



HAL
open science

Immobilisation de biomolécules sur des monocouches auto-assemblées et élaboration de sondes AFM à nanotubes de carbone fonctionnalisés pour des mesures d'interactions ligand-récepteur

Matthieu Meillan

► **To cite this version:**

Matthieu Meillan. Immobilisation de biomolécules sur des monocouches auto-assemblées et élaboration de sondes AFM à nanotubes de carbone fonctionnalisés pour des mesures d'interactions ligand-récepteur. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0109 . tel-01340958

HAL Id: tel-01340958

<https://theses.hal.science/tel-01340958>

Submitted on 3 Jul 2016

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ CHIMIE ORGANIQUE

Par Matthieu, MEILLAN

**Immobilisation de biomolécules sur des monocouches auto-assemblées et
élaboration de sondes AFM à nanotube de carbone fonctionnalisés pour des
mesures d'interactions ligand-récepteur**

Sous la direction de : Sophie, MARSAUDON
(co-directeur : Luc, VELLUTINI)

Soutenue le 23 juillet 2014

Membres du jury :

Mme. DUFOUR, Isabelle	Professeur, Université de Bordeaux	Présidente
M. LECLERE, Philippe	Chercheur qualifié du FNRS, Université de Mons (Belgique)	Rapporteur
M. WONG CHI MAN, Michel	Directeur de Recherche CNRS, Université de Montpellier	Rapporteur
M. PELLEQUER, Jean-Luc	Chercheur CEA, LIRM Marcoule	Examineur
Mme MARSAUDON, Sophie	Maître de Conférences, Université de Bordeaux	Directrice de thèse
M. VELLUTINI, Luc	Maître de Conférences, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Titre : Immobilisation de biomolécules sur des monocouches auto-assemblées et élaboration de sondes AFM à nanotube de carbone fonctionnalisés pour des mesures d'interactions ligand-récepteur

Résumé :

Lors de la mise au point de biocapteurs, le contrôle de l'état de surface sur laquelle sont immobilisées les biomolécules est un paramètre crucial pour la fiabilité et la reproductibilité des mesures. Pour ce travail de Thèse, deux objectifs principaux ont été fixés :

- obtenir de façon reproductible des films organiques fonctionnels capables de rendre les surfaces inorganiques biocompatibles afin d'immobiliser des biomolécules sans les dénaturer.
- se doter d'outils innovants afin d'analyser la distribution de biomolécules sur la surface et d'évaluer leur activité biologique à l'échelle de la molécule unique.

L'immobilisation a été réalisée sur des SAMs terminées par une fonction acide carboxylique.

Pour imager les surfaces nous avons choisi la Microscopie Atomique de Force (AFM) qui permet d'obtenir des informations à l'échelle nanométrique et de mesurer des interactions moléculaires de l'ordre du piconewton (10^{-12} N).

Des CNTs, générés par dépôt chimique en phase vapeur, sont fixés sur une pointe AFM. Puis ils sont biofonctionnalisés selon un protocole de trempage original afin d'obtenir une modification chimique sélective de leur apex. Les interactions entre un récepteur, immobilisé sur la surface, et son ligand, lié de façon covalente au CNT, sont mesurées à l'échelle de la molécule unique.

Mots clés : Monocouches Auto-Assemblées (SAMs), Biofonctionnalisation, Nanotubes de Carbone (CNTs), Interactions moléculaires

Title : Immobilization of biomolecules on self-assembled monolayers and elaboration of carbon nanotube AFM probes functionalized for ligand-receptor interactions measures

Abstract :

During the development of biosensors, control of the surface on which the biomolecules are immobilized is a crucial parameter for the reliability and reproducibility of the measurements. For this PhD work, two main objectives were set:

- obtain in a reproducible way functional organic films able to make inorganic surface biocompatible for the immobilization of biomolecules without any denaturation.
- develop innovative tools in order to analyze the distribution of biomolecules on the surface et evaluate their biological activity at single molecule scale

The immobilization step was done on SAMs terminated by a carboxylic acid function.

In order to image surfaces, Atomic Force Microscopy (AFM) was chosen. This technique permits to obtain information at nanometric scale and to measure molecular interactions in the range of piconewton forces (10^{-12} N).

MWCNTs were linked to a commercial AFM tip by micro-welding under optical microscopy. CNTs were biofunctionalized at the nanotube apex by an original dipping procedure.

The interactions between a ligand, immobilized on the surface, and a receptor covalently linked to a CNT have been characterized.

Keywords : Self-Assembled Monolayers (SAMs), Biofunctionalization, Carbon Nanotubes (CNTs), Molecular interactions

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE	1
I. CHAPITRE I :	7
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR L'IMMOBILISATION D'OBJETS BIOLOGIQUES SUR DES SURFACES CHIMIQUEMENT MODIFIEES ET LA FORMATION DES MONOCOUCHEES AUTO-ASSEMBLEES	7
A. Immobilisation d'objets biologiques sur une surface	9
1. Immobilisation non covalente	9
a) <i>Par adsorption physique</i>	9
b) <i>Par affinité biologique</i>	10
2. Immobilisation covalente	11
a) <i>Sur des monocouches terminées acide carboxylique</i>	12
b) <i>Sur des monocouches terminées par d'autres fonctions</i>	14
3. Problème de l'adhésion non spécifique	17
B. Monocouches auto-assemblées (SAMs)	19
1. Principe de formation de SAMs sur SiO ₂	21
2. Paramètres influençant la formation et l'organisation de SAMs	25
a) <i>L'eau et le solvant</i>	25
b) <i>La température de greffage</i>	27
c) <i>La longueur de la chaîne carbonée</i>	28
d) <i>Le groupement terminal</i>	28
e) <i>Les fonctions favorisant un auto-assemblage</i>	29
Les cycles aromatiques et les interactions π-π	29
Les liaisons hydrogène intermoléculaires	30
3. Formation de SAMs mixtes	34
a) <i>Par co-adsorption de deux molécules</i>	35
b) <i>Par additions successives de deux molécules.</i>	39
C. Résumé	41
II. CHAPITRE II :	43
ELABORATION DES MONOCOUCHEES AUTO-ASSEMBLEES (SAMS)	43
A. Synthèse des SAMs présentant un motif urée	45
1. Synthèse des agents de couplage siliciés	46
a) <i>Organosilane terminé par un groupement méthyle</i>	46
i. Synthèse du 10-isocyanatodéc-1-ène	47

Sommaire

ii.	Couplage entre l'amine et l'isocyanate	48
iii.	Hydrosilylation de l'urée insaturée	48
b)	<i>Organosilane terminé par une fonction ester nitrobenzylique</i>	50
i.	Protection de la fonction amine et formation de l'ester nitrobenzylique	51
ii.	Déprotection de la fonction amine et réaction avec l'isocyanate	52
iii.	Hydrosilylation de l'urée insaturée	53
2.	Synthèse et caractérisation des SAMs-urée	54
a)	<i>Rappels sur les substrats utilisés</i>	54
b)	<i>Synthèse et caractérisation de la SAM-urée-NO₂ 100%</i>	55
i.	Greffage des molécules avec un groupement trichlorosilyle	55
ii.	Greffage des molécules avec un groupement triméthoxysilyle.	57
▪	Caractérisation du greffage par PM-IRRAS	57
▪	Caractérisation du greffage par AFM	59
c)	<i>Synthèse et caractérisation de la SAM-urée-CH₃ 100%</i>	60
i.	Caractérisation du greffage par PM-IRRAS	61
ii.	Caractérisation du greffage par AFM	62
d)	<i>Synthèse et caractérisation de SAMs-urée mixtes</i>	63
i.	Greffage de la SAM-urée-NO ₂ 30%	63
▪	Caractérisation du greffage par PM-IRRAS	63
▪	Caractérisation du greffage par AFM	65
ii.	Greffage de SAM-urée-NO ₂ 10%	66
▪	Caractérisation du greffage par PM-IRRAS	66
▪	Caractérisation du greffage par AFM	67
B.	Synthèse de SAMs présentant un chaîon PEG	68
1.	Synthèse de l'organosilane terminé par une fonction ester nitrobenzylique	69
a)	<i>Couplage entre la chaîne alkyle et le groupement PEG</i>	70
b)	<i>Oxydation de la fonction alcool et protection de l'acide</i>	70
c)	<i>Hydrosilylation de l'ester insaturé</i>	71
2.	Synthèse et caractérisation des SAMs-PEG-NO ₂	71
a)	<i>Greffage du composé avec un groupement triméthoxysilyle</i>	71
i.	Caractérisation du greffage par PM-IRRAS	71
ii.	Caractérisation du greffage par AFM	72
b)	<i>Optimisation du temps de greffage pour le composé avec un groupement triméthoxysilyle</i>	73
i.	Caractérisation du greffage par PM-IRRAS	74
ii.	Caractérisation du greffage par AFM	74
c)	<i>Greffage du composé avec un groupement trichlorosilyle</i>	75
i.	Caractérisation du greffage par PM-IRRAS	76
ii.	Caractérisation du greffage par AFM	77
C.	Conclusion	77

III. CHAPITRE III :	79
FONCTIONNALISATION DES SAMS	79
A. Biofonctionnalisation des SAMs avec des nanoparticules recouvertes de protéine A	81
1. SAMs avec motif urée	82
a) <i>Immobilisation covalente des NP-pA</i>	82
i. Photodéprotection des fonctions acide carboxylique	83
ii. Activation des fonctions acide carboxylique	85
iii. Immobilisation covalente des NP-pA	88
b) <i>Adhésion non-spécifique des NP-pA</i>	91
2. SAMs avec chaînon PEG	93
a) <i>Immobilisation covalente des NP-pA</i>	93
i. Photodéprotection des fonctions acide carboxylique	94
ii. Activation des fonctions acide carboxylique	95
iii. Immobilisation covalente des NP-pA	96
b) <i>Adhésion non-spécifique des NP-pA</i>	98
B. Fonctionnalisation des SAMs-urée avec des NP-PEG-NH₂	99
1. Adhésion non-spécifique des NP-PEG-NH ₂ sur la SAM-urée-CH ₃ 100%	99
2. Immobilisation covalente des NP-PEG-NH ₂ sur la SAM-urée-COOH 100%	101
3. Immobilisation covalente des NP-PEG-NH ₂ sur la SAM-urée-COOH 30% et la SAM-urée-COOH 10%	104
C. Biofonctionnalisation de la SAM-urée-COOH 100% avec le Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV)	108
1. Immobilisation covalente du TMV sur la SAM-urée-COOH 100%	108
2. Contrôle de la hauteur du virus	110
D. Conclusion	111
IV. CHAPITRE IV :	113
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES NANOTUBES ET LEURS FONCTIONNALISATIONS	113
A. Les nanotubes de carbone	115
1. Différents types de nanotubes	116
a) <i>Les nanotubes multiparois (ou multifeuillets)</i>	117
b) <i>Les nanotubes monoparois (ou monofeuillets)</i>	118

