^{-1} est particulièrement important car il représente la raie principale du diamant (bande D). Il résulte de la vibration des atomes de carbone, hybridés sp^3 au sein du réseau cristallin du diamant. Une importante intensité de ce pic, par rapport aux autres structures témoigne de la prédominance des liaisons sp^3 dans la couche, mais aussi d'un bon ordre cristallin.

La largeur à mi-hauteur de ce pic permet également de renseigner sur la qualité cristalline de nos couches. En effet, une faible valeur de cette largeur (< 15 cm^{-1}) est un critère de bon arrangement (ordre) au sein du réseau et donc d'une bonne qualité cristalline.

Lorsque le diamant est dopé au bore, cette raie initialement présente à 1332 cm^{-1} se décale vers les bas nombres d'onde et voit en même temps son intensité diminuer *[24]*. Ce décalage est également accompagné par une déformation sur l'un ou l'autre des flancs de cette raie, selon la longueur d'onde d'excitation utilisée (325 nm, figure II-18A ; 632 nm, figure II-18B). Il s'agit de l'effet Fano *[25]*. Ce phénomène est plus prononcé lorsque l'échantillon est excité dans le rouge.

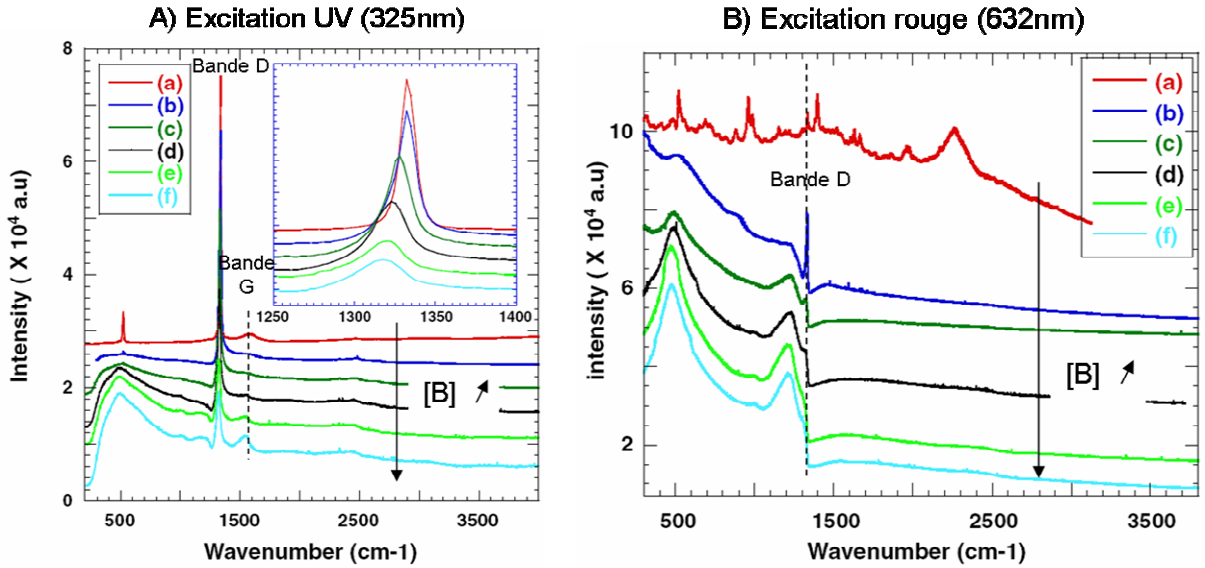


Figure II-18 : Evolution des spectres Raman avec une excitation dans l'UV (A) et dans le rouge (B) de couches polycristallines préparées avec différents rapports B/C pendant la croissance : B/C=0 (a), B/C=1600 (b), B/C=2000 (c), B/C=4000 (d), B/C=6000 (e), B/C=8000 (f) [26].

Ce décalage de la raie à 1332 cm^{-1} permet alors de déterminer le dopage dans les couches (figure II-19).

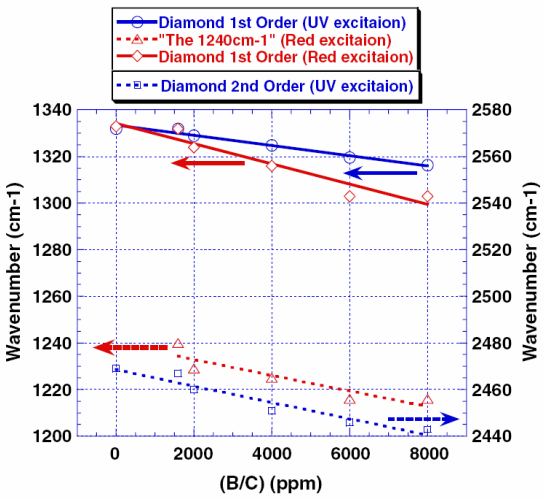


Figure II-19 : Positions de la raie à 1332 cm^{-1} en fonction du dopage, pour des excitations dans l'UV et dans le rouge [26].

La spectroscopie à effet Raman avec une excitation dans le rouge et dans l'UV nous a permis de définir que nos couches polycristallines de classe A ou B (NID-µCD) étaient très faiblement dopées, contrairement aux couches C, D (B-µCD) et E (B-NCD), très lourdement dopées au bore (tableau II-7). Les spectres de ces couches seront présentés dans la partie III.

Le pic à 1580 cm^{-1}, également appelé bande G (graphite), est la résultante de toutes les vibrations d'allongement des liaisons sp^2. Elles sont majoritairement concentrées au niveau des joints de grain. Cette composante donne alors une idée de la proportion globale des phases non-diamant de type sp^2 que contiennent nos couches. Cependant, cette bande G est invisible avec une excitation dans le rouge (sauf pour les très lourds dopages) (figure II-18B) alors qu'elle est bien visible avec une excitation dans l'UV (figure II-18A). Ce phénomène est dû au masquage de cette bande par l'effet Fano. Ainsi, toutes nos couches ont été caractérisées dans l'UV pour quantifier cette bande G par rapport à la bande D.

Nous avons donc vu que la spectroscopie à effet Raman, avec des excitations dans le rouge et dans l'UV, peut donner des informations quant au dopage au bore, à la qualité cristalline ainsi que sur les phases non-diamant présentes dans nos couches polycristallines. Toutes ces informations peuvent être tirées de l'étude de seulement deux pics : la bande D (1332 cm^{-1}) et la bande G (1580 cm^{-1}).

Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté la synthèse des couches de diamant monocristallines et polycristallines (avec des tailles de grains micrométriques) élaborées à l'Institut Néel à Grenoble, mais aussi les couches de diamant nanocristallines élaborées au LIST à Paris.

Puis, grâce aux travaux menés dans l'équipe « Semi-conducteurs à Grand Gap » à Grenoble sur les différentes caractérisations existantes pour ce matériau, nous pouvons utiliser ces résultats pour caractériser de manière non destructrice nos couches de diamant. En effet, il est alors possible d'estimer le dopage au bore des couches monocristallines par cathodoluminescence, mais aussi des couches polycristallines par la spectroscopie à effet Raman.

Ces deux méthodes de caractérisation seront très utiles dans la suite du manuscrit lors de l'étude de la biocompatibilité des électrodes de diamant, mais aussi pour l'immobilisation de molécules biologiques sur la surface du diamant.

Références Bibliographiques

[1] K. Plamann, D. Fournier, E. Anger, A. Gicquel, *Diamond and Related Materials* **1994**, *3*, 752.

[2] O. Madelung, Ed. *Semiconductors basic data*, **1996**.

[3] P. W. May, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences* **2000**, *358*, 473.

[4] J. Isberg, J. Hammersberg, E. Johansson, T. Wikstrom, D. J. Twitchen, A. J. Whitehead, S. E. Coe, G. A. Scarsbrook, *Science* **2002**, *297*, 1670.

[5] C. E. Nebel, B. Rezek, D. Shin, H. Uetsuka, N. Yang, *Journal of Physics D-Applied Physics* **2007**, *40*, 6443.

[6] A. N. Ndao, F. Zenia, A. Deneuville, M. Bernard, C. Levy-Clement, *Diamond and Related Materials* **2000**, *9*, 1175.

[7] E. Vanhove, J. de Sanoit, J. C. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Nesladek, *Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science* **2007**, *204*, 2931.

[8] F. P. Bundy, H. T. Hall, H. M. Strong, R. H. Wentorf, *Nature* **1955**, *176*, 51.

[9] F. P. Bundy, *Journal of Geophysical Research* **1980**, *85*, 6930.

[10] T. Feng, B. D. Schwartz, *Journal of Applied Physics* **1993**, *73*, 1415.

[11] C. Baron, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble **2005**.

[12] M. Volmer, A. Weber, *Zeitschrift für Physicalische Chemie* **1926**, *119*, 277.

[13] E. Gheeraert, Université Joseph Fourier, Grenoble **1992**.

[14] M. Kamo, Y. Sato, S. Matsumoto, N. Setaka, *Journal of Crystal Growth* **1983**, *62*, 642.

[15] S. Ghodbane, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble **2007**.

[16] K. Kanaya, S. Okayama, *Journal of Physics D-Applied Physics* **1972**, *5*, 43.

[17] H. Kawarada, H. Matsuyama, Y. Yokota, T. Sogi, A. Yamaguchi, A. Hiraki, *Physical Review B* **1993**, *47*, 3633.

[18] M. Kasu, M. Kubovic, A. Aleksov, N. Teofilov, Y. Taniyasu, R. Sauer, E. Kohn, T. Makimoto, N. Kobayashi, *Diamond and Related Materials* **2004**, *13*, 226.

[19] M. Kadri, D. Araujo, M. Wade, A. Deneuville, E. Bustarret, *Diamond and Related Materials* **2005**, *14*, 566.

[20] C. Tavarès, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble **2006**.

[21] H. Sternschulte, T. Albrecht, K. Thonke, R. Sauer, Eds., *The physics of semiconductors*, Singapore **1996**.

[22] C. Wild, R. Kohl, N. Herres, W. Mullersebert, P. Koidl, *Diamond and Related Materials* **1994**, *3*, 373.

[23] B. V. Spitsyn, L. L. Bouilov, B. V. Derjaguin, *Journal of Crystal Growth* **1981**, *52*, 219.

[24] E. Gheeraert, P. Gonon, A. Deneuville, L. Abello, G. Lucazeau, *Diamond and Related Materials* **1993**, *2*, 742.

[25] U. Fano, *Physical Review* **1961**, *124*, 1866.

[26] S. Ghodbane, A. Deneuville, *Diamond and Related Materials* **2006**, *15*, 589.

CHAPITRE III :

LA BIOCOMPATIBILITE DES ELECTRODES DE DIAMANT

Introduction

D'après tous les travaux qui ont été effectués et résumés dans la partie I.A., le diamant est un très bon candidat pour les applications *in vivo* et *in vitro* puisqu'il est biocompatible. Avec l'émergence de nouveaux projets tels que la réalisation de réseaux de neurones ou alors des rétines artificielles en diamant, ce matériau peut être utilisé en tant que transducteur. Le diamant doit se comporter comme une électrode, et être lourdement dopé au bore pour avoir un comportement métallique. Cependant, les travaux présentés dans la partie I.A. traitent seulement du diamant intrinsèque, non dopé. Or, lorsque celui-ci est lourdement dopé, il présente en surface du bore en concentration importante (~1% de bore). Plusieurs questions peuvent alors se poser quant à la biocompatibilité des électrodes de diamant :

- Le bore a-t-il un effet toxique sur les cellules ?
- Et donc, les électrodes de diamant dopé au bore sont-elles biocompatibles ?

Nous avons cherché à répondre à ces questions.

Dans le cadre d'un échange avec le laboratoire du Professeur Maryam Tabrizian au Department of Biomedical Engineering de l'Université McGill à Montréal au Canada, j'ai pu suivre deux séjours, d'une durée totale de trois mois, afin de travailler sur la biocompatibilité du diamant lourdement dopé au bore.

Pour vérifier cet effet, nous avons cultivé des cellules sur des échantillons lourdement dopés (des électrodes) et des échantillons non dopés afin d'effectuer des comparaisons, le diamant intrinsèque étant biocompatible.

Dans un premier temps, nous avons porté notre étude sur les échantillons polycristallins. De plus, même si la rugosité de surface a déjà été étudiée par Chong et al., nous avons voulu vérifier leurs résultats mais sur des gammes de rugosité beaucoup plus importantes *[1]*.

De même, nous savons que l'état d'oxydation de surface joue un rôle primordial quant à l'adhésion cellulaire. Cependant, toutes les études établies sur cet état ont utilisé des échantillons oxydés de manière artificielle (plasma d'oxygène, oxydation sous UV) *[1-3]*. Dans notre cas, nous avons utilisé du diamant vieilli à l'air pendant plusieurs semaines et donc oxydé de manière naturelle. En effet, ces échantillons ont subi après croissance, un plasma d'hydrogène, mais il a été démontré que le diamant hydrogéné s'oxydait en surface de

manière continue jusqu'à une stabilisation après une semaine *[4]*. Ainsi, cette étude va permettre d'évaluer l'impact du vieillissement, de l'oxydation naturelle sur la biocompatibilité du diamant.

Par définition, le diamant polycristallin est un diamant composé de cristaux de diamant. Ces derniers sont constitués de facettes de différentes orientations : (100) et (111) majoritairement. Lors d'un second séjour à L'Université de McGill, nous avons voulu vérifier l'influence de ces deux orientations sur l'adhésion cellulaire en travaillant sur diamant monocristallin orienté (100) et (111). Le lourd dopage a également été étudié afin de vérifier l'effet du bore qui s'incorpore préférentiellement selon l'orientation (111) *[5]*.

Pour ces deux études sur diamant polycristallin et monocristallin, nous avons utilisé deux lignées cellulaires différentes : des pré-ostéoblastes et des fibroblastes. Ces cellules ont été cultivées sur les échantillons et nous avons pu étudier l'adhésion et la prolifération de ces cellules.

A. Le diamant polycristallin

Avant d'effectuer la culture cellulaire sur nos échantillons, il est important de les caractériser.

Nous présenterons tout d'abord les différents paramètres étudiés dans le cadre de la biocompatibilité du diamant polycristallin. Puis, nous verrons l'influence de ces paramètres sur un troisième paramètre important vis-à-vis de la culture cellulaire : la mouillabilité de surface.

Après avoir caractérisé tous ces échantillons, nous pourrons alors étudier l'adhésion et la prolifération des cellules sur ceux-ci. Enfin, nous étudierons la morphologie des cellules par microscopie électronique à balayage (MEB) sur tous nos échantillons.

A.1. Les différents paramètres d'étude : dopage et rugosité

Nous avons porté notre étude sur deux paramètres : le dopage au bore et une gamme étendue de rugosités de surface. La rugosité est déterminée par l'étape de préparation des substrats de silicium alors que le dopant est incorporé dans le volume du matériau pendant la croissance.

Le tableau III-1 résume l'ensemble des différentes classes d'échantillons que nous avons synthétisés pour effectuer cette étude de biocompatibilité.

Tableau III-1 : Récapitulatif des différentes classes d'échantillons polycristallins synthétisés à l'Institut Néel et au LIST en fonction du dopage et de la préparation du substrat.

		Dopage	
		NID**	Lourdement dopés
Préparation du substrat de silicium (pâte diamantée)	« Scratching » (PD*=45 µm)	A	C
	« Scratching » (PD*=3 µm)	B	D
	« Seeding »		E

* PD : calibre de la pâte diamantée pour l'étape de « scratching » du substrat de silicium
** NID : diamant non intentionnellement dopé

La préparation et la synthèse de ces échantillons sont détaillées dans le chapitre II.
Les quatre échantillons A, B, C et D ont été synthétisés à l'Institut Néel (CNRS Grenoble) alors que l'échantillon E a été synthétisé au LIST (CEA Saclay).

A.1.a. La rugosité de surface

Nous avons déjà vu par microscopie électronique à balayage (MEB) que le diamètre de la pâte diamantée utilisée pour la préparation des substrats de silicium exerçait un rôle important sur la rugosité finale de la couche (figure II-15). Pour comparer et quantifier la rugosité des différents échantillons, nous les avons caractérisés par microscopie à force atomique (AFM), en mode « tapping ». Toutes les zones explorées étaient de 20x20 µm², ce qui correspond à la surface caractéristique des cellules que nous avons utilisées. Cette étude AFM a également permis de déterminer la valeur de la rugosité moyenne rms (« root mean

square ») de chaque échantillon. Les figures III-1a, III-1c, III-1e présentent les images AFM des échantillons A/C, B/D et E respectivement.

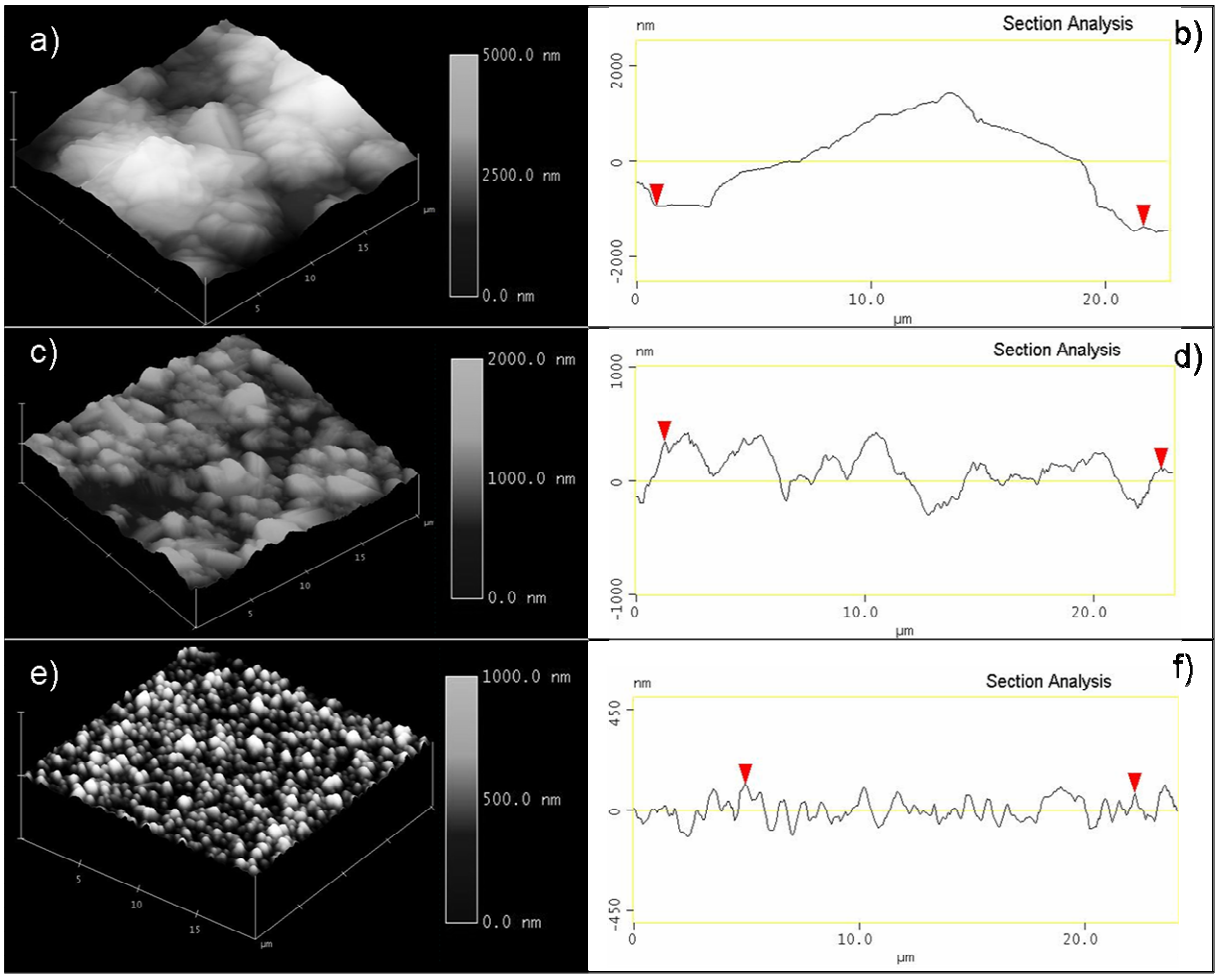


Figure III-1 : Images AFM en mode tapping et profils des différentes classes d'échantillons. a) et b) échantillons microcristallins A et C synthétisés sur silicium préparé par « scratching » avec une pâte diamantée de 45µm (rugosité de 600nm rms). c) et d) échantillons microcristallins B et D synthétisés sur silicium préparé par « scratching » avec une pâte diamantée de 3µm (rugosité de 200nm rms). e) et f) échantillon nanocristallin E préparé par « seeding » (rugosité de 50nm rms).

Les figures III-1a et III-1c confirment les observations préalablement obtenues au MEB pour les échantillons microcristallins (µCD). Plus le diamètre de la pâte diamantée est petit, plus la rugosité est faible. La rugosité de ces deux classes d'échantillons (A/C) est de 600 nm rms pour une préparation avec une pâte diamantée de 45 µm (figure III-1a) alors qu'elle est de 200 nm rms lorsque la pâte diamantée est de 3µm (figure III-1c, échantillons

B/D). L'échantillon nanocristallin E (NCD), préparé par « seeding » présente une rugosité plus faible encore puisque celle-ci est de 50 nm rms.

Cependant, la rugosité rms représente seulement une valeur caractéristique de la direction perpendiculaire à la surface : elle ne donne finalement aucune information quant au diamètre des motifs. Pour cela, nous présentons aussi les figures III-1b, III-1d et III-1f puisqu'elles donnent un aperçu de la répartition des motifs. Le diamètre de ceux–ci est de 20 µm, 5 µm et 0,8 µm pour les classes d'échantillons A/C, B/D (µCD) et E (NCD), respectivement.

A.1.b. Le dopage

Le dopage constitue un paramètre important de la biocompatibilité puisque les lourds dopages induisent sur la surface des échantillons une quantité de bore que l'on supposerait à première vue pouvoir être toxique pour les cellules. Afin de quantifier la densité de ces atomes de bore en surface, nous avons d'abord estimé le dopage en volume des échantillons par spectroscopie à effet Raman avec une excitation dans l'ultra-violet (325 nm).

En effet, nous avons déjà vu (figure II-19) qu'il a été démontré dans la littérature que le pic à « 1332 cm^{-1} », caractéristique des liaisons C-C hybridées sp^3, suit un décalage linéaire vers les bas nombres d'onde quand la concentration de bore dans le matériau augmente. La figure III-2 présente la zone [1200-1400 cm^{-1}] des différentes classes d'échantillons.

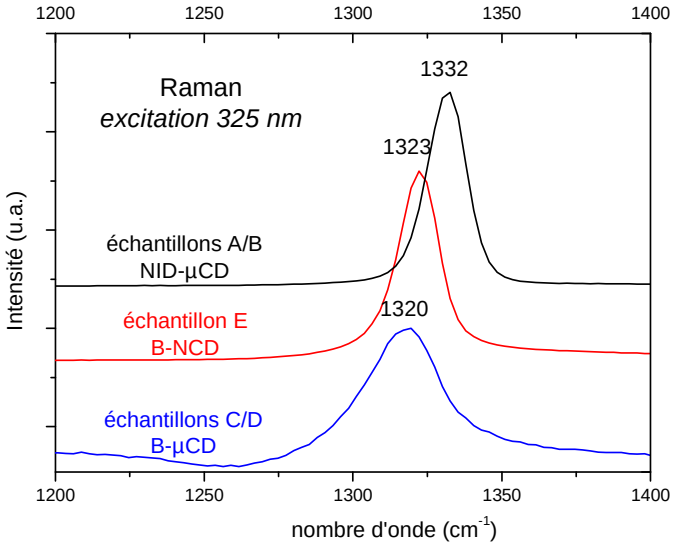


Figure III-2 : Spectres Raman, avec une excitation dans l'UV, des échantillons polycristallins, autour de la zone de la bande D (1332 cm^{-1}).

Pour les échantillons microcristallins non intentionnellement dopés (NID-µCD : A/B), le pic à « 1332 cm^{-1} » ne s'est pas décalé. Cependant nous ne pouvons pas affirmer l'absence totale de bore dans ces échantillons puisque tous les échantillons dopés et non dopés sont synthétisés dans le même bâti. Le bore résiduel peut s'incorporer dans les couches non dopées mais à des faibles concentrations. Finalement, nous ne pouvons seulement affirmer que la concentration de bore dans le matériau est inférieure à 10^{17} $B.cm^{-3}$.

En revanche pour tous les échantillons lourdement dopés, quelle que soit la rugosité (B-µCD : C/D ; B-NCD : E), nous pouvons observer un décalage important de cette composante. Pour l'échantillon E (B-NCD), ce décalage est de 9 cm^{-1} indiquant que celui-ci est lourdement dopé, et donc la concentration de bore dans le matériau est supérieure à 3×10^{20} $B.cm^{-3}$. Une mesure SIMS a permis d'évaluer exactement cette concentration qui est finalement de 5×10^{20} $B.cm^{-3}$. Enfin, les échantillons C et D présentent un décalage de 12 cm^{-1}, leur dopage est estimé à 10^{21} $B.cm^{-3}$.

A partir de ces résultats, nous avons estimé en première approximation le nombre d'atomes de bore présents en surface. Les échantillons A et B présentent moins de 1 ppm (partie par million) d'atome de bore par rapport à l'ensemble des carbones qui constituent la surface. En revanche, la densité des atomes de bore en surface est d'environ 1% pour les échantillons C, D et E.

Ainsi, la spectroscopie Raman avec une excitation dans l'UV, permet d'estimer la concentration de bore. Néanmoins, elle permet également d'estimer celle des carbones hybridés sp^2, majoritairement localisés aux joints de grains. En effet, la bande G, vers 1580 cm^{-1}, est caractéristique de cette phase non diamant. La spectroscopie Raman peut alors donner des informations indirectes quant à la rugosité puisque lorsque cette dernière diminue, la quantité de joints de grains augmente, et donc la bande G devrait être plus importante. En calculant le rapport de l'aire de la bande G sur celle de la bande diamant (pour les échantillons lourdement dopés), nous obtenons les valeurs de 1,5, 2,5 et 3,5% respectivement pour les rugosités de 600, 200 et 50 nm rms. Ces valeurs confirment donc les observations obtenues par AFM et ces faibles pourcentages indiquent une bonne qualité cristalline de tous ces échantillons.

Le tableau III-2 résume l'ensemble des caractéristiques de tous les échantillons utilisés pour cette étude de biocompatibilité.

Tableau III-2 : Tableau résumant les propriétés physiques (préparation, rugosité et dopage) des différentes classes d'échantillons diamant polycristallin utilisés pour la culture cellulaire.

Echantillons	A	B	C	D	E
Type Préparation Rugosité (rms)	µCD PD* (45 µm) 600 nm	µCD PD* (3 µm) 200 nm	µCD PD* (45 µm) 600 nm	µCD PD*(3 µm) 200 nm	NCD « seeding » 50 nm
Dopage Concentration en bore	NID** $<10^{17}$ cm^{-3}	NID** $<10^{17}$ cm^{-3}	Lourdement Dopé $\sim10^{21}$ cm^{-3}	Lourdement Dopé $\sim10^{21}$ cm^{-3}	Lourdement Dopé 5.10^{20} cm^{-3}

* PD : calibre de la pâte diamantée pour l'étape de « scratching » du substrat de silicium
** NID : diamant non intentionnellement dopé

A.2. Les angles de contact

Avant de cultiver les cellules sur ces échantillons, le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces a été étudié, puisque ce paramètre joue aussi un rôle important quant à l'adhésion cellulaire.

Le caractère hydrophile/hydrophobe d'une surface est mesuré par dépôt d'une goutte calibrée de solvant sur la surface d'un échantillon. Grâce à une caméra située perpendiculairement à cette surface, l'angle de contact de la goutte est mesuré (figure III-3).

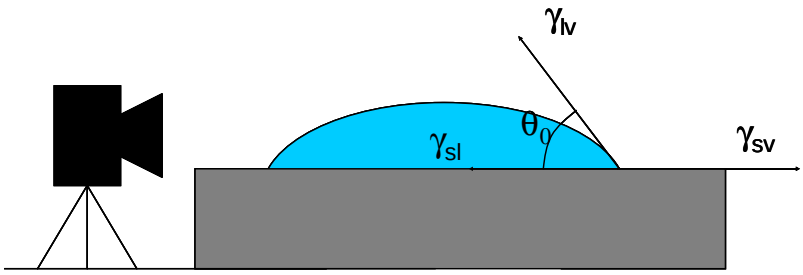


Figure III-3 : Principe de la mesure d'un angle de contact sur une surface.

La mesure de l'angle de contact permet d'accéder à l'énergie d'une surface par la loi de Young-Dupré :

$$\gamma_{lv} \cdot \cos(\theta_0) = \gamma_{sv} - \gamma_{sl}$$ *Equation III-1*

Avec : γ_{lv}, la tension interfaciale liquide-vapeur

γ_{sv}, la tension interfaciale solide-vapeur

γ_{sl}, la tension interfaciale solide-liquide

θ_0, l'angle de contact

Nous pouvons alors en déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface. La gamme d'angle est située entre 0° et 180° : la surface est très hydrophile lorsque l'angle se situe en dessous de 20° tandis que la surface est considérée comme hydrophobe lorsque l'angle est supérieur à 120°. Dans cette étude, l'eau ultra-pure était le solvant utilisé.

Les angles de contact caractérisent alors l'état de surface des échantillons, mais, dans le cas du diamant, la surface de celui-ci peut être différente en fonction des traitements physiques (plasma d'oxygène, photochimie UV), (électro-)chimiques et/ou du vieillissement de l'échantillon (partie I.B.). Lorsque les échantillons sortent du bâti de croissance après un plasma d'hydrogène, la surface est très hydrophobe puisqu'elle n'est composée que de liaisons C-H. Cependant, nous avons vu que la surface peut être oxydée par différentes méthodes. Elle contient alors des liaisons hydroxyles (C-OH), carbonyles (C=O), carboxyles (COOH) et des ponts éther (C-O-C) (figure I-6) présents à différents pourcentages en fonctions du traitement. L'angle de contact est alors modifié et diminue.

Tous les échantillons que nous avons utilisés dans cette étude étaient des échantillons diamant qui ont subi un plasma d'hydrogène après croissance, puis ils ont été conservés à l'air pendant quelques semaines.
Cependant, Vanhove et al. ont démontré que la surface du diamant hydrogéné était très réactive et s'oxydait à l'air *[4]*. La surface n'est alors plus seulement composée de liaisons CH mais aussi de liaisons hydroxyles. Ce changement de composition doit donc influencer la valeur de l'angle de contact, et la surface doit alors devenir plus hydrophile.

Cette oxydation de surface est en fait un phénomène que nous ne pouvions contrôler puisqu'il demande de prendre beaucoup de précautions dès la sortie du bâti de croissance, mais aussi nous ne voulions pas traiter les surfaces afin d'étudier cet effet d'oxydation naturelle sur l'adhésion cellulaire.

Les échantillons ont seulement été nettoyés dans un bain à ultra-sons dans de l'acétone, de l'alcool et de l'eau ultra-pure.

Les mesures d'angle de contact sur tous les échantillons sont résumées dans le tableau III-3.

Tableau III-3 : Valeurs des angles de contact pour les différentes classes d'échantillons polycristallins.

Rugosité (rms)	Echantillons NID*		Echantillons lourdement dopés	
600 nm	A	104.6° ± 2.2°	C	85.1° ± 2.1°
200 nm	B	98.9° ± 2.5°	D	81.0° ± 1.9°
50 nm			E	69.1° ± 3.0°

* NID : diamant non intentionnellement dopé

Nous pouvons remarquer tout d'abord l'influence du dopage au bore sur les angles de contact, avec une diminution notable d'environ 20° entre les échantillons non intentionnellement dopés et ceux lourdement dopés au bore, pour une même rugosité (A *vs* C, et B *vs* D). Cet effet est décrit ici pour la première fois et peut être dû au comportement électronique du diamant massif (ici, le diamant possède un comportement métallique) et/ou dû au bore présent en surface à une concentration estimée ici à environ 1% dans le cas des échantillons lourdement dopés.

Afin de vérifier l'origine de ce comportement, une étude pourrait consister à mesurer les angles de contact de plusieurs échantillons de même rugosité mais possédant des taux de dopage différents. Si le bore de surface est le facteur influençant cette diminution d'angle de contact, alors l'angle devrait diminuer de manière linéaire. En revanche, dans le cas où la conductivité de l'échantillon est le paramètre influant, nous devrions alors observer une transition avec une baisse soudaine de l'angle de contact lorsque la transition isolant/métal du diamant est dépassée ([B] > 3. 10^{20} B.cm^{-3}).

De plus, nous pouvons remarquer que la rugosité a un effet sur les angles de contact. Plus la rugosité des échantillons est faible, plus l'angle de contact diminue.
Pour des surfaces rugueuses, il existe deux modèles permettant de comprendre l'effet de la rugosité : le modèle de Cassie-Baxter et le modèle de Wenzel *[6]*.

Le premier modèle traite le cas de surfaces super-hydrophobes, on parle alors d'« effet lotus ». La goutte ne mouille pas entièrement la surface puisque des poches d'air sont emprisonnées sous la goutte dues à une profondeur et une répétabilité importantes des motifs. Dans notre cas, tous les échantillons ne possédaient pas ces caractéristiques donc nous ne pouvions pas appliquer ce modèle.

Le modèle de Wenzel étudie les surfaces rugueuses sans poches d'air entre la goutte et le substrat. La surface de contact entre la goutte et le substrat est donc amplifiée si la surface spécifique augmente, ainsi Wenzel a introduit un facteur de rugosité (R_f).

$$R_f = A_{spé} / A_{géo}$$ *Equation III-2*

Avec : $A_{spé}$, surface spécifique

$A_{géo}$, surface géométrique, projection de la surface spécifique sur un plan

L'angle de contact d'une surface rugueuse est calculé par Wenzel :

$$\cos(\theta) = R_f \cdot \cos(\theta_0)$$ *Equation III-3*

Avec : θ_0, angle de contact mesuré pour une surface plane

θ, angle de contact mesuré pour une surface rugueuse

R_f, facteur de rugosité

Dans notre cas, la surface spécifique augmente quand la rugosité diminue (figures III-1b, III-1d, III-1f), nous avons pour les échantillons lourdement dopés :

$$R_f\,[C] < R_f\,[D] < R_f\,[E]$$

Ainsi, avec $R_f > 1$:

$$\cos(\theta_C) < \cos(\theta_D) < \cos(\theta_E)$$

Comme la fonction cosinus est une fonction décroissante sur [0; 180°]:

$$\theta_C > \theta_D > \theta_E$$

Nous remarquons donc que nous pouvons appliquer le modèle de Wenzel dans notre étude puisque cette tendance est cohérente avec les résultats obtenus. Elle est également vérifiée dans le cas des échantillons non intentionnellement dopés, puisque :

$$\theta_A > \theta_B$$

Nous venons de démontrer que le dopage, ainsi que la rugosité étaient des paramètres importants vis-à-vis du caractère hydrophile/hydrophobe de la surface des échantillons de

diamant polycristallin. Ces paramètres le restent-ils aussi quant à l'adhésion cellulaire et surtout, le diamant lourdement dopé au bore conserve-t-il ses très bonnes propriétés de biocompatibilité ?

A.3. Adhésion, prolifération et morphologie des cellules

Après caractérisation, tous ces matériaux ont été clivés en quatre morceaux de 6x6 mm² afin d'étudier de manière statistique les résultats de culture cellulaire.
La méthodologie de culture des cellules est détaillée en annexe A.

Pour résumer, les échantillons sont introduits dans des plaques à puits, et un nombre défini de cellules dans un milieu sont mises en contact avec les échantillons. Puis, les cellules incubent avec les échantillons à température contrôlée pendant le temps de l'étude. Ensuite, les échantillons (avec des cellules sur leur surface) sont retirés du milieu, et sont introduits dans un nouveau milieu réagissant avec les cellules vivantes. La réaction induit une coloration du milieu. Avec une courbe d'étalonnage, élaborée à chaque expérience, nous pouvons par colorimétrie déduire la densité de cellules vivantes qui ont adhéré sur la surface des échantillons.

Dans un premier temps, nous étudierons l'adhésion des pré-ostéoblastes et des fibroblastes sur nos échantillons polycristallins. Puis, nous étudierons la prolifération des pré-ostéoblastes et enfin nous examinerons au MEB la morphologie des pré-ostéoblastes fixées sur nos échantillons après 24 heures d'incubation.

A.3.a. L'adhésion cellulaire

L'adhésion des cellules s'effectue pendant leurs premières heures de mise en contact avec les substrats. Nous avons alors quantifié le nombre de cellules viables qui ont adhéré sur tous nos échantillons pendant cette étape, après 1 heure, 2 heures et 4 heures d'incubation. Au-delà, les cellules commencent à proliférer sur la surface.

La figure III-4 présente les résultats obtenus de l'adhésion des pré-ostéoblastes sur nos échantillons polycristallins et sur un échantillon contrôle. Ce contrôle est un matériau biocompatible : du polystyrène dont la surface a été traitée, de marque BD Falcon™.

Une analyse statistique par comparaison avec le contrôle ou avec d'autre classe d'échantillons (effet du dopage ou de la rugosité) a été effectuée pour toutes les expériences de cultures cellulaires.

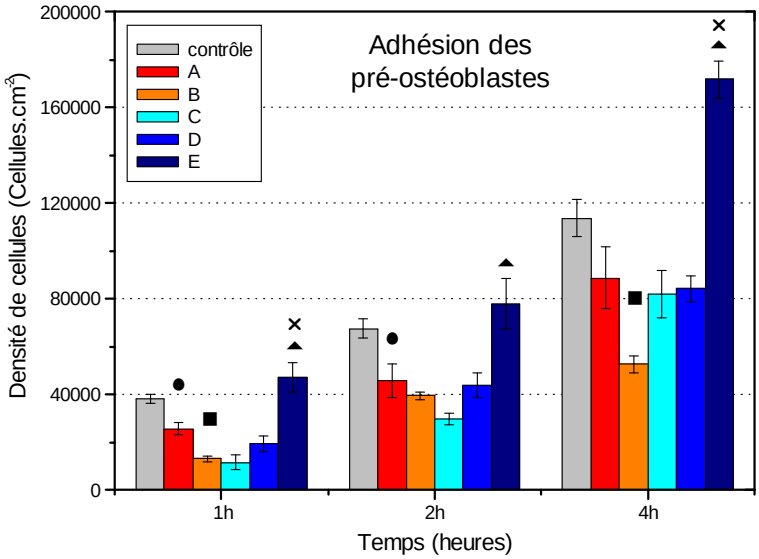


Figure III-4 : Graphique indiquant la densité de pré-ostéoblastes qui ont adhéré sur les surfaces des échantillons de différentes classes dont les caractéristiques sont présentées dans les tableaux III-2 et III-3. Chaque barre représente la moyenne des cellules adhérées ± l'écart type. Des comparaisons statistiques ont été effectuées par paire avec le test de Student. Par calcul, en utilisant les moyennes et les écarts type, lorsque p<0,05 la différence entre les deux classes est considérée comme statistiquement significative. Les symboles signifient:
(×) p<0,05 : classe E (B-NCD) comparée avec le contrôle ;
(▲) p<0,05 : classe E (B-NCD) comparée avec les classes A/B (NID-µCD) et C/D (B-µCD).
Effet du dopage pour une même rugosité :
(●) p<0,05 : classe A (NID-µCD) comparée à la classe C (B-µCD) ;
(■) p<0,05 : classe B (NID-µCD) comparée à la classe D (B-µCD).

Nous pouvons observer que le nombre de pré-ostéoblastes sur tous les échantillons, y compris le contrôle, augmente avec le temps d'incubation. Cependant, les densités ne sont pas équivalentes selon les substrats, elles dépendent de la texture des surfaces et de la mouillabilité.

L'adhésion des cellules sur l'échantillon E (B-NCD) est significativement supérieure vis-à-vis de tous les échantillons µCD (A, B, C et D). La densité de cellules est d'ailleurs toujours deux fois plus importante. Elle est aussi toujours supérieure par rapport au contrôle et nettement supérieure après 4 heures.