Sommaire

2.	Propriétés des nanotubes	119
a)	<i>Propriétés mécaniques</i>	119
b)	<i>Propriétés thermiques</i>	121
c)	<i>Propriétés électroniques</i>	122
3.	Méthodes de synthèse des nanotubes	123
a)	<i>Méthode de l'arc électrique</i>	124
b)	<i>Méthode par ablation laser</i>	126
c)	<i>Méthode par décomposition catalytique du monoxyde de carbone : HiPCO</i>	127
d)	<i>Méthode par dépôt chimique en phase vapeur catalytique</i>	128
i.	Influence de la taille et de la nature des particules de catalyseur	129
ii.	Influence du précurseur carboné utilisé	130
iii.	Influence de la température de synthèse	131
4.	Les nanotubes de carbone comme sondes pour l'AFM	132
a)	<i>Avantages des nanotubes de carbone en tant que pointes AFM</i>	132
i.	Leurs tailles nanométriques et leurs hauts rapports d'aspect	132
ii.	Grande résistance mécanique	134
iii.	Faible réactivité chimique	135
b)	<i>Désavantages des nanotubes de carbone en tant que pointes AFM</i>	136
c)	<i>Techniques utilisées au Laboratoire (CBMN) pour fixer les nanotubes sur les pointes AFM</i>	137
B.	Biofonctionnalisation des pointes AFM avec ou sans nanotubes	138
1.	Biofonctionnalisation d'une pointe AFM	138
2.	Biofonctionnalisation d'une pointe AFM munie d'un nanotube	142
C.	Résumé	145
V.	CHAPITRE V :	147
	FIXATION DE NANOTUBES MULTIPAROIS SUR UNE POINTE AFM ET BIOFONCTIONNALISATION	147
A.	Synthèse des MWCNT	150
B.	Soudure des MWCNT sur une pointe AFM et oxydation	152
1.	Dépôt du film de nickel sur les pointes AFM	152
2.	Soudure du nanotube sous microscopie optique	152
3.	Contrôle de la fixation au MEB	154
C.	Caractérisation de SAMs-urée avec des MWCNT fixés sur des pointes AFM	157
1.	Réponse mécanique d'un MWCNT sur une SAM	158

Sommaire

2.	Réponse mécanique d'un MWCNT sur les SAMs-urée, cas d'un levier de raideur intermédiaire	162
a)	<i>Reproductibilité des CAR en différents points des SAMs-urée</i>	162
b)	<i>Comparaison des réponses obtenues sur les différentes SAMs</i>	165
3.	Evolution de la réponse mécanique d'un MWCNT selon le traitement subi par l'extrémité lors de la soudure	167
4.	Images de SAMs avec des pointes AFM à MWCNT	173
a)	<i>Images de la SAM-urée-CH₃ 100% : comparaison pointe silicium et pointe à MWCNT et comparaison mode « tapping » et mode FM</i>	173
b)	<i>Particularité de l'imagerie de SAMs avec un nanotube</i>	176
c)	<i>Robustesse des pointes à nanotube</i>	181
D.	Biofonctionnalisation de l'extrémité du nanotube	182
1.	Expérience préliminaire	183
a)	<i>Activation des acides carboxyliques terminaux</i>	183
b)	<i>Immobilisation covalente des NP-pA sur l'extrémité du nanotube</i>	184
2.	Oxydation de l'extrémité du MWCNT	185
3.	Validation de la création de fonctions acide carboxylique et de la fonctionnalisation de l'apex du MWCNT	186
4.	Biotinylation de l'extrémité du nanotube	188
E.	Conclusion	189
VI.	CHAPITRE VI :	191
	MESURE D'INTERACTIONS LIGAND-RECEPTEUR PAR SPECTROSCOPIE DYNAMIQUE DE FORCE (DFS)	191
A.	Rappel bibliographiques sur la Spectroscopie Dynamique de Force (DFS)	193
1.	Paramètres importants	194
a)	<i>Contrôle de l'immobilisation des biomolécules</i>	194
b)	<i>Elimination des événements non-spécifiques</i>	195
c)	<i>Modèle utilisé pour l'analyse des courbes de forces</i>	197
2.	Application au système modèle biotine-avidine	198
B.	Mesure des interactions Biotine-Avidine	199
1.	Types de pointes utilisées	200

Sommaire

2.	Mise en évidence de la présence de la biotine	201
3.	Mesure d'interactions du couple avidine-biotine	204
C.	Conclusion	207
	CONCLUSION GENERALE	209
	PARTIE EXPERIMENTALE	213
	ANNEXE : MICROSCOPIE A FORCE ATOMIQUE	239
A.	Principe général de fonctionnement	241
B.	Matériel utilisé	243
1.	Microscopes	243
2.	Pointes AFM	243
C.	Conditions d'imagerie pour la caractérisation des SAMs en mode contact intermittent	244
D.	Traitements utilisés pour la mise en forme des images AFM	245
	GLOSSAIRE	247

Introduction générale

Les biocapteurs ont connu, ces dernières années, un intérêt grandissant en raison de leurs nombreuses applications principalement dans le domaine médical.¹ Ceux-ci permettent, contrairement à d'autres techniques existantes (RIA (radioimmunoassay), ELISA (enzyme linked immunoassay))², une détection en temps réel de cibles biologiques présentes dans un environnement complexe. L'étape clé de leur développement est l'immobilisation covalente des biomolécules sur la surface solide.³ En effet, il est capital que l'objet biologique ne soit pas déformé et garde son activité au cours de sa fixation sur la surface. C'est pourquoi, pour développer un biocapteur précis et sensible, il faut pouvoir caractériser qualitativement et quantitativement, la surface biologique de celui-ci.

Cette Thèse aura donc un double objectif:

- obtenir de façon reproductible des films organiques fonctionnels capables de rendre les surfaces métalliques biocompatibles afin d'immobiliser des biomolécules, de façon reproductible, sans les dénaturer.
- se doter d'outils innovants capables d'analyser la distribution de biomolécule sur la surface et évaluer leur activité biologique à l'échelle de la molécule unique.

Nous avons choisi de réaliser l'étape d'immobilisation sur des surfaces de silice chimiquement modifiées par des SAMs (Self-Assembled Monolayers). En effet, les SAMs à base d'organosilanes fonctionnels ont déjà montré leur efficacité pour immobiliser des objets biologiques avec une bonne reproductibilité et une bonne accessibilité des fonctions terminales de surface.^{4,5}

Afin d'avoir un meilleur contrôle des propriétés de surface, il est indispensable d'avoir un outil de choix, tel que l'AFM (Microscopie à Force Atomique), permettant de sonder, à l'échelle nanométrique, l'interface chimie-biologie. En effet, cette technique permet d'imager une surface à l'échelle nanométrique et de mesurer des interactions moléculaires de l'ordre du piconewton (10^{-12} N). Pour cela des pointes pyramidales obtenues par microfabrication de silicium sont utilisées en général. Plus ces pointes sont fines, plus elles sont fragiles. Afin

¹ a) Wong L.S., Khan F., Micklefield J. *Chem Rev.* **2009**, *109*, 4025-4053 ; b) Fransconi M., Mazzei F., Ferri T. *Anal Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 1545-1564 ; c) Rusmini F., Zhong Z., Feijen J. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775-1789.

² Nistor C., Emnéus J. *Comprehensive Analytical Chemistry XLIV*, Gordon L., Ed., vol. XLVI, **2005**, *9*, 375-427.

³ Kaserio B. *Surf. Sci.* **2002**, *500*, 656-677.

⁴ a) Ehrhart J-C., Bennetau B., Renaud L., Madrange J-P., Thomas L., Morisot J., Brosseau A., Allano S., Tauc P., Tran P-L. *Biosens. Bioelectr.* **2008**, *24*, 467-474 ; b) Dinh D.H., Pascal E., Vellutini L., Bennetau B., Rebière D., Dejous C., Moynet D., Belin C., Pillot J-P. *Sensor. Actuat. B.* **2010**, *146*, 289-296.

⁵ Ramin M.A., Le Bourdon G., Daugey N., Bennetau B., Vellutini L., Buffeteau T. *Langmuir* **2011**, *27*, 6076-6084.

d'augmenter la résolution latérale des images⁶ et la durée d'utilisation des sondes AFM⁷, des nanotubes de carbone ont été soudés sur des pointes AFM.

Une des variantes de l'AFM, la Spectroscopie de Force Dynamique (DFS) mesure les forces d'interaction ligand-récepteur entre des biomolécules immobilisées sur une surface et une pointe AFM biofonctionnalisée. Cette technique permet donc aussi de vérifier l'activité des biomolécules. Les procédés de biofonctionnalisation utilisés habituellement recouvrent toute la surface des pointes de composés réactifs, il était donc souvent compliqué de mesurer des interactions uniques entre un ligand et son récepteur. Nous avons développé un procédé original visant à la biofonctionnalisation sélective de l'extrémité d'un nanotube de carbone fixé sur une pointe AFM. Pour tester la possibilité de mesure unique, un système modèle de type avidine-biotine a été sélectionné.

Ces travaux de Thèse s'inscrivent dans le cadre du projet BIONANOTIP qui a reçu le soutien de l'ANR (P2N 2010).

Trois laboratoires se sont associés pour mener à bien ce projet:

- l'ISM, UMR 5255, Univ Bx/CNRS: pour l'élaboration des SAMs (agents de couplage, greffage, caractérisation des surfaces), et la biofonctionnalisation des supports.
- le CBMN, UMR 5248 Univ Bx/CNRS: pour l'élaboration des sondes AFM à nanotubes de carbone
- le LIRM, DSV, CEA Marcoule: pour les mesures des interactions ligand/récepteur par DFS.

Ce manuscrit sera divisé en six chapitres :

Le chapitre I concernera l'étude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées (SAMs).

Le chapitre II présentera la synthèse d'agents de couplage siliciés et l'obtention de SAMs à partir de ces composés.

Le chapitre III traitera de la biofonctionnalisation des SAMs par des nanoparticules recouvertes de protéine A et par le virus de la mosaïque du tabac (TMV).

⁶ Stevens R., Nguyen C., Cassell A.M., Delzeit L., Meyyappan M., Han J. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 3453-3455.

⁷ Marsaudon S. *Imaging & Microscopy* **2013**, 30-33.

Dans le chapitre IV, nous présenterons une étude bibliographique consacrée aux nanotubes de carbones et leurs fonctionnalisations.

Dans le chapitre V, nous décrirons l'obtention de pointes AFM modifiées par des CNTs ainsi que la fonctionnalisation contrôlée de leur apex.

Le chapitre VI sera consacré à la mesure d'interactions ligand-récepteur par Spectroscopie Dynamique de Force.

Chapitre I : Etude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées.

I. Chapitre I :

Etude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées

A. Immobilisation d'objets biologiques sur une surface

Avec le développement croissant des biocapteurs au cours des dernières années, l'étude de l'immobilisation de molécules biologiquement actives sur des surfaces a connu un fort intérêt.

Plusieurs méthodes permettent d'immobiliser des objets biologiques sur une surface. L'immobilisation peut être réalisée de manière covalente ou non covalente (par adsorption physique ou par affinité biologique) (Figure I-1).

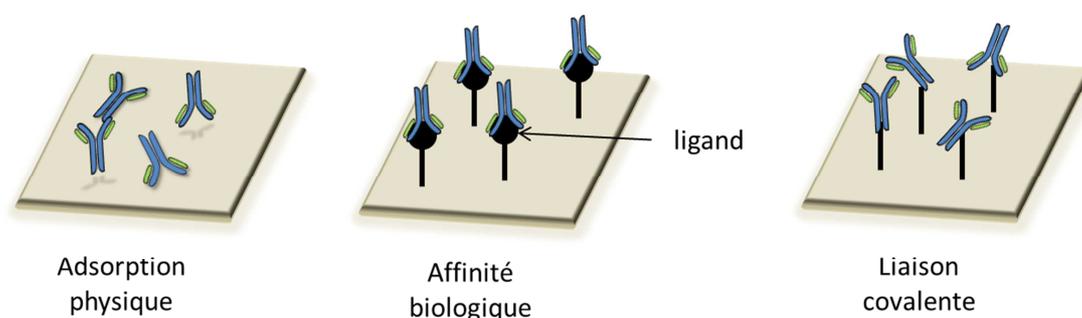


Figure I-1. Différentes méthodes d'immobilisation d'anticorps sur une surface.

1. Immobilisation non covalente

a) Par adsorption physique

Pour déposer des biomolécules sur une surface, une des premières méthodes utilisées a été l'adsorption physique. En 1956, Bull étudiait l'adsorption de l'albumine de sérum bovin (BSA) sur de la poudre de verre pyrex.¹ Il a montré que de la BSA pouvait être adsorbée mais qu'une valeur limite était atteinte. Cette valeur est proche de celle prévisible pour l'absorption d'une couche de molécule. Mais cette solution est loin d'être idéale. En effet, lors de leur adsorption sur une surface solide les biomolécules subissent souvent des changements conformationnels qui ont pour effet une dénaturation de la protéine.² Cela peut avoir comme

¹ Bull H.B. *Science* **1956**, *19*, 464-471.

² Gray J.J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, *14*, 110-115.

conséquence une perte d'activité.³ Comme la densité de dépôt des biomolécules n'est pas contrôlée, l'activité des biomolécules peut aussi être réduite par des gênes stériques.⁴

Certaines équipes ont aussi essayé d'adsorber des objets biologiques directement sur des SAMs. Par exemple, des globules rouges de lapin ou des cellules cancéreuses humaines ont été immobilisés sur une surface fonctionnalisée amine.⁵ Ils ont alors utilisé les forces d'interactions électrostatiques entre les groupements ammoniums de la surface et la membrane chargée négativement.

b) *Par affinité biologique*

Lors de l'immobilisation par adsorption physique des biomolécules sur une surface, il arrive souvent que la biomolécule soit déformée ou mal orientée et perde donc une partie de son activité biologique. Pour lutter contre ce problème, des méthodes plus spécifiques ont été développées. Ces méthodes, basées le plus souvent sur l'utilisation de séquences d'oligo-histidine (le groupement imidazole de l'histidine se chélate avec certains métaux de transition comme le nickel) ou du couple biotine-streptavidine, permettent d'orienter la biomolécule par l'utilisation d'un seul site de fixation spécifique. Au cours de cette Thèse, nous serons amenés à utiliser le système biotine-streptavidine. C'est pourquoi quelques exemples mettant en jeu ce couple sont présentés ici.

De par sa grande stabilité ($K_d = 10^{-15}$ mol/L), il permet une immobilisation orientée des biomolécules. Pavlickova et *al.* ont déposé une monocouche de streptavidine sur une surface d'or fonctionnalisée avec un thiol biotinylé.⁶ Ils ont ensuite immobilisé des antigènes synthétiques biotinylés pour pouvoir détecter des anticorps présents dans le sérum de personnes malades (Figure I-2).

³ Butler J.E. *Methods* **2000**, 22, 4-23.

⁴ Kusnezow W., Hoheisel J.D. *J. Mol. Recognit.* **2003**, 16, 165-176.

⁵ Margel S., Sivan O., Dolitzky Y. *Langmuir* **1991**, 7, 2317-2322.

⁶ Pavlickova P., Jensen N.M., Paul H., Schaeferling M., Giammasi C., Kruschina M., Du W-D., Theisen M., Ibba M., Ortigao F., Kambhampati D. *J. Proteome Res.* **2002**, 1, 227-231.

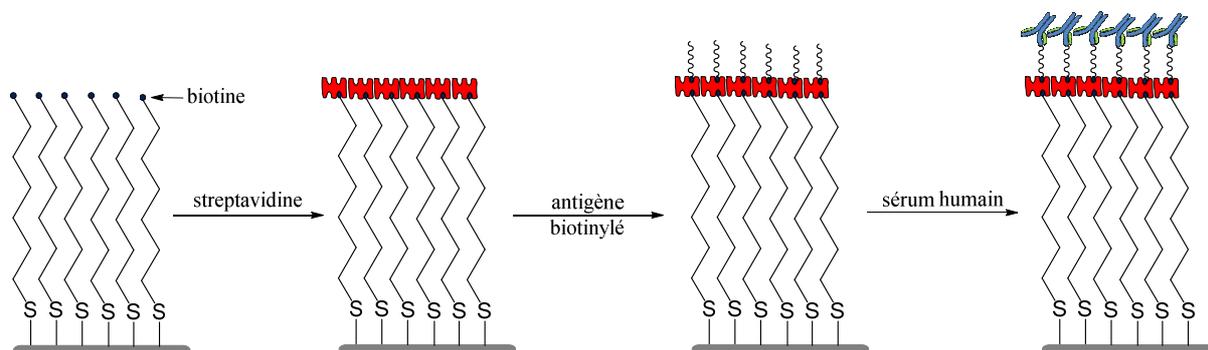


Figure I-2. Schéma de l'immobilisation d'antigènes biotinylés par Pavlickova.⁶

Le même principe (pont de streptavidine entre deux composés biotinylés) a été appliqué pour développer un capteur permettant la détection simultanée de plusieurs antigènes.⁷ Pour cela un monobrin d'ADN est immobilisé sur une surface d'or et la spécificité de l'hybridation de l'ADN est utilisée pour fixer des anticorps portant le brin d'ADN complémentaire.

Bien que l'immobilisation d'objets biologiques de façon non-covalente sur des surfaces soit souvent assez simple à mettre en œuvre, celle-ci n'est pas stable dans le temps. En effet, les biomolécules peuvent être désorbées de la surface par l'utilisation de certains tampons ou de températures élevées. De plus, une déformation ou une mauvaise orientation de l'objet biologique peut aussi souvent être notée, ce qui peut entraîner une perte partielle de l'activité biologique.

2. Immobilisation covalente

L'immobilisation covalente, entre la surface et la biomolécule, permet de fixer celle-ci de façon plus robuste sur la surface. Pour cela des monocouches terminées par des fonctions réactives (thiols, amines, acides, aldéhydes, époxydes) sont mises en jeu afin d'immobiliser les biomolécules grâce aux groupements fonctionnels présents sur celles-ci. Nous détaillerons le cas des fonctions acide carboxylique, utilisées dans cette Thèse, et présenterons succinctement celui des autres fonctions.

⁷ Ladd J., Boozer C., Yu Q., Chen S., Homola J., Jiang S. *Langmuir* **2004**, *20*, 8090-8095.

a) Sur des monocouches terminées acide carboxylique

Pour la biofonctionnalisation d'une surface, la fonction acide carboxylique est de tout premier choix. Elle peut réagir sur les acides aminés comportant une fonction amine sur leur chaîne latérale (arginine, lysine). Par contre, la fonction acide carboxylique n'est pas suffisamment réactive. Une étape d'activation est alors nécessaire, le plus souvent réalisée à l'aide du couple NHS/EDC.

Un trichloro- ou trialkoxysilane dont la chaîne alkyle est terminée par un groupement acide carboxylique ne peut pas être greffé directement sur une surface à base de silice. En effet, dans ce cas il risquerait de se déposer tête-bêche en formant des liaisons hydrogène entre la fonction carboxylique et les silanols présents à la surface de la silice (Figure I-3). Il faut donc que les fonctions acide carboxylique soient protégées par une fonction ester (ester méthylique ou ester trifluoroéthyle le plus souvent) avant l'étape de silanisation de la surface.⁸

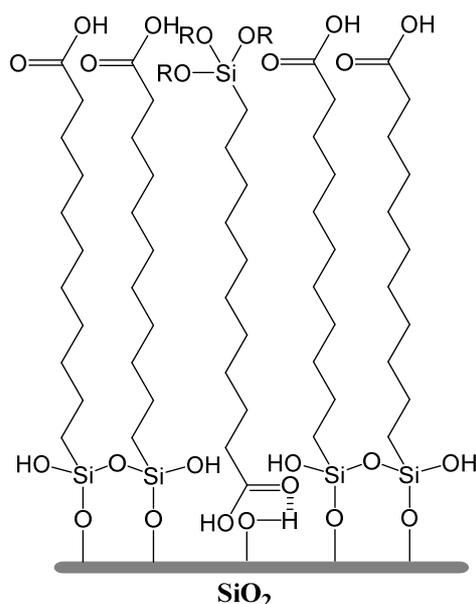


Figure I-3. Schéma d'une liaison hydrogène entre le groupement acide et les silanols de surface.