En revanche, le nombre de cellules sur les substrats µCD est toujours inférieur à celui du contrôle. Ainsi, il semble qu'à partir d'une certaine valeur de rugosité, l'adhésion des cellules est meilleure. En effet, pour les échantillons de 600 nm rms, la rugosité paraît trop importante, et les surfaces étudiées présentent peu de points d'attache pour les cellules (figures III-1). Pour des rugosités de 200 nm rms, les cellules ont quelques points d'accroche (figures III-1). Enfin, lorsque la rugosité est plus faible (50 nm rms), la surface présente aux cellules plusieurs sites d'adhésion (figures III-1). Ainsi, les faibles rugosités sont donc préférables comme Chong et al. l'avaient démontrés *[1]*.

En comparant les densités de cellules des échantillons de même rugosité mais de dopage différent (A *vs* C ; B *vs* D), il est difficile de conclure quant à la toxicité du bore présent en surface. Mais il semble qu'il n'y ait pas d'impact. D'ailleurs, l'échantillon E paraît le confirmer puisque celui-ci est lourdement dopé.

Pour affirmer de nouveau ces premiers résultats, nous avons établi la même étude mais avec des fibroblastes. La figure III-5 présente les résultats obtenus de l'adhésion des fibroblastes sur nos échantillons polycristallins et sur un échantillon contrôle.

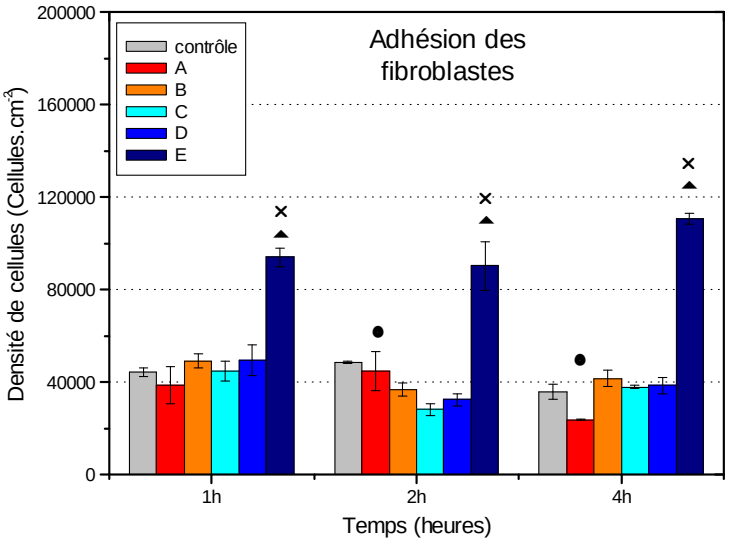


Figure III-5 : Graphique indiquant la densité de fibroblastes qui ont adhéré sur les surfaces des échantillons de différentes classes dont les caractéristiques sont présentées dans les tableaux III-2 et III-3. Comparaisons statistiques par paire avec le test de Student (voir figure III-4).
(×) $p<0,05$: classe E (B-NCD) comparée avec le contrôle ;
(▲) $p<0,05$: classe E (B-NCD) comparée avec les classes A/B (NID-µCD) et C/D (B-µCD).
Effet du dopage pour une même rugosité :
(●) $p<0,05$: classe A (NID-µCD) comparée à la classe C (B-µCD) ;
(■) $p<0,05$: classe B (NID-µCD) comparée à la classe D (B-µCD).

Contrairement aux pré-ostéoblastes, les densités de cellules n'augmentent pas avec les temps d'incubation. Cependant, le nombre de fibroblastes sur l'échantillon E (B-NCD) est toujours deux fois supérieur au contrôle et à tous les échantillons microcristallins, dopés ou non. Quant à l'effet du dopage, nous pouvons observer les mêmes densités sur les substrats microcristallins dopés et non dopés.

Ainsi, ces premiers résultats sur l'adhésion des pré-ostéoblastes et des fibroblastes permettent de conclure qu'il n'y a pas d'effet du bore de surface sur l'adhésion cellulaire sur des électrodes de diamant. Elles demeurent alors biocompatibles. En revanche, un paramètre est important, la rugosité : il semble qu'il y ait une limite, située entre 50 et 200 nm rms, en deçà de laquelle les cellules adhèrent plus facilement à la surface.

A.3.b. La prolifération des pré-ostéoblastes

La figure III-4 a démontré que le nombre de pré-ostéoblastes augmentait sur tous les échantillons, contrairement aux fibroblastes (figure III-5). Ainsi, étant donné cette évolution, nous allons étudier la prolifération des pré-ostéoblastes. La prolifération des cellules consiste à les laisser se multiplier pendant plusieurs jours. Dans notre étude, nous les avons quantifiées après 3 jours, 7 jours et 11 jours d'incubation. Il est important de noter que les cellules sont vivantes et très sensibles, il faut alors les nourrir régulièrement, tous les deux jours pour les pré-ostéoblastes, en changeant le milieu pour ne pas qu'elles meurent.

La figure III-6 présente les résultats obtenus après prolifération des pré-ostéoblastes sur nos échantillons polycristallins.

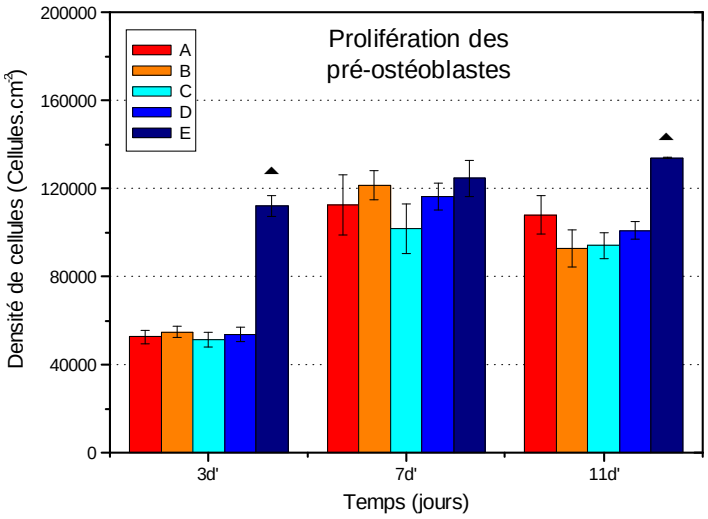


Figure III-6 : Graphique indiquant la densité de pré-ostéoblastes qui ont proliféré après 3 jours, 7 jours et 11 jours sur les surfaces des échantillons des différentes classes dont les caractéristiques sont présentées dans les tableaux III-2 et III-3. Comparaisons statistiques par paire avec le test de Student (voir figure III-4).
(▲) p<0,05 : classe E (B-NCD) comparée avec les classes A/B (NID-µCD) et C/D (B-µCD).
Effet du dopage pour une même rugosité :
(●) p<0,05 : classe A (NID-µCD) comparée à la classe C (B-µCD) ;
(■) p<0,05 : classe B (NID-µCD) comparée à la classe D (B-µCD).

Après trois jours de prolifération, nous pouvons observer les mêmes résultats préalablement obtenus durant l'adhésion cellulaire. La quantité de pré-ostéoblastes est deux fois plus importante sur le diamant nanocristallin dopé (B-NCD : E) par rapport aux échantillons microcristallins dopés et non dopés (B-µCD : C/D ; NID-µCD : A/B). En revanche, après sept et onze jours, la densité de cellules sur tous les substrats semble équivalente. En effet, cette densité sur l'échantillon E (B-NCD) semble ne plus évoluer après trois jours : elle a atteint un seuil. Alors que pour les échantillons microcristallins, ce seuil semble intervenir entre le troisième et le septième jour puisqu'au-delà les densités n'évoluent guère.

Avec ces trois études, d'adhésion de deux lignées cellulaires différentes (pré-ostéoblastes et fibroblastes) et de prolifération des pré-ostéoblastes, nous pouvons conclure que le diamant lourdement dopé au bore constitue un matériau biocompatible. Ainsi, ce matériau peut servir de support pour réaliser des structures hybrides diamant/milieu biologique et même être utilisé en tant qu'électrode implantable. En revanche, la rugosité de surface joue un rôle important et pour mieux comprendre cet effet de rugosité, nous allons étudier la morphologie des cellules sur ces échantillons.

A.3.c. Etude morphologique des cellules sur nos échantillons

L'étude de morphologie des cellules s'effectue au MEB, cependant, cette caractérisation s'opère dans le vide altérant alors les cellules. Pour ne pas modifier leur morphologie, après un jour d'incubation sur tous ces échantillons, nous avons « fixé » les cellules. Le protocole est décrit en annexe A. Pour résumer, les cellules ont été déshydratées puis ont subi un fin revêtement de palladium et d'or pour les observer au MEB.

Comme aucune différence n'a été observée sur la densité cellulaire entre les échantillons lourdement dopés et ceux qui sont non intentionnellement dopés, nous choisissons de présenter ici directement les observations MEB obtenues sur les échantillons dopés. Le seul paramètre variable est alors la rugosité de surface. La figure III-7 présente des images MEB de cellules qui ont adhéré sur les échantillons E (50 nm rms), D (200 nm rms) et C (600 nm rms). Nous pouvons remarquer la forte rugosité de l'échantillon C (figure III-7c) alors que l'échantillon E (figure III-7a) paraît « lisse ».

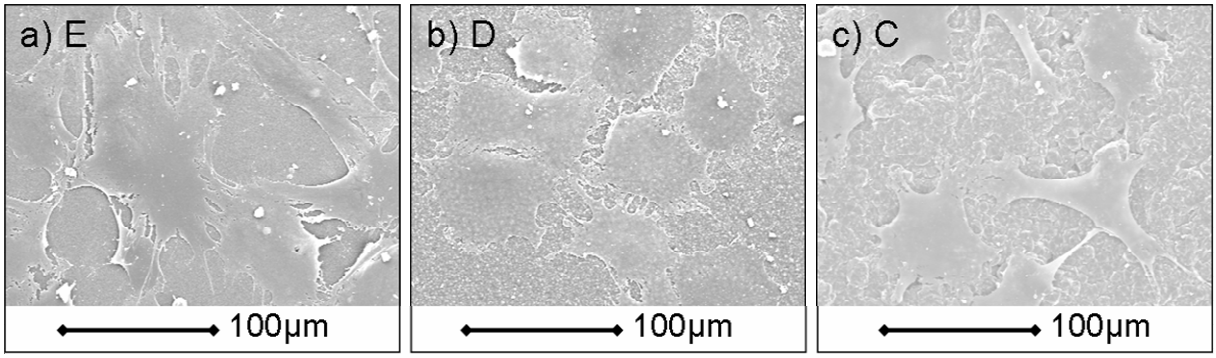


Figure III-7 : Images MEB de pré-ostéoblastes qui ont adhéré et proliféré après un jour d'incubation sur la surface des échantillons polycristallins dopés au bore. a) Classe E (B-NCD avec une rugosité de 50nm rms), b) classe D (B-µCD avec une rugosité de 200nm rms), c) classe C (B-µCD avec une rugosité de 600nm rms).

Nous observons que les cellules n'ont pas le même comportement en fonction de la rugosité du matériau. Cependant, la forme polygonale des cellules indique que celles-ci possèdent une activité normale : la surface ne leur est donc pas toxique.

Lorsque le diamant est nanocristallin (figure III-7a, échantillon E : B-NCD), nous pouvons observer que les cellules s'étendent, et épousent parfaitement la surface. Nous remarquons aussi la présence de nombreux filopodes qui permettent la connexion entre les cellules et donc l'échange d'informations (en particulier chimiques) pour une multiplication coopérative et cohérente. Tous ces phénomènes montrent finalement que l'adhésion des cellules est très forte sur diamant nanocristallin.

Au contraire, les cellules sur les échantillons microcristallins (figures III-7b et III-7c, échantillons D et C : B-µCD, respectivement) présentent peu de filopodes et donc peu d'interconnexion. Les cellules adhèrent finalement moins sur ce type de surface. De plus, nous pouvons observer sur la figure III-7c que les cellules possèdent des structures en trois dimensions. Ces morphologies sont probablement dues au caractère hydrophobe de cette surface, mais aussi à la rugosité importante.

En focalisant à l'interface filopode/diamant, nous voulions voir où les filopodes adhéraient : sur les facettes triangulaires (111), les facettes carrées (100) ou sur les joints de grain. Finalement, il semble qu'il n'y ait aucune préférence, mais ceci reste à confirmer, en étudiant l'adhésion cellulaire sur des monocristaux de diamant.

Pour conclure, nous avons démontré pour la première fois que le diamant polycristallin lourdement dopé au bore est biocompatible : il n'y a pas d'effet toxique du bore sur les cellules. Notamment, notre étude a permis de révéler que la rugosité de surface avait un rôle important quant à la quantité de cellules adsorbées mais aussi sur la force d'adhésion de celles-ci. L'adhésion cellulaire est finalement meilleure sur les échantillons nanocristallins.

B. Le diamant monocristallin

Nous venons de démontrer que le diamant polycristallin lourdement dopé au bore constituait un matériau biocompatible : il n'y a pas d'effet cytotoxique du bore présent en surface sur les pré-ostéoblastes et les fibroblastes. Or, le diamant polycristallin est constitué par définition de cristallites possédant des facettes de différentes orientations. Ces axes de croissance sont majoritairement les orientations (100) et (111). Nous voulions savoir si une orientation était préférable vis-à-vis d'une autre pour l'adhésion cellulaire. Ainsi, nous avons effectué la même étude sur diamant monocristallin (100) et (111). Il faut noter qu'aucune étude sur l'adhésion de cellules n'a été effectuée en fonction de l'orientation cristalline. Les seuls travaux existant sur diamant monocristallin traitent de l'adhésion de neurones mais avec une couche de protéines ou de peptides (laminine, poly-lysine ou poly-ornithine *[7]*) préalablement déposée. Notre étude est portée seulement sur l'adhésion cellulaire directe sur la surface de monocristaux.

De plus, pour compléter l'étude effectuée sur l'effet du bore sur les cellules, nous avons utilisé et comparé, en fonction de l'orientation cristalline, des échantillons très faiblement dopés (p^-) et lourdement dopés (p^+) au bore. Il faut noter que le bore s'incorpore préférentiellement selon l'orientation (111) *[5]*. Ainsi cet effet a-t-il des conséquences sur les cellules ?

B.1. Les différents paramètres d'études : orientations cristallines, dopage et angles de contact

Contrairement aux échantillons polycristallins, de grande taille 12x12 mm², les échantillons monocristallins sont beaucoup plus petits. En effet, ceux-ci ont une surface de 3x3 mm² pour les (100) et de 2x2 mm² pour les (111). Nous avions pu cliver les échantillons polycristallins en quatre morceaux pour une étude statistique, en revanche, pour réaliser une même étude avec des monocristaux, nous avons utilisé huit échantillons. Quatre échantillons ont crû selon l'orientation (100) et quatre autres selon l'orientation (111).

Puis, comme pour l'étude sur diamant polycristallin, tous ces échantillons ont été stockés à l'air pendant quelques mois. Avant d'effectuer la culture cellulaire, ils ont été nettoyés dans des bains à ultra-sons dans de l'acétone, de l'alcool et de l'eau ultra-pure.

Au sein de chaque orientation cristalline, deux couches ont été synthétisées pour que le dopage soit très faible (p^-) et deux autres pour des lourds dopages au bore (p^+). L'ensemble des échantillons utilisés pour réaliser cette étude est résumé dans le tableau III-4.

Tableau III-4 : Liste des échantillons monocristallins utilisés pour la culture cellulaire en fonction de l'orientation cristalline et du dopage.

		dopage	
		p^-	p^+
Orientations cristallines	(100)	Echantillon 8	DMO 667
		DMO 677	DMO 679
	(111)	DMO 700	DMO 686
		DMO 701	DMO 689

La préparation et la synthèse de ces échantillons sont détaillées dans le chapitre II.

Nous avons vu lors de l'étude de culture cellulaire sur les échantillons polycristallins que la rugosité de surface de ces derniers jouait un rôle important quant à l'adhésion des cellules. Pour les monocristaux, cette rugosité est très faible, inférieure à 10 nm rms (figure III-8).

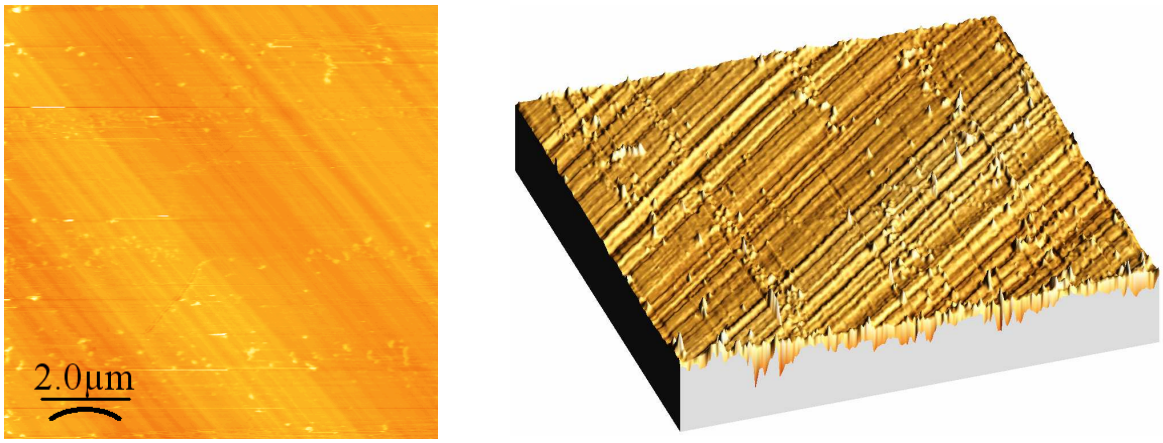


Figure III-8 : Image AFM indiquant la présence de rayures sur la surface d'un échantillon diamant monocristallin d'orientation (100).

Cette faible rugosité doit alors causer quelques problèmes pour l'adhésion des cellules à cause du manque de structures permettant l'accrochage de celles-ci sur la surface. Néanmoins, il existe certaines imperfections telles que des rayures (figure III-8) mais aussi quelques cristallites (figure III-9), qui peuvent participer au processus d'adhésion.

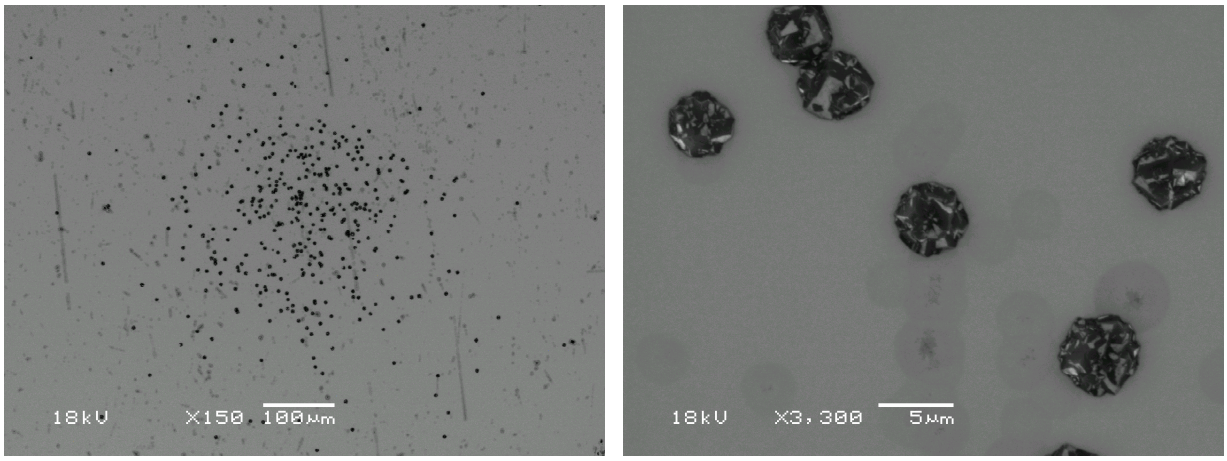


Figure III-9 : Images MEB indiquant la présence de cristallites sur la surface d'un échantillon diamant monocristallin (100) p^+.

Les rayures proviennent du substrat lors de son polissage, et celles-ci se propagent et sont amplifiées pendant la croissance. Les cristallites apparaissent pendant la croissance et sont dues à des rapports CH_4/H_2 importants *[8]*.
Les mêmes phénomènes ont été observés sur les deux orientations cristallines.

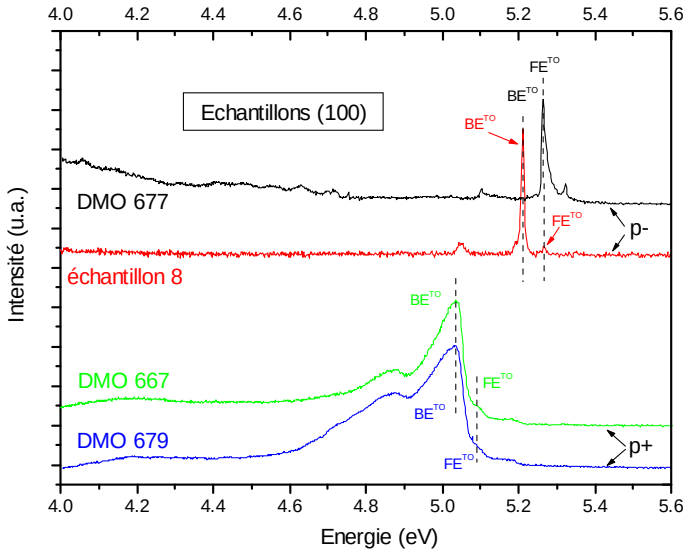
Nous allons maintenant présenter et estimer la quantité de bore présent en surface pour chaque échantillon à l'aide de la cathodoluminescence. Puis, après avoir présenté nos résultats sur les angles de contact, nous étudierons l'adhésion cellulaire en fonction de l'orientation cristalline (100) et (111), mais aussi en fonction du dopage.

B.1.a. Le dopage

Pour quantifier les atomes de bore présents en surface, nous avons estimé, dans un premier temps, le dopage en volume de nos échantillons. Pour cela, nous avons étudié la zone excitonique des spectres obtenus pas cathodoluminescence. En effet, dans la gamme des faibles dopages, nous avons utilisé la formule de Kasu (équation II-3) en calculant le rapport

d'intensité des pics de l'exciton lié (BE^{TO}) sur l'exciton libre (FE^{TO}). En revanche, dans la gamme des lourds dopages, nous avons utilisé la position du pic de l'exciton lié (BE^{TO}).

Les figures III-10 et III-11 présentent les spectres dans la zone excitonique de tous ces échantillons (100) et (111), respectivement. Tous les spectres ont été enregistrés avec une tension d'accélération de 5 kV afin de caractériser uniquement la couche synthétisée et non le substrat.



<u>Figure III-10</u> : Spectres de cathodoluminescence dans la zone excitonique des différents échantillons d'orientation (100), pris avec une tension d'accélération des électrons à 5kV.

L'échantillon faiblement dopé DMO 677 présente une composante importante du FE^{TO} alors qu'il est difficile de distinguer le BE^{TO}. La concentration de bore dans le volume est donc très inférieure à la constante de la formule de Kasu : $[B]_{677} \ll 6x10^{16}$ cm^{-3}. En revanche, pour l'Echantillon 8, nous pouvons observer que le BE^{TO} (à 5,211 eV) est plus important que le FE^{TO} (à 5,264 eV). Par calcul de la formule de Kasu, nous obtenons : $[B]_8 = 8x10^{17}$ cm^{-3}.

Pour les échantillons lourdement dopés, DMO 667 et DMO 679, la position du BE^{TO}, à 5,04 eV, permet d'indiquer que ces couches sont lourdement dopées. La figure III-12 montre le décalage du BE^{TO} en fonction des concentrations de bore et donc confirme cette observation. Cependant, nous ne pouvons connaître exactement le dopage de ces couches par cette caractérisation. Nous ne pouvons seulement affirmer que leur concentration en bore est supérieure à $3x10^{20}$ cm^{-3}.

Les valeurs de concentration pour tous les échantillons sont résumées dans le tableau III-5.

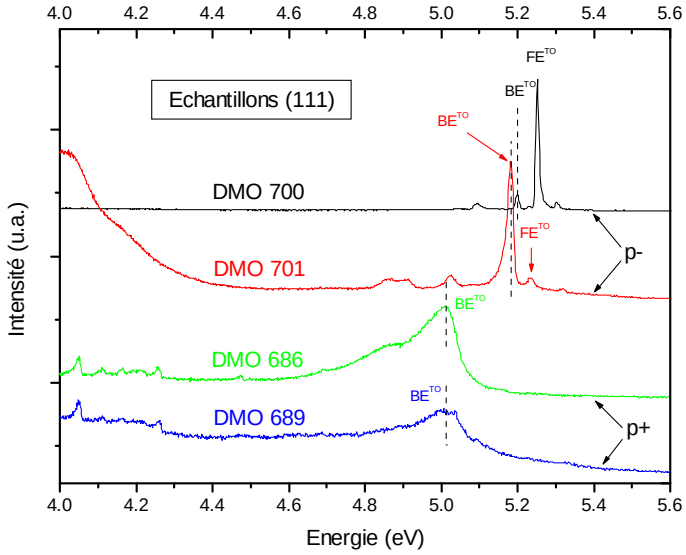


Figure III-11 : Spectres de cathodoluminescence dans la zone excitonique des différents échantillons d'orientation (111), pris avec une tension d'accélération des électrons à 5kV.

Pour les échantillons (111), nous pouvons distinguer sur la figure III-11 le faible dopage des couches DMO 700 et DMO 701 et le lourd dopage pour DMO 686 et 689. Or, ces échantillons monocristallins orientés (111) ont servi pour élaborer le graphique de la figure III-12. Ils ont alors tous été caractérisés par SIMS (excepté DMO 700 et DMO 701) pour connaître exactement leur dopage. Nous présentons ces couches dans le graphique, et les valeurs du dopage sont indiquées dans le tableau III-5.

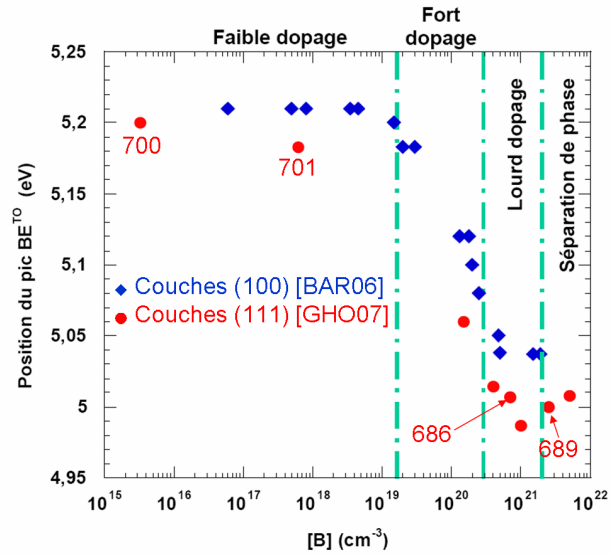


Figure III-12 : Comparaison des positions du BE^{TO} dans les couches homoépitaxiées d'orientation (100) et (111) en fonction du dopage au bore [9, 10], avec insertion des échantillons orientés (111) utilisés pour cette étude.

Tableau III-5 : Valeurs des concentrations en bore pour les échantillons monocristallins.

		dopage	
		p^-	p^+
Orientations cristallines	(100)	Echantillon 8 [B] = 8 10^{17} cm^{-3}	DMO 667 [B] » 3 10^{20} cm^{-3}
		DMO 677 [B] «10^{16} cm^{-3}	DMO 679 [B] » 3 10^{20} cm^{-3}
	(111)	DMO 700 [B] = 3,3 10^{15} cm^{-3}	DMO 686 [B] = 4 10^{20} cm^{-3}
		DMO 701 [B] = 6,2 10^{17} cm^{-3}	DMO 689 [B] = 2,5 10^{21} cm^{-3}

Finalement, avec ces valeurs obtenues de la concentration des atomes de bore dans les couches (tableau III-5), nous avons en première approximation estimé la concentration de bore en surface (tableau III-6).

Tableau III-6 : Estimations des concentrations surfaciques en bore, par rapport aux carbones constituant la surface, en fonction des différentes classes d'échantillons.

		dopage	
		p^-	p^+
Orientations cristallines	(100)	$[B]_{surf}$ < 4,5 ppm	0,2 % < $[B]_{surf}$ < 0,7 %
	(111)	$[B]_{surf}$ < 3,5 ppm	0,3 % < $[B]_{surf}$ < 1,4 %

Nous pouvons observer que la concentration des atomes de bore en surface représente quelques ppm, par rapport aux atomes de carbone qui constituent la surface, pour les échantillons p^- ((100) et (111)). Alors que celle-ci est de l'ordre du pourcent pour les échantillons p^+.

Finalement, nous voyons que l'étude de biocompatibilité du diamant monocristallin ne sera pas facile à interpréter car toutes les couches d'une même classe (même gamme de dopage et même orientation) ne possèdent pas exactement le même dopage. Cependant, un paramètre va permettre d'indiquer s'il existe une grande différence entre ces échantillons, il s'agit de la mouillabilité par la mesure des angles de contact.

B.1.b. Les angles de contact

Etant donné la petite taille des échantillons, nous avons utilisé 0,05 µl d'eau ultra-pure pour mesurer les angles de contact. Ces mesures ont été effectuées plusieurs fois sur les différentes classes d'échantillons pour obtenir des valeurs statistiques. Le tableau III-7 présente les valeurs obtenues.

Tableau III-7 : Valeurs des angles de contact pour les différentes classes d'échantillons monocristallins.

		dopage	
		p^-	p^+
Orientations cristallines	(100)	59.9 ± 1.0 °	50.6 ± 3.6 °
	(111)	31.9 ± 2.9 °	73.8 ± 0.4 °

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que les écarts type sont très faibles malgré les écarts de dopage entre les échantillons pour une même classe.
Il est important de noter qu'il est difficile de comparer nos résultats, car à ma connaissance aucune équipe n'a travaillé sur les angles de contact du diamant monocristallin orienté (111). Notamment, je n'ai vu aucun travail sur l'effet du dopage sur les angles de contact.

Pour les échantillons (100) p^-, nous obtenons des angles de contact proches de 60°. Ce résultat est en accord avec ceux de Kaibara et al. qui obtiennent des angles de 65° pour des échantillons oxygénés en surface, alors que l'angle est de 75° quand la surface est hydrogénée *[11]*. Ainsi, nos échantillons sont oxydés après quelques mois à l'air. Nous retrouvons alors les résultats de Vanhove et al. quant à l'oxydation naturelle des échantillons hydrogénés *[4]*.
Quand les échantillons (100) sont lourdement dopés, nous observons une diminution de l'angle de contact d'environ 10°. Nous retrouvons les résultats préalablement obtenus sur diamant polycristallin.

En revanche, pour l'orientation (111), nous observons une augmentation importante de cet angle de contact entre les couches p^- et les couches p^+. Il est très difficile d'interpréter ces

résultats. Est-ce que le bore induit, selon cette orientation, des groupements de surface hydrophobes ? La seule observation que nous pouvons faire sur les angles de contact, c'est que la surface des échantillons (111) p^- sont très hydrophiles (θ~32°) contrairement aux échantillons (111) p^+ (θ~74°).

Ces différents comportements hydrophile/hydrophobe des surfaces devraient influencer fortement l'adhésion cellulaire.

B.2. Adhésion et prolifération des cellules

Après caractérisation, tous ces matériaux ont été placés dans des plaques à puits pour effectuer la culture cellulaire. La méthodologie est la même que pour les échantillons polycristallins, détaillée en annexe A.
Il est important de noter qu'étant donnée la faible taille des échantillons, le nombre de cellules qui ont adhéré est par conséquent faible. Ainsi, lors de la révélation par colorimétrie, les résultats obtenus étaient proches de la limite de détection de l'appareil.

Dans un premier temps, nous étudierons l'adhésion des pré-ostéoblastes et des fibroblastes sur nos échantillons monocristallins. Puis, nous étudierons la prolifération des pré-ostéoblastes.

B.2.a. L'adhésion cellulaire

L'adhésion des cellules s'est effectuée pendant 1 heure, 2 heures et 4 heures d'incubation. La figure III-13 présente les résultats obtenus de l'adhésion des pré-ostéoblastes sur nos échantillons monocristallins et sur un échantillon contrôle.

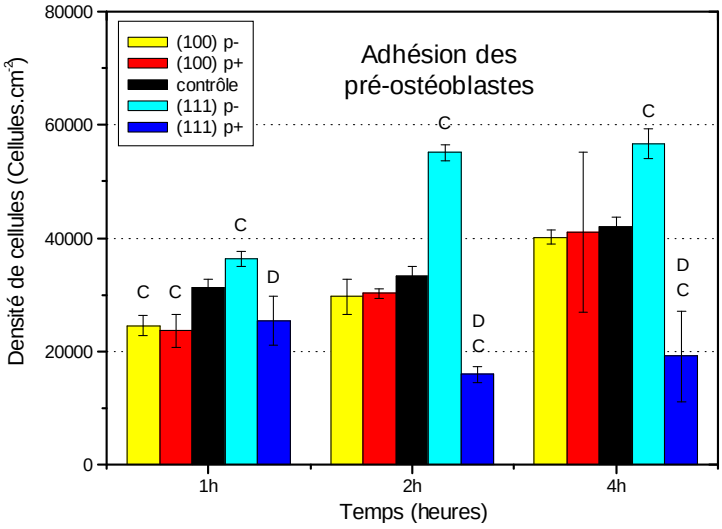


Figure III-13 : Graphique indiquant la densité de pré-ostéoblastes qui ont adhéré sur les surfaces des échantillons de différentes classes dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau III-7. Chaque barre représente la moyenne des cellules adhérées ± l'écart type. Des comparaisons statistiques ont été effectuées par paire avec le test de Student. Par calcul, en utilisant les moyennes et les écarts type, lorsque $p<0,05$ la différence entre les deux classes est considérée comme statistiquement significative. Les symboles signifient:
(C) *$p<0,05$: comparaison avec le contrôle ;*
(D) *$p<0,05$: p^+ comparé à p^- pour une même orientation (effet du dopage).*

Dans un premier temps, nous pouvons remarquer que la densité des pré-ostéoblastes augmente faiblement de manière linéaire sur les couches (100) p^-, (100) p^+ ainsi que sur le contrôle. Nous retrouvons alors les observations que nous avons pu faire sur diamant polycristallin. Notamment, quel que soit le dopage selon cette orientation, les densités de cellules sont équivalentes entre elles, et elles le sont aussi avec le contrôle. Nous pouvons conclure qu'il n'y a pas d'effet nocif du bore selon cette orientation.

En revanche, nous observons des résultats différents selon l'orientation (111) avec une augmentation de la densité cellulaire sur les p^- tandis que celle sur les p^+ diminue fortement avec le temps d'incubation. Cette densité sur les p^- est 50% puis 25% supérieure au contrôle après 2 heures puis 4 heures alors qu'elle est toujours 50% plus faible pour les p^+. Cependant, nous remarquons que le nombre de pré-ostéoblastes sur les p^+ après une heure d'incubation est important et est équivalent à celui du contrôle.

Avec ces résultats, il est difficile de conclure quant à la toxicité du bore. Nous ne pouvons simplement affirmer que la densité de cellules suit finalement le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces.

Pour confirmer ces premiers résultats, nous avons établi la même étude avec des fibroblastes. La figure III-14 présente les résultats obtenus de l'adhésion des fibroblastes sur nos échantillons monocristallins et sur un échantillon contrôle.

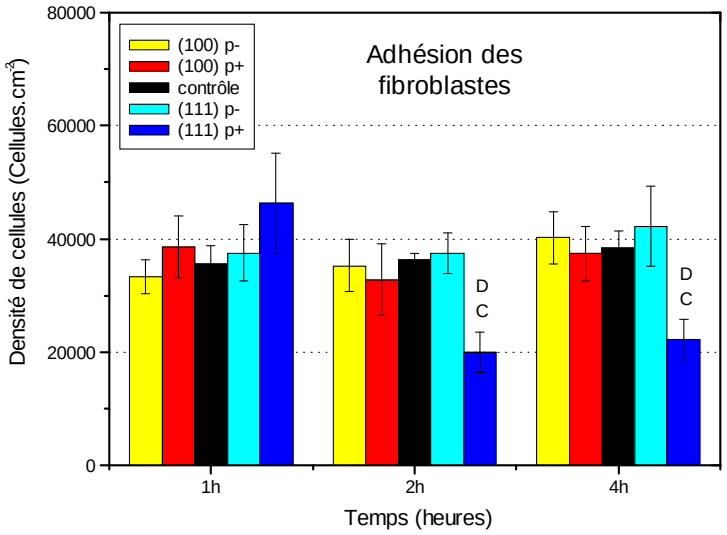


Figure III-14 : Graphique indiquant la densité de fibroblastes qui ont adhéré sur les surfaces des échantillons de différentes classes dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau III-7. Comparaisons statistiques par paire avec le test de Student (voir figure III-13).
(C) *$p<0,05$: comparaison avec le contrôle ;*
(D) *$p<0,05$: p^+ comparé à p^- pour une même orientation cristalline (effet du dopage).*

Comme pour le diamant polycristallin avec les fibroblastes, la densité de cellules reste constante pour les couches (100) p^-, (100) p^+, (111) p^- et le contrôle. En revanche, celle-ci diminue après 2 heures et 4 heures pour les échantillons (111) p^+.
Ces résultats confirment donc ceux préalablement obtenus avec les pré-ostéoblastes. Il semble alors que pendant la première heure, les cellules (pré-ostéoblastes et fibroblastes) adhèrent sur la surface des échantillons (111) p^+, puis, cette adhésion est limitée et est contrôlée par le caractère hydrophobe des surfaces.

Nous n'avons pas effectué d'étude morphologique des cellules sur les échantillons puisqu'il est nécessaire de les fixer et l'échantillon doit subir un revêtement de palladium et d'or. Or, nous comptions réutiliser ces échantillons pour faire des expériences complémentaires sur la force d'adhésion des cellules. Cependant, nous avons pu observer par microscopie optique les cellules. La figure III-15 présente des fibroblastes sur des couches (111) p^- et (111) p^+ après 4 heures d'incubation.

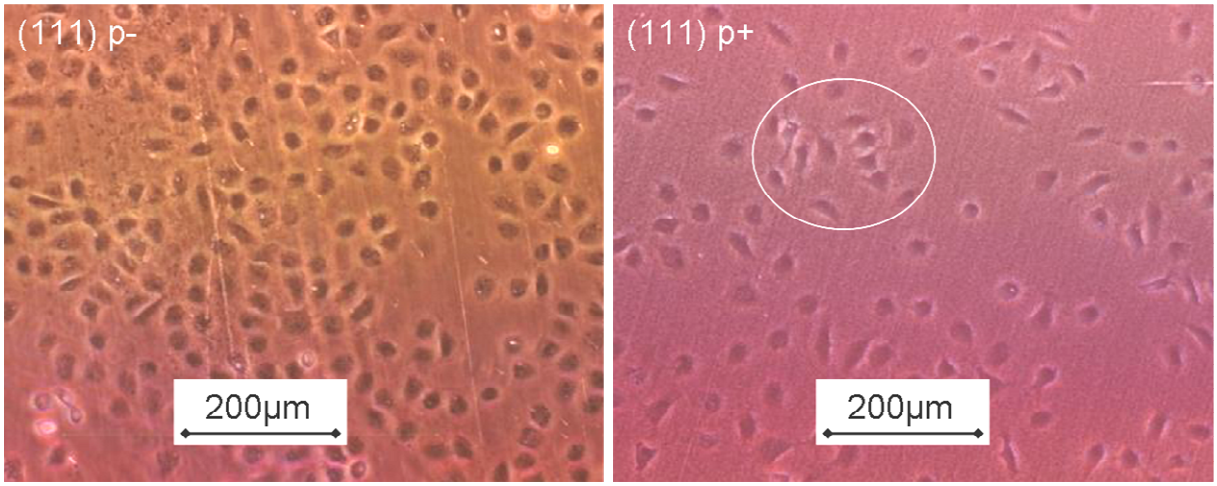


Figure III-15 : Images optiques de fibroblastes qui ont adhéré sur les échantillons (111) p^- et (111) p^+ après 4 heures d'incubation.