⁸ Ramin M.A., Le Bourdon G., Daugey N., Bennetau B., Vellutini L., Buffeteau T. *Langmuir* **2011**, 27, 6076-6084.

Chapitre I : Etude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées.

Une fois l'immobilisation sur la surface réalisée, la déprotection de l'acide est effectuée au moyen d'une hydrolyse acide ou basique. Fryxell et *al.* ont observé que la plupart de ces traitements avaient pour conséquence d'endommager cette surface.⁹

Pour éviter de détériorer la monocouche lors de la déprotection, il peut être envisagé de protéger la fonction acide par un ester photolabile.¹⁰ Une monocouche greffée sur une lame d'or peut être déprotégée, en irradiant sous UV à 365 nm. Jusqu'à 80% des fonctions acides sont régénérées.¹¹ En effet, cette déprotection ne peut être complète à cause de la photo-réduction des groupements nitrobenzyles.

Nakanishi et *al.* ont développé des monocouches à base de 1-(2-nitrophényl)éthyl-5-trichlorosilylpentanoate sur de la silice.¹² Ils ont révélé que cette monocouche permettait un contrôle spatiotemporel pour l'immobilisation de cellules (cellules de rein embryonnaires humaines HEK 293).¹³ Pour cela, ils recouvrent la monocouche de BSA (qui empêche le dépôt de cellule). Ensuite ils photo-déprotègent sélectivement certaines zones pour enlever la BSA et la remplacer par de la fibronectine (qui promeut l'adhésion des cellules). Il n'y a immobilisation de cellules que dans les zones photo-déprotégées. Ils ont aussi démontré que leurs surfaces pouvaient être utilisées pour faire migrer des cellules.¹⁴

Des monocouches mixtes, à base d'un dendron de 1^{ère} génération, terminé par un ester nitrobenzylique, et de décyltrichlorosilane, ont aussi été réalisées au Laboratoire (ISM) par Rahma et *al.* (Figure I-4).¹⁵ Lorsqu'elles sont réalisées dans le toluène, une ségrégation de phase est notée et des « îlots » se forment. Pour révéler quelle molécule forme les « îlots », après une déprotection de la fonction acide, des nanoparticules recouvertes d'une couche de polymère à base de chaînons PEG (polyéthylène glycol) terminés par une fonction amine sont déposées sur la surface. Celles-ci vont s'immobiliser uniquement sur les zones comportant le

⁹ Fryxell G.E., Rieke P.C., Wood L.L., Engelhard M.H., Williford R.E., Graff G.L., Campbell A.A., Wiacek R.J., Lee L., Halverson A. *Langmuir* **1996**, *12*, 5064-5075.

¹⁰ Critchley K., Zhang L., Fukushima H., Ishida M., Shimoda T., Bushby R.J., Evans S.D. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 17167-17174.

¹¹ Critchley K., Jeyadevan J.P., Fukushima H., Ishida M., Shimoda T., Bushby R.J., Evans S.D. *Langmuir* **2005**, *21*, 4554-4561.

¹² Nakanishi J., Kikuchi Y., Takarada T., Nakayama H., Yamaguchi K., Maeda M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16314-16315.

¹³ Nakanishi J., Kikuchi Y., Takarada T., Nakayama H., Yamaguchi K., Maeda M. *Anal. Chem. Acta* **2006**, *578*, 100-104.

¹⁴ Nakanishi J., Kikuchi Y., Inoue S., Yamaguchi K., Takarada T., Maeda M. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 6694-6695.

¹⁵ Rahma H., Buffeteau T., Belin C., Le Bourdon G., Degueil M., Bennetau B., Vellutini L., Heuzé K. *Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5*, 6843-6849.

dendron par formation d'une liaison amide avec sa fonction acide carboxylique terminale. Une analyse par AFM de la surface met en évidence une immobilisation sélective des nanoparticules sur les « îlots » (Figure I-4). Ceux-ci correspondent donc au dendron.

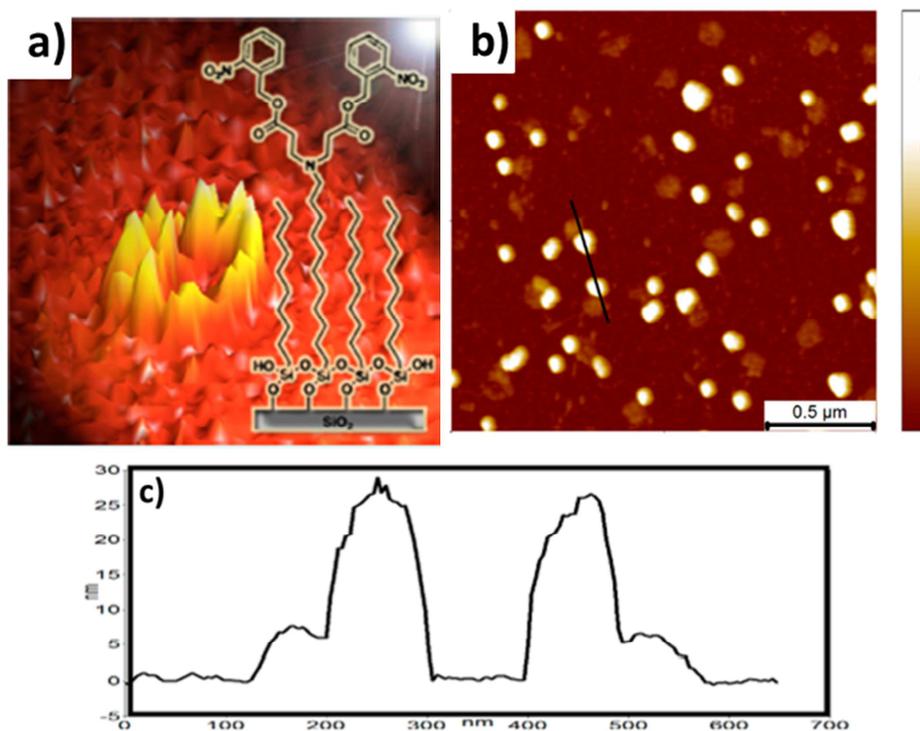


Figure I-4. a) représentation en 3D des îlots formés par le dendron ; b) image AFM de la SAM après immobilisation des nanoparticules ; c) profil de hauteur mettant en évidence la présence de nanoparticules sur les dendron.¹⁵

b) Sur des monocouches terminées par d'autres fonctions

Il est aussi possible d'utiliser d'autres fonctions que les acides carboxyliques pour immobiliser des objets biologiques sur des surfaces. Ici seront présentés quelques exemples d'immobilisations impliquant des fonctions amine, époxyde, aldéhyde, alcool, thiol.

Lors de l'immobilisation de biomolécules impliquant des chaînes terminées par des fonctions amine, des chaînes courtes sont souvent employées. Afin d'améliorer la stabilité des SAMs formées, des réactifs homo- ou hétérobifonctionnels sont souvent mis en œuvre. Par exemple, l'immobilisation avec une orientation contrôlée de métalloprotéines, par un unique

résidu cystéine, sur une surface d'APS par l'intermédiaire de 6-maléimidocaproate de *N*-succinimidyle a été réalisée (Figure I-5).¹⁶

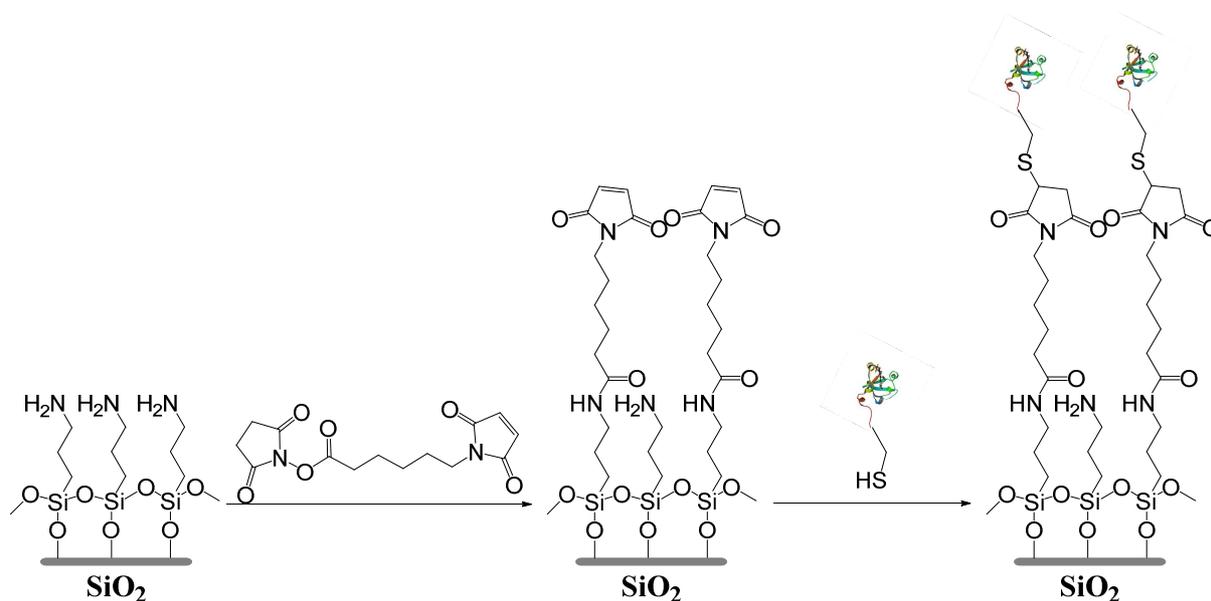


Figure I-5. Immobilisation du cytochrome b_5 sur une SAM d'APS.