Nous observons que le nombre de cellules est supérieur sur l'échantillon (111) p^- par rapport à l'échantillon (111) p^+, comme l'indique le graphique de la figure III-14. Néanmoins, même si la densité n'est pas très importante, nous distinguons (cercle blanc) une bonne adhésion cellulaire sur l'échantillon (111) p^+ (figure III-15b). En effet, les fibroblastes ont une forme polygonale et nous pouvons même distinguer des filopodes qui connectent les cellules entre elles.

Ainsi, nous avons vu que les cellules adhéraient bien sur les monocristaux (100) lourdement dopés ou non. La densité cellulaire selon cette orientation est d'ailleurs toujours équivalente à celle du contrôle qui est un matériau biocompatible. En revanche, selon l'orientation (111), la densité cellulaire est toujours très inférieure au contrôle, après deux heures d'incubation pour les couches p^+ alors qu'elle est équivalente voire supérieure au contrôle pour les couches p^-. Il semble donc que la densité cellulaire suit le caractère hydrophile/hydrophobe des surfaces.

B.2.b. La prolifération des pré-ostéoblastes

La figure III-13 a démontré que le nombre de pré-ostéoblastes augmentait sur tous les échantillons (excepté les (111) p^+), contrairement aux fibroblastes (figure III-14). Ainsi, nous

allons étudier la prolifération des pré-ostéoblastes. Dans notre étude, nous avons laissé les cellules proliférer pendant 3 jours, 7 jours et 11 jours d'incubation.

La figure III-16 présente les résultats obtenus après prolifération des pré-ostéoblastes sur nos monocristaux ainsi que le contrôle.

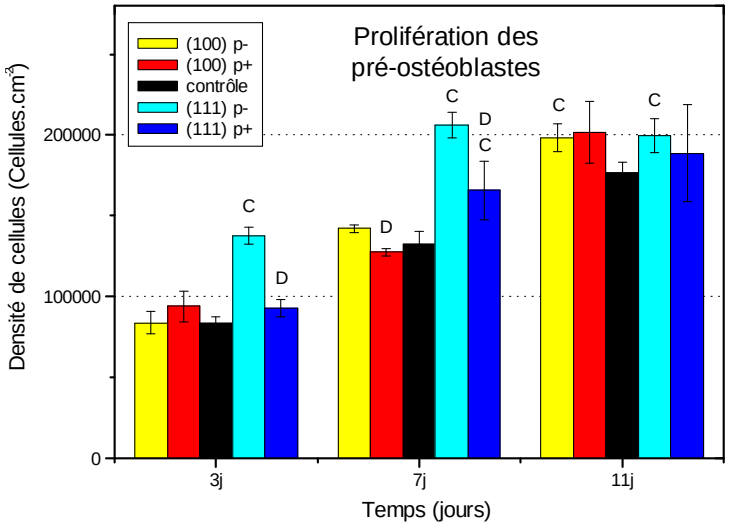


Figure III-16 : Graphique indiquant la densité de pré-ostéoblastes qui ont proliféré après 3 jours, 7 jours et 11 jours sur les surfaces des échantillons de différentes classes dont les caractéristiques sont présentées dans le tableau III-7. Comparaisons statistiques par paire avec le test de Student (voir figure III-13).
(C) *$p<0,05$: comparaison avec le contrôle ;*
(D) *$p<0,05$: p^+ comparé à p^- pour une même orientation cristalline (effet du dopage).*

Contrairement à la prolifération des pré-ostéoblastes sur diamant polycristallin, nous n'observons pas ici d'effet de saturation du nombre de cellules. Cette saturation intervient peut être avec des temps d'incubation plus longs. En revanche, la densité augmente avec le temps sur les échantillons et sur le contrôle. Cette augmentation confirme même tous les résultats obtenus quant à l'adhésion des cellules pour les couches (100) p^-, (100) p^+ et (111) p^-. Néanmoins, ces résultats de prolifération des cellules sur les échantillons (111) p^+ sont en désaccords avec l'adhésion cellulaire. Ce phénomène peut être attribué à une modification de la surface, probablement recouverte de fragments de cellules mortes ou d'un dépôt de protéines.

Pour conclure sur la biocompatibilité des monocristaux de diamant, nous avons vu que les cellules adhéraient et proliféraient sur tous nos échantillons sans pré-traitement avec des protéines ou des peptides. Nous demeurons alors les seuls à avoir accompli une telle étude sur

diamant monocristallin. Cependant, des résultats différents ont été obtenus en fonction des orientations cristallines. En effet, pour les (100), quel que soit le dopage, toutes nos études ont démontré que le nombre de cellules était toujours équivalent. Ainsi, il n'y a pas d'effet toxique du bore selon cette orientation. Les électrodes en diamant orientées (100) demeurent donc biocompatibles. En revanche, des résultats différents ont été obtenus selon l'orientation (111). Ceux-ci amènent à conclure que les monocristaux intrinsèques (111) sont de très bons matériaux biocompatibles contrairement aux monocristaux lourdement dopés (111). Il semble qu'il y ait un effet du bore sur les cellules lorsqu'elles sont en contact avec ces échantillons à cours terme alors que cet effet disparaît pendant la prolifération. Des expériences complémentaires pourront permettre de conclure quant à ces premiers résultats.

Conclusion

Dans un premier temps nous avons démontré que le diamant oxydé de manière naturelle est biocompatible. Les électrodes en diamant polycristallin le sont également parfaitement. Aucun effet toxique du bore n'a pu être observé lors de nos études sur nos échantillons polycristallins. De plus, nous avons mis clairement en évidence l'influence de la rugosité des échantillons sur l'adhésion cellulaire. En effet, cette dernière est meilleure lorsque les couches sont nanocristallines vis-à-vis des couches microcristallines. Cet effet est sans doute dû à une augmentation du nombre des points d'attache pour les cellules lorsque la taille des motifs diminue.

Dans un second temps, nos études sur les monocristaux ont permis de déterminer et de confirmer la biocompatibilité du diamant oxydé naturellement à l'air. Malgré les résultats contradictoires obtenus selon l'orientation (111), il ne semble pas y avoir d'influence du bore sur l'adhésion cellulaire.

Des expériences complémentaires sont alors nécessaires pour confirmer tous ces résultats. Des expériences sont effectivement prévues pour étudier la force d'adhésion des cellules sur tous les types de surface (polycristallins et monocristallins). Cette étude s'effectuera par AFM. Enfin, des protéines, comme l'actine ou la fibronectine permettant l'attache des cellules, pourront être mises en évidence par colorimétrie.

Références Bibliographiques

[1] K. F. Chong, K. P. Loh, S. R. K. Vedula, C. T. Lim, H. Sternschulte, D. Steinmuller, F. S. Sheu, Y. L. Zhong, *Langmuir* **2007**, *23*, 5615.

[2] M. Kalbacova, M. Kalbac, L. Dunsch, A. Kromka, M. Vanecek, B. Rezek, U. Hempel, S. Kmoch, *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics* **2007**, *244*, 4356.

[3] M. Kalbacova, L. Michalikova, V. Baresova, A. Kromka, B. Rezek, S. Kmoch, *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics* **2008**, 1.

[4] E. Vanhove, J. de Sanoit, J. C. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Nesladek, *Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science* **2007**, *204*, 2931.

[5] B. V. Spitsyn, L. L. Bouilov, B. V. Derjaguin, *Journal of Crystal Growth* **1981**, *52*, 219.

[6] M. Nosonovsky, B. Bhushan, *Advanced Functional Materials* **2008**, *18*, 843.

[7] P. Ariano, P. Baldelli, E. Carbone, A. Gilardino, A. Lo Giudice, D. Lovisolo, C. Manfredotti, M. Novara, H. Sternschulte, E. Vittone, *Diamond and Related Materials* **2005**, *14*, 669.

[8] D. Takeuchi, H. Watanabe, S. Yamanaka, H. Okushi, K. Kajimura, *Physica Status Solidi a-Applied Research* **1999**, *174*, 101.

[9] C. Baron, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble **2005**.

[10] S. Ghodbane, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble **2007**.

[11] Y. Kaibara, K. Sugata, M. Tachiki, H. Umezawa, H. Kawarada, *Diamond and Related Materials* **2003**, *12*, 560.

CHAPITRE IV :

FONCTIONNALISATION DE LA SURFACE DU DIAMANT VIA L'UTILISATION DES SELS DE DIAZONIUM

A. Le greffage de la biotine

L'un des objectifs principaux de ma thèse est de fonctionnaliser la surface du diamant par des biomolécules afin d'élaborer des biocapteurs. Plusieurs méthodes de fonctionnalisation du diamant ont été présentées dans la partie I.B.. Le développement de celles-ci est très récent et ces techniques ont tout particulièrement évolué au cours de ces trois dernières années.

Au début de nos travaux en 2005 sur ce domaine, un seul article traitait de la méthode de greffage utilisant les sels de diazonium sur diamant *[1]*. Cette voie paraissait être une bonne alternative à d'autres voies telles que la photochimie ou la chimie, puisqu'elle est plus rapide (de l'ordre de la minute). Nous cherchions donc à élaborer une stratégie afin de mettre en évidence le greffage d'entités via cette technique lorsqu'en 2006, Wang et al. ont utilisé les sels de diazonium pour immobiliser une enzyme (la glucose oxydase) sur la surface d'un échantillon diamant en plusieurs étapes *[2]*.

Finalement, nous nous sommes basés sur leur protocole expérimental afin de greffer sur la surface une autre molécule d'intérêt biologique : la biotine, puisque cette dernière constitue avec l'avidine un modèle biologique de système de reconnaissance affin.

Notamment, notre objectif spécifique a été dès le départ de localiser le greffage sur la surface. Nous avons utilisé pour cela une technique originale développée au CREAB, appelée electrospotting, que nous avons mise en œuvre avec succès pour la première étape réactionnelle électrochimique, et ce pour la première fois sur une surface de diamant.

A.1. Un modèle biologique : le couple biotine/avidine

Notre étude s'est portée sur le greffage de la biotine car cette molécule constitue un modèle biologique avec l'avidine. Elle permet en effet de greffer d'une manière générique, par couplage avec l'avidine, de nombreux types différents de molécules d'intérêt biologique (protéines, anticorps…).

La biotine est une vitamine (H ou B8) (figure IV-A-1a) hydrosoluble qui est stable à la chaleur et à l'oxydation.

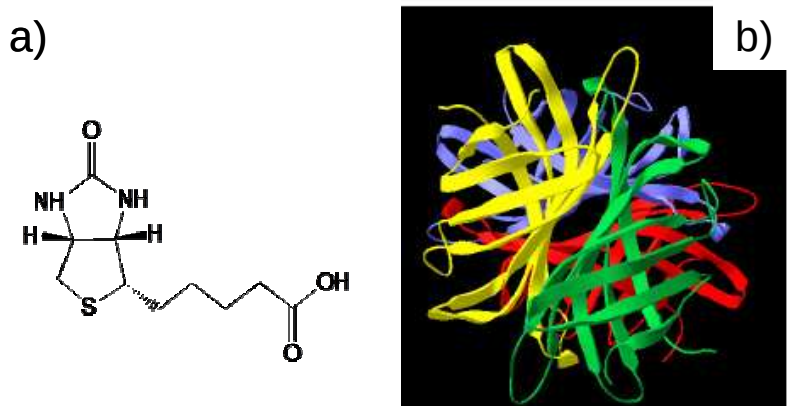


Figure IV-A-1 : a) Formule topologique de la biotine et b) structure de l'avidine.

L'avidine (figure IV-A-1b) est une glycoprotéine que nous retrouvons dans le blanc d'œuf cru. Elle est composée de quatre monomères constitués d'une chaîne de 128 acides aminés (15 800 Da par monomère). Chaque monomère possède une « poche » permettant la liaison avec la biotine laissant ainsi quatre sites de reconnaissance pour la biotine. Ces deux molécules ont une affinité particulièrement forte : la constante d'affinité* est de six ordres de grandeur supérieure aux constantes rencontrées habituellement en reconnaissance moléculaire (tableau IV-A-1).

Tableau IV-A-1 : Constantes d'affinité des couples biotine-avidine et antigène-anticorps.

Couples	**Affinité K [M^{-1}]**
Biotine-avidine	$1,5\ 10^{15}$
Antigène-anticorps	10^{9}

Malgré cette forte affinité, le lien peut être brisé en cassant les structures secondaires et tertiaires de l'avidine. En effet, en la mettant dans des milieux comportant des tensio-actifs, celle-ci se dénature et se détache de la biotine puisqu'elles sont liées l'une à l'autre par des ponts hydrogènes (figure IV-A-2).

* Somme des forces d'attraction et de répulsion mises en jeu dans un couple biologique

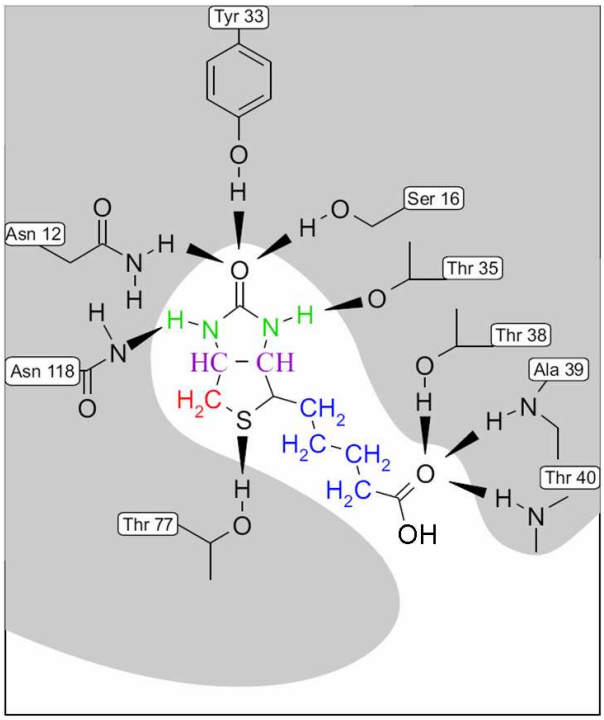


Figure IV-A-2 : Schéma de principe de la « poche de liaison » de l'avidine indiquant les acides aminés intervenant dans les liaisons par ponts hydrogènes (figure adaptée de [3]).

Ainsi, lorsque la biotine est immobilisée sur la surface, l'avantage de l'utilisation de ce couple est de pouvoir renouveler avec facilité la surface biotinylée. Cette possibilité de régénération permet alors d'arrimer sur la surface des avidines fonctionnalisées par des fluorophores ou des protéines chimiquement actives telle que la peroxydase de raifort (HRP, horse raddish peroxydase). Notamment, en greffant l'avidine par reconnaissance avec la biotine immobilisée, trois « poches » de reconnaissance de l'avidine demeurent libres. Des biomolécules biotinylées, que l'on trouve facilement sur le marché, peuvent être immobilisées.

Cette fonctionnalisation de la surface du diamant par la biotine montre alors l'aspect générique du greffage.

Afin de vérifier la localisation, la disponibilité des sondes (la biotine) ainsi que la stabilité du greffage de la biotine sur nos échantillons, nous les avons caractérisés par microscopie de fluorescence. Nous avons alors utilisé la streptavidine - un dérivé de l'avidine possédant la même affinité avec la biotine - fonctionnalisée avec la R-phycoérythrine, un fluorophore.

A.2. Un greffage multi-étape

Pour fonctionnaliser la surface du diamant avec la biotine, nous avons adapté le protocole déjà établi par Wang et al. qui consiste à immobiliser une enzyme en plusieurs étapes dont la première utilise les sels de diazonium *[2]*.

Comme l'activation des ces derniers s'effectue par électrochimie, nous avons alors utilisé des échantillons de diamant lourdement dopé au bore, en tant qu'électrodes.

Des échantillons de différentes rugosités ont également été utilisés afin d'en étudier l'influence sur le greffage de la biotine. Nous avons alors travaillé avec des échantillons nanocristallins (B-NCD, type E, voir tableau II-7) provenant du CEA-Saclay ainsi que des échantillons microcristallins (B-µCD, type D, voir tableau II-7) synthétisés à l'Institut Néel.

La fonctionnalisation de ces surfaces de diamant par la biotine s'effectue en quatre étapes, électrochimiques ou chimiques (figure IV-A-3).

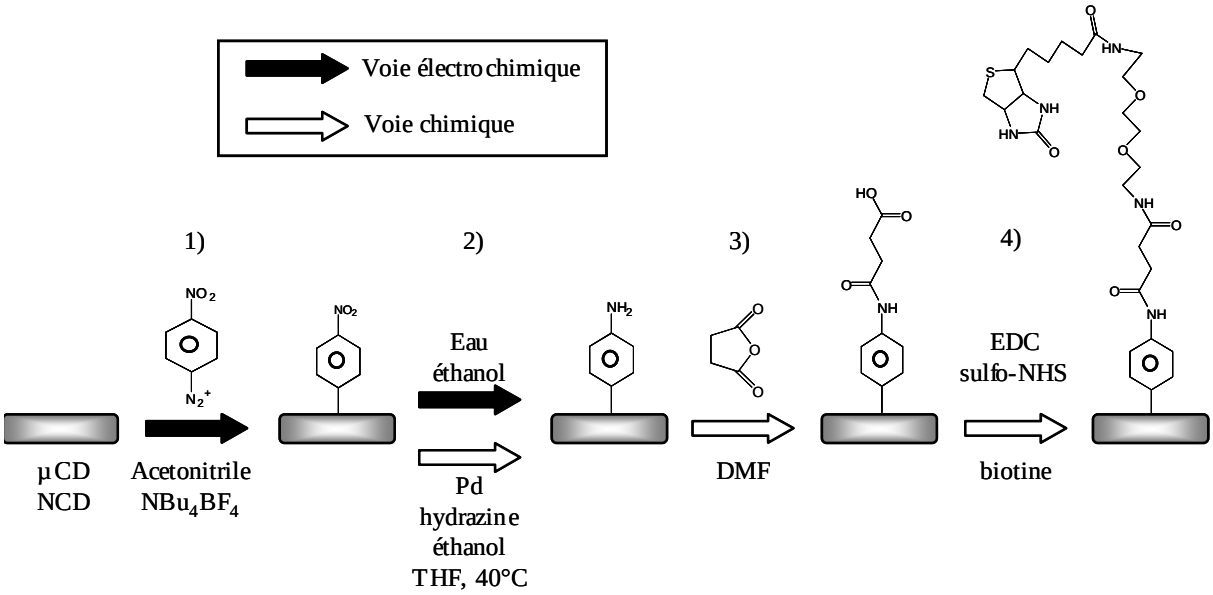


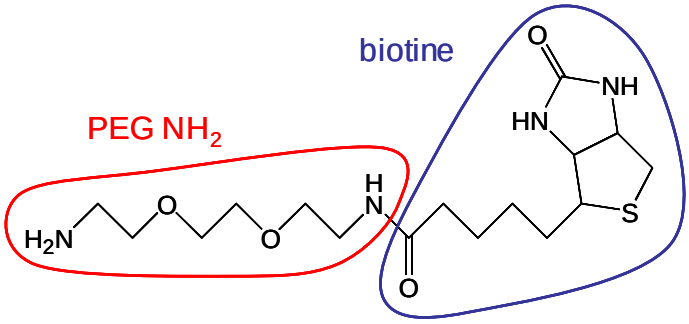
Figure IV-A-3 : Schéma décrivant le principe de greffage de la biotine sur la surface du diamant polycristallin en quatre étapes (électro-)chimiques.

La première étape (figure IV-A-3 étape 1) consiste à immobiliser sur la surface des échantillons des groupements nitrophényles par réduction électrochimique de sels de diazonium. Ces groupements vont servir de primaires d'arrimages pour les réactions ultérieures.

Ainsi, à l'issue de cette première étape, la surface est décorée par des groupements nitro, assez peu réactifs pour les réactions de greffage qui nous occupent : ils sont donc réduits dans l'étape suivante pour former des amines, plus réactives. Cette réduction peut s'effectuer soit par électrochimie, soit par voie chimique (figure IV-A-3 étape 2).

Ces deux voies ont été suivies et caractérisées par électrochimie ainsi que par spectroscopie XPS pour étudier et comparer leur efficacité.

La troisième étape réactionnelle (par voie chimique) exploite la réaction des amines de surface avec l'anhydride succinique pour obtenir un tapissage de la surface du diamant par des groupements carboxyliques (COOH) (figure IV-A-3 étape 3). Enfin, ces derniers sont activés avec de l'EDC et du sulfo-NHS, afin de réagir plus facilement avec une biotine aminée (figure IV-A-4) pour former une amide, très stable (figure IV-A-3 étape 4).



<u>Figure IV-A-4</u> : Formule topologique de la biotine-PEG-NH_2.

La biotine modifiée biotine-PEG-NH_2 avec une terminaison amine (figure IV-A-4) a été choisie puisque la biotine seule (figure IV-A-1a) ne possède pas de groupement amine primaire pouvant réagir. De plus, la présence d'un bras PEG (poly éthylène glycol), permet :

- d'augmenter la solvatation de la biotine en milieux aqueux,
- de servir de bras espaceur entre la biotine et la surface facilitant ainsi l'arrimage du conjugué avidiné pendant la reconnaissance.

En effet, du fait de la présence d'un long bras aliphatique, la biotine devient alors plus mobile à la surface et peut donc se mouvoir pour se lier avec le conjugué.

Ce protocole de fonctionnalisation a tout d'abord été appliqué macroscopiquement sur des diamants polycristallins afin de caractériser le greffage par XPS à différentes étapes du protocole. Nous avons donc travaillé dans une cellule électrochimique.

A.3. L'electrospotting

La technique d'electrospotting a été initialement développée au CREAB pour élaborer des puces à ADN sur des lames d'or par électro-polymérisation du pyrrole *[4]*. Dans ce contexte particulier, elle consiste à utiliser une microcellule électrochimique mobile, un cône de pipette dont l'extrémité est mise en contact direct avec la surface d'or à fonctionnaliser. Ce cône contient une électrode de platine et, une différence de potentiel est appliquée entre les deux électrodes (or et platine) pour l'électro-polymérisation du pyrrole. L'ouverture du cône de la pipette détermine la taille du plot de poly-pyrrole électro-généré.

Dans le cas qui nous occupe, nous avons adapté ce système en introduisant dans la microcellule une seconde électrode de platine, constituant ainsi un système électrochimique à trois électrodes (figure IV-A-5):

- une électrode de travail : le diamant lourdement dopé au bore
- une contre électrode : le platine
- une pseudo-électrode de référence : le platine

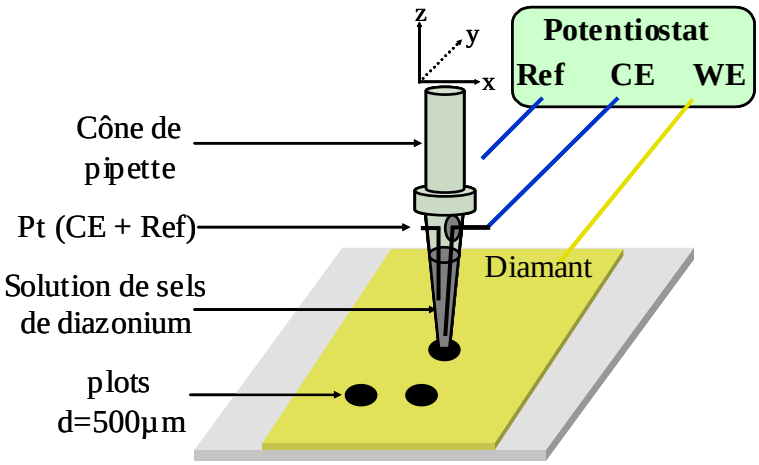


Figure IV-A-5 : Schéma de principe de l'electrospotting.

La deuxième électrode de platine constitue une pseudo-électrode de référence puisqu'elle est directement en contact avec le milieu. Son potentiel d'abandon est d'environ -0,3 V *vs* Ag/AgCl dans des électrolytes contenant des sels de diazonium, mais il varie avec d'autres électrolytes. La mesure de ce potentiel d'abandon est importante pour mesurer les potentiels électrochimiques, et elle est donc systématiquement faite lorsque l'on utilise cette microcellule à trois électrodes.

Après le remplissage du cône par la solution de sels de diazonium, celui-ci est déplacé par des moteurs pas à pas selon les trois directions de l'espace. Il est mis en contact avec la surface de l'échantillon, puis les plots de fonctionnalisation sont générés par réduction électrochimique des sels de diazonium. Il est important de noter que la rugosité de surface du diamant joue un rôle primordial dans la conduite de ce procédé puisque dans le cas d'échantillons trop rugueux, attaqués avec une pate diamantée de 45µm, la solution fuit sous les bords du cône ce qui compromet le contrôle du procédé.

L'ouverture du cône permet d'élaborer des plots de différentes tailles, d'un diamètre de 300µm à 1500µm. Cependant, il est possible d'obtenir des plots d'une dizaine de micromètres de diamètre en utilisant des systèmes de peignes à plusieurs électrodes *[5]*.

En conclusion, grâce à cette approche originale, nous avons démontré pour la première fois la possibilité de localiser le greffage d'entités sur la surface du diamant sans prétraitement de nos échantillons. Mais surtout, la technique d'electrospotting permet de mener des études multi-paramétriques sur un seul échantillon, ce qui est extrêmement intéressant pour la comparaison des résultats sans avoir besoin de tenir compte de la dispersion des caractéristiques physico-chimiques de la surface du diamant (qui serait de fait présente dans le cas de l'utilisation de plusieurs échantillons).

A.4. Greffage et caractérisations des groupements nitrophényles

A.4.a. Le greffage

La première étape de fonctionnalisation constitue l'étape-clef de ce protocole puisqu'elle permet de greffer des primaires d'arrimage sur la surface du diamant mais aussi de localiser le dépôt.

Les courbes suivantes représentent les voltampérogrammes obtenus lors de trois cycles de réduction électrochimique des sels de diazonium sur des échantillons nano et microcristallins (figure IV-A-6) en utilisant les cellules macroscopiques (électrode de travail : diamant, $S_{électrodes}$ = 2mm² ; contre-électrode : platine ; électrode de référence : Ag/AgCl). Les voltampérogrammes obtenus en electrospotting sont équivalents, cependant les courants sont moins importants du fait de la taille réduite des électrodes de travail ($S_{électrodes}$ = 2mm²).

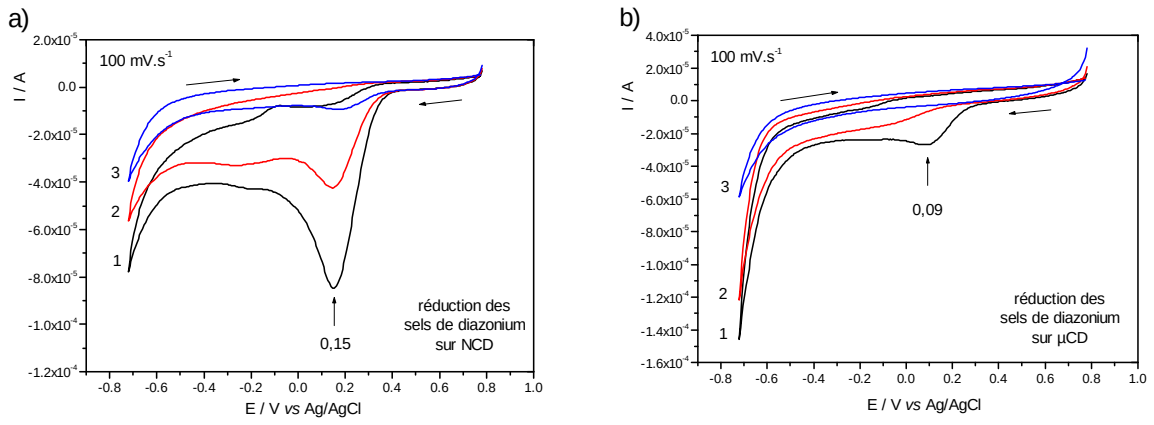


Figure IV-A-6 : Voltampérogrammes indiquant la réduction des sels de diazonium (1mM) sur des électrodes de diamant a) nanocristallin (NCD) et b) microcristallin (µCD). 0,1M NBu_4BF_4 dans ACN, $S_{électrodes}$ = 2mm², 100mV.s^{-1}.

Ces voltampérogrammes présentent, pour les deux types d'échantillons, un pic de réduction irréversible situé à +0,15 et +0,09 V (*vs* Ag/AgCl) lors du premier cycle, pour les échantillons NCD et µCD, respectivement. Puis, aux deuxième et troisième cycles, nous observons une diminution, voire une disparition de ce pic de réduction.

Shin et al. obtiennent sur diamant monocristallin oxydé le même pic de réduction situé vers -0,41 V (*vs* Ag^+/Ag), ce qui représente +0,05 V (*vs* Ag/AgCl) *[6]*. Ce potentiel est équivalent à ceux que nous obtenons sur diamant polycristallin.

Une diminution rapide de l'intensité de ce pic est aussi observée dès le deuxième cycle sur diamant monocristallin. Shin et al. ont ainsi attribué ce pic, en s'appuyant des travaux déjà établis par l'équipe de Savéant sur carbone vitreux et graphite hautement orienté (HOPG) *[7]*, à la réduction de la fonction diazonium. Cette réduction conduit à la libération de diazote (N_2) et à la formation d'un radical situé dans la couche de diffusion de l'électrode donc au voisinage de celle-ci. Ce radical est très réactif : une liaison carbone-carbone se crée à la surface (figure IV-A-7).

Ainsi, lors du second cycle, le signal de réduction diminue du fait de la modification des électrodes par les groupements nitrophényles de surface. Cela mène alors à une baisse de la cinétique de transfert des charges au travers ces groupements.

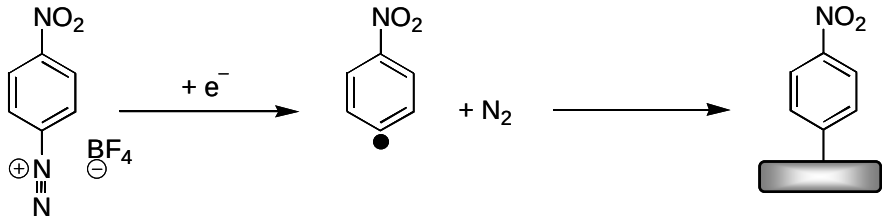


Figure IV-A-7 : Schéma de réduction des sels de diazonium avec dégagement de N_2 et formation d'un radical sur le cycle benzénique réagissant avec la surface.

Nous pouvons notamment observer une différence d'intensité des pics de réduction sur diamant nanocristallin (figure IV-A-6a) et microcristallin (figure IV-A-6b). Cette différence provient probablement de la surface spécifique plus importante de l'échantillon NCD comparée à celle de l'échantillon µCD (figure III-1).

A.4.b. Caractérisation XPS

Afin de vérifier la présence de ces groupements nitrophényles sur la surface des électrodes, nous avons caractérisé les échantillons fonctionnalisés macroscopiquement par XPS. La signature caractéristique XPS du greffage de nitrophényles sur une surface carbonée telle que le diamant provient des niveaux de cœur 1s de l'azote (N1s).

La figure IV-A-8 présente les niveaux d'énergie d'une zone non greffée ainsi que d'une zone greffée avec des nitrophényles.

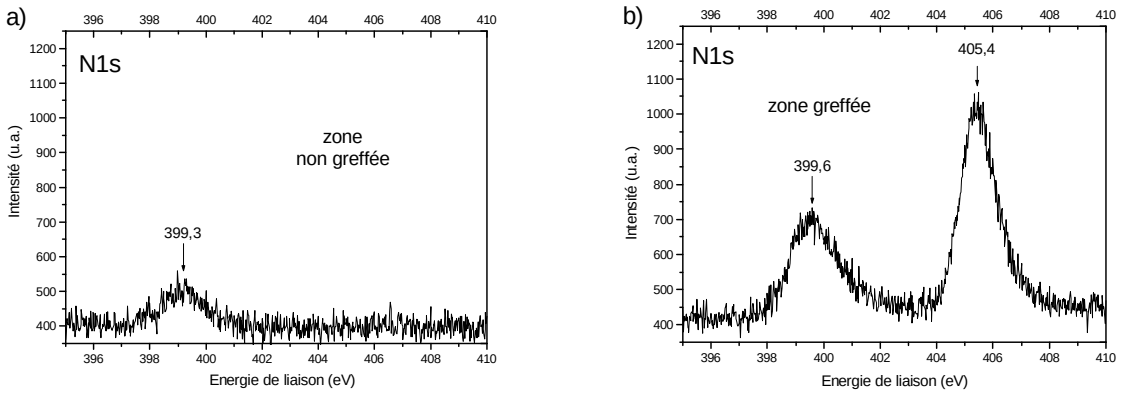


Figure IV-A-8 : Spectres XPS dans la zone N1s sur a) une zone non greffée de diamant et b) une zone de diamant fonctionnalisée par des nitrophényles.

Nous pouvons distinguer sur la zone non greffée une faible composante spectrale à 399,3 eV qui peut être attribuée à du diazote adsorbé sur la surface. En revanche, la zone greffée présente deux composantes bien distinctes situées à 399,6 et 405,4 eV. Cette dernière est sans ambiguïté attribuée aux groupements nitro des nitrophényles *[8]* alors que la première composante peut provenir de différentes origines. Une faible partie peut être attribuée au diazote adsorbé, alors que la grande majorité est attribuée à des fonctions amines (NH_2). En effet, il est possible que lors du greffage, une réduction des fonctions nitro se soit accomplie lors du cyclage à des potentiels réducteurs assez bas (-0,7 V, figure IV-A-6) et à la présence de traces d'eau dans le milieu. De plus, il a été démontré par Lud et al. que les fonctions nitro étaient réduites en fonctions amino lors du rayonnement provenant de l'étude XPS (figure IV-A-9) *[9]*.

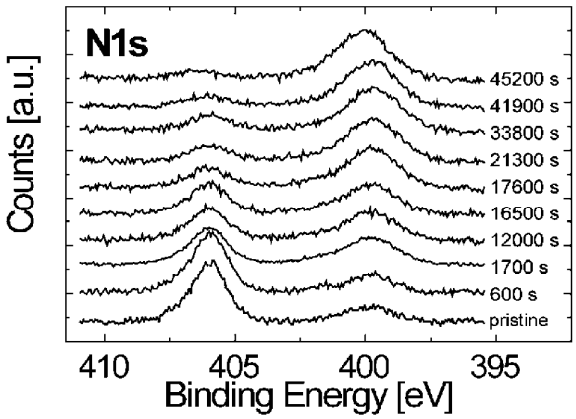


Figure IV-A-9 : Spectres XPS dans la zone N1s de groupements nitrobiphényles immobilisés sur diamant en fonction du temps d'irradiation aux rayons X [9].

Par cette étude, plus les groupements nitrophényles sont soumis au rayonnement X, plus le taux de réduction des fonctions nitro est grand. Cependant le temps nécessaire pour réduire la totalité de ces fonctions lors de cette caractérisation est de 13 heures.

D'autre part, cette première composante spectrale, à 399,6 eV, peut aussi être attribuée en partie à une composante des atomes d'azote des fonctions azo (-C-N=N-C-), qui est normalement située vers 400 eV. Elle proviendrait de l'étape de greffage puisqu'une deuxième voie électrochimique, différente de celle indiquée à la figure IV-A-7, peut s'effectuer. Le clivage entre le nitrophényle et le diazote ne s'effectue pas, mais un radical est stabilisé sur le deuxième azote du diazonium, qui réagit avec la surface (figure IV-A-10).

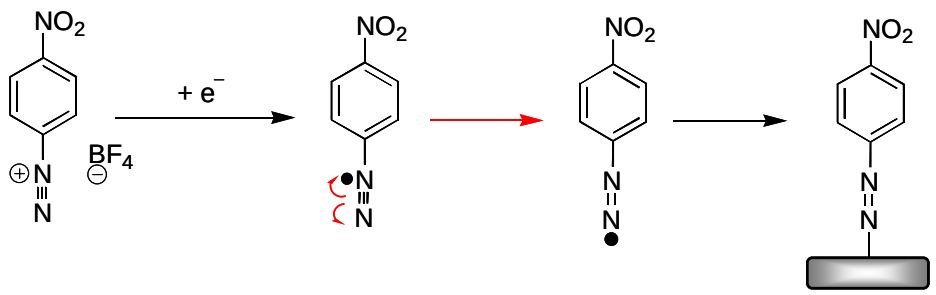


Figure IV-A-10 : Schéma de réduction des sels de diazonium sans dégagement de N_2 mais avec formation d'un radical sur l'azote en bout de chaîne. Ce radical réagit alors avec la surface et forme un pont azo.

Ce phénomène a été observé par le groupe de Bélanger sur des échantillons d'or *[8]*. Une composante a été effectivement observée, lors de la caractérisation XPS, dans la zone N1s vers 400 eV alors que la molécule utilisée était le sel de para-carboxyphényldiazonium ($^{+}{}_{2}$N-Φ-COOH). Ils ont pu ainsi définir que pour 12 cycles benzéniques greffés, 1 cycle était lié à la surface par des ponts azo (-C-N=N-C-), ce qui représente environ 8% *[10]*. Ainsi, il semble que cette réaction est secondaire mais nous verrons que celle-ci peut devenir prépondérante dans d'autres situations.

Enfin, cette composante à 399,6 eV ne peut pas provenir de l'azote de l'électrolyte support ($^{+}$NBu$_4$) puisque la composante spectrale spécifique à celle-ci est située à plus haute énergie, vers 402,6 eV (Annexe C).

A.4.c. Caractérisations structurales (MEB, AFM)

Après avoir vérifié de manière élémentaire la présence de nitrophényles à la surface du diamant, nous avons voulu vérifier la localisation du greffage effectué lors de cette première étape, mais aussi la structure du dépôt.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé ce dernier par microscopie électronique à balayage (MEB). Nous nous sommes appuyés sur les travaux de Wang et al. qui ont observé au MEB, la présence d'un film greffé de manière locale par photochimie *[11]*. Ces observations ont été réalisées malgré l'épaisseur nanométrique des dépôts généralement

établis selon la méthode de photochimie (monocouche). En effet, ils ont pu observer avec une faible tension d'accélération des électrons incidents (2 kV), une légère différence de contraste entre les zones fonctionnalisées, plus sombres, et les zones non fonctionnalisées.

Cette diminution des électrons secondaires émis par le substrat de diamant au travers la couche peut être expliquée par le fait que ceux-ci sont ralentis par la couche désorganisée. Ainsi, le détecteur récolte moins d'électrons et donc l'image est plus sombre.

Nous avons observé les mêmes phénomènes confirmant ainsi la localisation des dépôts. Afin d'éviter de l'endommager, nous avons travaillé avec une faible tension d'accélération (2 kV). La figure suivante (imagerie d'électrons secondaires) montre effectivement un plot plus sombre de 500µm de diamètre, en très bonne correspondance avec le diamètre d'ouverture du cône (figure IV-A-11). Nous avons donc mis en évidence que nous avons bien effectuée le greffage des entités nitrophényles sur la surface mais aussi, que le dépôt est bien localisé.

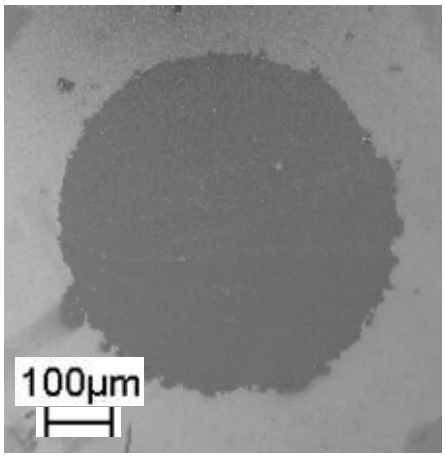


Figure IV-A-11 : Image MEB en électrons secondaires d'un plot de nitrophényles greffés sur diamant NCD.

De plus, nous remarquons un fort contraste qui peut être expliqué par une épaisseur importante de groupements nitrophényles à la surface. En effet, lors du greffage électrochimique de sels de diazonium, les radicaux attaquent tout d'abord la surface puis ils se greffent les uns aux autres formant ainsi un film multicouche (figure IV-A-12) *[8]*.

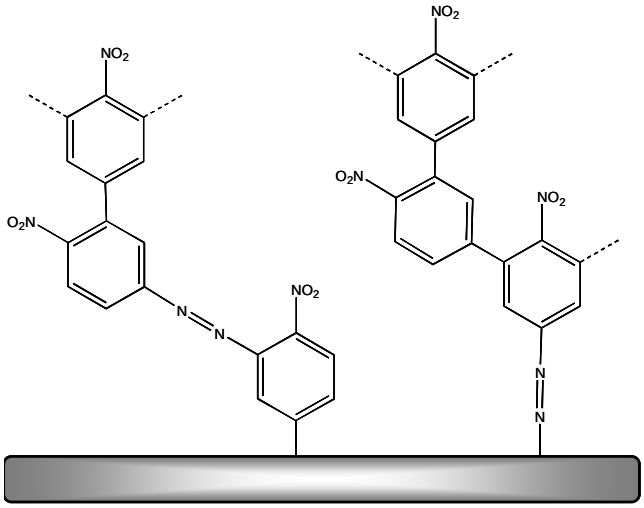


Figure IV-A-12 : Formation d'un film multicouche sur les électrodes par réduction des sels de diazonium.

En focalisant successivement l'image au MEB sur une zone non greffée et sur une zone greffée d'un échantillon nanocristallin, nous pouvons observer des différences au niveau des facettes des grains (figure IV-A-13). Les facettes carrées (100) et triangulaires (111) sont lisses pour la zone non greffée (figure IV-A-13a) alors qu'elles présentent une structuration de surface avec des boursouflures de 30 à 100 nm dans les zones greffées (figure IV-A-13b). Il semble ainsi que le greffage de primaires d'arrimage utilisant les sels de diazonium est indifférent selon les orientations cristallines.

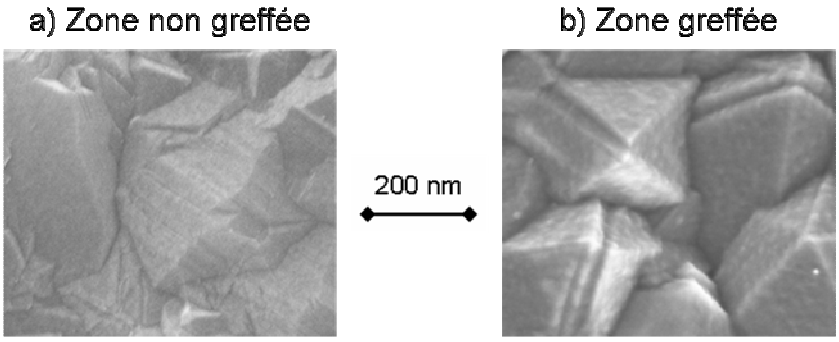


Figure IV-A-13 : Images MEB en électrons secondaires a) d'une zone de diamant nue et b) d'une zone greffée de diamant par des nitrophényles. Nous pouvons distinguer sur l'image b) la présence de boursouflures sur les cristallites.

Nous avons voulu confirmer ces observations obtenues au MEB, par microscopie à force atomique (AFM) en mode « tapping ». La figure IV-A-14 présente les images AFM de zones non greffée (figure IV-A-14b) et greffée (figure IV-A-14c).

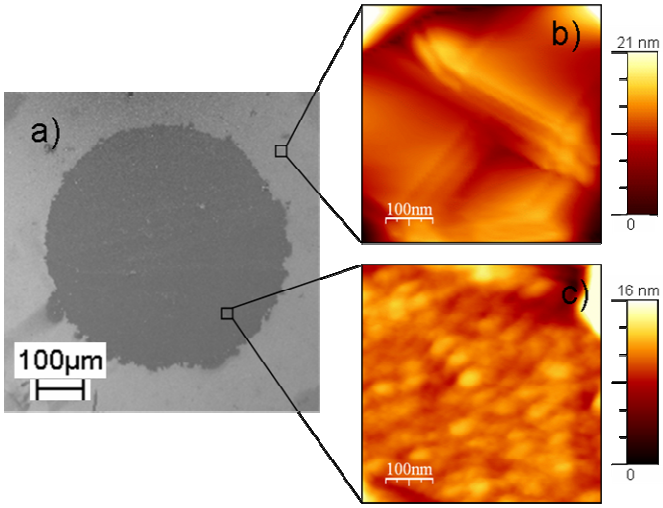


Figure IV-A-14 : a) Image MEB d'un plot de nitrophényles avec des images AFM en mode « tapping » b) d'une zone non greffée et c) d'une zone greffée.

Nous pouvons distinguer sur les zones non greffées, que les facettes des grains de diamant demeurent lisses alors que les zones greffées présentent des boursoufflures, comme les observations préalablement faites au MEB.

Ces boursoufflures ont des diamètres de 30 à 100 nm et des hauteurs de 1 à 3 nm *[12]*. Or, comme les groupements nitrophényles ont une taille d'environ 8 Å *[13]*, ces résultats confirment donc la formation d'un film épais.

Ainsi, nous venons de démontrer que nous avons fonctionnalisé la surface du diamant polycristallin avec des groupements nitrophényles de manière locale par electrospotting. Ces dépôts ont été caractérisés par diverses méthodes confirmant la présence de ces primaires d'arrimage sur la surface, non sous forme d'une monocouche, mais sous la forme d'un film épais.

A.5. Réductions chimique et électrochimique des nitrophényles – arrimage de la biotine

La deuxième étape du procédé consiste à réduire les fonctions nitro présentes à la surface en fonctions amino. Six électrons et six protons (H^+) sont échangés pendant cette réduction, et il faut passer par deux intermédiaires (nitroso NO, hydroxylamine NHOH) pour former un groupement amine (figure IV-A-15).

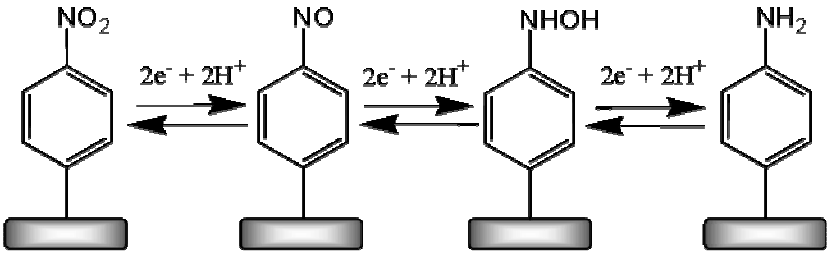


Figure IV-A-15 : Réduction des groupements nitrophényles immobilisés en groupements aminophényles mettant en jeu six électrons et six protons, avec deux intermédiaires réactionnels (nitroso NO, hydroxylamine NHOH).

Deux voies ont été explorées pour étudier et comparer leur efficacité : la réduction électrochimique et la réduction chimique.

Lors d'un stage réalisé au laboratoire du CREAB par Eric Meunier, cette étude de comparaison de ces deux méthodes de réduction s'est effectuée sur la surface d'un autre matériau carboné, le carbone vitreux (GC, Glassy Carbon). L'efficacité de ces voies a été mesurée à l'aide de caractérisations électrochimiques.

Sur diamant, cette étude d'efficacité a aussi été menée au travers d'une caractérisation par spectroscopie XPS à diverses étapes du protocole expérimental du greffage de la biotine.

A.5.a. Le carbone vitreux

Après trois cycles de greffage de nitrophényles en milieu acétonitrile sur la surface de deux échantillons de carbone vitreux, le premier film à été réduit et caractérisé par électrochimie alors que le second a été réduit par voie chimique puis caractérisé par électrochimie.

A.5.a.i La réduction électrochimique

La réduction électrochimique s'effectue en milieux aqueux alcoolique. La figure IV-A-16 montre le voltampérogramme du premier et du second cycle de la réduction.

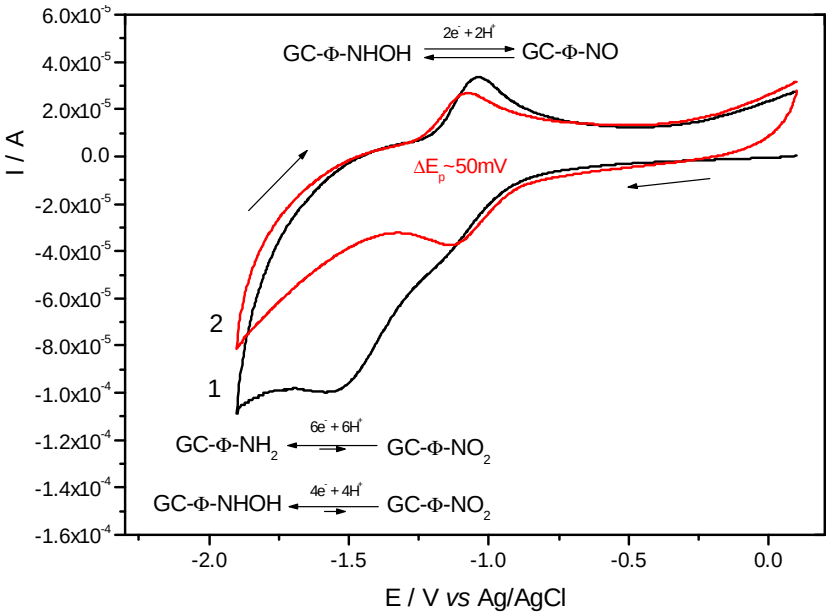


Figure IV-A-16 : Voltampérogramme indiquant la réduction des groupements nitrophényles immobilisés sur GC. 0,1M KCl dans une solution d'eau/éthanol (90/10, vol.), $S_{électrodes}$ = 2mm², 100mV.s^{-1}.

Lors du premier cycle, un large pic de réduction des fonctions nitro est observé à -1,6 V *vs* Ag/AgCl, puis lors des cycles suivants, ce pic disparaît mais un couple redox réversible apparaît. La faible distance inter-pic de ce couple (ΔE_p<60mV) indique que les espèces sont immobilisées sur la surface. Ce dernier correspond au couple (nitroso/hydroxylamine), (GC-Φ-NO / GC-Φ-NHOH) (réaction 1).

$$\text{GC-}\Phi\text{-NO} + 2\,e^- + 2\,H^+ \leftrightarrows \text{GC-}\Phi\text{-NHOH} \qquad \text{réaction 1}$$

La présence de ce couple redox indique que la réduction électrochimique n'est pas totale et donc, le large pic de réduction correspond à la réduction des fonctions nitro en fonctions amino (réaction 2), mais aussi en fonctions hydroxylamino (réaction 3).

$$\text{GC-}\Phi\text{-NO}_2 + 6\,e^- + 6\,H^+ \leftrightarrows \text{GC-}\Phi\text{-NH}_2 + 2\,H_2O \qquad \text{réaction 2}$$

$$\text{GC-}\Phi\text{-NO}_2 + 4\,e^- + 4\,H^+ \leftrightarrows \text{GC-}\Phi\text{-NHOH} + H_2O \qquad \text{réaction 3}$$

Ainsi, le film présente des fonctions de surface aminées avec des fonctions hydroxylamines. Le film peut donc être fonctionnalisé par la biotine.

En revanche, il a été démontré par l'équipe de Downard que dans le cas de films épais, des fonctions nitro trop éloignées de la surface demeurent électro-inactives et non détectées par voltampérométrie (figure IV-A-17) *[14]*. En effet, le transfert électronique à travers le film est ralenti par les premières couches de celui-ci.

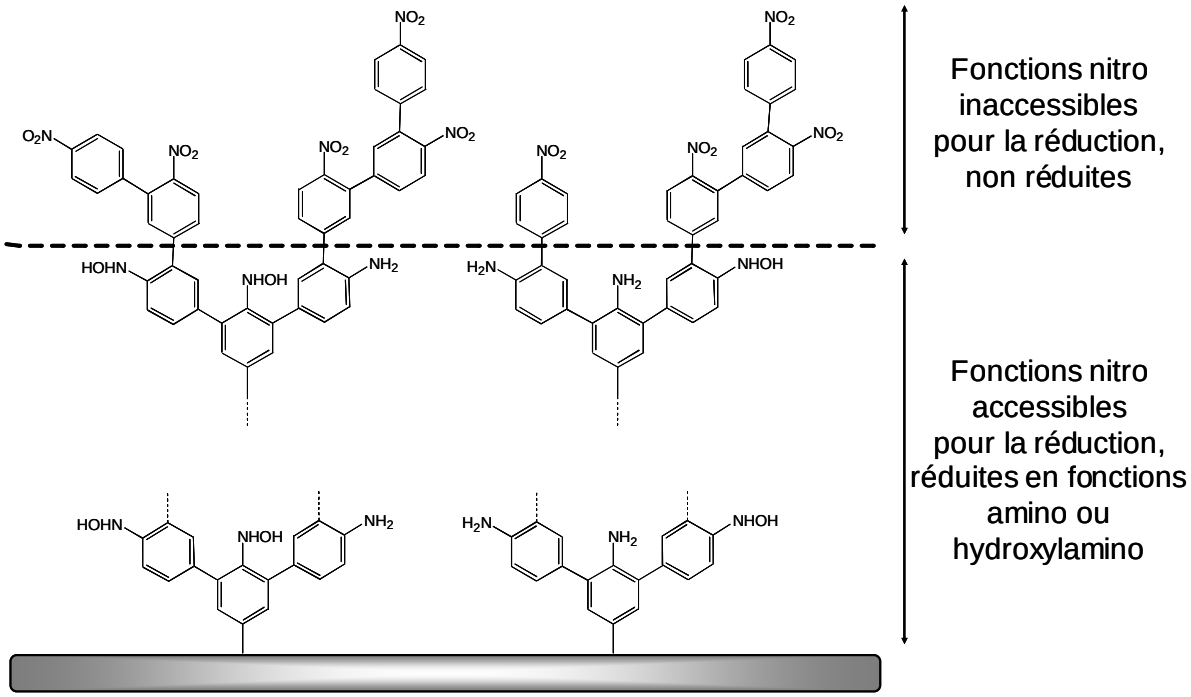


Figure IV-A-17 : Schéma indiquant la réduction des fonctions nitro par électrochimie lorsque celles-ci sont proches de la surface, alors que les fonctions nitro trop éloignées sont inaccessibles à la réduction électrochimique.

Ainsi, dans le cas d'une réduction électrochimique d'un film épais de nitrophényles, les fonctions nitro proches de la surface sont réduites en fonctions amino ou hydroxylamino, alors que celles plus éloignées et même à l'extérieur du film ne sont pas réduites.
Le film n'est donc plus fonctionnalisable par la biotine puisque les fonctions amino ne sont plus accessibles.

Dans notre cas, nous savons que les films que nous générons sont épais (figure IV-1-14c), mais nous ne savons pas si les couches externes du film sont réduites. Les seules méthodes qui permettent de confirmer cela sont l'XPS et la fluorescence.

A.5.a.ii La réduction chimique

Dans les cas étudiés ici, notre objectif consistait à immobiliser la biotine sur la surface des électrodes, donc à ce stade du procédé nous devions obtenir à la surface du film des fonctions amino.

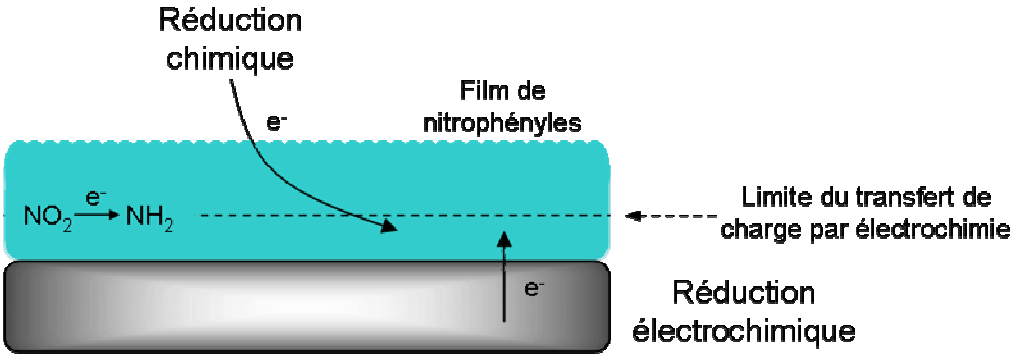


Figure IV-A-18 : Schéma indiquant l'origine des électrons dans le cas d'une réduction chimique (électrons provenant de la solution) et d'une réduction électrochimique (électrons provenant de l'électrode).

La réduction des fonctions nitro situées à l'extérieur de la couche s'est effectuée par voie chimique (figure IV-A-18). Pour cela, ces fonctions ont été réduites par une solution d'hydrazine catalysée par du palladium *[15]*. Cette voie chimique permet non seulement de réduire les fonctions nitro en surface mais aussi celles qui sont situées à l'intérieur du film par diffusion.

Après réduction chimique, nous avons caractérisé par électrochimie le film dans les mêmes conditions que pour la réduction électrochimique d'un film de nitrophényles. La figure IV-A-19 présente les voltampérogrammes d'un tel film.

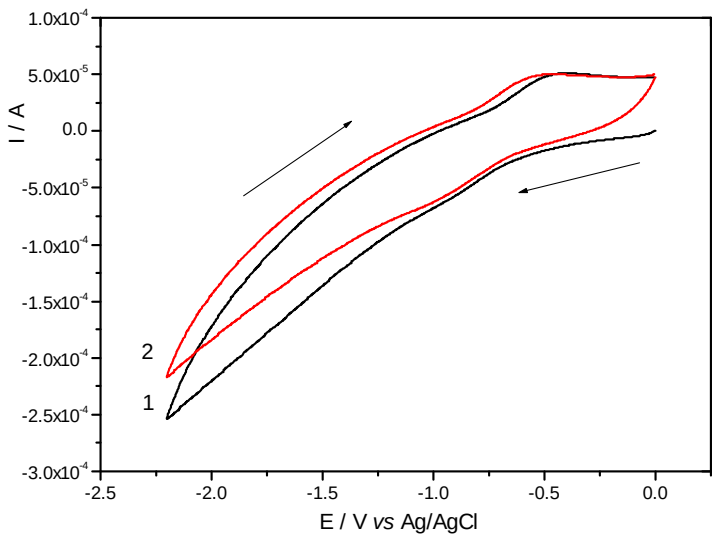


Figure IV-A-19 : Voltampérogramme après réduction chimique des groupements nitrophényles immobilisés sur carbone vitreux. 0,1M KCl dans une solution d'eau/éthanol (90/10, vol.), $S_{électrodes}$ = 2mm², 100mV.s^{-1}.

Nous ne remarquons pas la présence du pic à -1,6 V *vs* Ag/AgCl, caractéristique de la réduction des fonctions nitro, mais la présence d'un faible couple réversible. Ainsi, les fonctions nitro ont été réduites efficacement en fonctions amino, contrairement à la réduction électrochimique. Mais aussi, dans le cas d'un film épais, même les fonctions nitro proche de la surface ont été totalement réduites en fonctions amino, donc celles de surface ont aussi été réduites.

Par cette étude sur carbone vitreux, nous pouvons conclure que la réduction chimique est plus efficace que la réduction électrochimique, surtout lorsque les films sont épais.

Nous allons maintenant vérifier ces résultats sur diamant mais avec la caractérisation XPS, plus sensible.

A.5.b. Le diamant

Nous avons comparé l'efficacité de la réduction chimique avec la réduction électrochimique par spectroscopie XPS. La signature caractéristique XPS de l'efficacité de ces réductions des fonctions nitro provient des niveaux de cœur 1s de l'azote (N1s).
Cette mesure a été effectuée après la réduction, dans le cas de la réduction électrochimique, tandis qu'elle fut mesurée après l'arrimage de la biotine dans le cas de la réduction chimique.

A.5.b.i La réduction électrochimique

La réduction électrochimique des fonctions nitro sur diamant, après trois cycles de greffage avec des sels de diazonium, présente le même voltampérogramme présenté en figure IV-A-16. Ainsi, le film proche de la surface de diamant a été réduit en fonctions amino et hydroxylamino. Cependant, si le film est épais, des fonctions nitro ne sont pas réduites et doivent être observables par spectroscopie XPS.

La figure IV-A-20 montre le spectre XPS de la zone N1s après réduction électrochimique.

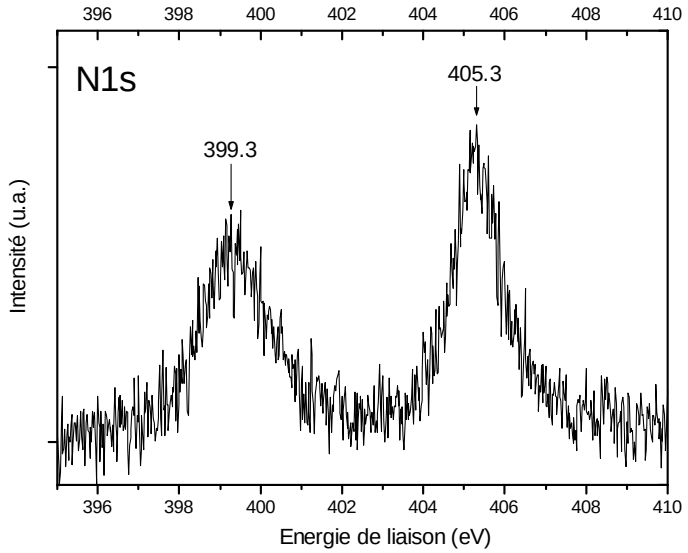


Figure IV-A-20 : Spectre XPS dans la zone N1s après réduction électrochimique des groupements nitrophényles immobilisés sur diamant.

Nous remarquons que ce spectre présente les mêmes composantes que celles indiquées sur la figure IV-A-8b. La composante spectrale à 405,3 eV montre la présence des fonctions nitro qui n'ont pas été oxydées. Nous pouvons notamment distinguer une faible diminution de ce pic et une augmentation de la composante à 399,5 eV. Les rapports d'intensité entre ce dernier et le premier passe de 2 (avant la réduction) à 1,75 (après la réduction électrochimique). Ainsi, nous pouvons conclure, à partir de ces spectres, que quelques fonctions nitro ont été réduites, mais le film est trop épais pour réduire la totalité des fonctions nitro par électrochimie. La réduction électrochimique n'est pas suffisamment efficace.

A.5.b.ii Réduction chimique puis greffage de la biotine

Nous avons réduit chimiquement les fonctions nitro en fonctions amino, puis nous avons suivi le protocole en suivant les étapes 3 et 4 (figure IV-A-3). Nous avons alors caractérisé par XPS ce film dans la zone spectrale N1s (figure IV-A-21).

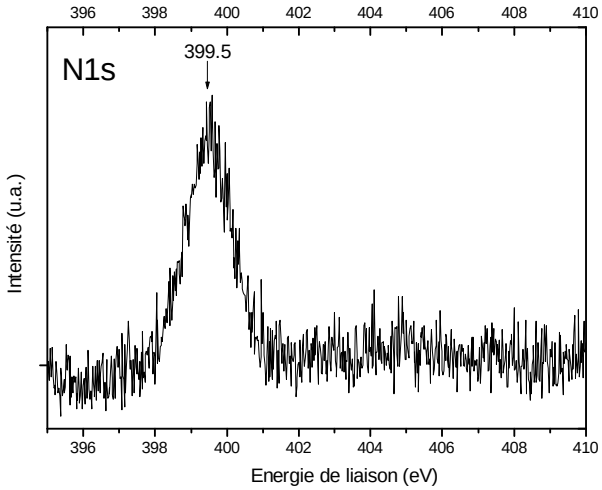


Figure IV-A-21 : Spectre XPS dans la zone N1s après réduction chimique et immobilisation de la biotine sur la surface du diamant (figure IV-A-3).

Nous ne distinguons qu'une seule composante spectrale située à 399,5 eV. La composante XPS à plus haute énergie (405 eV) a totalement disparu, traduisant ainsi l'absence des fonctions nitro. La composante à 399,5 eV est caractéristique des fonctions amino mais aussi des fonctions amides (CONH) présentes dans la biotine *[16]*. La réduction chimique est très efficace et permet le greffage de la biotine après les deux étapes 3 et 4.
En revanche, si le film est trop épais pour une étude XPS (c'est-à-dire une épaisseur supérieure au libre parcours moyen des photoélectrons dans le film, >4nm), caractérisons-nous seulement la partie supérieure du film sans en caractériser la totalité avec son interface ?

En étudiant la zone C1s, nous avons pu observer une composante importante liée au carbone sp^3 du diamant *[12]*. Cela traduit alors que les électrons peuvent traverser l'ensemble du film. Ainsi, le spectre obtenu dans la zone N1s (figure IV-A-21) caractérise donc la totalité du film.

Nous pouvons donc conclure que la réduction chimique permet de réduire toutes les fonctions nitro en fonctions amino sur l'ensemble du film même si ce dernier est épais.

Pour maintenant vérifier que la biotine est greffée sur la surface de diamant, nous avons utilisé la caractérisation par microscopie de fluorescence.

A.6. Caractérisation par microscopie de fluorescence

Pour confirmer la présence de la biotine sur la surface du diamant, nous avons caractérisé l'ensemble des échantillons par microscopie de fluorescence. Nous avons alors mis en contact toute la surface des échantillons avec une solution de streptavidine-R-phycoérythrine (SAPE). La streptavidine possède une forte affinité avec la biotine permettant ainsi la reconnaissance biologique, et la phycoérythrine constitue le fluorophore. Ce fluorophore est préféré aux autres généralement utilisés (fluoresceine, cyanine) puisque l'enveloppe protéique de la phycoérythrine protège le centre actif fluorescent des phénomènes de « quenching » (extinction) provoqués par le substrat conducteur. Ce phénomène a déjà été observé sur or, par exemple.

La figure IV-A-22 présente les images MEB et de fluorescence du même plot élaboré selon la partie IV.A.d..

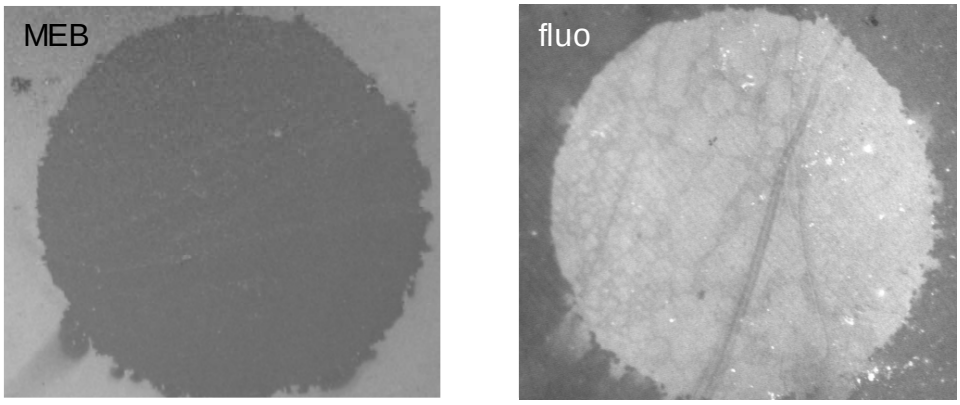


Figure IV-A-22 : Images MEB et de fluorescence du même plot après le greffage des groupements nitrophényles (MEB, figure IV-A-3 étape 1) et après fonctionnalisation par la biotine (figure IV-A-3) révélée par microscopie de fluorescence (fluo).

L'image de fluorescence (figure IV-A-22fluo) confirme la présence de la biotine immobilisée de manière locale sur la surface. Ainsi, toutes les étapes permettant le greffage de la biotine après la réduction chimique ont été effectives. En revanche, aucune fluorescence n'a

été observée dans le cas de la réduction électrochimique confirmant donc les résultats préalablement obtenus par caractérisations XPS et électrochimiques (partie IV.A.e.).

Il est à noter que l'extérieur de l'échantillon constitue un blanc qui a subit toutes les étapes d'immobilisation excepté la première. Notamment, en observant ces deux images, le contour de ce plot caractérisé par deux techniques différentes (MEB et fluorescence), à deux étapes distinctes (1ère et 4e étape) est rigoureusement identique. Ainsi, ces résultats permettent de confirmer que l'étape de réduction des sels de diazonium par electrospotting constitue l'étape-clef du greffage et de la localisation de primaires d'arrimage sur la surface du diamant.

Nous avons tracé à partir de l'image obtenue par microscopie de fluorescence de la figure IV-A-22fluo, une image en trois dimensions avec pour axe z, l'intensité de fluorescence (figure IV-A-23).

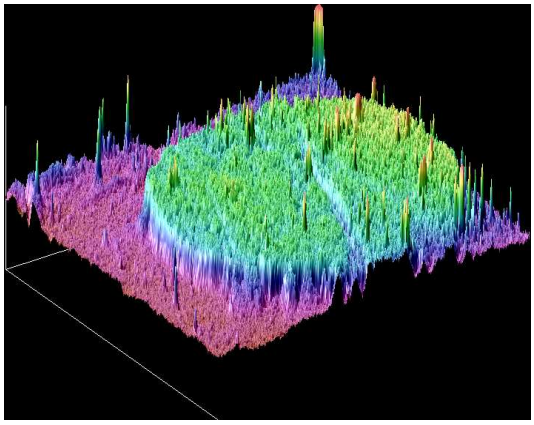


Figure IV-A-23 : Image de fluorescence en trois dimensions de la figure IV-A-22fluo avec pour axe z, l'intensité de fluorescence.

Nous distinguons que la fluorescence reste homogène sur l'ensemble du plot, indiquant alors une bonne répartition macroscopique de la biotine sur la surface. En revanche, la microscopie de fluorescence ne permet pas de quantifier cette répartition puisqu'elle constitue une caractérisation semi-quantitative.

Nous avons alors suivi un plan de travail par comparaison des intensités de fluorescence en fonction de quelques paramètres influant de la première étape de greffage : la concentration en sels de diazonium (0,5, 1 et 2 mM) et le nombre de cycles de greffage (1, 3 et 5 cycles).

L'histogramme de la figure IV-A-24 présente l'intensité de fluorescence relative en fonction de ces deux paramètres. L'intensité de fluorescence relative est la différence entre l'intensité à l'intérieur du plot et celle à l'extérieur (le blanc).

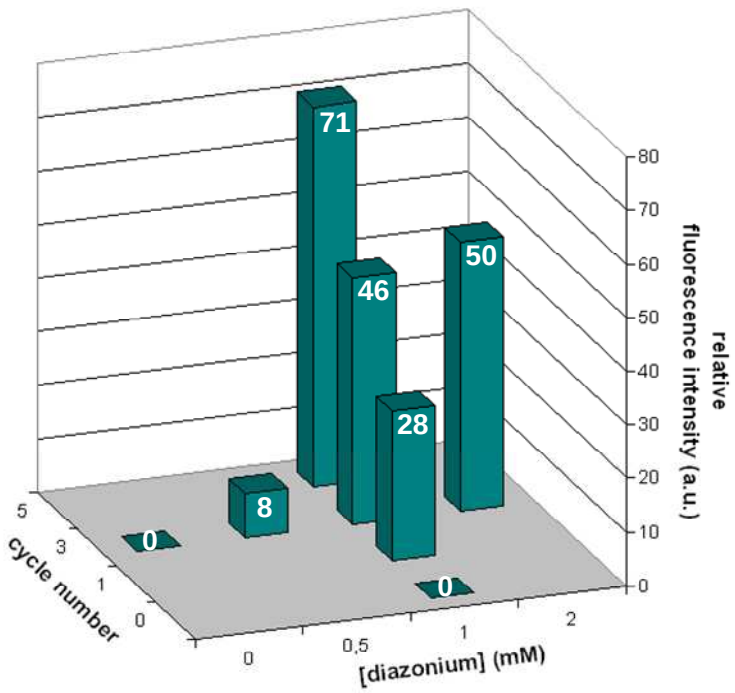


Figure IV-A-24 : Histogramme des intensités relatives de fluorescence en fonction des paramètres du greffage électrochimique des groupements nitrophényles (figure IV-A-3 étape 1) sur la surface du diamant (nombre de cycles et concentration des sels de diazonium).

Le point central de l'étude (1mM, 3 cycles) a été répété deux fois dans le cadre d'une étude de répétabilité. Les résultats de fluorescence obtenus pour ce point sont équivalents et permettent alors de conclure sur la bonne répétabilité des expériences.

Comme l'indique ce graphique, en augmentant la concentration des sels de diazonium et le nombre de cycles, l'intensité relative de fluorescence augmente. Ceci indique que le greffage de la biotine est directement lié à l'efficacité du procédé électrochimique.

L'intensité relative de fluorescence augmente de manière caractéristique lorsque la concentration de sels de diazonium passe de 0,5 à 1 mM. Mais elle semble se stabiliser pour des concentrations plus importantes (2 mM), pour le même nombre de cycles (3 cycles). Cet

accroissement du nombre de biotine en surface peut être dû à une limitation du transfert de matière des sels de diazonium dans le cas de faibles concentrations (0,5 mM). En revanche, pour des fortes concentrations de sels de diazonium (2mM), cette stabilisation de quantité de biotine de surface proviendrait d'une limitation de transfert de charge au travers du film électro-généré lors de la fabrication de celui-ci.

Lorsque le nombre de cycles augmente, nous observons une augmentation de la quantité de biotine de surface. Ce comportement diffère significativement de celui observé lors de l'évolution de la concentration des sels de diazonium. Même si le greffage des primaires d'arrimage avec les sels de diazonium s'effectue majoritairement lors du premier cycle (figure IV-A-6), les cycles suivants permettent de greffer de nouvelles entités sur ce film. Or nous avons vu que ce film présentait des boursouflures en surface (figure IV-A-14c), ainsi, celles-ci augmentent la surface spécifique du matériau. Il est important de noter que la taille caractéristique de ces boursouflures est de l'ordre de 30 à 100 nm. Elle est supérieure à la taille de la SAPE estimée à 15x15 nm². Donc, en augmentant le nombre de cycle, la surface spécifique augmente par la présence de boursouflures et permet un greffage plus important de la biotine en surface d'où une fluorescence plus importante.

Nous avons vu qu'il est possible de moduler la quantité de biotine en surface grâce à la première étape électrochimique. Ainsi, cela pourra permettre d'augmenter la quantité de protéines telle qu'une peroxydase et donc augmenter le signal lors de la réalisation d'un biocapteur.

Cependant, pour réaliser un biocapteur en diamant de première génération pour la détection de produits organiques, le produit de dégradation de la réaction enzymatique diffuse jusqu'à la surface pour échanger des électrons (figure IV-A-25). Mais le film de nitrophényles peut gêner ou atténuer la détection de ce produit de dégradation, du fait de la limitation du transfert de matière (figure IV-A-25a) ou de charge (figure IV-A-25b) au travers de ce film.

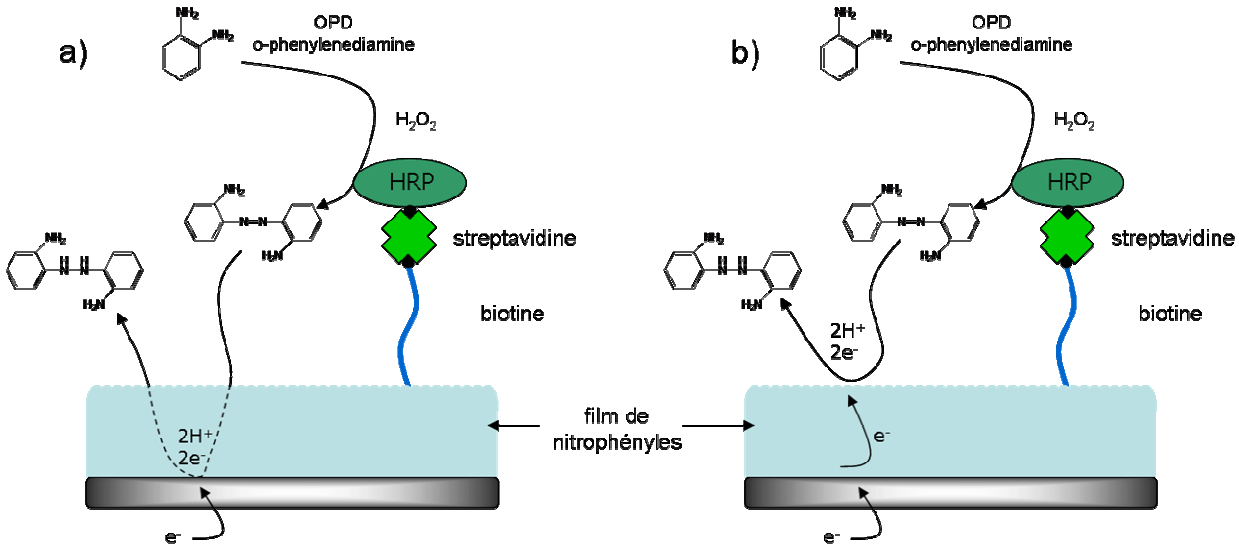


Figure IV-A-25 : Principe d'un biocapteur de première génération (figure I-28) avec l'immobilisation de la HRP sur la surface du diamant. Atténuation du signal de détection du produit de dégradation de la réaction enzymatique du fait a) de la limitation du transfert de matière de ce produit au travers du film ou b) de la limitation du transfert de charge au travers de ce même film.

Ainsi, le film généré lors de l'électrogreffage doit gêner la détection d'un signal électrique, mais surtout ce film masque la surface du diamant. Les propriétés de surface très intéressantes du diamant telles que la biocompatibilité, l'inertie chimique et les propriétés électrochimiques sont masquées.

Il faut donc diminuer l'épaisseur de ce film électro-généré pour obtenir une monocouche voire seulement des zones fonctionnalisées entourées de zones de diamant nu.

Pour résumer ces travaux, nous avons réussi à greffer sur la surface du diamant polycristallin une molécule biologique, la biotine, en quatre étapes et de manière locale grâce à l'electrospotting. Finalement, nous sommes aujourd'hui les seuls à avoir immobilisé de manière locale par électrochimie, une molécule biologique sur la surface du diamant sans prétraitement de la surface.

La première étape de greffage constitue l'étape-clef du procédé puisqu'elle permet d'immobiliser des primaires d'arrimage de manière locale sur la surface. Cependant, nous avons vu que celle-ci ne mène pas au greffage d'une monocouche moléculaire mais à un film épais pouvant gêner la détection électrochimique lors de la réalisation d'un biocapteur. De plus, ce film masque les propriétés très intéressantes de surface du diamant. Il faut alors diminuer l'épaisseur de ce film.

B. Le greffage d'un complexe de ruthénium

B.1. Position du problème

Nous venons de démontrer que, lors de l'utilisation de sels de diazonium pour le greffage d'un primaire sur la surface de diamant, une multicouche de nitrophényles était formée. Ce film masque alors les propriétés de surface très intéressantes du diamant mais aussi il peut gêner ou atténuer la détection du produit de dégradation d'une protéine immobilisée.

Nous devons donc chercher à maîtriser le dépôt de cette couche afin d'en diminuer l'épaisseur et tendre vers la monocouche.

Même si de nombreux travaux existent sur les sels de diazonium, seuls Lud et al. ont obtenu une monocouche compacte, d'une manière reproductible sur diamant *[9]*. Ils utilisent les propriétés réductrices du diamant hydrogéné et, sans électrochimie, une monocouche auto-organisée se dépose à la surface (SAM). Cependant, l'inconvénient principal de cette méthode réside dans le fait que le temps de réaction est d'environ 73 heures. Il est alors difficile de localiser le dépôt par cette méthode.

Notre objectif consistait alors à greffer de manière rapide, par réduction électrochimique de sels de diazonium, une couche de faible épaisseur voire une monocouche. Il était alors important de maîtriser ce dépôt électrochimique.

Cette étude nécessitait un marqueur afin de caractériser le dépôt par différentes méthodes : une caractérisation électrochimique et une caractérisation élémentaire, la spectroscopie XPS. Le marqueur utilisé dans cette étude est l'ion ruthénium (Ru^{2+}) complexé par trois bipyridines dont l'une est fonctionnalisée par un sel de diazonium (figure IV-B-1).

Ce complexe est synthétisé au laboratoire du CEA à Grenoble par le procédé décrit par Jousselme et al. en plusieurs étapes de chimie organique *[17]*.