Au Laboratoire (ISM), pour immobiliser des anticorps reconnaissant des cellules tumorales du cancer du sein circulantes, un aminosilane à longue chaîne (21-aminohénicosyltrichlorosilane (AHTS)) a servi afin de disposer d'une SAM bien ordonnée.^{17,18} Dans ce type de capteurs visant au diagnostic précoce, il est important d'avoir une détection spécifique du type de cellules recherchées. De plus, il faut pouvoir en détecter des petites quantités. En raison d'un plus grand nombre de cellules immobilisées, la détection des cellules tumorales du cancer du sein par immunofluorescence est bien meilleure avec l'AHTS qu'avec des molécules à chaînes courtes comme l'APTES.

Dans le domaine des puces à ADN, l'efficacité de la puce dépend grandement de la façon dont les monobrinns d'ADN sont immobilisés sur le support. Il est donc important que le procédé de couplage utilisé soit rapide, permette une immobilisation covalente et reproductible. Une équipe a comparé l'immobilisation de monobrinns d'ADN sur des surfaces fonctionnalisées avec des triméthoxysilanes terminés par une fonction amine, ou des

¹⁶ Hong H-G., Bohn P.W., Sligar S.G. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 1635-1638.

¹⁷ Ehrhart J-C., Bennetau B., Renaud L., Madrange J-P., Thomas L., Morisot J., Brosseau A., Allano S., Tauc P., Tran P-L. *Biosens. Bioelectr.* **2008**, 24, 467-474.

¹⁸ Bennetau B., Tran P-L. Brevet Français FR-2872912 **2006**.

trichlorosilanes terminés par une fonction acide carboxylique ou aldéhyde.¹⁹ L'immobilisation de monobrin d'ADN en faisant réagir la fonction amine sur une surface terminée par une fonction aldéhyde s'est révélé être une méthode de choix, dans l'optique des puces à ADN (Figure I-6). En effet, non seulement il n'y a pas de liaisons non-spécifiques, mais en plus comme la réaction entre l'aldéhyde de la SAM et l'amine du monobrin d'ADN ne nécessite pas d'activation au préalable cela diminue les sources de variabilité lors du dépôt avec un appareil automatique utilisé pour la fabrication de ces puces à grande échelle. Ces puces à ADN permettent de détecter, par fluorescence, des ADN cibles de cytomégalo virus humain avec une limite de détection de 0,01 nM.

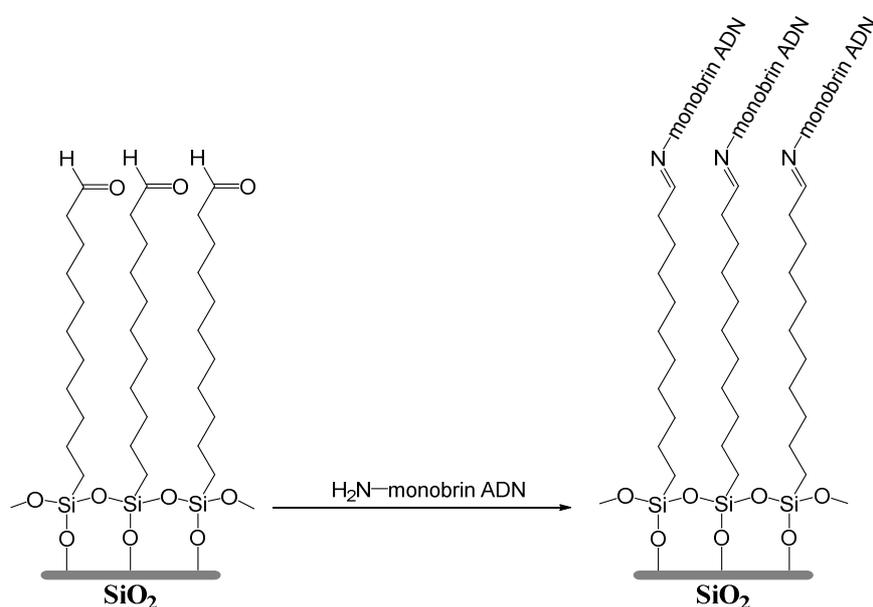


Figure I-6. Immobilisation d'un monobrin d'ADN aminé sur des lames de verre fonctionnalisées aldéhyde.

Les fonctions époxydes sont aussi des fonctions de choix pour l'immobilisation de biomolécules sur des surfaces. Elles peuvent réagir directement sur des fonctions amines sans avoir besoin d'une réaction d'activation préalable. Par exemple, l'immobilisation de la vancomycine sur une SAM formée à partir de (3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GPTS) a été démontrée.²⁰ Au sein du Laboratoire (ISM), une monocouche formée à partir de triméthoxy-(22-oxiranylméthoxy-docosyl)-silane a été développée.²¹ Cette SAM, qui possède aussi un meilleur potentiel pour l'immobilisation de bioorganismes, que celle formée à partir d'un silane commercial à chaîne courte tel que le GPTS, a été utilisée pour fonctionnaliser la

¹⁹ Zammatteo N., Jeanmart L., Hamels S., Courtois S., Louette P., Hevesi L., Remacle J. *Anal. Biochem.* **2000**, 280, 143-150.

²⁰ Elbs M., Brock R. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 4793-4800.

²¹ Dinh D.H., Vellutini L., Bennetau B., Dejous C., Rebière D., Pascal E., Moyne D., Belin C., Desbat B., Labrugère C., Pillot J-P. *Langmuir* **2009**, 25, 5526-5535.

surface d'un capteur acoustique à ondes de Love pour la détection des bactéries *Escherichia coli* (Figure I-7).^{22,23} De plus, grâce à la longue chaîne des molécules, un effet de lissage de la surface est observé et les anticorps sont plus accessibles pour les bactéries.

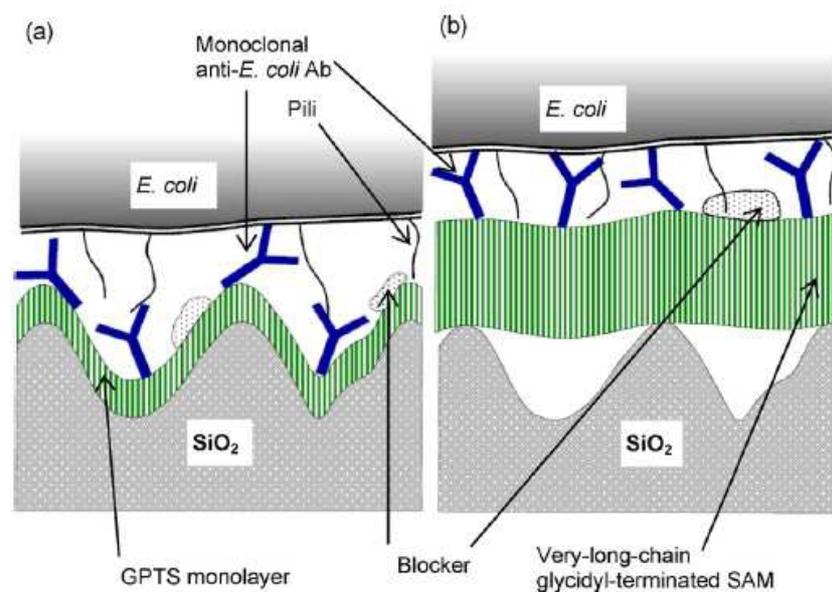


Figure I-7. Schéma des interactions entre *E. coli* et une monocouche de GPTS (a) ou d'une longue chaîne terminée glycidyle (b).²²

3. Problème de l'adhésion non spécifique

Pour le développement des biocapteurs et des biomatériaux, il faut pouvoir immobiliser de façon spécifique une biomolécule tout en limitant l'adhésion non-spécifique. Dans ce but, les chercheurs ont proposé diverses techniques.

Les premières études sur la réduction de l'adhésion non-spécifique des biomolécules par les chaînons éthylène glycol (EG) ont été réalisées en 1991 par Pale-Grosdemange et *al.* Ils ont développé des monocouches composées de thiols, comportant une partie alkyle terminée par un PEG de longueur variable, adsorbés sur une lame d'or.²⁴ Le PEG induit un certain désordre au sein de la SAM contrairement à celle composée de chaînes alkyles uniquement. De plus, ces surfaces permettent de diminuer l'adsorption des protéines. L'amointrissement de l'adhésion non-spécifique de quatre protéines tests (fibrinogène,

²² Dinh D.H., Pascal E., Vellutini L., Bennetau B., Rebière D., Dejous C., Moynet D., Belin C., Pillot J-P. *Sensors and Actuators B* **2010**, *146*, 289-296.

²³ Mas G.Y., Moynet D., Rebière D., Dejous C., Zimmermann C., Bennetau B., Pillot J-P. Brevet Français FR-2878622 **2006**.

²⁴ Pale-Grosdemange C., Simon E.S., Prime K.L., Whitesides G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 12-20.

Chapitre I : Etude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées.

lysozyme, pyruvate kinase et RNase A) a été confirmé sur ce même type de SAM.²⁵ La résistance à l'adhésion augmente avec la longueur du chaînon PEG. Par contre, le groupement terminal ne semble pas jouer de rôle.

Une monocouche mixte constituée d'alkylthiols biotinylés et de thiols terminés par un chaînon tétraéthylène glycol (TEG) augmente la liaison spécifique de la streptavidine sur la biotine.²⁶ Ceci est dû à la réduction de l'adsorption non-spécifique par le chaînon TEG et aussi à une meilleure accessibilité des biotines.

De même, les chaînons EG sont aussi souvent utilisés dans des applications où il est important d'avoir une adhésion non-spécifique minimale (puces à ADN^{27,28} ou mesure d'interactions protéine-ligand²⁹). Ces mêmes propriétés ont été utilisées pour faire croître un réseau de cellules neuronales par photodéprotection sélective de certaines zones de façon à déposer de la poly-D-lysine pour faire croître les neurones.³⁰

Une étude a montré que les molécules à base de chaînons EG ne sont pas les seules à limiter l'adhésion non-spécifique des molécules.³¹ Les propriétés nécessaires pour cela ont été mise en évidence (hydrophilicité, molécules électriquement neutres et comportant des groupements accepteurs de liaisons hydrogènes mais pas de groupements donneurs). Parmi les nombreuses molécules testées, les dérivés de l'oligo(sarcosine), la *N*-acétylpipérazine et des dérivés de sorbitol perméthylés se sont montrés être de bons candidats pour diminuer l'adhésion non-spécifique (Figure I-8).