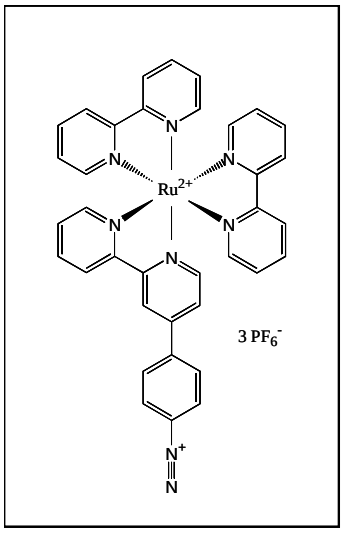


Figure IV-B-1 : Formule topologique du sel de p-(tris(bipyridine) Ru^{2+})benzène diazonium.

Nous remarquons que ce complexe peut fournir une réponse électrochimique par le biais des différents couples redox que possède ce complexe (Ru^{3+}/Ru^{2+}, Ru^{2+}/Ru^{+}, Ru^{+}/Ru^{0}). Notamment, comme le ruthénium est un atome lourd (Z=44) et qu'il possède une section efficace importante (7,39 pour $Ru3d_{5/2}$ avec AlK_{α} *[18]*), il est alors possible de le détecter par spectroscopie XPS à condition qu'il soit présent de manière suffisante.

Cependant, nous pouvons noter que ce complexe est majoritairement composé d'atomes de carbone (figure IV-B-1). Comme le diamant est un matériau carboné, l'étude XPS directe du complexe de ruthénium sur diamant est difficile. En effet, la zone spectrale C1s des électrons de cœur du diamant est située à des énergies entre 283 eV et 288 eV avec différentes composantes provenant du diamant massif et des groupements oxydés ou hydrogénés de surface tels que *[19]*:

- les carbones hybridés sp^3 du diamant, les CH, vers 283,9 eV
- les CH_x (x = 2 ou 3) à +0,5 eV,
- les hydroxyles (C-OH) à +1,2 eV,
- les ponts éther (C-O-C) à +1,9 eV,
- les carbonyles (C=O) à +3,2 eV et
- les carboxyles (COOH) à +4 eV.

Or, les niveaux de cœur des carbones des molécules greffées possèdent des énergies similaires à celles des fonctions oxydées. Ainsi, il y a superposition des composantes spectrales.

Afin de séparer les composantes liées à la molécule de celles du diamant, nous avons tout d'abord greffé le complexe de ruthénium sur un matériau métallique non carboné, en l'occurrence l'or. En effet, les sels de diazonium peuvent se greffer sur tout matériau métallique *[20]*. Puis, grâce à l'étude XPS du complexe immobilisé sur or, nous avons utilisé ces résultats et les avons transposés sur diamant. Il est important de noter que sans cette étude sur un autre matériau que le diamant, une étude XPS fine du complexe greffé n'aurait pu être possible.

Notamment, il a été démontré dans la littérature que la surface du diamant hydrogénée, sortie de bâti de croissance, était très réactive à l'air *[19]*. Celle-ci s'oxyde de manière continue jusqu'à un équilibre après une semaine. Ainsi, pour simplifier cette étude XPS, les échantillons hydrogénés ont été stockés et conservés sous argon pour éviter cette oxydation naturelle. Les échantillons ont été seulement quatre heures de contact avec l'air ambiant.

De plus, pour éviter de dépendre de la qualité, du niveau de dopage et de l'état d'oxydation des échantillons de diamant, nous avons greffé et caractérisé électrochimiquement les dépôts par electrospotting sur un même échantillon. Pour caractériser les plots par spectroscopie XPS, leur diamètre était de 1300µm (500µm dans la partie IV.A.). L'échantillon utilisé pour cette étude était un échantillon microcristallin lourdement dopé au bore (B-µCD), de type D (200nm rms, voir tableau II-7) pour éviter les fuites de solution lors de l'electrospotting.

Dans un premier temps, notre objectif consistait à greffer de manière suffisante le complexe de ruthénium sur or et sur diamant afin d'obtenir un signal électrochimique et XPS du ruthénium.

Puis, afin de contrôler le dépôt électrochimique, nous avons utilisé une méthode pulsée, la chronopotentiométrie (CP) qui consiste à imposer un courant et à suivre le potentiel en fonction du temps. Par cette méthode, il est possible de maîtriser la charge utilisée lors du dépôt par deux paramètres :

- l'intensité imposée, elle influe sur la cinétique du dépôt,
- le temps de dépôt, il permet de contrôler l'épaisseur des films via la charge.

Enfin, avec les résultats obtenus lors des caractérisations électrochimique et de spectroscopie XPS du complexe immobilisé sur la surface du diamant, nous avons cherché à corréler les résultats de la caractérisation élémentaire avec ceux de la caractérisation électrochimique.

B.2. Greffage et caractérisation électrochimiques sur or et diamant

Dans un premier temps, afin que le ruthénium puisse être observé par spectroscopie XPS sur or et sur diamant, nous voulions greffer le complexe avec des quantités suffisantes. Nous l'avons donc greffé par voltampérométrie cyclique en effectuant plusieurs cycles à 100mV.s^{-1}, en l'occurrence 5 cycles dans cette étude avec une concentration en sels de diazonium de 1mM.

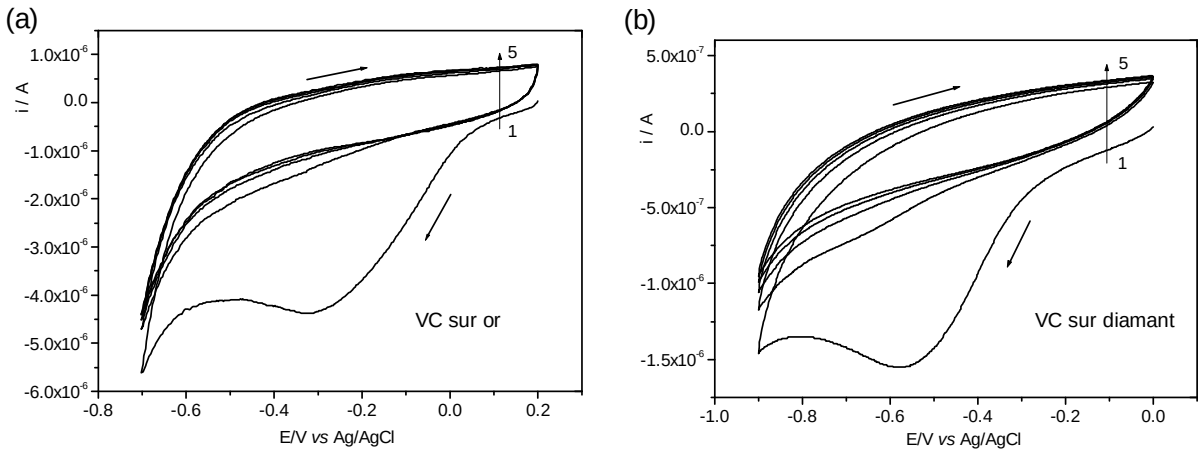


Figure IV-B-2 : Voltampérogrammes indiquant la réduction des sels de diazonium (1mM) sur des électrodes a) d'or et b) de diamant microcristallin. 0,1M NBu_4BF_4 dans ACN, $S_{électrodes}$ = 1,3 mm², 100mV.s^{-1}.

Les voltampérogrammes enregistrés lors du greffage sur or (figure IV-B-2a) et sur diamant (figure IV-B-2b) présentent lors du premier cycle un large pic irréversible de réduction situé vers -0,3 et -0,58 V *vs* Ag/AgCl. Jousselme et al. obtiennent sur carbone vitreux, avec la même molécule, le même pic de réduction situé vers -1,1 V (*vs* Ag^+/Ag), ce qui représente -0,64 V (*vs* Ag/AgCl) *[17]*. Soit un potentiel équivalent sur matériaux carbonés. Puis, une disparition de ce pic est observée lors des cycles suivants. L'allure de ces voltampérogrammes ressemble finalement à ceux obtenus lors du greffage des nitrophényles sur la surface du diamant (figure IV-A-6). Ce pic est donc associé à la réduction des fonctions diazonium générant un radical sur le cycle qui réagit alors avec la surface (figure IV-B-3).

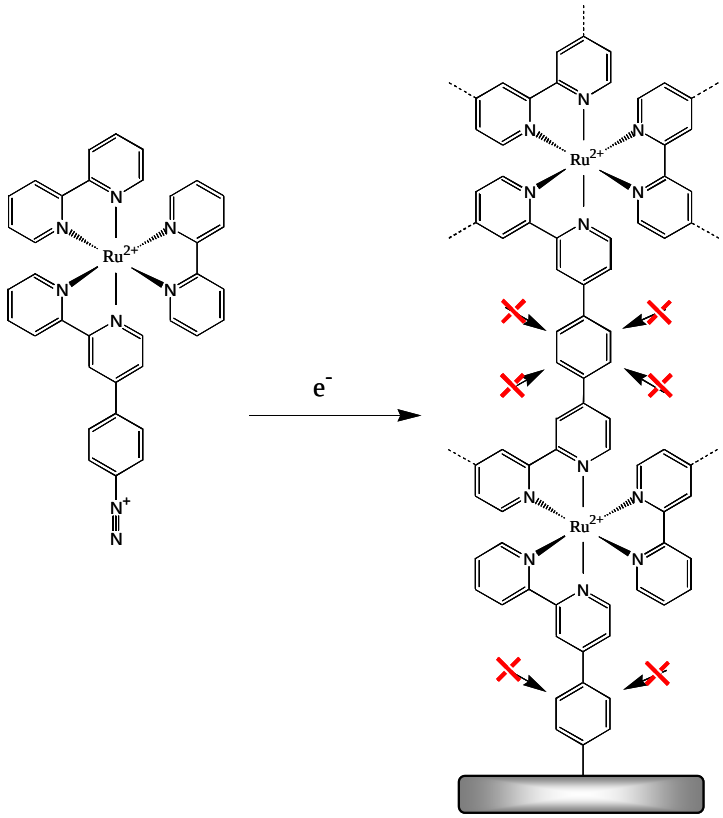


Figure IV-B-3 : Principe de formation d'un film multicouche de complexe de ruthénium sur surface, par réduction électrochimique de sels de diazonium.

En revanche, le potentiel de réduction de ce sel de diazonium sur diamant est inférieur de 600 mV par rapport à celui lors de l'utilisation du sel de *p*-nitrobenzène diazonium ($^{+}{}_{2}$N-Φ-NO_2) (figure IV-A-6). Cette différence de potentiel peut être expliquée par l'influence du groupement situé en position para de la fonction diazonium.

Comme pour les sels de *p*-nitrobenzène diazonium, au fur et à mesure des cycles, nous observons un abaissement significatif de ces pics. Un tel comportement électrochimique indique la formation d'une multicouche organique à la surface des électrodes (figure IV-B-3). La réduction des espèces n'est plus possible du fait de la limitation du transfert électronique au travers du film généré à la surface. La formation d'une multicouche ne peut être générée que si de nouvelles entités peuvent se greffer sur d'autres déjà immobilisées. Dans ce cas, à cause de la gêne stérique engendrée par les bipyridines, ces nouveaux complexes ne peuvent se greffer que sur les carbones des bipyridines et non sur les cycles benzéniques (figure IV-B-3).

Il est important de noter que, comme pour les sels de *p*-nitrophényl diazonium, un second schéma réactionnel ne libérant pas de diazote peut s'effectuer (figure IV-A-10) : les molécules se greffent via des ponts azo (figure IV-B-4). L'origine de ce phénomène est difficile à expliquer, mais il peut être observé par spectroscopie XPS.

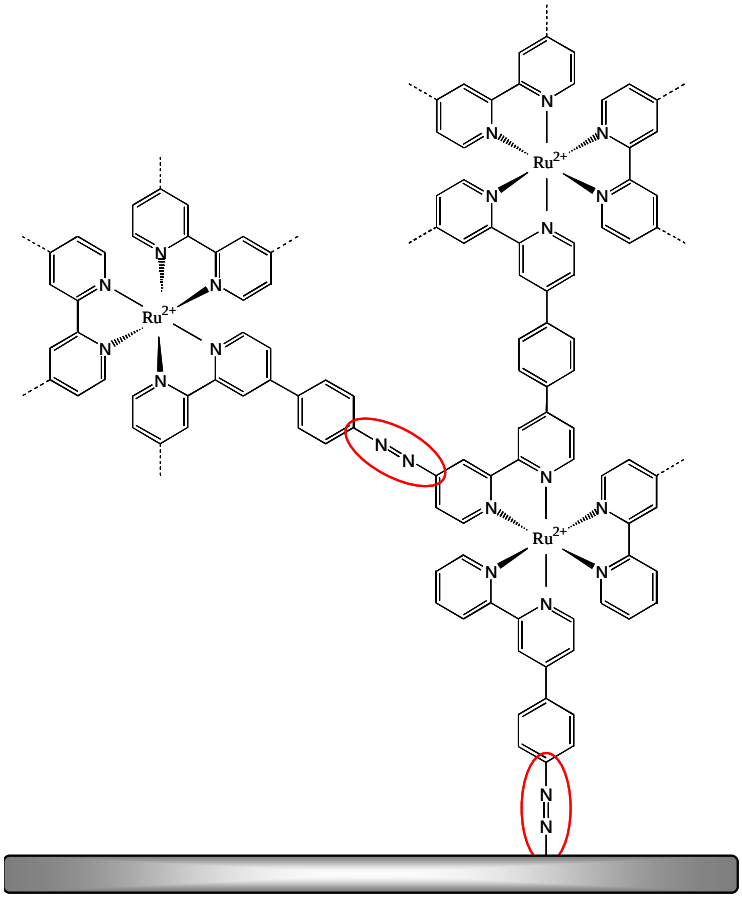


Figure IV-B-4 : Complexes de ruthénium liés par des ponts azo (figure IV-A-10).

Après la synthèse de ces films sur les surfaces d'or et de diamant, les échantillons ont été nettoyés et rincés abondamment à l'acétonitrile. Puis, les plots élaborés ont été caractérisés par voltampérométrie cyclique avec une solution ne contenant pas de ruthénium afin de vérifier l'immobilisation du complexe sur les électrodes.

Lors d'une expérience préliminaire sur la réponse électrochimique du ruthénium greffé, nous désirions obtenir la réponse de tous les couples redox (figure IV-B-5).

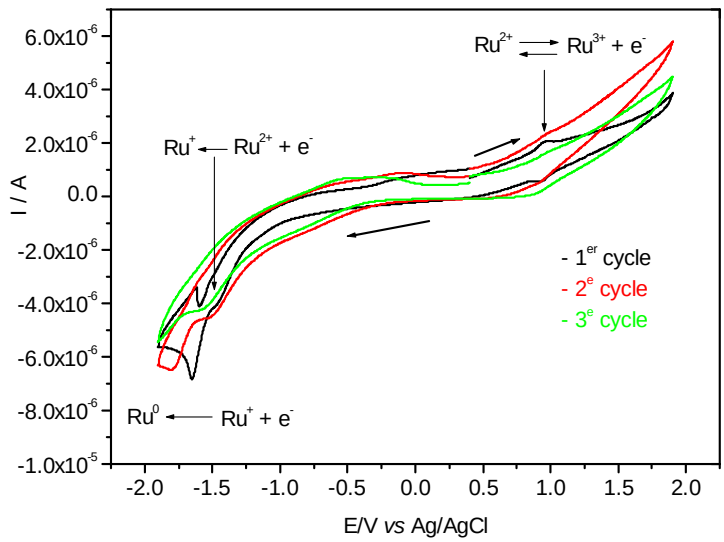


Figure IV-B-5 : Voltampérogrammes de la réponse du complexe de ruthénium immobilisé sur la surface du diamant : disparition de la réponse du couple Ru^{3+}/Ru^{2+} dès le second cycle après passage dans les bas potentiels. 0,1M NBu_4BF_4 dans ACN, $S_{électrodes}$ = 1,3 mm², 100mV.s^{-1}.

Lors du premier cycle, le couple Ru^{3+}/Ru^{2+} répond de manière réversible vers 0,9 V *vs* Ag/AgCl avec un ΔE_p=40mV. Puis, vers les bas potentiels cathodiques, nous pouvons distinguer un pic situé vers -1,65 V *vs* Ag/AgCl avec un épaulement vers -1,5 V *vs* Ag/AgCl. Ces positions correspondent à la réduction des autres couples redox du ruthénium *[17]*.

Lors des deuxième et troisième cycles, le couple Ru^{3+}/Ru^{2+} a totalement disparu tandis que les pics à bas potentiels diminuent d'intensité.

Nous en avons conclu que lorsque nous travaillons à des potentiels trop bas, il était possible que le complexe se démétallise.

Dans la suite de cette étude, nous nous sommes alors seulement focalisés sur le couple redox Ru^{3+}/Ru^{2+} pour étudier de manière quantitative le greffage sans endommager le film.

La figure IV-B-6 présente le voltampérogramme du complexe de ruthénium immobilisé sur la surface du diamant. La réponse électrochimique de ce même complexe immobilisé sur or est similaire. Nous pouvons distinguer le couple redox Ru^{3+}/Ru^{2+} quasi-réversible vers 0,9V *vs* Ag/AgCl. Cependant, nous distinguons un comportement très capacitif des électrodes et, la distance inter pic est de 70 mV. Cette distance inter pic est en désaccord avec la théorie pour des systèmes « outer-sphere » dont le ΔE_p doit tendre vers 0V. Une telle différence est liée aux transferts électronique et ionique au travers du film épais généré à la surface.

En revanche, le comportement capacitif est sans doute lié à une diminution de la réactivité de la surface du diamant. Celle-ci sera étudiée ultérieurement.

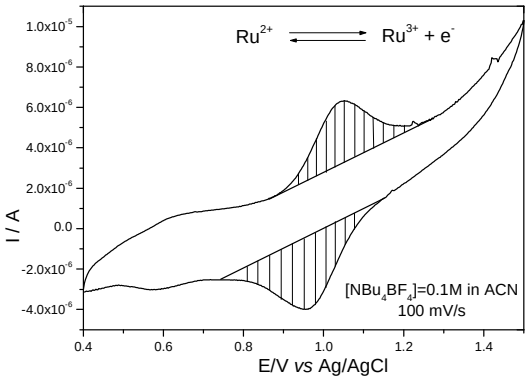


Figure IV-B-6 : Voltampérogramme de la réponse du complexe de ruthénium immobilisé sur la surface du diamant, dans la gamme de potentiels du couple Ru^{3+}/Ru^{2+}. 0,1M NBu_4BF_4 dans ACN, $S_{électrodes}$ = 1,3 mm², 100mV.s^{-1}.

L'électrochimie étant une caractérisation quantitative, nous avons pu mesurer le nombre d'atomes de ruthénium électro-actifs dans le film par intégration des pics d'oxydation ou de réduction du couple Ru^{3+}/Ru^{2+}. Les résultats sont équivalents dans les deux cas, et la concentration de complexe immobilisé sur la surface est de 5,5 nmol.cm^{-2}. Or, en considérant le complexe comme une sphère de 5 Å de rayon, la concentration maximale pour une monocouche compacte est de 0,8 nmol.cm^{-2}. Ainsi, le résultat obtenu correspond bien à une structure multicouche. Ceci est en totale cohérence avec la structure préalablement démontrée avec les nitrophényles.

Après cette caractérisation électrochimique prouvant le greffage des complexes sur les électrodes, nous avons caractérisé par XPS ces mêmes films pour une étude plus fine.

Cependant, afin d'identifier toutes les composantes spectrales liées au film généré à la surface, l'étude de caractérisation XPS a d'abord été portée sur les films greffés sur or.

B.3. Etude XPS du complexe immobilisé sur or

La caractérisation XPS du film généré à la surface de l'or est basée sur la déconvolution des pics associés à l'azote, au ruthénium et au carbone. L'étude de ces éléments nous permet d'extraire des informations sur le greffage (azote/carbone), la présence de molécules greffées (ruthénium) et la structure du film (azote/carbone). La figure IV-B-7 présente le spectre XPS global du film greffé sur or. Nous pouvons noter la présence des doublets Au4f (vers 90 eV) et Au4d (vers 340 eV) indiquant alors que le film déposé n'est sans doute pas suffisamment épais pour masquer le substrat ou qu'il existe des zones où l'or n'est pas recouvert. Or, d'après les observations établies (AFM et MEB) lors de l'étude du greffage des nitrophényles sur la surface, nous avions pu conclure que le film n'était pas homogène (présence de boursouflures, figure IV-A-14c), mais que celui-ci était déposé sur toute la surface (figure IV-A-13b). Ainsi, il semblerait que l'épaisseur apparente de ce film ne soit pas suffisante pour masquer le substrat.

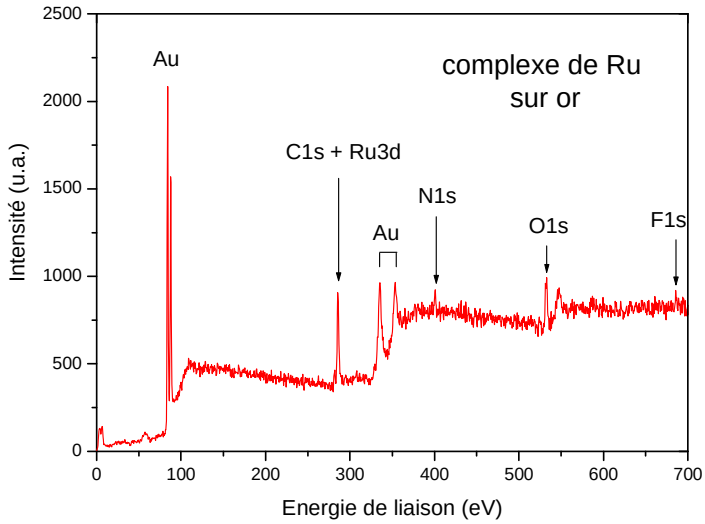


Figure IV-B-7 : Spectre XPS global de la surface de l'or fonctionnalisée par le complexe de ruthénium.

Sur ce spectre XPS global, nous distinguons notamment des pics associés aux niveaux de cœur 1s du carbone (vers 285 eV), de l'azote (vers 400 eV), de l'oxygène (vers 530 eV) et très faiblement du fluor (vers 685 eV). Le fluor est présent ici par le biais des ions BF_4^- ou PF_6^- sous forme de traces après électrochimie. Par ailleurs, ces ions peuvent aussi permettre

de neutraliser électriquement le film puisque le complexe est chargé par deux charges positives (Ru^{2+}). Cependant, les zones spectrales du fluor ainsi que celle de l'oxygène n'ont pas été étudiées puisqu'elles ne donnent d'informations ni sur la structure ni sur le greffage.
En revanche, il nous importait d'étudier le marqueur de la molécule, le ruthénium. Les électrons du niveau de cœur 3d de ce dernier possèdent un doublet d'énergie vers 281,5 eV et 285.7 eV *[21]*. Comme les niveaux d'énergies de cœur du carbone sont situés vers 285 eV, une étude fine de la zone spectrale autour du C1s et du Ru3d a été réalisée. Cette étude permet alors d'extraire des informations sur la présence du complexe mais aussi de calculer les rapports des aires sous les composantes spectrales pour proposer finalement une structure du film.
Un seul pic caractéristique des azotes des bipyridines est attendu dans la zone spectrale N1s.

Dans la suite de cette étude, il est important de noter que les spectres bruts sont représentés mais les déconvolutions ont été réalisées sur les spectres lissés.

Les figures IV-B-8a et IV-B-8b présentent respectivement les niveaux N1s et C1s-Ru3d du complexe de Ru immobilisé sur or. Selon la figure IV-B-3, nous devrions observer au niveau du N1s un pic avec une seule composante spectrale située à 400,6 eV indiquant la présence d'azotes des bipyridines liés à l'ion Ru^{2+} *[21]*. Néanmoins, nous pouvons observer sur la figure IV-B-8a un spectre déconvolué par trois composantes dont une principale située à 400,6 eV comme attendu.

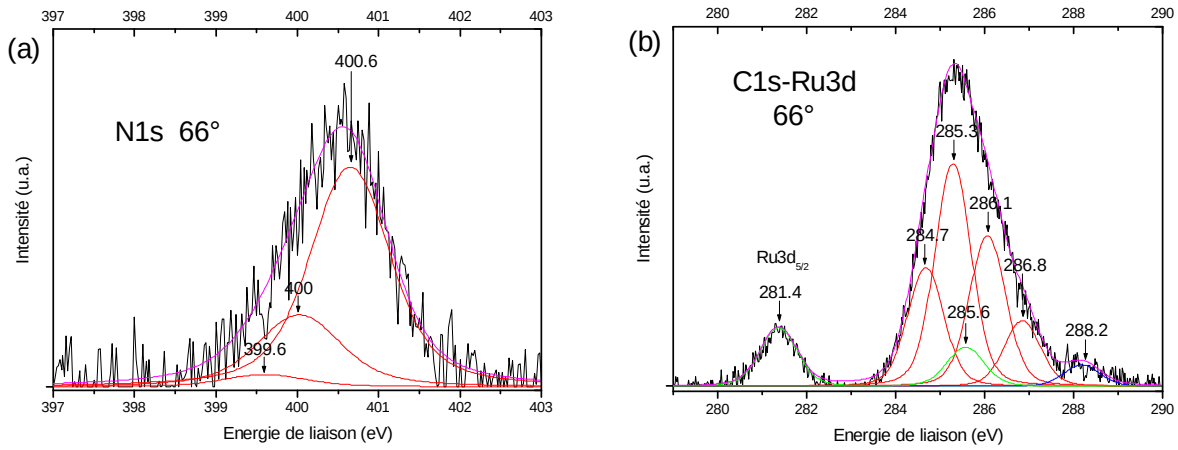


Figure IV-B-8 : Spectres XPS de la surface de l'or fonctionnalisée par le complexe de Ru dans les zones a) N1s et b) C1s-Ru3d.

Afin de ne pas attribuer l'une de ces trois composantes aux azotes de l'électrolyte support ($^{+}NBu_4$, tetrabutylammonium), nous avons mis en évidence lors d'une expérience préliminaire (Annexe C), que les azotes de cet ammonium possèdent des niveaux d'énergie plus hauts. En effet, ceux-ci sont situés vers 402,6 eV. Or, nous pouvons distinguer sur la figure IV-B-8a que ces niveaux d'énergie n'ont pas été observés indiquant donc que la surface a bien été rincée.

La première composante située à 399,6 eV est très faible et est attribuée aux azotes des bipyridines qui ne sont pas complexées avec du ruthénium *[16]*. Or, les complexes de trisbipyridine de ruthénium sont très stables. Il semblerait donc qu'il y ait, malgré cette stabilité, un défaut du complexe avec un phénomène de démétallisation. Celui-ci a d'ailleurs déjà été observé lors de l'étude des couples redox Ru^{2+}/Ru^{+}, Ru^{+}/Ru^{0} (figure IV-B-5). Ainsi, cette démétallisation est possible et peut être obtenue partiellement au cours de l'électrogreffage.

La seconde composante à 400 eV est attribuée dans la littérature aux azotes constituant des ponts azo (figure IV-B-4) *[8]*. Cette dernière est présente en grande quantité vis-à-vis de la composante principale, environ trois fois moins importante. Or, dans le cas de la formation de ponts azo, deux atomes d'azote sont mis en jeu alors qu'il y a six atomes d'azotes dans le complexe, soit un rapport 1/3. Ainsi, il semble que la majorité des complexes sont immobilisés via des ponts azo (-C-N=N-C-).

Finalement, les composantes situées à 399,6 et 400,6 eV renseignent sur la structure du film alors que la composante à 400 eV informe sur les liens entre les molécules. Cependant, le spectre obtenu dans la zone N1s n'est pas suffisamment résolu afin de permettre une quantification fine. Notamment, il est difficile de calculer les rapports des bipyridines non complexées vis-à-vis des molécules de ruthénium greffées. Ainsi, en étudiant la zone spectrale C1s-Ru3d qui est mieux définie, nous aurons plus d'informations quant à la formation et à la structure du film.

Le spectre de la zone C1s-Ru3d présente deux pics bien séparés centrés à 281,4 et 285,3 eV (figure IV-B-8b). Le premier est associé selon la littérature *[21]* aux électrons du niveau de cœur $Ru3d_{5/2}$ alors que le second, plus important, correspond aux électrons des niveaux C1s. Ce second pic C1s contient également une composante du ruthénium ($Ru3d_{3/2}$), puisque les niveaux 3d du ruthénium présentent un doublet ($3d_{5/2}$ et $3d_{3/2}$). Pour déconvoluer

ce pic avec les composantes des carbones (C1s) et du ruthénium ($Ru3d_{3/2}$), nous avons tout d'abord fixé cette dernière. Selon Liu et al., les contributions du doublet Ru3d sont séparées de 4,2 eV : la composante $Ru3d_{3/2}$ à été fixée à 285,6 eV *[21]*. Son intensité a été également fixée puisque le rapport des intensités des composantes $3d_{3/2}$ par rapport à $3d_{5/2}$ est égal à 2/3. Les composantes Ru3d étant fixées, il est alors possible de déconvoluer le pic principal avec des contributions provenant seulement du niveau C1s. Afin de connaître le nombre de celles-ci à ajouter pour déconvoluer correctement ce pic principal, il faut en premier lieu différencier les carbones de la molécule en fonction des liaisons auxquelles ils contribuent. En effet, l'énergie de liaison des électrons de cœur du niveau 1s du carbone dépend de la liaison chimique à laquelle ils participent. Ainsi, le complexe de ruthénium peut se décomposer en deux entités distinctes possédant des atomes de carbone dont les énergies des électrons des niveaux de cœur sont différentes (figure IV-B-9) :

- une entité α, une bipyridine fonctionnalisée avec un cycle benzénique,
- deux entités β, des bipyridines.

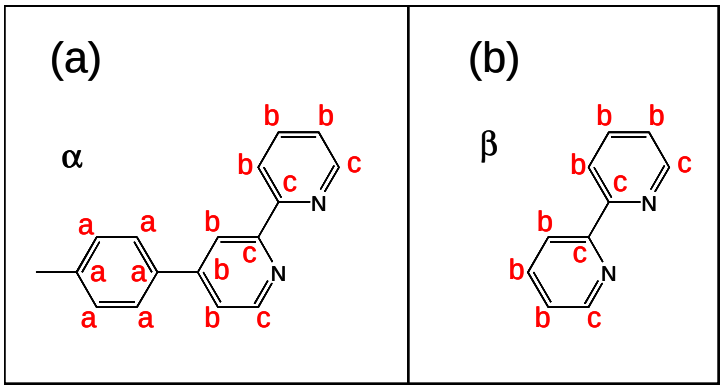


*Figure IV-B-9 : Décomposition du complexe de Ru en deux entités a) α et b) β, avec une différenciation des atomes de carbone en trois groupes **a**, **b** et **c**.*

Finalement, chaque complexe contient 36 atomes de carbone qui peuvent être séparés en 3 groupes ***a***, ***b*** et ***c*** à des énergies différentes *[16]* :

- le groupe des carbones ***a*** (possédant une énergie de 284,7 eV) est constitué des 6 carbones du cycle benzénique de l'entité α, noté C_a ;
- le groupe des carbones ***b*** (possédant une énergie de 285,4 eV) est constitué des 18 carbones situés en opposition des atomes d'azote dans les bipyridines, notés C_b ;
- et le groupe des carbones ***c*** (possédant une énergie de 286,0 eV) est constitué des 12 carbones liés aux atomes d'azote dans les bipyridines, notés C_c.

Selon cette description théorique de la molécule, le pic n'a pu être déconvolué de manière parfaite sur la base de ces trois composantes principales. Or, le spectre N1s (figure IV-B-8a) a clairement mis en évidence l'existence de nombreux ponts azo (-C-N=N-C-) qui peuvent influencer les niveaux de cœur des carbones voisins. Nous avons alors défini une autre décomposition du complexe avec une nouvelle entité dérivée de α, notée α' (figure IV-B-10) permettant de constituer un nouveau groupe de carbones :

- le groupe des carbones ***d*** (possédant une énergie de 286,9 eV selon Mouanda et al. *[22]*) est constitué des 2 carbones encadrant le pont azo, noté C_d.

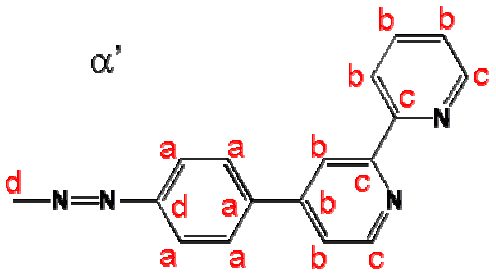


Figure IV-B-10 : Entité α', dérivée de α (figure IV-B-9a), avec la présence de pont azo (-C-N=N-C-). Apparition d'un nouveau groupe de carbones : ***d****.*

Afin de déconvoluer correctement le spectre obtenu, nous avons donc ajouté deux composantes dont l'une est liée aux carbones du groupe ***d*** (figure IV-B-8b). Ces cinq composantes sont situées aux énergies de 284,7 ; 285,3 ; 286,1 ; 286,8 et 288,2 eV. Les quatre premières et principales correspondent exactement aux niveaux d'énergie de cœur des carbones des groupes ***a***, ***b***, ***c*** et ***d***, respectivement, alors que la dernière composante constitue un pic satellite. Elle a été finalement attribuée à l'adsorption d'hydrogénocarbonates (HCO_3^-) à la surface de l'or, déposés lors du nettoyage de l'électrode *[10]*.

Le tableau IV-B-1 présente les positions, les aires et les pourcentages relatifs de chaque composante. Nous pouvons noter que la dernière située à 288,2 eV (HCO_3^-) ne représente que 4%, et elle est notamment bien séparée des autres composantes.

Tableau IV-B-1 : Positions et pourcentages relatifs des aires des différentes composantes C1s du complexe de Ru immobilisé sur la surface de l'or (tirés du spectre XPS C1s de la figure IV-B-8b). Comparaisons des pourcentages relatifs avec les pourcentages atomiques théoriques en ne considérant le greffage uniquement via des ponts azo (-C-N=N-C-).

	Expérience				Théorie avec des ponts azo	
C1s	E (eV)	Atomes de carbone		Ligand	C_{Ru} [1]	C_{Ru} + α' [2]
		Aire	Aire (%)	Aire (%)	Pourcentage atomique (%)	Pourcentage atomique (%)
C_a	284,7	544	20	21	14	19
C_b	285,3	1024	38	40	49	43
C_c	286,1	695	26	27	32	30
C_d	286,8	301	11	12	5	8
C (HCO_3^-)	288,2	97	4			

[1] : Pourcentages atomiques théoriques des atomes de carbone calculés pour un film composé uniquement de complexes de Ru liés par des ponts azo.

[2] : Pourcentages atomiques théoriques des atomes de carbone calculés pour un film composé de complexes de Ru, liés par des ponts azo, et de complexes démétallisés avec l'entité α' (figure IV-B-10). Calculs élaborés avec le rapport 1/1, complexe de Ru/complexe démétallisé.

A partir de ces résultats expérimentaux obtenus par mesure d'aire sous chaque composante, nous avons essayé de déterminer une structure du film synthétisé à la surface. Nous avons alors utilisé les pourcentages expérimentaux en ne considérant seulement les atomes de carbone du complexe, et nous avons essayé de proposer différents modèles de structure du film sur la surface de l'or.

Tout d'abord, étant donné le pourcentage élevé de carbones liés à des ponts azo, nous avons conclu que toutes les molécules greffées étaient liées les unes aux autres par ce type de liaison (entité α', figure IV-B-10). Puis théoriquement, en considérant tous les atomes de carbone du complexe (une entité α' et deux entités β), les pourcentages atomiques théoriques calculés (colonne C_{Ru}) sont assez éloignés de ceux obtenus expérimentalement. Cependant, en ajoutant une entité α', c'est-à-dire un complexe démétallisé, les pourcentages atomiques théoriques (colonne C_{Ru} + α') correspondent cette fois-ci à ceux obtenus expérimentalement.

Ces résultats obtenus par comparaison entre la théorie et l'expérience dans la zone C1s-Ru3d permettent de retrouver ceux prédits lors de l'étude de la zone spectrale N1s. En effet, une composante importante des groupements azo et une autre, plus faible, des azotes des bipyridines non complexées étaient observées.

Ainsi, nous pouvons proposer à partir de cette étude une structure potentielle du film (figure IV-B-11). Cependant, toutes ces mesures ne nous permettent pas de conclure quant à l'état de la liaison entre la première couche déposée et la surface de l'or.

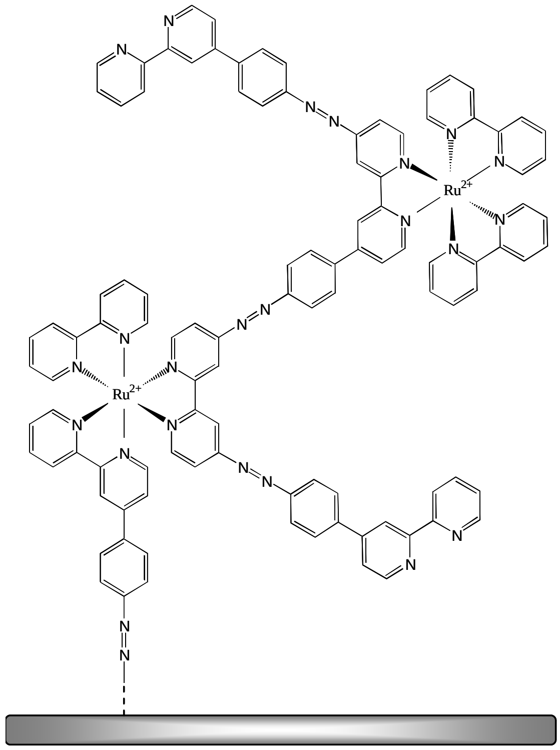


Figure IV-B-11 : Structure potentielle du film de complexes de Ru immobilisés sur la surface de l'or.

B.4. Etude XPS sur diamant nu

Grâce à l'étude conjointe portée sur les niveaux de cœur 1s de l'azote et du carbone, nous avons pu déterminer la nature des liens entre les molécules ainsi que la structure du film déposé. Néanmoins, par cette étude préliminaire des niveaux de cœur du carbone du complexe immobilisé sur une surface d'or, nous avons pu nous rendre compte de la complexité de la déconvolution des spectres avec quatre composantes dues aux carbones du complexe, deux dues au ruthénium et une due à l'adsorption. Notamment, un signal provenant du substrat a pu être observé indiquant que la couche déposée à la surface de l'or n'est pas suffisamment épaisse (figure IV-B-7).

Si nous voulons établir la même étude sur diamant, il est nécessaire d'étudier au préalable la signature XPS de la surface nue. Celle-ci a été conservée au maximum en atmosphère inerte (sous argon) afin d'éviter son oxydation et donc plusieurs composantes XPS. Cette étude permettra alors de constituer une référence avec la détermination des composantes principales qui peuvent potentiellement intervenir lors de l'étude XPS du complexe immobilisé sur diamant.

La figure IV-B-12 présente les niveaux de cœur 1s du carbone du même échantillon diamant. Cette zone n'a jamais été en contact avec la solution de sels de diazonium et elle a été conservée sous argon. Pour amplifier les résultats surfaciques, l'angle d'analyse a été diminué par un tilt de l'échantillon afin que la profondeur des photoélectrons soit plus faible pour ainsi rendre la mesure plus spécifique de la surface (voir annexe B).

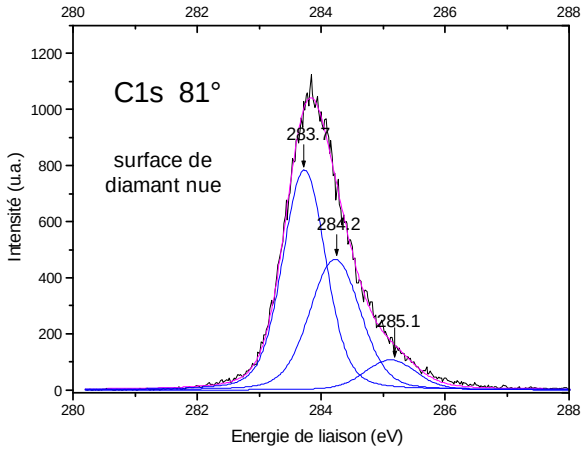


Figure IV-B-12 : Spectre XPS dans la zone C1s de la surface nue de diamant.

Nous pouvons observer sur la figure IV-B-12 un spectre caractéristique de la surface du diamant avec la présence de trois composantes résumées dans le tableau IV-B-2.

Tableau IV-B-2 : Positions et pourcentages relatifs des aires des différentes composantes C1s de la surface nue de diamant (tirés du spectre XPS C1s de la figure IV-B-12).

C1s	E (eV)	Atomes de carbone	
		Aire	Aire (%)
C sp^3, CH	283,7	737	54
C (CH_x, x=2, 3)	284,2	510	38
C (C-OH)	285,1	117	8

La première composante à 283,7 eV est la signature des carbones hybridés sp^3 du diamant, mais aussi, cette composante est due aux liaisons C-H. Les C-H sont normalement situés à une énergie de 0,2 eV supérieure à la composante principale du diamant mais la résolution de l'appareil utilisé est de 0,5 eV. La deuxième composante située à +0,5 eV est due aux carbones liés à 2 ou 3 hydrogènes (CH_x, x=2 ou 3). La dernière composante à +1,4 eV est la signature des atomes de carbone liés à un atome d'oxygène par une simple liaison. Elle traduit alors la présence de liaisons hydroxyles (C-OH) présentes en surface provenant de l'oxydation de celle-ci malgré les précautions prises lors de la conservation des échantillons *[19]*.

Cette dernière composante à 285,1 eV est située à une énergie inférieure à la résolution de l'appareil de la composante principale du complexe de ruthénium (285,3 eV pour les C_b). La déconvolution de ces deux composantes des spectres obtenus du complexe immobilisé sur diamant ne sera pas possible. Cependant, comme le pourcentage de celle-ci est faible et qu'elle sera probablement masquée par le film, nous pourrons en première approximation ne pas en tenir compte et donc la négliger.

Ainsi, nous n'utiliserons que les deux composantes principales du diamant (C sp^3 / CH et CH_x) pour l'étude XPS du complexe immobilisé sur ce matériau.

B.5. Etude XPS du complexe immobilisé sur diamant

Avec ces deux spectres XPS de référence de la zone C1s que nous venons de constituer (complexe immobilisé sur or (partie IV.B.c.) et surface nue de diamant (partie IV.B.d.)), nous pouvons étudier le complexe immobilisé sur la surface du diamant. Celui-ci a tout d'abord été greffé par voltampérométrie cyclique (VC) (partie IV.B.b.). La figure IV-B-13 présente le spectre global du complexe de ruthénium immobilisé sur la surface de diamant. Nous retrouvons les mêmes pics préalablement obtenus sur or (en dehors de ceux associés à l'or) avec toujours la présence du fluor et de l'oxygène.

Etant donné l'importance du pic d'énergie C1s-Ru3d, il semble que tout comme l'or, il y ait une contribution du substrat. Néanmoins, ce spectre large ne permet pas de conclure.

Le pic correspondant à l'oxygène paraît notamment important. Une oxydation de la surface semble s'être effectuée pendant les étapes électrochimiques (synthèse et caractérisation), et/ou pendant le stockage de l'échantillon.

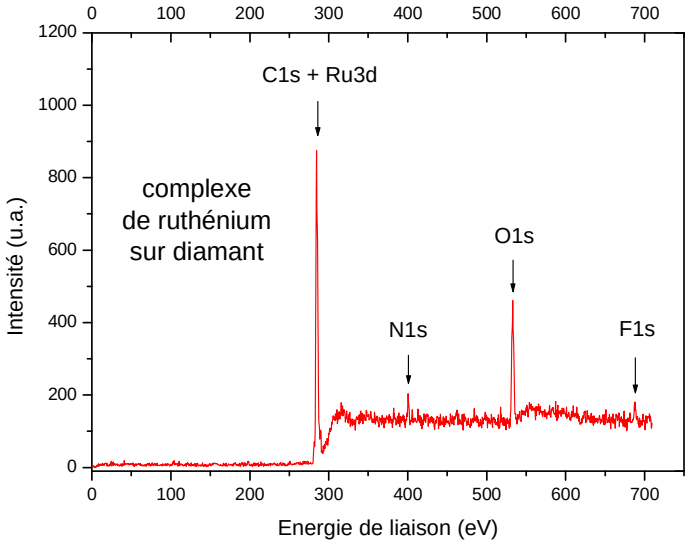


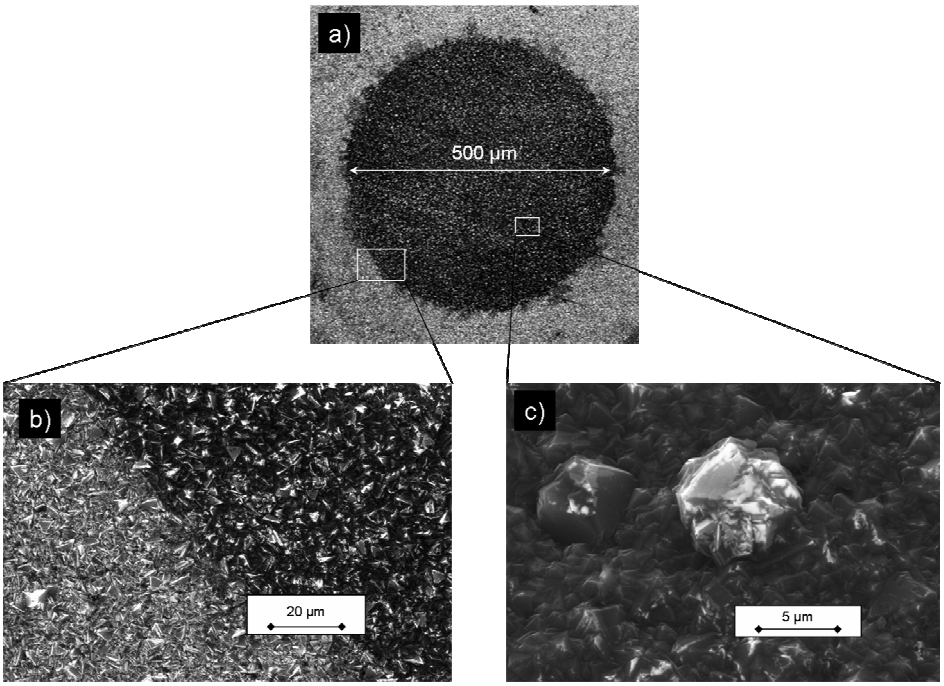
Figure IV-B-13 : Spectre XPS global de la surface de diamant fonctionnalisée par le complexe de Ru, film synthétisé par voltampérométrie cyclique (VC).

Lors d'une étude préliminaire du greffage du complexe de ruthénium par electrospotting sur un échantillon de 200 nm rms, nous avons caractérisé les plots obtenus par

microscopie électronique à balayage, en électrons secondaires (figure IV-B-14). Les images ont été obtenues avec une tension d'accélération de 15 kV.

Nous pouvons observer sur la figure IV-B-14a la zone sombre du greffage du complexe, et ce résultat concorde avec ceux obtenus lors du greffage des groupements nitrophényles (figure IV-A-11). De plus, le contraste paraît plus important que celui obtenu avec les nitrophényles. Ce phénomène est peut-être amplifié par le fait que les électrons sont piégés par les complexes de ruthénium chargés positivement, mais aussi, le ruthénium est un atome lourd et donc sa section efficace est importante. Ainsi, le détecteur capte moins d'électrons pour la zone greffée.

En focalisant sur une zone frontière de ce plot, nous distinguons des zones claires à certains endroits du plot, comme à l'extérieur (figure IV-B-14b). Ces zones claires sont majoritairement situées sur les extrémités des grains de diamant (figure IV-B-14c).



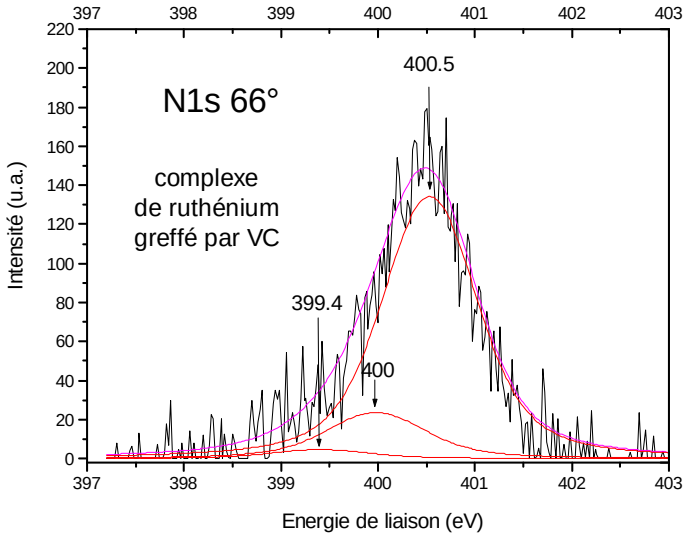
<u>Figure IV-B-14</u> : a) Image MEB en électrons secondaires d'un plot de complexes de Ru immobilisés sur la surface de diamant. Images MEB à b) la frontière et à c) l'intérieur du plot. Tension d'accélération des électrons : 15kV.

Ce phénomène laisse présager que le greffage électrochimique ne s'effectue pas sur les pointes, contrairement à ce qui a été observé avec les nitrophényles (figure IV-A-13b).

Cependant, il est possible que pendant cette caractérisation, le film soit endommagé par des électrons incidents de forte énergie (15 kV). Cette destruction du film peut être amplifiée par des effets de pointes, également observés sur les zones non greffées (figure IV-B-14b). Ainsi, nous ne pouvons conclure quant à la continuité du film électro-généré en utilisant la microscopie électronique à balayage. Mais il semble que le film ne doit pas être très épais pour être autant endommagé et laisser la surface avec des pointes nues de diamant.

Ainsi, un signal provenant du substrat devrait être détecté. L'étude préalable sur diamant nu est donc bien nécessaire et va permettre d'étudier finement la caractérisation XPS du greffage du complexe sur diamant.

La figure IV-B-15 présente le spectre de la zone N1s obtenu après greffage du complexe de ruthénium sur la surface du diamant.



<u>Figure IV-B-15</u> : Spectre XPS dans la zone N1s de la surface de diamant fonctionnalisée par le complexe de Ru, film synthétisé par voltampérométrie cyclique (VC) (figure IV-B-2b).

Au niveau de l'azote, la même déconvolution du spectre est observée avec trois composantes situées aux mêmes énergies que celles obtenues sur or. Ceci indique alors la présence de ponts azo ainsi que la présence de complexes démétallisés α' (figure IV-B-10). Mais, le faible rapport signal/bruit sur cette zone spectrale, empêche de conclure quant à la structure du film sur diamant : est-elle la même que celle obtenue sur or ?

Ce rapport est plus important sur les niveaux d'énergie des électrons de cœur des niveaux C1s et Ru3d (figure IV-B-16a). Le spectre de la figure IV-B-16a permet de rendre compte de la complexité de l'étude avec la présence de trois pics centrés à 281,3 ; 283,8 et 289,3 eV et d'un épaulement à 285,3 eV. Finalement, nous retrouvons les pics attribués:

- au ruthénium ($Ru3d_{5/2}$, 281,3 eV),
- aux carbones du diamant (283,8 eV),
- à une troisième composante à haute énergie qui n'apparaissait ni sur or, ni sur diamant nu (289,3 eV),

et enfin l'épaulement correspond aux carbones du complexe (285,3 eV) (figure IV-B-16b).

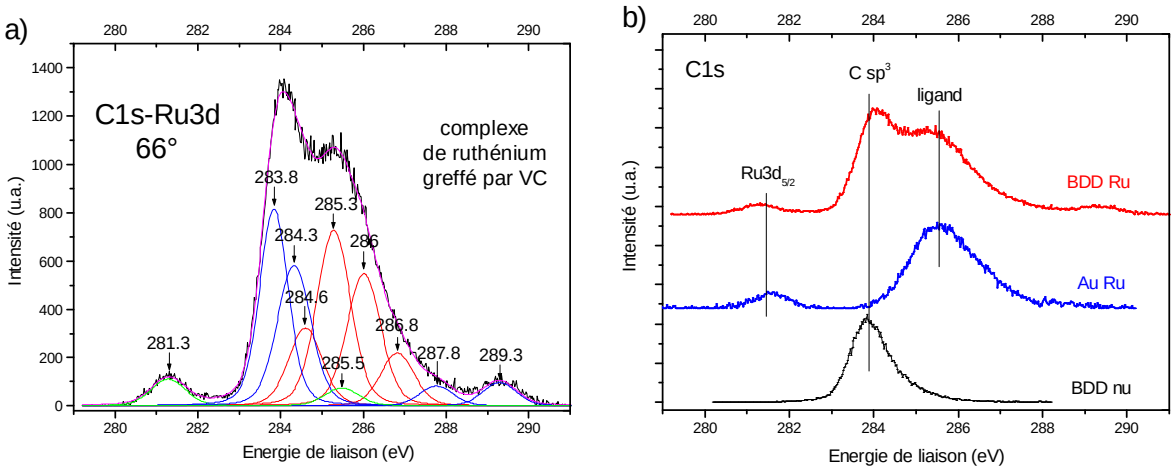


Figure IV-B-16 : a) Spectre XPS dans la zone C1s-Ru3d de la surface de diamant fonctionnalisée par le complexe de Ru, film synthétisé par voltampérométrie cyclique (VC) (figure IV-B-2b).
b) Comparaison des différents spectres XPS, dans la zone C1s, obtenus sur la surface de diamant nue (noir, figure IV-B-12), sur la surface d'or fonctionnalisée par le complexe de Ru (bleu, figure IV-B-8b) et sur la surface de diamant fonctionnalisée par le complexe de Ru (rouge, figure IV-B-16a).

Pour déconvoluer ce spectre, nous avons d'abord ajouté les composantes du doublet du ruthénium, puis les deux principales du diamant (C-C sp^3 et CH_x, x=2 ou 3), et les quatre des carbones du ligand. Enfin, deux composantes supplémentaires ont été rajoutées (287,8 et 289,3 eV). Le tableau IV-B-3 présente la position de toutes les composantes liées au carbone ainsi que leur pourcentage respectif.

Tableau IV-B-3 : Positions et pourcentages relatifs des aires des différentes composantes C1s de la surface du diamant fonctionnalisée par le complexe de Ru, film synthétisé par VC (tirés du spectre XPS C1s de la figure IV-B-16a).

C1s	E (eV)	Atomes de carbone		Ligand
		Aire	Aire (%)	Aire (%)
C-C sp^3, CH	283,8	769	21	
C (CH_x, x=2, 3)	284,3	641	18	
C_a	284,6	355	10	18
C_b	285,3	802	22	40
C_c	286	606	17	30
C_d	286,8	241	7	12
C (COOH)	287,8	91	3	
C (CF)	289,3	105	3	

Nous distinguons tout d'abord que les composantes liées au diamant (C-C sp^3 ; CH ; CH_x), ainsi que celles liées au ligand (C_a, C_b, C_c, C_d) possèdent les mêmes positions (à ±0,1 eV). Mais aussi, les pourcentages des carbones du complexe sont équivalents à ceux obtenus lors de l'étude sur or. Ces résultats permettent alors de conclure que la structure du film sur diamant est rigoureusement la même que celle sur or (figure IV-B-11).

En revanche, les deux dernières composantes à hautes énergies, situées à +4 eV (287,8 eV) et +5,5 eV (289,3 eV) par rapport à la principale du diamant (283,8 eV) ne peuvent être attribuées qu'à la surface puisque nous ne les avions pas sur or. Elles seraient alors apparues pendant l'électrochimie (synthèse et caractérisation du film). Par ailleurs, nous pouvons remarquer que celle à haute énergie sur or (288,2 eV) n'apparaît pas ici. L'hydrogénocarbonate (HCO_3^-) ne s'adsorbe pas sur diamant.

La première composante située à +4 eV (287,3 eV) est généralement attribuée à des groupements carboxyles de surface (COOH), qui sont générés à haut potentiel anodique lors de la détection électrochimique du ruthénium. La dernière composante à très haute énergie (289,3 eV) est attribuée dans la littérature à des carbones liés avec des atomes de fluor *[23]*. Cette composante est confirmée par la présence du fluor sur le spectre global à des hautes énergies (vers 688 eV, figure IV-B-13), puisque si le fluor provenait de l'adsorption du contre

ion ($^-BF_4$) utilisé pendant la fonctionnalisation et la détection électrochimiques, nous aurions dû obtenir un signal dans la zone F1s vers 685-686 eV. Ces atomes de fluor peuvent provenir de la décomposition du contre ion (PF_6^-) en acide fluorhydrique (HF), lorsque le contre ion est en présence d'eau. Or, le complexe est très hygroscopique, et lors d'une mesure RMN du produit, il a été observé une forte présence d'eau. En effet, le composé que nous avons utilisé pour réaliser cette étude était conservé depuis quelques mois à l'air à 4°C. Ainsi, il se peut que pendant l'électrochimie, le fluor de l'acide fluorhydrique ait pu réagir avec la surface pour générer des liaisons covalentes C-F en surface.

Selon Sine et al., cette fluorination de surface modifie les propriétés électrochimiques du diamant et augmente la fenêtre électrochimique du diamant en repoussant la réduction de l'hydrogène à des potentiels plus cathodiques (figure I-19) *[23]*. La fluorination aboutit de même à une modification des propriétés de surface du diamant qui peut expliquer le comportement capacitif des électrodes (figure IV-B-6).

Lors d'une seconde étude avec un composé fraîchement synthétisé, nous avons greffé le complexe par voltampérométrie cyclique sur diamant et caractérisé le greffage par spectroscopie XPS et par électrochimie (figures IV-B-17 et IV-B-18).

Nous observons que l'étude de la zone spectrale C1s-Ru3d (figure IV-B-17), donne les mêmes composantes résumées dans le tableau IV-B-4 excepté celle du fluor.

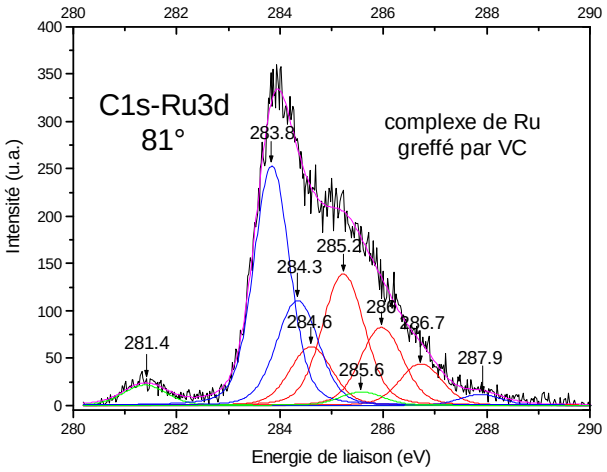


Figure IV-B-17 : Spectre XPS dans la zone C1s-Ru3d de la surface de diamant fonctionnalisée par le complexe de Ru, film synthétisé par voltampérométrie cyclique (VC) avec un composé fraîchement synthétisé.

Tableau IV-B-4 : Positions et pourcentages relatifs des aires des différentes composantes C1s de la surface du diamant fonctionnalisée par le complexe de Ru, film synthétisé par VC avec un composé fraîchement synthétisé (tirés du spectre XPS C1s de la figure IV-B-17).

C1s	E (eV)	Atomes de carbone		Ligand
		Aire	Aire (%)	Aire (%)
C-C sp^3, CH	283,8	239	32	
C (CH_x, x=2, 3)	284,3	122	17	
C_a	284,6	68	9	19
C_b	285,2	153	21	42
C_c	286	91	12	25
C_d	286,7	48	7	13
C (COOH)	287,9	13	2	
C (CF)	-	-	-	

Les pourcentages des carbones du complexe montrent aussi que la structure du film est bien celle indiquée selon la figure IV-B-11, c'est-à-dire avec la présence de complexes démétallisés.

En étudiant la réponse électrochimique du ruthénium de ce film (figure IV-B-18), le couple redox Ru^{3+}/Ru^{2+} est parfaitement réversible (ΔE_p=24mV) et surtout il y a très peu de phénomène capacitif.

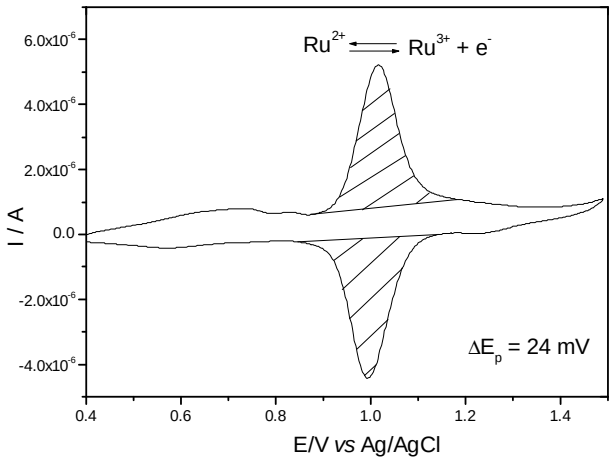


Figure IV-B-18 : Voltampérogramme de la réponse du complexe de Ru immobilisé sur la surface du diamant, dans la gamme de potentiels du couple Ru^{3+}/Ru^{2+}. Film synthétisé par VC avec un composé fraîchement synthétisé. 0,1M NBu_4BF_4 dans ACN, $S_{électrodes}$ = 1,3 mm², 100mV.s^{-1}.

Par ailleurs, l'aire sous le pic d'oxydation (équivalente à celle sous le pic de réduction) permet de quantifier la densité surfacique de complexes immobilisés sur la surface (1,9 $nmol.cm^{-2}$). Cette densité indique alors la formation d'un film multicouche, mais celui-ci est moins épais que le premier élaborer dans les mêmes conditions.

Donc, nous pouvons conclure que l'épaisseur importante, ainsi que la fluorination de surface de la première électrode peut expliquer la quasi-réversibilité du couple redox obtenu à la figure IV-B-6 (ΔE_p=70mV).

Pour conclure, nous avons pu nous rendre compte de la complexité de la caractérisation XPS d'un film de complexe métallique immobilisé sur la surface du diamant, surtout dans la zone C1s-Ru3d. En effet, nous avons jusqu'à dix composantes dans cette zone spectrale. Cependant, avec cette caractérisation XPS, nous avons pu expliquer certains phénomènes électrochimiques et même conclure quant à la structure de ce film.

B.6. Vers le contrôle de l'épaisseur sur diamant

Avec ces premiers travaux sur la détermination de toutes les composantes dans la zone spectrale C1s-Ru3d du complexe greffé sur diamant, nous avons cherché à maîtriser ce dépôt, et notamment son épaisseur apparente. En diminuant l'épaisseur du film, les réponses électrochimique du ruthénium (Ru^{3+}/Ru^{2+}) ainsi que celles du complexe lors de l'étude XPS dans la zone C1s-Ru3d devraient conjointement diminuer.
Cependant, la voltampérométrie cyclique est une méthode peu appropriée pour un tel contrôle du greffage puisque celui-ci se produit majoritairement pendant le 1er cycle (figure IV-B-2).

Afin de contrôler l'épaisseur, le greffage est effectué par une méthode pulsée, la chronopotentiométrie (CP). Cette méthode consiste à imposer une densité de courant constante et à suivre le potentiel en fonction du temps. La densité de courant imposée permet de contrôler la cinétique de la réduction électrochimique alors que le temps permet de contrôler l'épaisseur du film déposé.

Nous avons effectué deux films par cette méthode en imposant une densité de courant de -0.11 mA.cm^{-2} (figure IV-B-19).

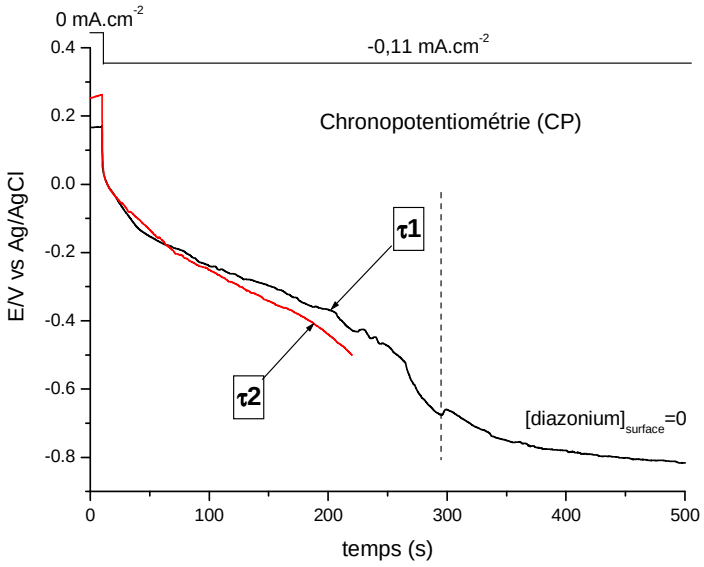


Figure IV-B-19 : Chronopotentiogrammes enregistrés lors de l'élaboration, avec des temps différents (τ_1 et τ_2), de films de complexes de Ru sur diamant. 1mM de sel de p-(tris(bipyridine)Ru^{2+})benzène diazonium et 0,1M NBu_4BF_4 dans ACN, j=-0,11mA.cm^{-2}.

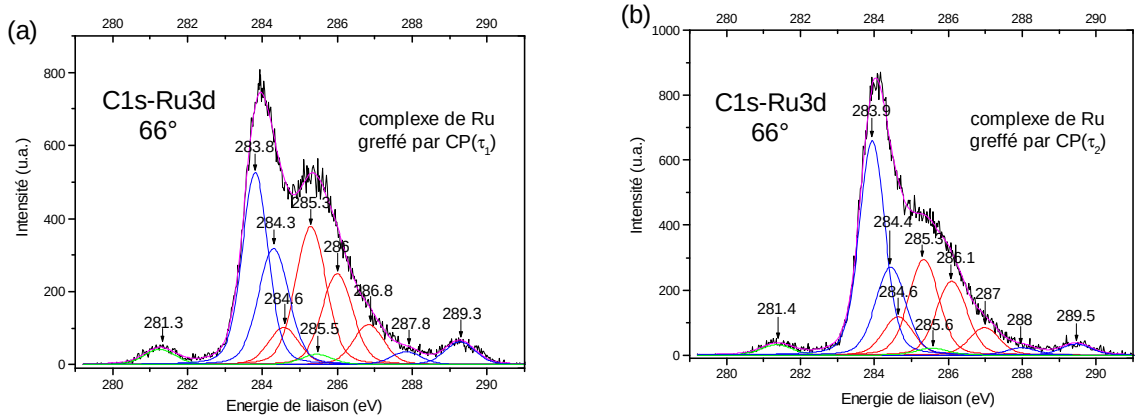
Dans un premier temps, nous avons exécuté le greffage pendant un temps suffisamment long (τ_1), jusqu'à une déplétion de surface des espèces électro-actives. En effet, le dépôt électrochimique s'effectue tant que des espèces sont proches de l'électrode. Le potentiel mesuré varie peu selon Nernst (plateau). Dans le cas présenté ici, le potentiel diminue faiblement, ceci provient de la modification de la surface de l'électrode par le greffage des complexes. Puis, une transition est observée, les sels de diazonium sont consommés aux abords de l'électrode, leur concentration devient nulle. Le potentiel diminue plus fortement et atteint un second plateau indiquant la réduction d'un nouveau système redox. Le greffage s'est effectué pendant un temps τ_1 = 290s.

Pour la réalisation d'un second film, nous avons stoppé le greffage à un temps τ_2 = 210s, inférieur à τ_1. Toutes les espèces disponibles à la surface n'ont pas été consommées.

Les charges utilisées pour la synthèse électrochimique de ces deux films τ_1 et τ_2 sont respectivement de Q_1 = 32 mC.cm^{-2} et Q_2 = 23 mC.cm^{-2}, ce qui représente un rapport Q_2/Q_1 égale à 0,72. Les deux films doivent alors posséder des épaisseurs différentes.

Ces derniers ont ensuite été rincés abondamment à l'acétonitrile avant d'être caractérisés électrochimiquement et par spectroscopie XPS.

Les figures IV-B-20a et IV-B-20b présentent les spectres XPS dans la zone C1s-Ru3d de ces deux films greffés par chronopotentiométrie (CP) sur une électrode de diamant.



<u>Figure IV-B-20</u> : Spectres XPS dans la zone C1s-Ru3d des surfaces de diamant fonctionnalisées par le complexe de Ru, films synthétisés par chronopotentiométrie (CP) avec les temps a) τ_1 et b) τ_2 (figure IV-B-19).

Nous retrouvons exactement les mêmes composantes, et surtout, nous remarquons que l'épaulement, caractéristique des carbones du complexe, est plus important pour le film réalisé pendant le temps τ_1 (figure IV-B-20) vis-à-vis du film réalisé pendant le temps τ_2 (figure IV-B-20b). L'épaisseur du film a bien été modulée.

Nous avons lissé tous les spectres (VC, CP τ_1 et τ_2) de cette zone d'énergie (C1s-Ru3d), et les avons normalisés par rapport à la composante principale du diamant (C-C sp^3, CH). La figure IV-B-21a montre que, quand nous diminuons le dépôt par électrochimie, nous avons conjointement une diminution des composantes du ligand et du ruthénium ($Ru3d_{5/2}$). Nous avons mesuré les aires sous cette dernière composante associée au Ru pour les deux films τ_1 et τ_2. Elles sont égales à : A_1 = 47,3 et A_2 = 36,2 (unités arbitraires) ce qui correspond à un rapport A_2/A_1 de 0,76.

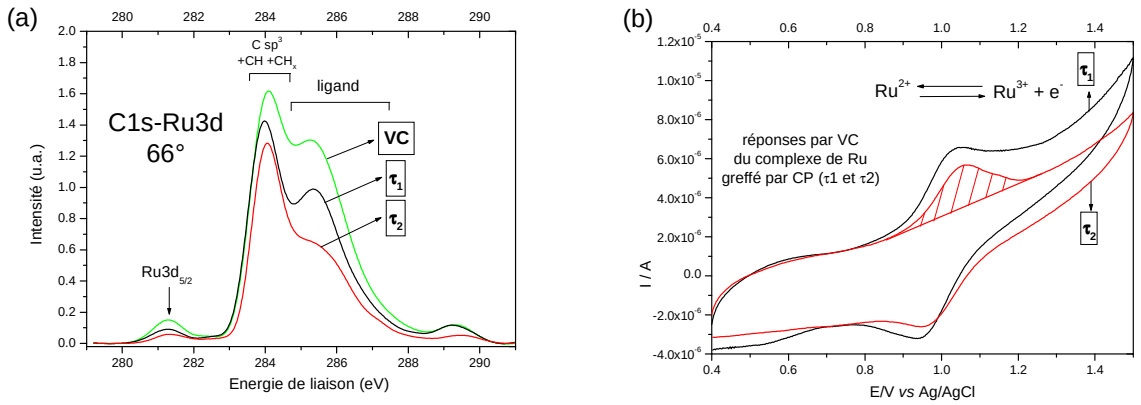


Figure IV-B-21 : a) Spectres XPS, lissés et normalisés par rapport à la composante principale du diamant, dans la zone C1s-Ru3d, des différents films de complexes de Ru synthétisés par VC (figure IV-B-16a) et CP (figure IV-B-20).
b) Réponses électrochimiques par VC des films de complexes immobilisés sur la surface du diamant synthétisés par CP (τ_1 et τ_2) (figure IV-B-19).

En ce qui concerne l'électrochimie, nous pouvons distinguer sur la figure IV-B-21b que la réponse du ruthénium suit aussi les résultats de l'étude XPS.

La surface sous les pics d'oxydation du couple Ru^{3+}/Ru^{2+} de ces deux films τ_1 et τ_2 sont respectivement de S_1 = 415 et S_2 = 307 µC.cm^{-2} ce qui représente des concentrations surfaciques de 4,3 et 3,2 nmol.cm^{-2}. Ces concentrations indiquent la formation de multicouche à la surface et le rapport S_2/S_1 est égal à 0,74.

Nous pouvons noter que les rapports S_2/S_1 (réponses électrochimiques) et A_2/A_1 (réponses XPS) sont similaires, indiquant alors une bonne corrélation entre les caractérisations électrochimiques et de spectroscopie XPS. Ainsi, nous avons réussi à corréler des résultats provenant d'une caractérisation physique élémentaire semi-quantitative, l'XPS, avec une caractérisation électrochimique quantitative.

Ces rapports sont notamment équivalents à celui obtenu lors de l'électrodéposition par chronopotentiométrie (Q_2/Q_1). Ce comportement démontre donc que l'électrogreffage utilisant la chronopotentiométrie permet de moduler l'épaisseur du film généré à la surface par contrôle des charges.

Cette étude a montré que nous pouvons greffer un complexe métallique directement sur la surface du diamant et nous constituons ainsi les seuls à avoir mené un tel travail.

Nous avons vu dans un premier temps que grâce aux mesures XPS du complexe de ruthénium immobilisé sur la surface de l'or et de la surface nue de diamant, nous avons pu déterminer la structure du film greffé sur la surface du diamant. Cependant, contrairement à ce qui est généralement obtenu avec les sels de *p*-nitrobenzène diazonium, les liens entre les molécules sont établis par des ponts azo. Des études complémentaires sont prévues en synthétisant des complexes fonctionnalisés avec une fonction diazonium, avec des intermédiaires alkyls pour éloigner le complexe du cycle contenant la fonction diazonium. Ainsi, nous pourrons vérifier l'influence du complexe sur la formation de ces ponts azo.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence que nous pouvons contrôler par chronopotentiométrie l'épaisseur du film électro-généré à la surface des électrodes de diamant. En effet, une très bonne corrélation entre l'électrochimie de greffage et les résultats des caractérisations XPS et électrochimiques ont été obtenues. Nous pouvons donc maintenant essayer de diminuer l'épaisseur ce film pour atteindre une monocouche.

Enfin, des études pourront être menées pour effectuer de l'électrochimie luminescence avec ce complexe immobilisé sur la surface du diamant.

Conclusion

Le travail effectué sur les sels de diazonium a permis de démontrer que nous pouvons greffer de manière locale sur la surface du diamant des molécules d'intérêt biologique après plusieurs étapes (électro-)chimiques. Cependant, lors de cette première étape de greffage de primaires, nous avons mis en évidence la formation d'un film multicouche masquant les propriétés de surface très intéressantes du diamant. De plus, pour la fabrication d'un biocapteur, ce film peut rendre moins sensible ce biocapteur. Nous avons donc pu mettre en évidence, par différentes caractérisations (XPS et électrochimie), et grâce à un marqueur (le ruthénium), que nous pouvons contrôler l'épaisseur de ce film par une méthode pulsée (la chronopotentiométrie). Ainsi, nous pouvons transposer cette méthode de greffage sur les sels de *p*-nitrobenzène diazonium pour finalement diminuer l'épaisseur apparente du film de nitrophényles et même tendre vers la monocouche. Nous pourrons alors réaliser un biocapteur très sensible.

Cependant, une question réside : est-il possible de greffer une monocouche compacte, comme Lud et al. *[9]*? Ou obtiendrons-nous des clusters de nitrophényles avec des zones non fonctionnalisées ?

Références Bibliographiques

[1] T. C. Kuo, R. L. McCreery, G. M. Swain, *Electrochemical and Solid State Letters* **1999**, *2*, 288.

[2] J. Wang, J. A. Carlisle, *Diamond and Related Materials* **2006**, *15*, 279.

[3] L. Dreesen, Y. Sartenaer, C. Humbert, A. A. Mani, J.-J. Lemaire, C. Méthivier, C.-M. Pradier, P. A. Thiry, A. Peremans, *Thin Solid Films* **2004**, *464*, 373.

[4] T. Livache, E. Maillart, N. Lassalle, P. Mailley, B. Corso, P. Guedon, A. Roget, Y. Levy, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2003**, *32*, 687.

[5] E. Descamps, T. Leichle, B. Corso, S. Laurent, P. Mailley, L. Nicu, T. Livache, C. Bergaud, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 1816.

[6] D. C. Shin, N. Tokuda, B. Rezek, C. E. Nebel, *Electrochemistry Communications* **2006**, *8*, 844.

[7] P. Allongue, M. Delamar, B. Desbat, O. Fagebaume, R. Hitmi, J. Pinson, J. M. Saveant, *Journal of the American Chemical Society* **1997**, *119*, 201.

[8] A. Laforgue, T. Addou, D. Belanger, *Langmuir* **2005**, *21*, 6855.

[9] S. Q. Lud, M. Steenackers, R. Jordan, P. Bruno, D. M. Gruen, P. Feulner, J. A. Garrido, M. Stutzmann, *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 16884.

[10] J. Lyskawa, D. Bélanger, *Chemistry of Matérials* **2006**, *18*, 4755.

[11] X. Wang, P. E. Colavita, K. M. Metz, J. E. Butler, R. J. Hamers, *Langmuir* **2007**, *23*, 11623.

[12] M. Bonnauron, C. Agnès, P. Mailley, J.-C. Arnault, J. d. Sanoit, C. Mer, L. Rocha, P. Bergonzo, M. Nesladek, F. Omnès, O. Elmazria, *Material Research Society Symposium Proceedings* **2007**, *956*, 81.

[13] C. E. Nebel, B. Rezek, D. Shin, H. Uetsuka, N. Yang, *Journal of Physics D-Applied Physics* **2007**, *40*, 6443.

[14] P. A. Brooksby, A. J. Downard, *Langmuir* **2004**, *20*, 5038.

[15] E. Baranoff, I. M. Dixon, J. P. Collin, J. P. Sauvage, B. Ventura, L. Flamigni, *Inorganic Chemistry* **2004**, *43*, 3057.

[16] G. Beamson, D. Briggs, *High Resolution XPS of Organic Polymers, The Scienta ESCA3000 Database*, Wiley Interscience, **1992**.

[17] B. Jousselme, G. Bidan, M. Billon, C. Goyer, Y. Kervella, S. Guillerez, E. A. Hamad, C. Goze-Bac, J.-Y. Mevellec, S. Lefrant, *Journal of electroanalytical chemistry* **2008**, *621*, 277.

[18] J. H. Scofield, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1976**, *8*, 129.

[19] E. Vanhove, J. de Sanoit, J. C. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Nesladek, *Physica Status Solidi a-Applications and Materials Science* **2007**, *204*, 2931.

[20] J. Pinson, F. Podvorica, *Chemical Society Reviews* **2005**, *34*, 429.

[21] G. M. Liu, A. Klein, A. Thissen, W. Jaegermann, *Surface Science* **2003**, *539*, 37.

[22] B. Mouanda, P. Viel, C. Blanche, *Thin Solid Films* **1998**, *323*, 42.

[23] G. Sine, L. Ouattara, M. Panizza, C. Comninellis, *Electrochemical and Solid State Letters* **2003**, *6*, D9.

CHAPITRE V :

MATERIAUX COMPOSITES ET NANOSTRUCTURES

Introduction

Nous avons vu dans le chapitre précédant, ainsi que dans le chapitre introductif, que l'immobilisation covalente de molécules d'intérêt biologique sur la surface du diamant s'effectuait par l'intermédiaire de bras espaceurs organiques. Ces derniers sont greffés directement sur la surface du diamant via différentes techniques préalablement présentées dans le chapitre I.

Nous nous sommes intéressés à la réalisation de matériaux composites avec comme support conducteur le diamant dopé au bore, pour l'immobilisation de biomolécules. En effet, les performances analytiques et le transfert de charge entre l'enzyme et l'électrode servant de transducteur, peuvent être améliorés avec des nanostructures composites. Les nanotubes de carbone représentent un important groupe de nanomatériaux avec des géométries, des propriétés électroniques et chimiques attractives *[1, 2]*. Ils présentent de grandes potentialités pour la détection électrochimique. Ceux-ci sont déposés sur la surface d'une électrode, comme le carbone vitreux, et améliorent alors la détection électrochimique de différentes biomolécules comme le cytochrome C *[3]* ou l'acide ascorbique *[4]*.