²⁵ Prime K.L., Whitesides G.M. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714-10721.

²⁶ Nelson K.E., Gamble L., Jung L.S., Boeckl M.S., Naeemi E., Golledge S.L., Sasaki T., Castner D.G., Campbell C.T., Stayton P.S. *Langmuir* **2001**, *17*, 2807-2816.

²⁷ Zhang L., Li D., Meng W., Huang Q., Su Y., Wang L., Song S., Fan C. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *25*, 368-372.

²⁸ a) Bennetau B., Bousbaa J., Choplin F. Brevet Mondial WO0153303 **2001** ; Bennetau B., Bousbaa J., Choplin F., Souteyrand E., Martin J-R., Cloarec J-P. Brevet Mondial WO0153523 **2001**.

²⁹ Sekar M.M.A., Hampton P.D., Buranda T., Lopez G.P. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 5135-5141.

³⁰ Cheng J., Zhu G., Wu L., Du X., Zhang H., Wolfrum B., Jin Q., Zhao J., Offenhäusser A., Xu Y. *J. Neurosci. Methods* **2013**, *213*, 196-203.

³¹ Ostuni E., Chapman R.G., Holmlin R.E., Takayama S., Whitesides G.M. *Langmuir* **2001**, *17*, 5605-5620.

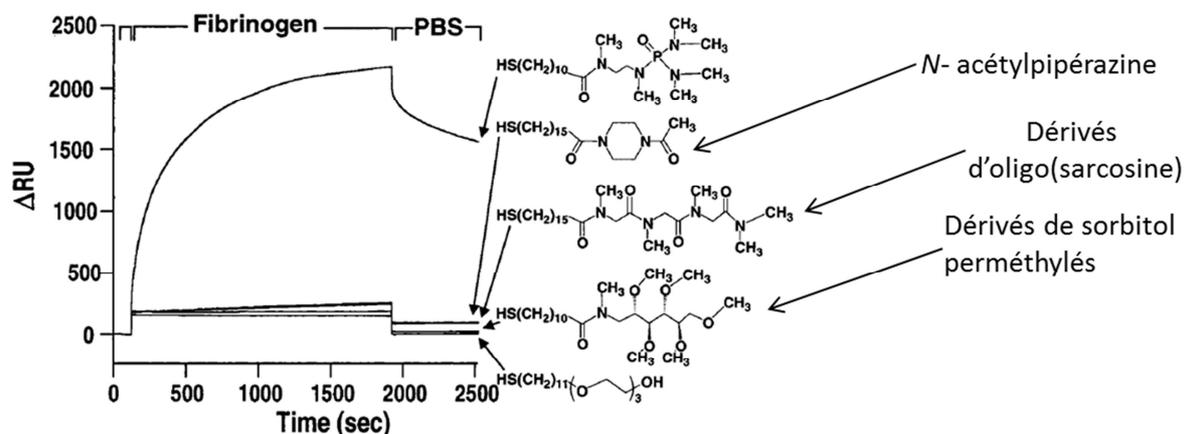


Figure I-8. Absorbance du fibrinogène sur des SAMs préparées à partir de *N*-acétylpipérazine, de dérivés d'oligo(sarcosine) ou de dérivés de sorbitol perméthylés.³¹

Au vu des différents éléments présentés ici, les SAMs semblent être une méthode de choix pour immobiliser de manière covalente des objets biologiques sur des surfaces solides. Nous allons donc détailler le principe de l'élaboration de SAMs sur des surfaces de silice et les différents paramètres influençant la formation et l'organisation de celle-ci.

B. Monocouches auto-assemblées (SAMs)

En s'appuyant sur les travaux de Langmuir de 1917 montrant que le dépôt de quelques gouttes de molécules amphiphiles (de l'huile par exemple) sur une surface d'eau conduisait à la formation d'un film monomoléculaire³², Blodgett a démontré que ce film pouvait être déposé sur une surface solide (films de Langmuir-Blodgett).^{33,34} Malgré son grand intérêt pour la modification des propriétés d'une surface, cette technique présente des limites intrinsèques (une petite variation de la température détériore de manière irréversible le film) qui réduiront son utilisation.

En 1946, Bigelow et *al.* prouvent que des molécules polaires à longues chaînes alkyle (alcools, acides, amines) dans un solvant non polaire (hexadécane ou dicyclohexyle) peuvent former, par adsorption sur une surface, une monocouche de molécules bien organisées.³⁵

³² Langmuir I. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 39, 1848-1906.

³³ Blodgett K. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 495.

³⁴ Blodgett K. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57, 1007-1022.

³⁵ Bigelow W.C., Pickett D.L., Zisman W.A. *J. Colloid Sci.* **1946**, 1, 513-538.

Chapitre I: Etude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées.

Bien que cela ait été postulé auparavant sans être directement mis en évidence expérimentalement^{36,37}, Sagiv a montré, en 1980, le premier exemple de formation spontanée d'une monocouche d'octadécyltrichlorosilane (OTS) par adsorption directe sur une surface de silice avec création de liaisons covalentes entre le silane et la surface.³⁸ Le terme de monocouches auto-assemblées (SAM : Self-Assembled Monolayers) est employé pour la première fois dans un article du *New Scientist* de 1983³⁹, décrivant la formation de multicouches ordonnées par chemisorption successives de plusieurs couches d'hexadécenyltrichlorosilane.⁴⁰

Dans les années 80, le grand développement de nouvelles techniques d'analyses de surface telles que la microscopie à effet tunnel (STM, 1981) et la microscopie à force atomique (AFM, 1986), a fortement contribué à l'essor des monocouches auto-assemblées. Celles-ci sont toujours constituées de molécules organiques spontanément adsorbées sur un substrat solide avec une création de liaisons chimiques entre la molécule et le substrat. Un grand nombre de combinaisons a été examiné lors de ces vingt dernières années. A titre d'exemple, Tao et *al.* ont étudié, en 1993, l'auto-assemblage d'acides carboxyliques comprenant des groupements biphényle et naphthyle sur des surfaces d'argent et de cuivre.⁴¹

Il existe deux principaux types de SAMs. Elles peuvent provenir soit de l'adsorption de composés soufrés tels que les thiols, les sulfures ou les disulfures sur des surfaces métalliques (or, argent, cuivre...), soit du greffage covalent d'organosilanes sur des surfaces d'oxydes de silicium ou d'aluminium (Figure I-9).

³⁶ Zisman W.A. *Ind. Eng. Chem., Prod. Res. Dev.* **1969**, 8, 98-111.

³⁷ Lee L-H. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, 27, 751-760.

³⁸ Sagiv J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 92-98.

³⁹ *New Scientist* **1983**, 98, 20.

⁴⁰ Netzer L., Sagiv J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 674-675.

⁴¹ Tao Y-T., Lee M-T., Chang S-C. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 9547-9555.

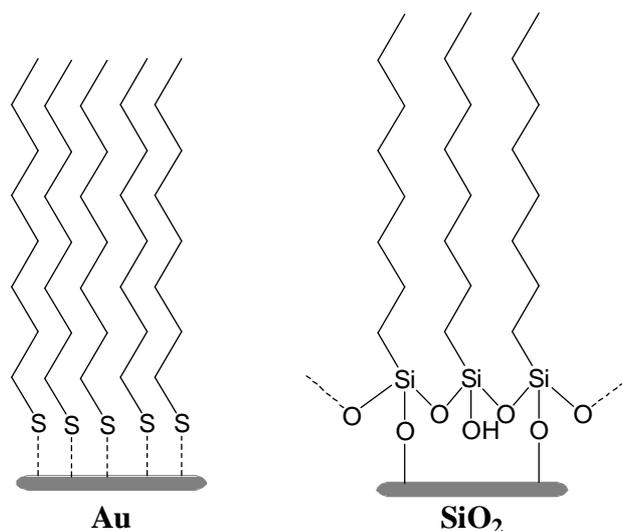


Figure I-9. Monocouches auto-assemblées sur or et silice.

La particularité des SAMs préparées à partir d'organosilanes est leur stabilité supérieure à celles obtenues avec des thiols sur de l'or. En effet, les silanes peuvent créer trois liaisons covalentes en raison de trois groupements portés par l'atome de silicium, contrairement aux thiols qui ont un seul site réactionnel. Ainsi se forme un réseau tridimensionnel de liaisons covalentes très fortes appelées siloxanes (Si-O-Si). De plus, la compréhension de la nature exacte de la liaison soufre-métal reste un des sujets les plus controversés en nanoscience.⁴²

En raison de la meilleure stabilité des liaisons siloxaniques, nous avons choisi de travailler avec des organosilanes et des substrats de SiO₂.

1. Principe de formation de SAMs sur SiO₂

Pour former un nanofilm organique sur une surface de silice, la réaction de silanisation est souvent utilisée. Celle-ci consiste en la condensation d'un composé silicié (trichlorosilane ou trialkoxysilane) sur les groupements silanols de surface (Figure I-10).

⁴² Pensa E., Cortés E., Corthey G., Carro P., Vericat C., Fonticelli M.H., Benitez G., Rubert A.A., Salvarezza R.C. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1183-1192.

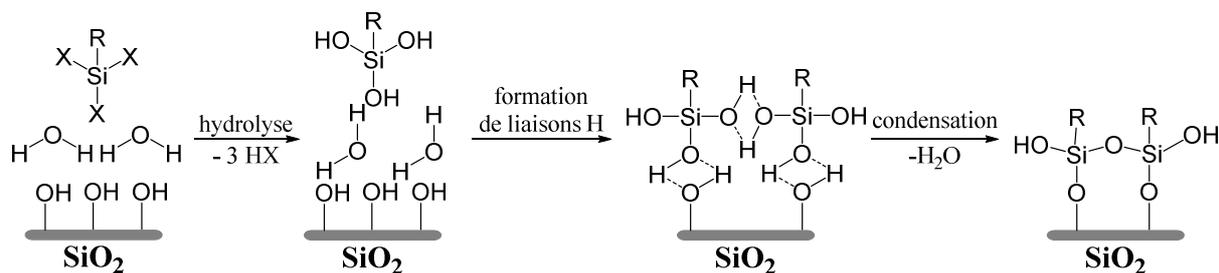


Figure I-10. Schéma du mécanisme de silanisation selon Sagiv.³⁸

Le mécanisme communément admis pour cette réaction comporte trois étapes.³⁸ La première est une attraction des silanes vers la surface de silice, recouverte d'une fine couche d'eau, les groupements $-\text{SiX}_3$ agissant comme une tête polaire. Les groupements halogène ou alcoyle sont hydrolysés lorsqu'ils sont suffisamment proches de la surface. Les silanes sont ensuite liés par des liaisons hydrogène aux silanols de la surface et leurs proches voisins. Pour finir une condensation permet la formation d'un réseau dans lequel les molécules d'OTS peuvent former une liaison avec la surface et des liaisons hydrogène avec leurs voisines ou vice versa.