Dans le cas du diamant, aucun travail n'a à ma connaissance été réalisé avec l'utilisation de nanotubes de carbone. En revanche, la surface du diamant a été nanostructurée ou des dépôts électrochimiques de métaux sur les électrodes ont été effectués.
En effet, les dépôt métalliques modifient les propriétés de surface du diamant et peuvent servir de catalyseurs *[5]*. De nombreux métaux ont été déposés sur la surface de ce matériau (platine, or, fer, argent, cuivre, palladium…) et donc de nouvelles applications analytiques sont possibles, dont :

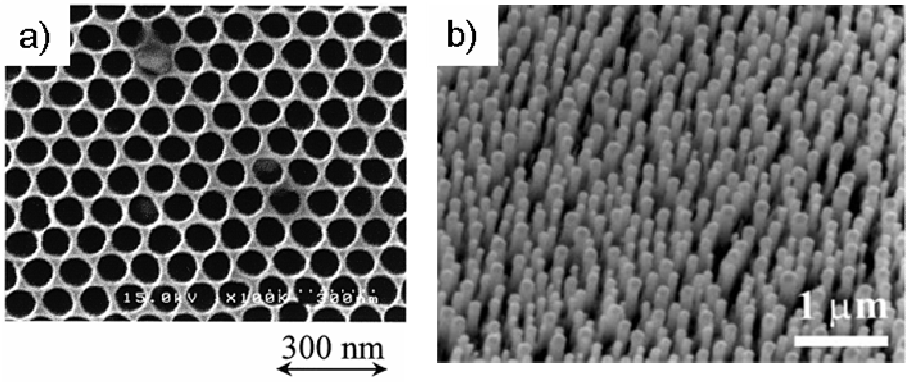
- l'oxydation des alcools avec des particules de platine *[6]*,
- la détection du peroxyde d'hydrogène par dépôt de nanoparticules d'oxyde d'iridium *[7]*,
- la détection de l'arséniure en solution avec un dépôt d'or *[8]*…

Ainsi, de nombreux matériaux composites ont été réalisés avec comme support les électrodes de diamant. Ces structures demeurent intéressantes pour des applications électro-analytiques directes. Cependant, celles-ci ne permettent pas de réaliser une connexion directe

entre les biomolécules et le transducteur, le diamant. Un grand intérêt s'est alors porté sur la fabrication d'un matériau carboné de taille nanométrique permettant d'immobiliser les biomolécules pour un transfert électronique directe.

Par une approche dite « top-down », le diamant après synthèse peut être nanostructuré par différents motifs. Des études ont permis de réaliser des structures en nids d'abeille *[9]* ou des nanopointes-nanopiliers *[10]*. Dans ces deux cas, un masque est réalisé sur la surface et un plasma grave les zones non couvertes.

Pour réaliser des structures en nid d'abeille, l'équipe de Fujishima a déposé dans un premier temps une couche d'aluminium sur l'ensemble de l'échantillon. Puis, une structure en nid d'abeille a été réalisée par anodisation de l'aluminium, constituant alors le masque pour la gravure (figure V-1a) *[11]*. En revanche, le masque pour réaliser des nanopointes-nanopiliers est simplement une monocouche de nanoparticules d'or *[12]* (figure V-1b) ou de diamant *[13]*.

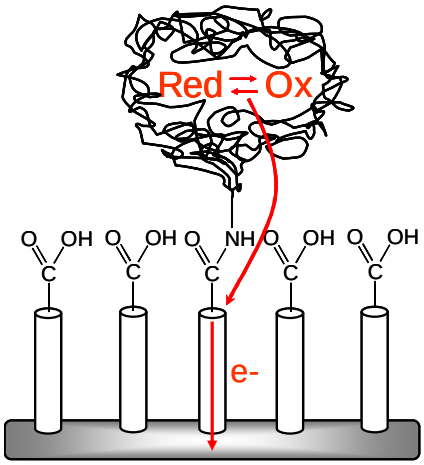


<u>Figure V-1</u> : a) Structure en nid d'abeille du diamant [11] et b) nanopiliers de diamant [12].

Nous distinguons sur la figure V-1 que ces nanostructures présentent l'avantage d'augmenter la surface spécifique du diamant : celles-ci permettent d'améliorer l'efficacité et la sensibilité du transducteur à un évènement biologique cible. Cependant, malgré cet avantage considérable, très peu de travaux ont été réalisés avec ces structures. L'équipe de Fujishima est la seule à avoir utilisé la structure en nid d'abeille pour déposer des particules de platine *[14]*. Et l'équipe de Nebel a tout récemment utilisé pour la première fois les nanopointes de diamant pour greffer des oligonucléotides. Cette utilisation des nanopointes a finalement permis d'améliorer par environ 100 à 1000 fois la sensibilité de la détection de l'hybridation de l'ADN par électrochimie, comparée à une surface plane de diamant ou d'or *[13]*.

Dans notre cas, l'objectif consistait à réaliser des nanostructures avec des matériaux carbonés permettant d'augmenter la surface spécifique. Nous nous sommes orientés vers l'utilisation des nanotubes de carbone (NTC). Contrairement aux deux autres nanostructures carbonées présentées, nous avons eu une approche dite « bottom-up », c'est-à-dire que nous avons fait croître les nanotubes sur la surface de nos échantillons diamant. Ce dernier constitue en fait un parfait matériau en tant que substrat pour la croissance des nanotubes. De plus, les nanotubes de carbone présentent un avantage incontestable vis-à-vis des nanofils de diamant. En effet, ces derniers nécessitent forcément le greffage de bras espaceurs pour l'immobilisation finale de biomolécules alors que les nanotubes peuvent présenter des fonctions carboxyles (COOH) à leur extrémité mais aussi sur leur paroi (constituant des défauts). Cela permet donc de les fonctionnaliser directement par des molécules d'intérêt biologique via la formation de liaisons amides puisque ces molécules présentent, dans la majorité des cas, des fonctions amines libres.

Notre objectif consistait alors à greffer directement des enzymes sur les nanotubes. Du fait de la proximité de centre prosthétique de l'enzyme par l'absence du bras espaceur, mais aussi grâce aux propriétés conductrices des nanotubes, ces derniers peuvent « servir de fils électriques » et transférer directement l'information (figure V-2).



<u>Figure V-2</u> : Schéma de fonctionnalisation par une protéine des nanotubes de carbone sur une surface et principe de transfert électronique entre le centre prosthétique et le substrat au travers du nanotube de carbone.

Le matériau composite diamant/nanotubes de carbone constitue alors une structure originale pour la réalisation de biocapteur.

Il est à noter que le travail que nous avons réalisé représente seulement des études préliminaires. Donc, dans ce chapitre, nous traiterons uniquement la faisabilité du greffage de molécules biologiques sur les nanotubes ayant crû sur divers substrats (silicium et diamant). En effet, de nombreuses questions restent en suspens, et celles-ci seront posées pendant cette étude.

Dans un premier temps, nous expliquerons la synthèse des nanotubes de carbone sur substrat, puis nous étudierons la fonctionnalisation de ces nanotubes.

A. Synthèse des nanotubes de carbone (NTC)

La synthèse des nanotubes de carbone est menée à l'Institut Néel avec Anne-Marie Bonnot, par dépôt en phase vapeur comme pour le diamant *[15]*. Cependant, la source d'énergie n'est pas apportée dans ce cas par les micro-ondes mais par un filament chaud : on parle alors de HFCVD.

La technique HFCVD est bien connue pour ces performances en dépôt de couche diamant. Pour obtenir la croissance de nanotubes, deux modifications essentielles ont été apportées. La première est l'ajout d'un catalyseur, le cobalt, sur le substrat, requis pour la formation de nanotubes de carbone. La seconde a pour objectif de favoriser un environnement sp^2 comme dans le graphite, plutôt que sp^3 comme dans le diamant. Ceci en augmentant le pourcentage de méthane dans l'hydrogène, typiquement 10 vol. % au lieu de 1 vol.% pour le diamant, et en diminuant la température du filament chaud, typiquement 2000°C au lieu de 2200°C, afin de limiter la présence d'hydrogène atomique. L'accroissement de la pression totale joue aussi en faveur de la formation de carbone sp^2. Les autres conditions de dépôt, débit des gaz et température de substrat restent semblables dans les deux cas.

Dans notre technique HFCVD, le catalyseur est déposé sous forme d'une couche mince de cobalt, d'épaisseur nanométrique. Des particules de cobalt se forment par démouillage lorsque le filament est chauffé. La présence simultanée d'espèces carbonées au voisinage de la surface des particules de cobalt provoque alors la formation de nanotubes de

carbone. Suivant l'épaisseur de la couche de cobalt et pour une température de dépôt de 800°C, on obtiendra des nanotubes monoparois ou multiparois à faible nombre de parois (1-4).

Un autre paramètre important dans notre étude est la densité de nanotubes qui imposera la surface effective de fonctionnalisation. Pour cela, il a été mis au point par Anne-Marie Bonnot un procédé permettant, à épaisseur de cobalt constante, de faire varier la densité de nanotubes dans une large gamme *[16]*.

Le bâti HFCVD est constitué d'une enceinte en quartz connectée d'une part à un banc de pompage (vide limite de 10^{-7} mbar à l'aide d'une pompe à diffusion) et d'autre part à des arrivées de gaz, méthane et hydrogène. Les substrats sont positionnés au centre de l'enceinte sur un support en molybdène chauffé par contact avec une résistance de graphite enrobée de nitrure de bore. A un centimètre au-dessus du substrat, reposant sur deux amenées de courant, se trouve un filament de tungstène de 0,3 mm de diamètre chauffé par effet Joule. Il est ainsi possible d'ajuster les températures du filament et du substrat afin d'optimiser indépendamment la décomposition des gaz par le filament et la température de dépôt.

Ainsi, diamant et nanotubes de carbone peuvent être obtenus par des techniques CVD. Cependant, contrairement à la croissance du diamant, la croissance de nanotubes de carbone nécessite la présence de particules de catalyseur sur la surface des échantillons. Ces particules ont la propriété de dissoudre le carbone issu des espèces réactives à leur voisinage et sont à l'origine de la formation de germes carbonés puis de la croissance des nanotubes de carbone *[17]*. Les catalyseurs les plus couramment rencontrés sont à base de fer, nickel, cobalt. La taille des particules catalytiques détermine dans une certaine mesure le diamètre des nanotubes formés *[18]*. Deux modes de croissance peuvent se produire. Soit la particule catalytique reste ancrée sur le substrat et la croissance s'effectue par la racine *[19]*, soit la particule adhère peu sur le substrat et se retrouve située au sommet du nanotube (figure V-3) *[17]*. La croissance du nanotube s'arrêtera lorsque la particule catalytique sera encapsulée par du graphite empêchant alors au carbone de pénétrer dans celle-ci.

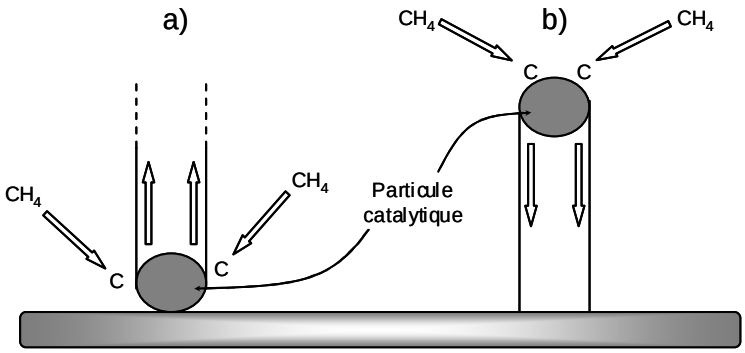


Figure V-3 : Modèle de croissance d'un nanotube à partir d'une particule catalytique avec a) une croissance par la racine [19] tandis que b) la particule est située au sommet du nanotube et se déplace au fur et à mesure de la croissance [17].

Dans notre cas, les deux situations semblent coexister : la particule peut être située en haut ou en bas du nanotube. Plusieurs questions peuvent alors être posées dans ces deux situations :

- si la particule se situe à l'interface diamant/NTC :
  - quelle est la stabilité de la particule sur la surface ? et donc quelle est la stabilité du nanotube sur la surface du diamant?
  - la particule ne gène-t-elle pas le transfert électronique entre le NTC et le diamant ?
- si la particule se situe à l'extrémité supérieure du nanotube :
  - quelle est le type de liaison entre le nanotube et la surface du diamant ? la liaison est-elle covalente ?
  - le transfert électronique est-il possible dans ce cas ?

De même, le cas présenté ici ne traite que des nanotubes monofeuillets, or ces derniers ont des propriétés de semi-conducteur (2/3) ou de métal (1/3) en fonction de leur structure. Pour qu'ils puissent « servir de fils électriques », il faut qu'ils aient un comportement métallique. Toutefois, la synthèse ne permet pas de discriminer un des deux états électriques. Ainsi, il est sans doute préférable de synthétiser directement des nanotubes multiparois qui sont toujours de type métallique.

Nous avons donc vu qu'il reste de nombreuses questions quant à la synthèse des nanotubes de carbones sur la surface du diamant. Celles-ci nécessitant de nombreux travaux, je me suis donc axé uniquement sur la fonctionnalisation des nanotubes sur la surface du diamant.

B. Caractérisation et fonctionnalisation des NTC sur substrats

Pour démontrer qu'il est possible de fonctionnaliser par des molécules d'intérêt biologique les nanotubes de carbone qui ont crû sur une surface, nous avons utilisé le même modèle biologique : le couple biotine/avidine. Pour cela, après activation des fonctions carboxyles sur les nanotubes (améliorant alors la formation d'un amide), nous avons immobilisé la biotine (figure V-4). Puis, afin de vérifier le greffage de la biotine, nous avons révélé cette immobilisation par fluorescence avec la reconnaissance entre la biotine et la streptavidine-R-phycoérythrine (SAPE) (figure V-4).

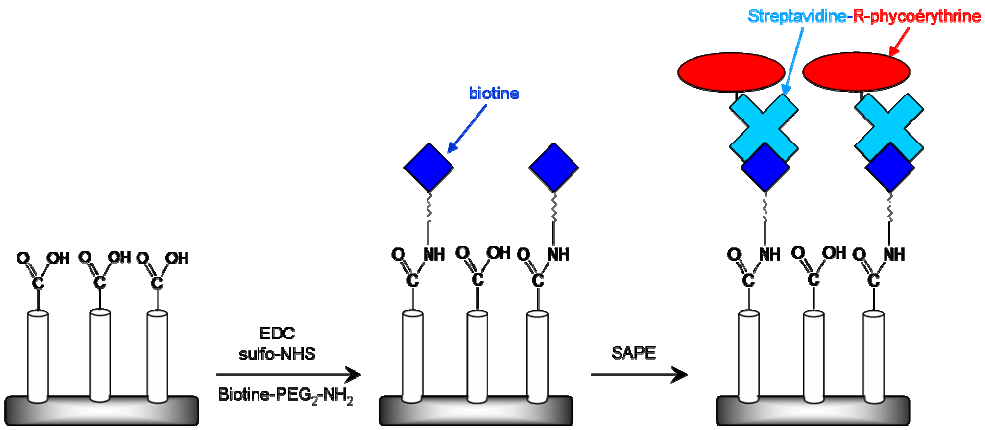


Figure V-4 : Schéma de principe de la fonctionnalisation des nanotubes par la biotine avec formation d'un amide, puis reconnaissance biologique entre la biotine immobilisée et la SAPE pour une observation par microscopie de fluorescence.

Dans un premier temps, nous avons réalisé ces expériences sur des nanotubes qui ont crû sur silicium. Puis, nous avons appliqué ce même protocole sur des nanotubes sur diamant.

B.1. Nanotubes de carbone sur silicium (NTC/Si)

Il faut savoir que la résolution de la microscopie de fluorescence ne permet pas de distinguer les nanotubes les uns par rapport aux autres. Ainsi, nous avons réalisé des tresses de nanotubes. En effet, en fonction de l'épaisseur du catalyseur déposé et en fonction des conditions de croissance des nanotubes, il est possible de réaliser de telles structures. L'image prise au MEB (figure V-5a) permet de distinguer ces tresses de nanotubes.

En focalisant sur une tresse, nous pouvons distinguer qu'il ne s'agit pas d'un seul nanotube, mais d'un ensemble de nanotubes (figure V-5b).

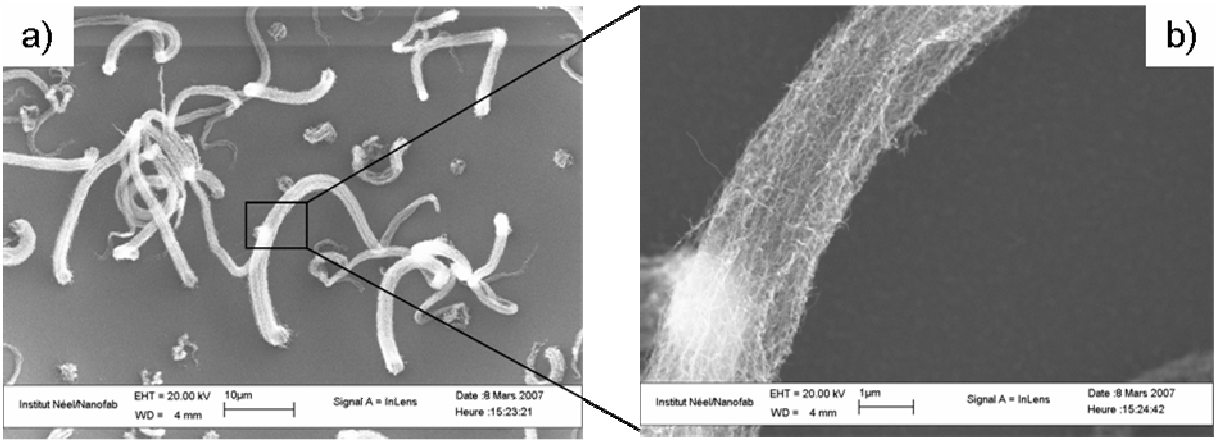


Figure V-5 : Images prises au MEB a) de tresses de nanotubes de carbone qui ont crû sur un substrat de silicium et b) focalisation sur une tresse avec observation des nanotubes.

De plus, ces tresses possèdent des diamètres d'environ deux micromètres et des tailles variables de dix à trente micromètres. Ces structures sont alors observables par microscopie de fluorescence.

Après fonctionnalisation par la biotine selon le schéma décrit à la figure V-4, nous avons révélé la présence de la biotine sur les nanotubes par fluorescence après reconnaissance entre la biotine et la SAPE (figure V-6fluo).

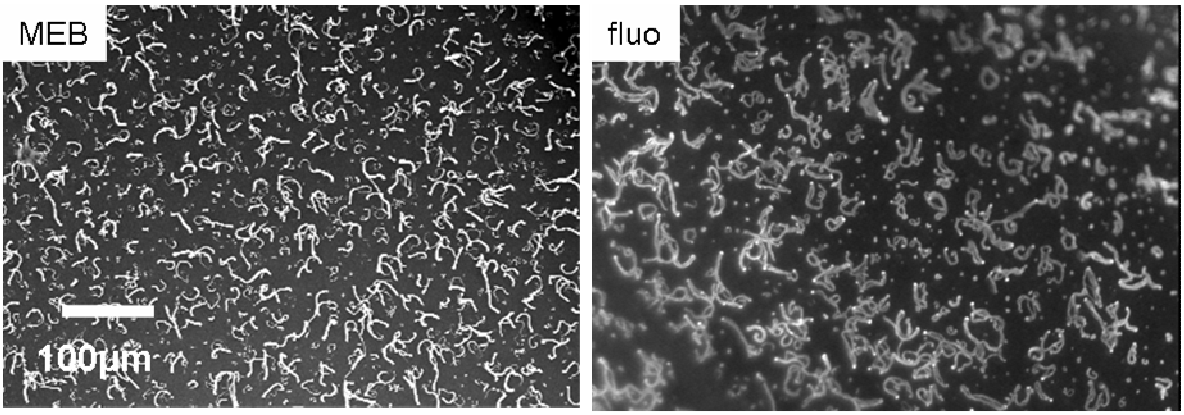


Figure V-6 : Image MEB avant fonctionnalisation (gauche) et image de fluorescence après fonctionnalisation (figure V-4) des tresses de nanotubes (droite).

Nous pouvons très bien distinguer qu'il n'y a que les tresses de nanotubes qui fluorescent, le substrat est lui non fluoresçant : il semble alors que la biotine soit greffée sur les nanotubes. Afin de vérifier que les nanotubes seuls ne sont pas fluorescents, nous avons caractérisé ces tresses de nanotubes, après dénaturation de la SAPE (c'est-à-dire, nous avons retiré la streptavidine ainsi que le fluorophore), aucune fluorescence n'a été observée. Puis, après plusieurs expériences de reconnaissance et de caractérisation, nous retrouvons toujours cette même fluorescence. Il semble donc possible d'immobiliser la biotine sur les nanotubes de carbone.

Après ces premiers résultats encourageants, nous avons alors synthétisé des nanotubes de carbone sur la surface du diamant pour vérifier la faisabilité de l'immobilisation de molécules sur les NTC qui ont crû sur diamant.

B.2. Nanotubes de carbone sur diamant (NTC/BDD)

Après synthèse d'un échantillon diamant polycristallin lourdement dopé au bore (type D, tableau II-7), nous avons fait croître un tapis de nanotubes sur la surface de cet échantillon. Nous devinons aisément sur les figures V-7a et V-7b, que les nanotubes suivent la rugosité sous jacente de l'échantillon diamant. Les nanotubes de carbones croissent donc très bien sur la surface de diamant.

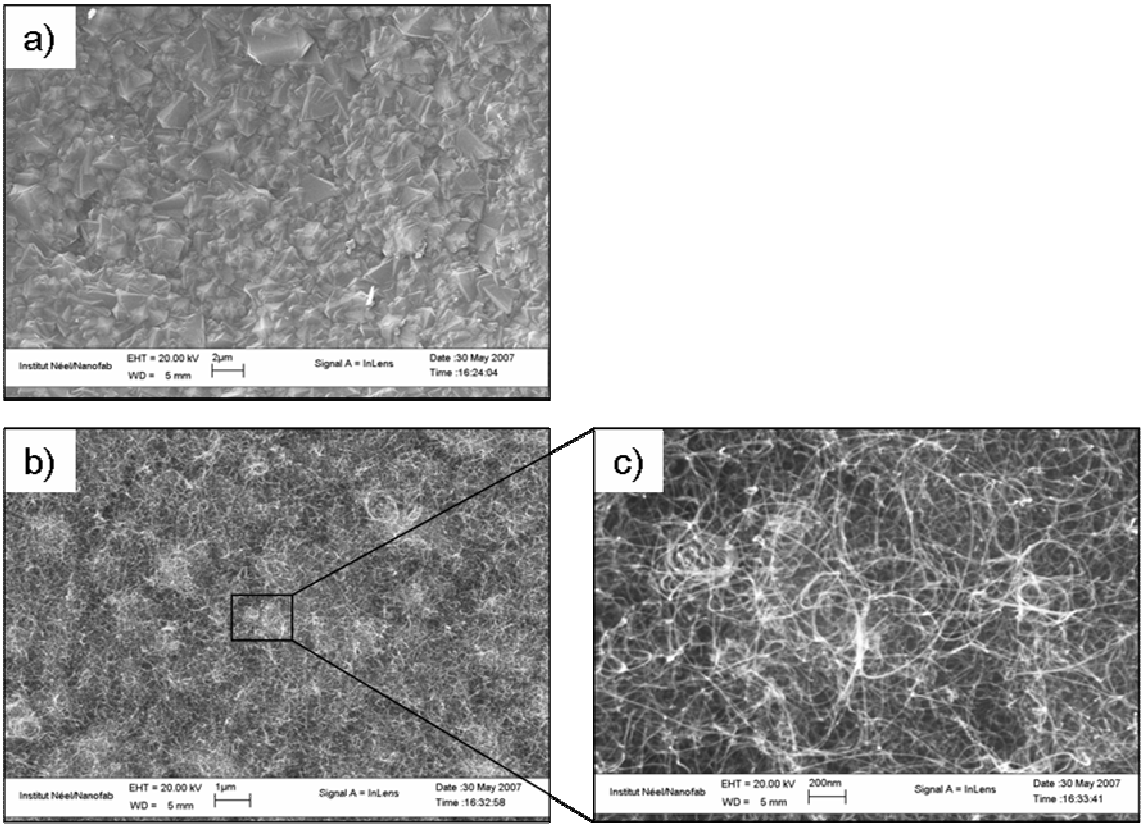


Figure V-7 : Images MEB a) de la surface de diamant nue avant croissance des nanotubes de carbone puis b) après croissance avec c) la formation d'une forêt de nanotubes.

En focalisant sur ce tapis, nous distinguons (figure V-7c) que les nanotubes sont enchevêtrés les uns avec les autres offrant alors une surface spécifique très importante.

Pour vérifier alors le greffage de la biotine sur cet échantillon, nous avons suivi une stratégie différente : nous avons dans un premier temps activé tous les carboxyles présents sur la surface, puis nous avons fait réagir seulement la moitié de l'échantillon avec la biotine (figure V-8).

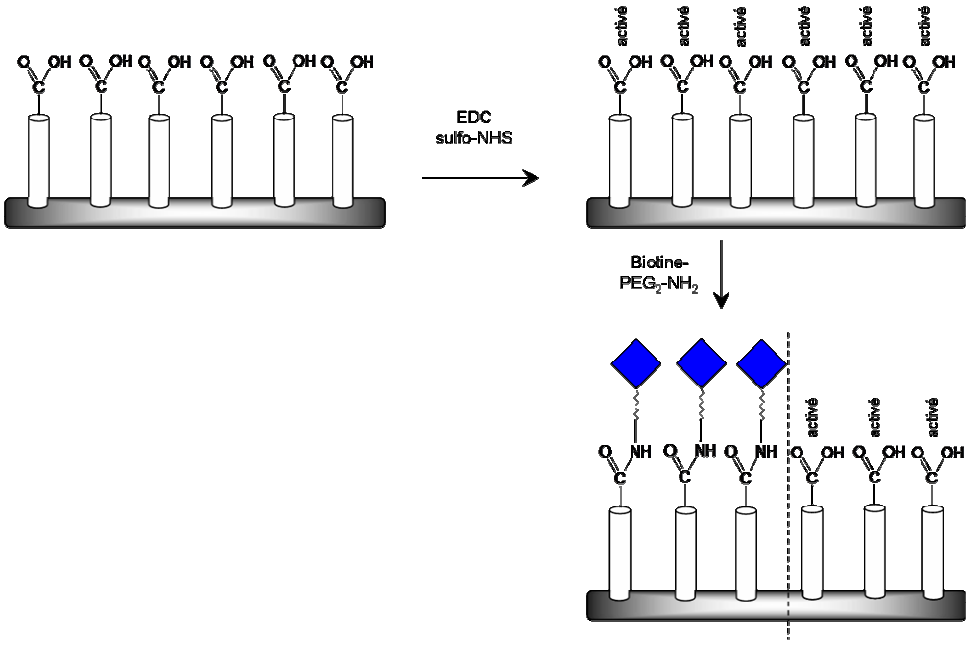


Figure V-8 : Principe de fonctionnalisation partielle par la biotine de la forêt de nanotubes sur diamant.

Il faut savoir qu'après réaction avec la biotine, l'autre moitié des carboxyles situés sur les nanotubes de carbone restent activés.

Après ces réactions, nous avons caractérisé l'échantillon par fluorescence après reconnaissance avec la SAPE. Lors de la première caractérisation par microscopie de fluorescence, aucune différence de contraste de fluorescence n'a pu être observée (figure V-9a). Nous avons alors dénaturé la protéine et effectué à nouveau deux reconnaissances avec la SAPE pour des caractérisations de fluorescence. Nous distinguons alors sur les figures V-9b et V-9c, la présence d'une zone fluorescente (celle qui a été immergée pour réagir avec la biotine) et d'une zone sombre (celle qui n'a pas été en contact avec la biotine).

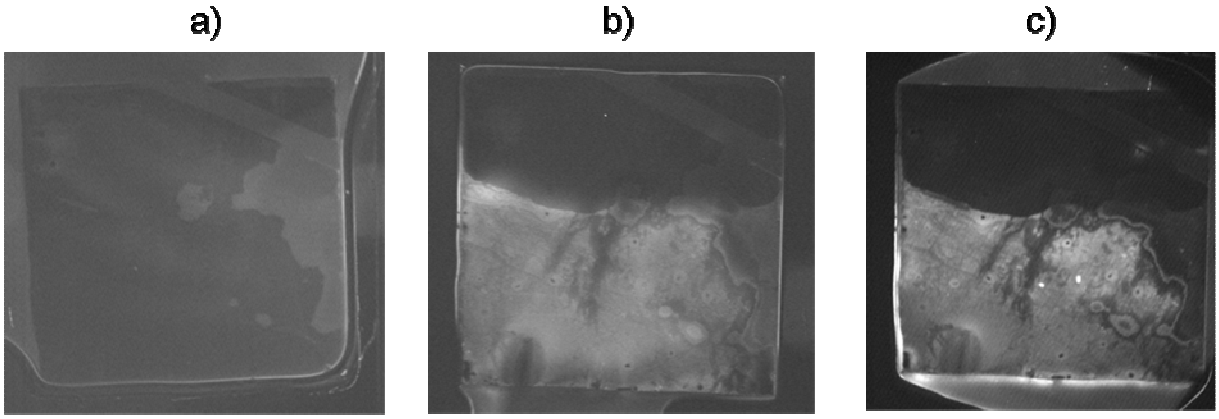


Figure V-9 : Images de fluorescence après a) la première, b) la deuxième et c) la troisième révélations.

La fluorescence obtenue lors de la première révélation sur la zone qui n'a pas été en contact est sans doute due à la présence de fonctions amines libres en grande quantité sur streptavidine mais aussi sur la phycoérythrine réagissant alors sur les carboxyles activés des nanotubes de carbone (figure V-10a). Puis, après dénaturation de la streptavidine et du fluorophore, la SAPE se détache de la biotine dans un cas, mais dans l'autre cas, la SAPE se dénature tout en restant immobilisée. Le fluorophore n'est alors plus actif (figure V-10b). Enfin, lors de la deuxième reconnaissance, la SAPE s'immobilise sur la zone biotinylée, mais elle ne peut plus réagir sur les carboxyles activés puisqu'ils sont déjà occupés (figure V-10c). Seule la zone qui a réagit avec la biotine fluoresce.

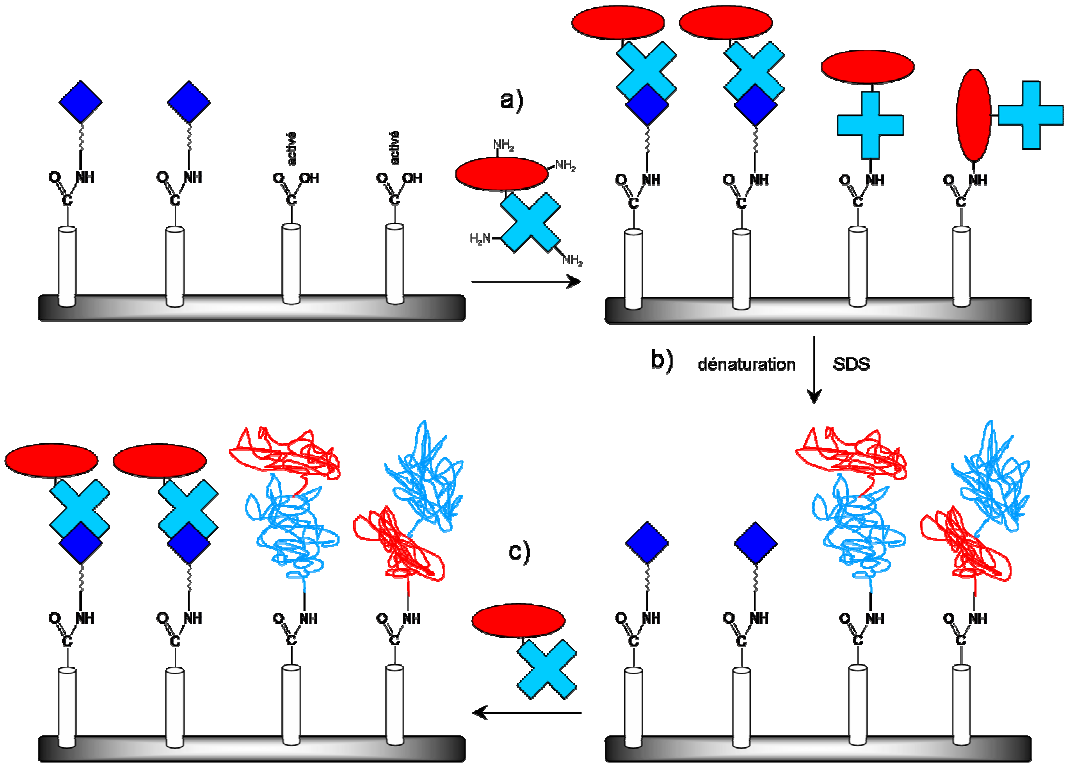


Figure V-10 : Schéma décrivant le processus d'immobilisation de la SAPE sur la zone fonctionnalisée par la biotine et la zone non fonctionnalisée. a) Première reconnaissance biologique (figure V-9a). b) Dénaturation de la SAPE dans une solution de SDS avec la libération des biotines et la présence de SAPEs immobilisées dénaturées. c) Deuxième et troisième reconnaissances biologiques (figures V-9b et V-9c).

Ainsi, par cette expérience nous avons mis en évidence que nous pouvons immobiliser la biotine sur des nanotubes de carbone qui ont crû sur la surface de diamant. Mais aussi, cette expérience démontre qu'il est possible de greffer directement en une étape des enzymes sur la surface du diamant avec comme bras espaceur un nanotube de carbone.

Il reste alors à vérifier que le nanotube peut être utilisé comme « fils conducteur » entre l'enzyme et le diamant. Une nouvelle thèse, avec Sébastien Ruffinatto, vient de débuter sur ces travaux et tâchera alors de répondre à toutes les questions posées. De nouvelles expériences sont prévues en greffant des protéines comme le cytochrome C ou des peroxydases. Le cytochrome C (figure V-11b) possède dans son enveloppe protéique une grande quantité de lysines (figure V-11a), un acide aminé avec une chaine alkyle possédant à son extrémité une fonction amine. Celle-ci peut alors permettre d'immobiliser de manière covalente cette protéine sur les nanotubes. En revanche, du fait de la présence de ces fonctions amines sur l'ensemble de l'enveloppe, le cytochrome C peut être immobilisé avec des orientations différentes. Or, certaines orientations peuvent amoindrir ou empêcher le transfert électronique entre le centre prosthétique et le nanotube. Ainsi, nous projetons d'immobiliser la micro-peroxydase (figure V-11c) possédant une seule lysine et donc un seul site de greffage. En particulier, nous pouvons remarquer que l'enveloppe protéique est très faible limitant alors la distance entre le centre actif et le nanotube.

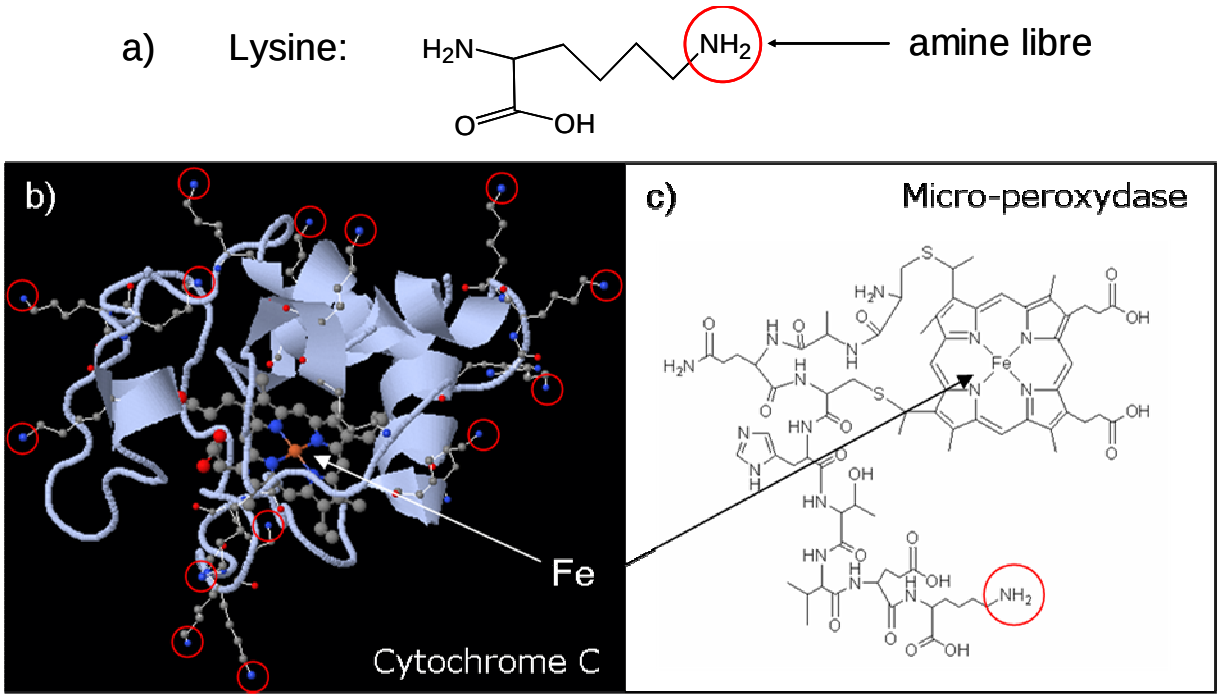


Figure V-11 : a) Formule topologique de la lysine présentant à l'extrémité de sa chaîne une fonction amine libre. b) Structure du cytochrome C avec son centre prosthétique et son enveloppe protéique contenant de nombreuses lysines [20]. c) Formule topologique de la micro-peroxydase avec son centre prosthétique et la présence d'une lysine dans son squelette.

Conclusion

Cette étude a permis de démontrer que pour la première fois il était possible de faire croître des nanotubes de carbone sur la surface du diamant permettant alors la réalisation d'un matériau composite uniquement formé d'atomes de carbone : diamant/nanotubes. L'utilisation de ces nanotubes permet alors d'augmenter considérablement la surface spécifique comme pour les structures en nid d'abeille ou les nanopointes en diamant. Mais l'avantage de l'utilisation des nanotubes est que ces derniers peuvent servir de bras espaceurs pour l'immobilisation de molécules biologiques en une seule étape contrairement aux nanopointes en diamant. De plus, ces nanotubes pourraient être utilisés en tant que « fils conducteurs » entre la protéine et le diamant. Dans ce cas, de nombreux travaux sont encore à effectuer avec la thèse de Sébastien Ruffinatto qui a débuté en octobre 2008, sur la base de ces travaux.

Ce nouveau matériau composite nanostructuré offre de nombreuses applications dans le domaine de l'électroanalyse. En effet, il ouvre la voie pour la conception de biocapteurs basés sur le transfert électronique direct permettant une détection sélective de cibles i. sans le besoin d'un médiateur artificiel ou naturel et ii. avec un facteur d'échange d'électron, impliqué dans le métabolisme, plus efficace (car non basé sur la diffusion).

De plus, étant donnée la grande surface développée de cette nanostructure, il est envisageable d'effectuer la détection de métaux lourds par la méthode dite « Potentiommetric Stripping Analysis ». Elle consiste à accumuler des métaux sur les électrodes en appliquant un potentiel de réduction électrochimique. Cette technique exige une grande surface spécifique pour la précipitation métallique. Elle a d'abord été développée avec du mercure dû à sa propriété de former des amalgames avec d'autres métaux (et donc de les stocker). De ce fait, la porosité intrinsèque de la forêt de NTC couplée aux bas courants de fond des électrodes de diamant offrira de grandes potentialités.

Enfin, les forêts de nanotubes ont été démontrées comme étant biocompatibles, efficaces pour la croissance de neurones et pour la stimulation *[21]*. Mais, les tapis de nanotubes manquent de stabilité mécanique sur la surface de l'électrode avec notamment un contact électrique résistif (dû à l'interface électrode/NTC). Cette stabilité mécanique peut être meilleure avec le matériau composite diamant/nanotubes. L'efficacité du transfert électrique peut être aussi améliorée, permettant ainsi la stimulation neuronale pour des études d'interfaçage avec des neurones. Des premiers contacts ont d'ailleurs été pris avec François Berger, à l'Institut des neurosciences à Grenoble pour réaliser de telles structures.

Références Bibliographiques

[1] R. H. Baughman, A. Zakhidov, W. A. de Heer, *Science* **2002**, *297*, 787.

[2] C. N. Rao, B. C. Satishkumar, A. Govindaraj, M. Nath, *Chemical Physics and Physical Chemistry* **2001**, *2*, 78.

[3] J. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li, Z. Gu, *Analytical Chemistry* **2002**, *74*, 1993.

[4] Z. H. Wang, J. Liu, Q. L. Liang, Y. M. Wang, G. Luo, *Analyst* **2002**, *127*, 653.

[5] J.-S. Gao, T.Arunagiri, J.-J. Chen, P. Goodwill, O. Chyan, J. Perez, D. Golden, *Chemistry of Materials* **2000**, *12*, 3495.

[6] J. Wang, G. Swain, T. Tachibana, K. Kobashi, *Electrochemicals and Solid-State Letters* **2000**, *3*, 286.

[7] C. Terashima, T. N. Rao, B. V. Sarada, N. Spataru, A. Fujishima, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2003**, *544*, 65.

[8] Y. Song, G. Swain, *Analytica Chimica Acta* **2007**, *593*, 7.

[9] H. Masuda, M. Watanabe, K. Yasui, D. Tryk, T. Rao, A. Fujishima, *Advanced Materials* **2000**, *12*, 444.

[10] H. Shiomi, *Japanese Journal of Applied Physics* **1997**, *36*, 7745.

[11] M. Yoshimura, K. Honda, R. Uchikado, T. Kondo, T. N. Rao, D. A. Tryk, A. Fujishima, Y. Sakamoto, K. Yasui, H. Masuda, *Diamond and Related Materials* **2001**, *10*, 620.

[12] Y. S. Zou, Y. Yang, W. J. Zhang, Y. M. Chong, B. He, I. Bello, S. T. Lee, *Applied Physics Letters* **2008**, *92*, 053105.

[13] N. Yang, H. Uetsuka, E. Osawa, C. E. Nebel, *Angewandte Chemie* **2008**, *47*, 5183.

[14] K. Honda, M. Yoshimura, T. N. Rao, D. A. Tryk, A. Fujishima, K. Yasui, Y. Sakamoto, K. Nishio, H. Masuda, *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, *514*, 35.

[15] L. Marty, thèse de doctorat, Université Joseph Fourier, Grenoble **2004**.

[16] A. M. Bonnot, V. Bouchiat, M. Faucher, Patent number: WO 2004 094690

[17] S. Helveg, C. López-Cartes, J. Sehested, P. L. Hansen, B. S. Clausen, J. R. Rostrup-Nielsen, F. Abild-Pedersen, J. K. Nørskov, *Nature* **2004**, *427*, 426.

[18] E. F. Kukovitsky, S. G. L'vov, N. A. Sainov, V. A. Shustov, L. A. Chernozatonskii, *Chemical Physics Letters* **2002**, *355*, 497.

[19] Y. Li, W. Kim, Y. Zhang, M. Rolandi, D. Wang, H. Dai, *Journal of Physical Chemistry B* **2001**, *105*, 11424.

[20] RCSB Protein Data Bank website, www.pdb.org

[21] T. Gabay, E. Jakobs, E. Ben-Jacob, Y. Hanein, *Physica A* **2005**, *350*, 611.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les propriétés physico-chimiques exceptionnelles du diamant font de ce semi-conducteur un excellent candidat pour de nombreuses applications telles que l'électrochimie, la bioélectroanalyse et la bioélectronique. En effet, ce matériau présente toutes les propriétés nécessaires afin de réaliser des biocapteurs et des biopuces : le diamant est biocompatible et le greffage d'entités biologiques par des liaisons covalentes sur sa surface est possible.

Ces aspects ont été clairement mis en évidence dans ce manuscrit, soulignant ainsi la pluridisciplinarité de cette thèse. Les différents chapitres se sont effectivement axés selon trois domaines scientifiques cohérents :

- la physique via la synthèse du matériau diamant**,** avec les différentes méthodes de caractérisation des couches (chapitre II)
- la biologie via l'étude de la biocompatibilité des substrats de diamant non dopés et lourdement dopés au bore (chapitre III)
- la chimie de surface via le greffage d'entités biologiques (chapitre IV).

Ce travail de thèse représente une étude complète allant de la synthèse du matériau jusqu'à sa fonctionnalisation en passant par sa caractérisation. Dans ce contexte, la première partie de ce travail, s'appuyait sur le savoir faire de l'Institut Néel en terme de synthèse de diamant mono- et polycristallin via la « prise en main » de la méthodologie de synthèse et des techniques de caractérisation (Cathodoluminescence, MEB, spectroscopie à effet Raman). Cette appropriation était cruciale dans le sens où la maîtrise du matériau augure de ses

propriétés finales (orientation cristalline, rugosité, dopage), primordiales pour une application en bioélectronique (biocompatibilité, biofonctionnalisation). J'ai ainsi participé à une étude plus fondamentale dédiée à la synthèse et à la caractérisation du diamant en collaboration avec S. Ghodbane.

Mais aussi, il a été nécessaire de définir et de s'approprier d'autres stratégies pour caractériser finement les interfaces qui ont été soumises à des milieux biologiques (AFM, MEB) ou après fonctionnalisation (électrochimie, microscopie de fluorescence, XPS).

Lorsque les échantillons de diamant sont lourdement dopés au bore, ces couches peuvent servir d'électrode pour l'électrochimie, et de nombreuses applications sont désormais possibles dans les domaines environnemental et médical. En effet, des travaux sont actuellement en cours pour réaliser des électrodes en diamant pour la neurostimulation ou pour la fabrication de rétines artificielles. Néanmoins, même si il a été démontré dans la littérature que le diamant intrinsèque demeure biocompatible, aucune étude n'a été effectuée sur la biocompatibilité des électrodes de diamant dopé au bore.

J'ai réalisé cette étude à l'Université de McGill à Montréal en effectuant des expériences de culture cellulaire (adhésion et prolifération des pré-ostéoblastes et des fibroblastes) sur des échantillons intrinsèques et lourdement dopés au bore et de différentes structures cristallographiques.

Dans un premier temps, j'ai pu montrer pour la première fois que les électrodes de diamant polycristallin oxydées naturellement demeurent biocompatibles : il n'a pas été observé d'effet cytotoxique du bore sur l'adhésion des cellules. Néanmoins, l'influence du bore a été démontrée sur la mouillabilité de surface. Ce phénomène reste à étudier puisqu'il n'a jamais été décrit auparavant, mais il peut être exploitable afin de donner un éclairage sur la physico-chimie attachée aux atomes de bore de surface. Des expériences complémentaires sont toutefois nécessaires pour comprendre plus en profondeur ce phénomène.

La rugosité de surface des électrodes a également été étudiée, et j'ai mis en évidence que celle-ci constitue un paramètre important sur l'adhésion cellulaire. L'adhésion est plus importante sur des échantillons nanocristallins contrairement à des échantillons microcristallins. Le diamant nanocristallin constitue donc un matériau d'avenir dans le domaine biomédical pour la restauration des tissus sur la surface de celui-ci.

Dans un second temps, j'ai mené pour la première fois une étude de culture cellulaire sur des échantillons monocristallins, lourdement et faiblement dopés au bore, en fonction des différentes orientations cristallines (100) et (111). Cette recherche constitue une approche macroscopique fondamentale par la compréhension de l'adhésion cellulaire sur le diamant polycristallin. En effet, elle permet d'étudier l'influence des différentes orientations cristallines mais aussi de s'affranchir des joints de grains présents dans le cas du diamant polycristallin. Cette approche renseignera alors sur l'élaboration de diamant polycristallin orienté suivant les applications visées.

Aucun effet cytotoxique du bore n'a été observé lors de l'adhésion cellulaire selon l'orientation (100), alors qu'il semble y avoir une influence de l'orientation (111) sur l'adhésion en fonction du dopage. Cependant, les résultats de prolifération des cellules demeurent contradictoires avec ceux obtenus quant à l'adhésion puisqu'aucun effet n'a été observé.

Des études complémentaires sont alors envisagées afin d'étudier la force d'adhésion des cellules par AFM sur les différents types d'échantillons (poly- ou monocristallins) en fonction du dopage. Ces résultats permettront ainsi de confirmer ou d'infirmer ceux obtenus sur les échantillons monocristallins (111) lourdement dopés au bore.

Ces études de biocompatibilité du diamant dopé au bore sont novatrices dans la communauté diamant puisque l'ensemble des études préalables ont été effectuées uniquement sur le diamant non dopé. De plus, elles sont aujourd'hui de toute première importance car elles ont permis de démontrer que ce matériau pouvait être utilisé en tant qu'électrode implantable pour la neurostimulation. Le diamant polycristallin étant un matériau biocompatible, des entités biologiques actives telles que des oligonucléotides ou des protéines peuvent être greffés, tout en gardant leur activité biologique, sur la surface de celui-ci pour réaliser des biopuces ou des biocapteurs. Ces entités peuvent être immobilisées de manières covalentes via différentes méthodes.

Dans ce manuscrit, j'ai mis en évidence la possibilité d'arrimer une molécule d'intérêt biologique, la biotine, via l'utilisation des sels de diazonium. Le greffage de la biotine constitue alors une voie générique pour la fonctionnalisation par diverses protéines amenant à la réalisation de biocapteurs.

De plus, cette molécule a été greffée de manière locale, sans structuration de surface, grâce à l'utilisation et à l'adaptation d'une méthode développée au CREAB pour la réalisation de puces à ADN sur des lames d'or : l'electrospotting. Ces travaux d'immobilisation électrochimique locale, qui permettent une individualisation des plots, sont pionniers sur diamant.

Cependant, j'ai pu mettre clairement en évidence que l'utilisation des sels de diazonium formait sur la surface, un film qui peut masquer les propriétés de surface du diamant, dont la biocompatibilité.

J'ai alors mené une étude sur l'immobilisation d'un complexe de ruthénium sur la surface du diamant via les sels de diazonium.

Par une méthodologie originale de caractérisations électrochimique et de spectroscopie XPS, j'ai pu démontrer l'existence d'une très bonne corrélation entre les résultats obtenus par ces deux techniques. L'épaisseur de ce film peut être également contrôlée lors du dépôt électrochimique par une méthode pulsée : la chronopotentiométrie.

Néanmoins, contrairement à ce qui est décrit dans la littérature sur le greffage électrochimique via les sels de diazonium, j'ai pu observer, par spectroscopie XPS, que le complexe est majoritairement lié via des ponts azo. Le complexe métallique situé en position para vis-à-vis de la fonction diazonium a sans doute une influence sur la formation de ces fonctions. Des expériences sont alors prévues pour étudier cette influence en éloignant le complexe du groupement diazonium en intercalant des fonctions alkyles entre ces deux entités.

Pour la première fois, un complexe métallique a été greffé sur la surface du diamant, et celui-ci peut être utilisé pour effectuer de l'électrochimieluminescence et même réaliser des biocapteurs. En effet, en utilisant un centre métallique osmium plutôt que ruthénium, ces complexes peuvent servir pour la connexion directe entre une enzyme, de type oxydase, et le diamant.

Des synthèses organiques sont actuellement en cours pour réaliser ces produits.

Un biocapteur n'a cependant pu être réalisé avec l'utilisation des sels de diazonium. En revanche, un biocapteur ampérométrique enzymatique de troisième génération a pu être élaboré avec l'immobilisation d'une peroxydase par une voie de fonctionnalisation qui est à

ce jour en cours de brevet. Notamment, des biopuces à ADN ont été réalisées par cette même voie de fonctionnalisation par greffage d'oligonucléotides.

Enfin, j'ai ouvert la voie vers l'étude d'un nouveau matériau composite original uniquement constitué d'atomes de carbone : diamant/nanotubes. L'utilisation des nanotubes permet d'augmenter considérablement la surface spécifique comme pour les structures en nid d'abeille ou les nanopointes en diamant. Mais l'un des avantages des nanotubes réside dans leur utilisation comme bras espaceurs pour l'immobilisation de molécules biologiques. L'idée centrale de cette approche est alors d'élaborer des biocapteurs dont le centre prosthétique est directement connecté au nanotube.

Cette nouvelle structure composite est également très intéressante pour la neurostimulation. Des premiers contacts ont ainsi été pris avec François Berger (GIN, Institut des Neurosciences à Grenoble) pour utiliser celle-ci et des expériences *in vivo* sont prévues au premier trimestre 2009.

Les résultats présentés constituent seulement des expériences préliminaires car de nombreuses questions restent en suspens quant à la stabilité mécanique et au transfert électronique à l'interface diamant/nanotubes. Ces premiers résultats ont permis d'ouvrir la voie à une nouvelle thèse qui a débuté en octobre 2008 avec Sébastien Ruffinatto que j'ai co-encadré lors de son stage de master de recherche.

ANNEXES

Annexe A : Culture cellulaire

➢ Adhésion et prolifération cellulaire :

Après nettoyage des échantillons polycristallins (ou monocristallins), ces échantillons sont introduits dans une plaque à 24 puits. Ensuite, 500 µl (ou 300 µl pour les échantillons monocristallins) de milieu, correspondant à la lignée cellulaire étudiée, sont incorporés dans chaque puits avec des concentrations de 10^5 cellules/500µl pour l'adhésion ou 2.10^4 cellules/500µl pour la prolifération cellulaire.
La même quantité de cellules est aussi introduite dans des puits ne contenant pas d'échantillons. Ils constituent la référence (le contrôle) puisque les plaques à puits sont élaborées avec un polymère traité qui est biocompatible, de marque BD Falcon™.
Puis, on laisse incuber les cellules sur les échantillons à 37°C dans une atmosphère à 5% de dioxyde de carbone (CO_2), pendant le temps de l'étude (1heure, 2heures ou 4 heures pour l'adhésion ; 3jours, 7jours ou 11jours pour la prolifération). Dans le cas de la prolifération, il nécessaire de changer le milieu tous les deux ou trois jours.

✓ *Préparation des standards :*

Afin de connaître le nombre de cellules présentes sur les échantillons, une courbe d'étalonnage est réalisée. On introduit dans une plaque à 96 puits, 100µl du milieu correspondant à la lignée cellulaire étudiée avec des concentrations en cellules différentes :

Concentrations (cellules/100µl)	0	625	1250	2500	5000	10000	20000	30000	50000

Cette plaque à puits est aussi laissée sous incubation, pendant une heure.

✓ *Etude par colorimétrie :*

Après incubation des cellules sur les échantillons et le contrôle, les échantillons sont retirés du milieu et sont introduits dans des puits contenant 500µl (300µl pour les monocristaux) de milieu ne contenant pas de cellules. En revanche, pour le contrôle, le milieu avec les cellules est retiré pour y ajouter 500µl de milieu sans cellules.

On introduit alors 10% volumique d'un réactif dans chaque puits (contenant les échantillons ; le contrôle et les standards) qui va réagir avec les cellules vivantes et colorer la solution. Le réactif utilisé est un « Quick Cell Proliferation Assay Kit » de chez Biovision. Il contient des sels de tetrazolium WST-1 qui se clivent en présence des mitochondries des cellules pour former du formazan, le colorant. Plus le nombre de cellules sur une surface est grand, plus la coloration va être importante.

On prend 100µl, du contrôle et de chaque puits contenant les échantillons, que l'on introduit dans des puits distincts de la plaque à 96 puits des standards.

Enfin, on mesure l'absorbance de chaque puits : ceux-ci étant illuminés avec un faisceau incident de 450nm de longueur d'onde.

A l'aide de la courbe d'étalonnage (absorbance en fonction du nombre de cellules), il est possible de quantifier le nombre de cellules sur les échantillons après normalisation des surfaces.

➢ <u>Fixation des pré-ostéoblastes pour l'étude de morphologie :</u>

Afin de pouvoir observer au MEB les cellules sur les échantillons, celles-ci sont préalablement « fixées » : elles sont figées tout en gardant leur forme initiale (vivantes). Pour cela plusieurs étapes sont nécessaires.

Après un jour d'incubation sur les échantillons polycristallins, ces derniers sont introduits dans une solution de 2,5% de glutaraldéhyde dans 0,1M de cocadylate de sodium à pH=7,4, pendant une nuit.

Puis, les cellules sont déshydratées : les échantillons sont plongés dans des bains successifs d'éthanol dans l'eau avec des concentrations d'éthanol croissantes :

% éthanol dans l'eau	30	50	70	80	90	95	100

Puis, l'éthanol est substitué par de l'amylacétate par le même principe :

% amylacétate dans l'éthanol	25	50	75	100

Ensuite, l'amylacétate est retiré par la méthode dite de « Critical Point Drying » : les échantillons sont introduits dans du dioxyde de carbone liquide à 42°C et à une pression de 1300 PSI (~90 bar).

Enfin, les échantillons avec les cellules sont métallisés : un dépôt successif d'or et de palladium est réalisé.

➢ Milieux utilisés en fonction des lignées cellulaires :

Fibroblastes (Rat1)	**Pré-ostéoblastes (MC3T3)**
DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 4,5 $g.l^{-1}$ D-glucose + L-glutamine + sodium-pyruvate + Peniciline/Streptomycine + 10% FBS (Foetal Bovine Serum)	αMEM Minimum Essential Medium alpha + L-glutamine + 2,2 $g.l^{-1}$ bicarbonate de sodium + Peniciline/Streptomycine + 10% FBS (Foetal Bovine Serum) Sans: • acide ascorbique • desoxyribonucléosides • ribonucléosides

Annexe B : Caractérisations XPS et microscopie de fluorescence

➢ X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

Cette méthode de caractérisation est particulièrement sensible à la surface des échantillons. Elle est donc parfaitement adaptée pour l'étude de molécules immobilisées sur une surface. L'échantillon est placé en face d'une source de rayons X sous ultravide (10^{-10} torr). Les rayons X arrachent les électrons des niveaux de cœur des atomes. Seuls les électrons arrachés aux atomes de la surface et de la subsurface (3 à 10 nm) sont émis dans la chambre. Les électrons éjectés possèdent ainsi différentes énergies cinétiques, caractéristiques de chaque type d'atome et elle est décalée (« shiftée ») en fonction de l'environnement chimique auquel cet atome est lié. Ceci permet alors d'identifier également les atomes voisins et le type de ces liaisons avec l'atome excité. La figure B-1 illustre le mécanisme d'éjection des photoélectrons.

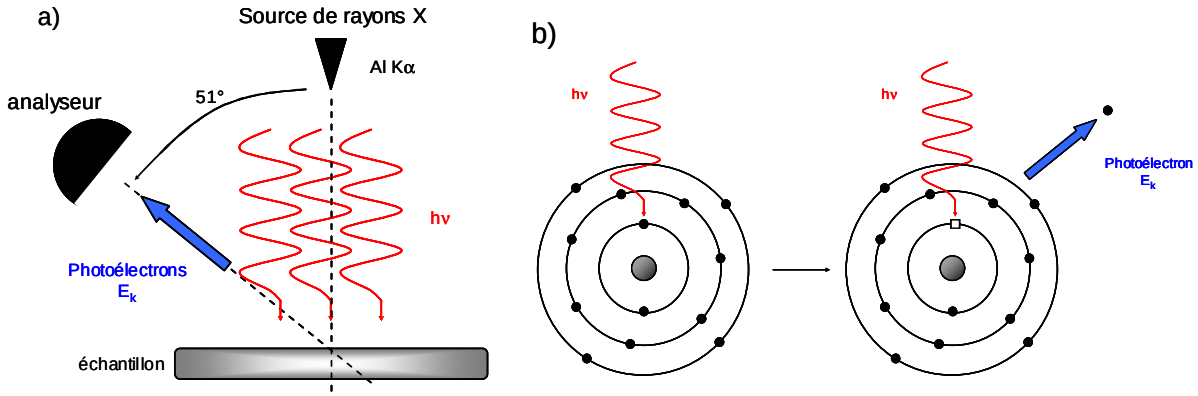


Figure B-1 : Principe de la spectroscopie XPS.

La relation entre l'énergie cinétique et l'énergie de liaison des électrons émis par un atome donné, peut être modélisée par l'équation :

$$E_K = h\nu - E_B - \Phi \qquad \textit{Equation B-1}$$

Avec : E_K : énergie cinétique de l'électron éjecté

$h\nu$: énergie de la source des rayons X

E_B : énergie de liaison de l'électron du niveau de cœur

Φ : travail de sortie du matériau

Nous avons pu caractériser par XPS les molécules greffées sur différentes surfaces avec Jean-Charles Arnault au LIST (CEA de Saclay).

Le système utilisé est équipé d'une source de rayons X de 1486,7 eV (anode AlK_{α} monochromatisée) et les énergies des photoélectrons sont mesurées par un analyseur hémisphérique situé à 51° par rapport à la normale à la surface lorsque l'échantillon n'est pas tilté.

En tiltant ce dernier, il est alors possible de diminuer l'épaisseur de caractérisation de la couche et donc de rendre plus sensible la caractérisation au niveau de la surface.

Les spectres présentés dans le cadre de ce travail ont été réalisés à différents angles d'analyse : en incidence normale (θ=51°) (figure B-2a), avec un tilt de l'échantillon de 15° (θ=66°) (figure B-2b), et de 30° (θ=81°).

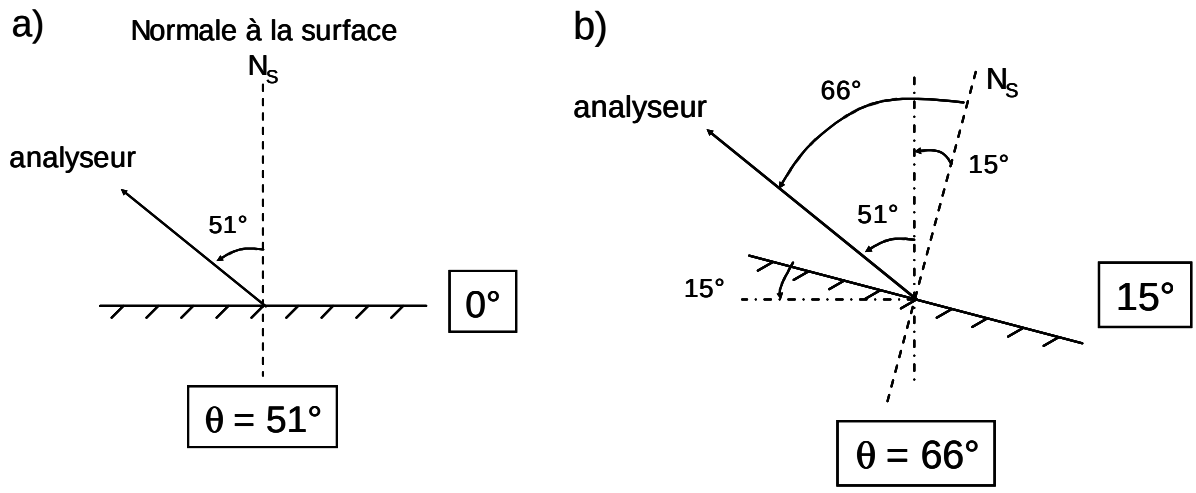


Figure B-2 : Principe de la caractérisation XPS à différents angles d'analyse : a) en incidence normale (θ=51°), b) avec un tilt de l'échantillon de 15° (θ=66°).

Avant l'étude spectrale, les énergies de liaison ont été référencées sur or avec le pic $Au4f_{7/2}$ localisé à 83,6 eV. Puis, après un spectre global, des spectres haute définition de chaque plage d'énergie sont pris autour du niveau de cœur de différents atomes, avec une résolution de 0,5 eV.

La procédure de déconvolution des différents spectres a été effectuée à l'aide d'un logiciel « peakfit » après lissage de ces spectres. Pour extraire les composantes des zones C1s, N1s et du doublet Ru3d, nous avons utilisé la fonction de Voigt avec une largeur à mi-hauteur

de la lorentzienne de 0,2, 0,6, et 0,24 eV respectivement. La largeur de la gaussienne à été considérée comme un paramètre ajustable.

Enfin, pour des mesures semi-quantitatives, les aires sous chaque composante ont été calculées et leur ratio par rapport à l'aire totale ont été reporté en tenant compte des sections efficaces de chaque élément[*].

➢ La microscopie de fluorescence

La microscopie de fluorescence est une méthode de caractérisation de choix pour nos études de reconnaissance. En effet, elle est très sensible (figure I-23), elle permet de comparer les résultats et de suivre l'évolution des contrastes de fluorescence. Cependant, cette méthode de caractérisation n'est pas quantitative.

Dans le cas de nos surfaces de diamant fonctionnalisées par la biotine, nous avons utilisé la streptavidine-R-phycoérythrine (SAPE) pour caractériser la présence de la biotine en surface. La SAPE est constituée de la streptavidine, permettant la reconnaissance biologique avec la biotine, et d'un fluorophore, la phycoérythrine. Cette dernière est excitée par un faisceau de lumière dans une gamme de longueurs d'onde située entre 496 et 565 nm, et elle émet alors à 578 nm.
Deux étapes sont nécessaires avant la révélation de la reconnaissance biologique entre la biotine et la streptavidine :

1- Le blocage de la surface avec une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) pendant dix minutes, puis rinçage au PBS
2- La reconnaissance biologique entre la biotine immobilisée sur la surface et la SAPE, pendant dix minutes dans le noir, puis rinçage au PBS et enfin le dépôt d'une lamelle de verre sur l'échantillon.

La première étape consiste à bloquer un maximum de sites d'adsorption non spécifiques situés à la surface du diamant. Même si le diamant est réputé être un matériau sur

[*] J. H. Scofield, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1976**, *8*, 129

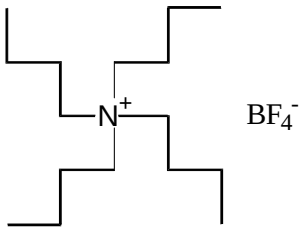
lequel l'adsorption non spécifique est très faible, cette étape est nécessaire pour augmenter les contrastes de fluorescence.

Puis, la deuxième étape de reconnaissance s'effectue dans le noir afin d'éviter que le fluorophore ne perde son activité.

Enfin, la révélation est réalisée à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé d'une caméra CCD, sous une lumière verte, avec des grossissements allant de 1,5x à 40x, et des temps d'accumulation différents (de l'ordre de la dizaine de millisecondes). Les images des plots sont prises et leurs intensités de fluorescence sont mesurées par le logiciel Image Pro Plus.

Annexe C : Etude XPS de l'électrolyte support (NBu_4BF_4)

Le greffage d'entités sur la surface du diamant par électrochimie via les sels de diazonium s'effectue dans un électrolyte support constitué d'un solvant, l'acétonitrile, et d'ions, le tetrabutylammonium tetrafluoroborate ($NBu_4BF_4 = NBu_4^+ + BF_4^-$) (figure C-1).
Nous pouvons voir, pour le tetrabutylammonium (NBu_4^+), la présence d'atomes d'azote et de carbone pouvant interférer avec nos analyses.



<u>Figure C-1</u> : Formule topologique du tetrabutylammonium tetrafluoroborate ($NBu_4BF_4 = NBu_4^+ + BF_4^-$).

Afin de vérifier que les atomes de ces ions n'interviennent pas lors de la caractérisation XPS, nous avons alors effectué sur un même échantillon une série d'expériences.
Dans un premier temps, après greffage du complexe de ruthénium sur la surface d'un échantillon diamant, celui-ci n'a pas été rincé mais séché à l'air.
Puis, cet échantillon a été caractérisé par XPS.
Dans un second temps, une deuxième caractérisation XPS a été effectuée après rinçage abondant à l'acétonitrile de ce même échantillon.

Nous distinguons sur le spectre large la présence d'une composante très importante du fluor, avant rinçage, provenant des fluors du tetrafluoroborate (BF_4^-) (figure C-2). Une transition Auger est même observée. Puis, après rinçage, ces deux composantes disparaissent.

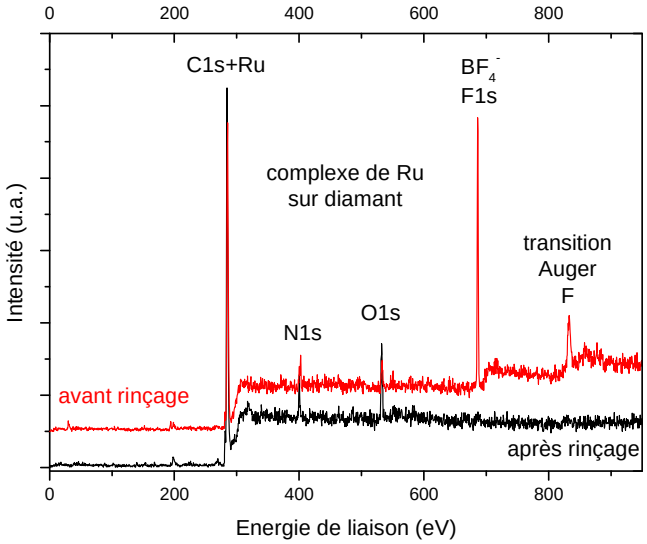


Figure C-2 : Spectres XPS globaux obtenus avant (rouge) et après (noir) rinçage d'un échantillon de diamant fonctionnalisé avec le complexe de ruthénium.

En ce qui concerne le tetrabutylammonium, les zones spectrales N1s et C1s ont été étudiées (figure C-3).

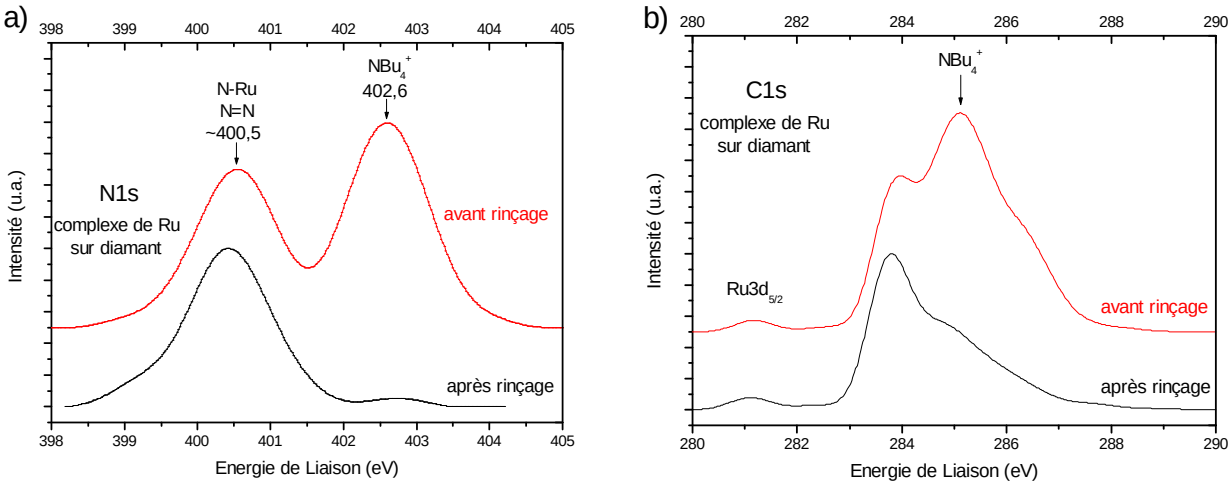


Figure C-3 : Spectres XPS dans la zone a) N1s et b) C1s, obtenus avant (rouge) et après (noir) rinçage d'un échantillon de diamant fonctionnalisé avec le complexe de ruthénium.

Dans la zone spectrale N1s, nous pouvons noter que les électrons de cœur de l'azote de l'ammonium possèdent des niveaux élevés en énergie situés à 402,6 eV, ce qui correspond à des énergies qui se situent au-delà de celles étudiées (figure C-3a). En revanche, les électrons de cœur des carbones des chaines alkyles possèdent des niveaux d'énergie situés dans la zone d'analyse (figure C-3b). Ainsi, la zone C1s peut être interférée par ce cation.

Cependant, nous distinguons, dans les deux cas (pour la zone N1s ainsi que la zone C1s) une diminution très importante après rinçage de ces deux composantes avec une totale disparition de celle située à 402,6 eV, dans le cas de la zone spectrale N1s. Nous avons donc conclu que celle attribuée aux carbones du cation était négligeable après rinçage de l'échantillon.

Il ne faut donc pas tenir compte des atomes de l'électrolyte support dans l'étude XPS, lorsque les échantillons ont été rincés abondamment.

Communications

Publications :

Highly and heavily boron doped diamond films
A. Deneuville, C. Baron, S. Ghodbane, C. Agnès
Diamond and Related Materials, **2007**, *16*, 915

Surface Bio-functionalization of boron doped diamond
M. Bonnauron, C. Agnès, P. Mailley, J.-C. Arnault, J. de Sanoit, C. Mer, L. Rocha, P. Bergonzo, M. Nesladek, F. Omnès, O. Elmazria
Material Research Society Symposium Proceedings, **2007**, *956*, 81

XPS study of ruthenium tris-bipyridine electrografted from diazonium salt derivative on microcrystalline boron doped diamond
C. Agnès, J.-C. Arnault, F. Omnès, B. Jousselme, M. Billon, P. Mailley, G. Bidan
Soumission à *Physical Chemistry Chemical Physics*

Cell adhesion properties of polycrystalline diamond: effect of boron doping and roughness
C. Agnès, F. Azari, M. Tabrizian, F. Omnès, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Bonnauron, S. Ghodbane
Soumission à *Advanced Materials*

Effect of the substrate position below the plasma ball on the crystalline quality of boron doped {111}-homoepitaxial diamond films
S. Ghodbane, F. Omnès, C. Agnès
Soumission à *Journal of Applied Physics*

Comparison of the XPS signals from homoepitaxial {111}, {100} and polycrystalline boron doped diamond films
S. Ghodbane, D. Ballutaud, F. Omnès, C. Agnès
Soumission à *Journal of Applied Physics*

Local bio-sensitization of polycrystalline boron doped diamond surfaces with biotin using electrospotting
C. Agnès, M. Bonnauron, F. Omnès, J.-C. Arnault, P. Bergonzo, M. Nesladek, P. Mailley
Manuscrit en préparation pour *Physica Status Solidi A*

Conférences orales et posters

MRS Boston 2008 (Boston, Etats-Unis, 1er-5 décembre 2008)
Materials Research Society
Cell Attachment and Proliferation on Undoped and Heavily Boron Doped Polycrystalline Diamond (poster)
C. Agnès, F. Azari, M. Tabrizian, F. Omnès, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Bonnauron, S. Ghodbane

MADICA 2008 (Rabat, Maroc, 30 octobre - 1er novembre 2008)
6èmes Journées Maghreb-Europe : Les Matériaux et leurs Applications aux Dispositifs Capteurs
Le diamant dopé au bore, un matériau biofonctionnel pour les biotechnologies (présentation orale)
P. Mailley, C. Agnès, E. Van-Hove, F. Azari, S. Ruffinatto, J. De Sanoit, F. Omnès, P. Bergonzo, M. Tabrizian

XI colloque du GFB (Lacanau, France, 29 septembre - 2 octobre 2008)
Groupe Français de Bioélectrochimie
Le diamant, un matériau bio-fonctionnel (présentation orale)
C. Agnès, F. Omnès, P. Mailley

Diamond 2008 (Sitges, Espagne, 7-11 septembre 2008)
19th European Conference on Diamond, Diamond-Like Materials, Carbon Nanotubes, and Nitrides
Cell adhesion on polycrystalline boron doped diamond (poster)
C. Agnès, F. Azari, M. Tabrizian, F. Omnès, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Bonnauron, S. Ghodbane

MINATEC CROSSROADS'08 (Grenoble, France, 23-27 juin 2008)
Diamond, a biofunctional material (poster)
C. Agnès, F. Omnès, P. Mailley

SBDD XIII (Hasselt, Belgique, 25-28 février 2008)
Surface and Bulk Defects in CVD Diamond films
XPS study of *p*-(tris(bipyridine)Ru^{2+})phenyl electrografted from diazonium salt derivative on microcrystalline boron doped diamond (présentation orale)
C. Agnès, J.-C. Arnault, F. Omnès, B. Jousselme, M. Billon, P. Mailley, G. Bidan

BES 07 (Toulouse, France, 1-4 avril 2007)
19th International Symposium in Bioelectrochemistry
Electrochemistry as a tool for BDD electrode biofunctionalization (présentation flash + poster)
C. Agnès, F. Omnès, P. Mailley

SBDD XII (Hasselt, Belgique, 28 février - 2 mars 2007)
Surface and Bulk Defects in CVD Diamond films
Electrochemical derivatization of BDD electrodes using functional diazonium salts (présentation orale)
C. Agnès, M. Bonnauron, F. Omnès, J.-C. Arnault, P. Bergonzo, P. Mailley

MRS Boston 2007 (Boston, Etats-Unis, 26-30 novembre 2007)
Materials Research Society
Surface Bio-functionalization of boron doped diamond (poster)
M. Bonnauron, C. Agnès, P. Mailley, J.-C. Arnault, J. de Sanoit, C. Mer, L. Rocha, P. Bergonzo, M. Nesladek, F. Omnès, O. Elmazria

MADICA 2006 (Mahdia, Tunisie, 30 octobre - 1er novembre 2006)
5èmes Journées Maghreb-Europe : Les Matériaux et leurs Applications aux Dispositifs Capteurs
Activation électrochimique d'électrodes diamant dopé au bore pour la conception d'interfaces bio sensitives (présentation orale)
C. Agnès, F. Omnès, P. Mailley

Diamond 2006 (Estoril, Portugal, 3-8 septembre 2006)
17th European Conference on Diamond, Diamond-Like Materials, Carbon Nanotubes, and Nitrides
Highly and heavily boron doped diamond films (présentation orale invitée)
A. Deneuville, C. Baron, S. Ghodbane, C. Agnès

Le diamant dopé au bore pour la bioélectronique : Biocompatibilité et Fonctionnalisation

Résumé :

Afin de réaliser des électrodes pour des applications en bioélectroniques, des couches minces polycristallines et homoépitaxiées d'orientations (100) et (111) de diamant dopé bore ont été synthétisées. Celles-ci ont été obtenues par dépôt en phase vapeur (CVD – Chemical Vapour Deposition) assisté par plasma micro-onde puis caractérisées par spectroscopie Raman, cathodoluminescence et Microscopie Electronique à Balayage (MEB).
Une étude préalable de la biocompatibilité du diamant en fonction de différents paramètres (dopage, rugosité et orientation cristalline) a été réalisée par culture de deux lignées cellulaires : fibroblastes et pré-ostéoblastes.
Les électrodes de diamant ont également été fonctionnalisées avec la biotine qui a été greffée en plusieurs étapes, de manière locale par electrospotting via les sels de diazonium. L'utilisation d'un complexe de ruthénium, fonctionnalisé par des sels de diazonium, a permis de démontrer que l'épaisseur du film électrogénéré était maîtrisée par chronopotentiométrie d'après les analyses XPS et électrochimique.
Enfin, une nouvelle structure hybride nanotubes de carbone/diamant a été réalisée afin d'utiliser les nanotubes comme bras espaceur pour le greffage de la biotine.

Mots clés : Diamant dopé bore, biocompatibilité, bio-fonctionnalisation, electrospotting, sels de diazonium, biotine, nanotubes de carbone

Boron Doped Diamond for Bioelectronics: Biocompatibility and Functionalization

Summary:

In order to produce electrodes for bioelectronic applications, polycrystalline and homoepitaxial (100) and (111) Boron Doped Diamond (BDD) films were synthesized. Those films were grown by Microwave Plasma enhanced Chemical Vapour Deposition (MPCVD) and characterized by cathodoluminescence, Raman spectroscopy and SEM.
First, diamond biocompatibility was studied according to different parameters (doping, roughness and crystalline orientation), through the culture of two different cell lines: fibroblasts and pre-osteoblasts.
BDD electrodes were locally functionalized with biotin in several steps, using electrospotting of diazonium salts. Chronopotentiometry, through the electrografting of aryl diazonium-derivatized ruthenium-complex, allows controlling the electrogenerated film thickness as demonstrated using electrochemical and XPS characterizations.
Finally, a new hybrid structure carbon nanotubes/diamond was realized and nanotubes were used as spacer arm to graft biotin.

Keywords: Boron doped diamond, biocompatibility, biofunctionalization, electrospotting, diazonium salts, biotin, carbon nanotubes