Silberzan et *al.* ont ensuite complété ce mécanisme en montrant que les molécules de silanes formaient un réseau en se liant entre elles après leur physisorption sur le film d'eau présent à la surface de la silice. Ensuite, ce réseau s'accroche sur la silice en ne formant que quelques liens avec celle-ci (Figure I-11).⁴³

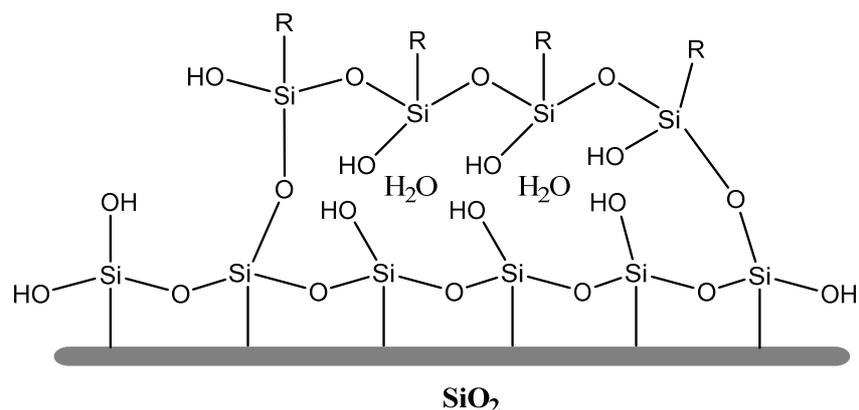


Figure I-11. Schéma d'une SAM selon Silberzan.⁴³

⁴³ Silberzan P., Léger L., Ausserré D., Benattar J.J. *Langmuir* **1991**, 7, 1647-1651.

Chapitre I: Etude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées.

Suivant les groupements hydrolysables utilisés, la réactivité vis-à-vis des silanols de la silice peut fortement varier. En effet, lors de l'hydrolyse des groupements trichlorosilanes, de l'acide chlorhydrique est libéré dans le milieu. Cela a pour effet de catalyser la réaction d'hydrolyse. Les groupements alcoxy (méthoxy ou éthoxy) sont quant à eux beaucoup moins sensibles à l'hydrolyse. Il faut donc ajouter un catalyseur (acide ou basique). L'hydrolyse est beaucoup plus rapide en milieu acide. Par contre en milieu basique c'est plutôt la condensation des molécules qui est rapide. Celle-ci pourra même se produire avant que toutes les molécules soient hydrolysées.⁴⁴ Par ailleurs le groupement triméthoxysilyle est plus facilement hydrolysable que le groupement triéthoxysilyle pour des raisons d'encombrement stérique. Ainsi d'une façon générale, il faudra utiliser les chlorosilanes rapidement après leur synthèse alors que les alcoxysilanes pourront être stockés plus longtemps sous atmosphère inerte.

L'étude de monocouches partielles a permis d'en savoir plus sur la formation des SAMs et sur le processus d'auto-assemblage. En 1986, Cohen et *al.* ont suggéré, suite à l'étude par infrarouge de couches partielles d'OTS, que la croissance de la SAM se faisait plus par la formation d'« îlots » qu'avec une couche homogène de molécules éparses.⁴⁵ A l'inverse des études par ellipsométrie, réflectivité des rayons X et infrarouge de monocouches partielles, semblaient plutôt laisser penser à une structure homogène mais désordonnée (Figure I-12).^{46,47}

⁴⁴ Hench L.L., Wet J.K. *Chem. Rev.* **1990**, *90*, (p. 38-39) 33-72.

⁴⁵ Cohen S.R., Naaman R., Sagiv J. *J. Phys. Chem.* **1986**, *112*, 3054-3056.

⁴⁶ Wasserman S.R., Whitesides G.M., Tidswell I.M., Oscko B.M., Pershan P.S., Axe J.D. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 5852-5861.

⁴⁷ Mathauer K., Franck C.W. *Langmuir* **1993**, *9*, 3446-3451.

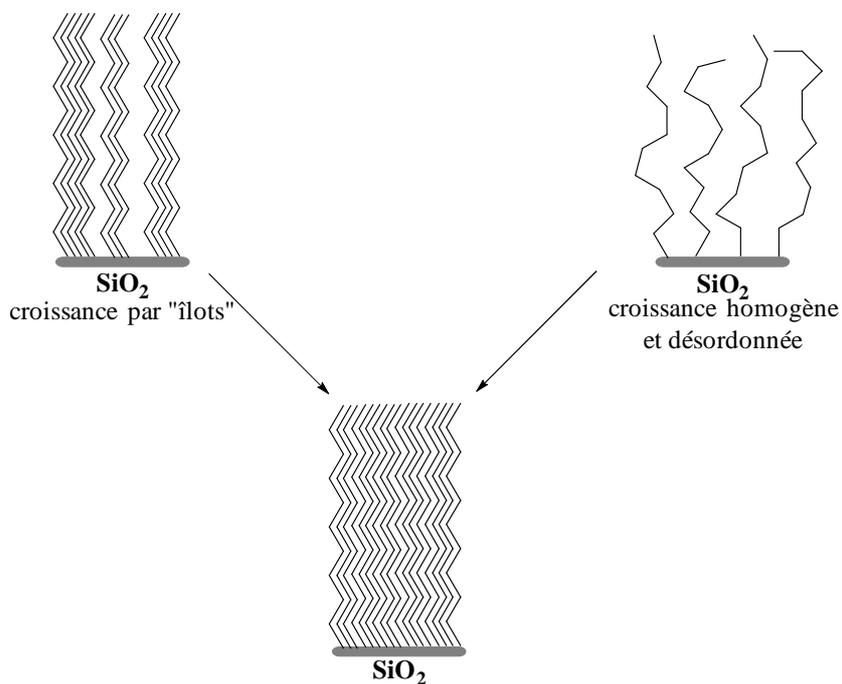


Figure I-12. Représentation de la croissance par îlots et de la croissance homogène et désordonnée.

Mais en 1995, une étude AFM menée par Bierbaum et *al.* sur des monocouches d'OTS a montré que c'était finalement la croissance par « îlots » qui prévalait (Figure I-13).⁴⁸

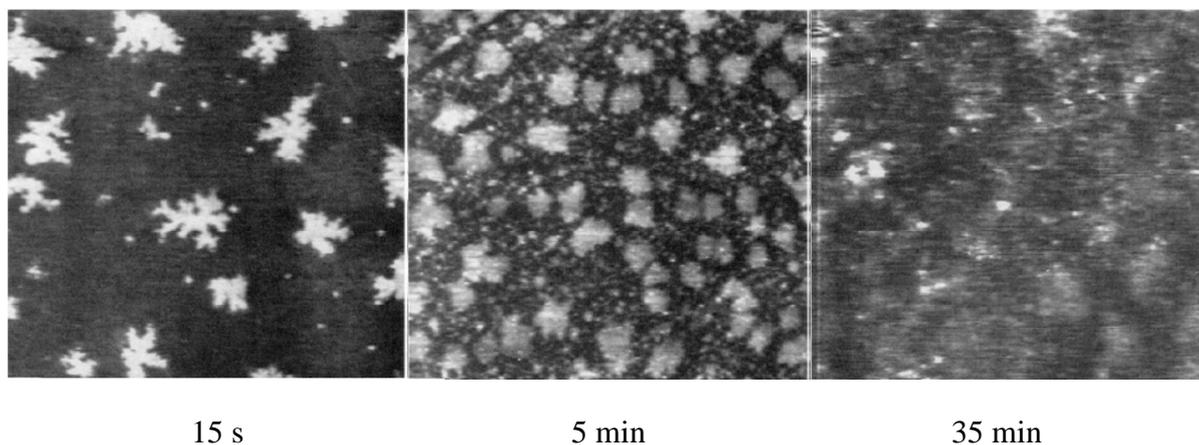


Figure I-13. Images AFM de la formation d'une monocouche d'OTS en fonction du temps d'immersion ($5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$).⁴⁸

⁴⁸ Bierbaum K., Grunze M., Baski A.A., Chi L.F., Schrepp W., Fuchs H. *Langmuir* **1995**, *11*, 2143-2150.

Diverses équipes ont confirmé par AFM le mécanisme de croissance par « îlots » pour la formation de monocouches d'OTS, de 3-mercaptopropyltriméthoxysilane⁴⁹ et d'octadécyltriméthoxysilane (OTMS)⁵⁰, prouvant ainsi sa validité pour les alcoxysilanes.

Toutefois de nombreux autres paramètres sont importants pour former des SAMs denses et homogènes.

2. Paramètres influençant la formation et l'organisation de SAMs

a) L'eau et le solvant

Parmi les nombreux paramètres qui influencent la formation et l'organisation d'une SAM, la quantité d'eau présente dans le milieu a une grande importance puisqu'elle participe à l'hydrolyse du composé silicié.

L'étude infrarouge d'une monocouche d'OTS a mis en évidence que celle-ci était plus compacte et ordonnée sur une surface de silice complètement hydratée que sur un wafer de silicium sec où le taux de recouvrement sera moins bon.⁵¹ Tripp et *al.* ont quant à eux démontré, toujours en utilisant la spectroscopie infrarouge, l'absence de réaction directe entre l'OTS et les silanols de la silice pyrogénique (silice amorphe dont les grains sont poreux et présentent une grande surface spécifique) mais que l'OTS réagissait avec une couche d'eau présente à la surface de celle-ci.⁵² Cela a été confirmé par Finklea et *al.* qui ont réussi à former une monocouche d'OTS à la surface d'une lame d'or préalablement hydratée malgré l'absence de groupements hydroxyle à sa surface.⁵³

Afin de déterminer la quantité d'eau optimale nécessaire pour obtenir une monocouche très dense, de l'eau deutérée a été adsorbée sur de la silice. Ensuite, la mesure de la quantité de D₂O extraite par un solvant (toluène) a permis d'obtenir la quantité d'eau optimale (0,15 mg/100 mL de solvant).⁵⁴ Une augmentation de la proportion d'eau dans le milieu réactionnel a pour conséquence un greffage plus rapide. De plus, comme la formation en solution et

⁴⁹ Yang S.-R., Kolbesen B.O. *Applied Surface Science* **2008**, 255, 1726-1735.

⁵⁰ Pillai S., Pai R.K. *Ultramicroscopy* **2009**, 109, 161-166.

⁵¹ Angst D.L., Simmons G.W. *Langmuir* **1991**, 7, 2236-2242.

⁵² Tripp C.P., Hair M.L. *Langmuir* **1992**, 8, 1120-1126.

⁵³ Finklea H.O., Robinson L.R., Blackburn A., Richter B., Allara D., Bright T. *Langmuir* **1986**, 2, 239-244.

⁵⁴ McGovern M.E., Kallury K.M.R., Thomson M. *Langmuir* **1994**, 10, 3607-3614.

Chapitre I : Etude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées.

l'adsorption de larges agrégats pré-organisés est favorisée, la croissance par « îlots » est privilégiée.^{55,56}

Des monocouches d'OTS particulièrement lisses (rugosité Rms : 1,0 Å) ont été obtenues avec une concentration d'eau très faible et un solvant très hydrophobe (Isopar-G) qui force la fine pellicule d'eau à rester collée à la surface.⁵⁷ Les temps de greffage sont beaucoup plus longs car il faut 48 h pour obtenir une monocouche complète. Les molécules de silane doivent probablement diffuser dans le solvant jusqu'à atteindre la fine pellicule d'eau présente à la surface de la silice.

Dans le cas de greffage de triméthoxysilanes sur une surface de silice, sans ajout de catalyseur pour faciliter l'hydrolyse, il semble qu'un seul des groupements méthoxyle réagisse avec les silanols de la surface.⁵⁸ La monocouche obtenue sera donc clairsemée. La quantité de molécules greffées est déterminée après mesure de l'absorbance après greffage de coumarine sur la surface. Un lavage à l'eau, entre deux étapes de silanisation, permet d'hydrolyser les autres groupements méthoxyle et donc d'obtenir une monocouche plus dense avec la formation de liaisons siloxanes entre les différentes molécules de silane.

Le choix du solvant de greffage joue aussi un rôle important. En effet, selon McGovern et *al.*, des monocouches de meilleure qualité sont obtenues avec le toluène ou le benzène. Ceux-ci présentent la capacité de solubiliser la quantité d'eau optimale et permettent ainsi aux molécules de polymériser à la surface du substrat.⁵⁴ Ils ont aussi montré que le solvant pouvait jouer un rôle dans la compacité de la monocouche d'OTS présente à la surface de la silice. En effet, lorsque le solvant utilisé est composé de longues chaînes alkyle (n = 16, hexadécane), celui-ci en s'intercalant entre les molécules d'OTS aide à leur auto-assemblage. Dans le cas de chaînes courtes (n = 5, pentane par exemple), en venant s'agréger entre les molécules d'OTS, les molécules de solvant peuvent rendre l'auto-assemblage plus difficile. En effet, elles vont réduire les interactions entre les molécules d'OTS. Le dichlorométhane, en facilitant la formation de liaisons hydrogène entre les molécules d'eau et les groupements trichlorosilyles, favorise leur hydrolyse.⁵⁹ Cela permet d'obtenir des SAMs mieux organisées

⁵⁵ Desbief S., Patrone L., Goguenheim D., Guerin D., Vuillaume D. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 2870-2879.

⁵⁶ Vallant T., Brunner H., Mayer U., Hoffmann H., Leitner T., Resch R., Friedbacher G. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 7190-7197.

⁵⁷ Wang Y., Lieberman M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1159-1167.

⁵⁸ Krasnoslobodtsev A.V., Smirnov S.N. *Langmuir* **2002**, *18*, 3181-3184.

⁵⁹ Manifar T., Rezaee A., Sheikhzadeh M., Mittler S. *Applied Surface Science* **2008**, *254*, 4611-4619.

et plus compactes. Le toluène montre aussi cette capacité à faciliter l'adsorption des molécules d'OTS sur la surface de silice.

Au Laboratoire (ISM), Navarre et *al.*, ont montré que dans le cas du greffage de trichlorosilanes comportant une longue chaîne alkyle comme le 22-(trichlorosilyl)docosane, un ajout d'hexadécane comme co-solvant permettait la pré-organisation des molécules en solution et diminuait donc le nombre d'agrégats observés.⁶⁰

b) La température de greffage

D'après Bigelow et *al.*, l'influence de la température est capitale lors de la formation de monocouches sur des surfaces solides.⁶¹ Ils ont montré qu'il existait une température au-dessus de laquelle il n'était plus possible de former des monocouches. Une autre équipe a montré qu'une baisse de la température coïncide avec une meilleure qualité des monocouches obtenues même si cela peut sembler paradoxal.⁴³ Ils l'expliquent par une baisse de la solubilité du silane dans le solvant ce qui favorise sa physisorption sur le substrat. Une étude par mesure d'angle de contact, ellipsométrie et spectroscopie infrarouge, a mis en évidence l'existence d'une température critique T_c ($28 \pm 5^\circ\text{C}$ pour l'OTS) en dessous de laquelle la monocouche atteignait sa densité la plus élevée, et au-dessus de laquelle elle devenait beaucoup plus désordonnée.⁶² Cette température est proportionnelle à la longueur de la chaîne carbonée, c'est une propriété intrinsèque du silane qui est indépendante du solvant utilisé.^{63,64} D'après Rye, cette température critique est proportionnelle à la température de fusion des alcanes correspondants.⁶⁵ Il émet l'hypothèse, qu'au-dessous de cette température, les interactions alcane-alcane favorisent un alignement des molécules proches les unes des autres de manière à avoir une SAM bien organisée. Au-dessus de cette température, l'augmentation de l'énergie thermique amène les molécules de silanes à se masquer les unes les autres et les groupes hydroxyle deviennent moins accessibles pour former les liaisons siloxane. D'autres auteurs ont aussi mis en évidence l'existence de cette température critique en dessous de laquelle une croissance par « îlots » mène à une surface bien ordonnée.⁶⁶ A l'aide d'une étude AFM, une autre équipe a montré l'existence de deux températures caractéristiques pour le greffage d'OTS.⁶⁷ Ils ont donc défini une température T_0 (16°C pour l'OTS) en dessous de

⁶⁰ Navarre S., Choplin F., Bousbaa J., Bennetau B., Nony L., Aimé J.-P. *Langmuir* **2001**, *17*, 4844-4850.

⁶¹ Bigelow W.C., Glass E., Zisman W.A. *J. Colloid Sci.* **1947**, *2*, 563-591.

⁶² Parikh A.N., Allara D.L., Ben Azouz I., Rondelez F. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7577-7590.

⁶³ Brzoska J.B., Shahidzadeh N., Rondelez F. *Nature* **1992**, *360*, 719-721.

⁶⁴ Brzoska J.B., Ben Azouz I., Rondelez F. *Langmuir* **1994**, *10*, 4367-4373.

⁶⁵ Rye R.R. *Langmuir* **1997**, *13*, 2588-2590.

⁶⁶ a) Davidovits J.V., Pho V., Silberzan P., Goldmann M. *Surface Science* **1996**, *352-354*, 369-373 ; b) Goldmann M., Davidovits J.V., Silberzan P. *Thin Solid Films* **1998**, *327-329*, 166-171.

⁶⁷ Carraro C., Yauw O.W., Sung M.M., Maboudian R. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 4441-4445.

laquelle a lieu uniquement une croissance par « îlots » ainsi qu'une température T_c (40°C pour l'OTS) au-dessus de laquelle a lieu uniquement une croissance homogène. Entre les deux températures, ces deux types de croissance sont observés simultanément.

c) *La longueur de la chaîne carbonée*

La capacité d'auto-assemblage des alkyltrichlorosilanes dépend de la longueur de la chaîne. Bierbaum et *al.* ont constaté, grâce à une étude par absorption des rayons X (NEXAFS), qu'il y avait une longueur optimale ($n = 18$) où les chaînes sont toutes en conformation *trans* et orientées perpendiculairement à la surface.⁶⁸ Pour les chaînes plus longues, comme dans le cas du triacontyltrichlorosilane ($n = 30$), la couche est moins ordonnée. La chaîne, dans sa partie basse, est ordonnée mais, en raison de sa trop grande longueur, peut être désordonnée dans sa partie haute. Elle a tendance à se replier sur elle-même. Pour les chaînes plus courtes, comme le propyltrichlorosilane ($n=3$), des films complètement désordonnés sont obtenus. En effet, comme les chaînes sont trop courtes, les interactions entre elles ne sont pas suffisantes pour permettre une bonne organisation de celles-ci.⁶⁹

d) *Le groupement terminal*

Le groupement terminal de la chaîne alkyle peut aussi avoir une influence sur l'ordre des molécules dans la monocouche. Par FTIR-ATR, spectroscopie XPS et angle de contact, Heid et *al.* ont en effet montré que des couches bien organisées et compactes étaient obtenues avec des organosilanes terminés aussi bien par une fonction vinyle que par un groupement méthyle ($n = 14$ et 15).⁷⁰ Par contre pour des organosilanes ($n = 17$) terminés par un groupement plus volumineux, comme par exemple le groupe phthaloyle, les monocouches sont beaucoup moins ordonnées. En effet, il peut y avoir, soit des gênes stériques, soit des interactions dipôle-dipôle répulsives entre les groupements. Pour un organosilane terminé par une fonction amine ($n = 17$), des monocouches complètement désordonnées sont obtenues à cause d'interactions acide-base entre les groupements amine et les silanols de la surface. Avec des organosilanes terminés par un groupement ester, cyanure ou bromure, il y a une moins bonne organisation de la monocouche qu'avec les chaînes terminées méthyle de même longueur ($n = 16$).⁷¹

⁶⁸ Bierbaum K., Kinzler M., Wöll Ch., Grunze M., Hähner G., Heid S., Effenberger F. *Langmuir* **1995**, *11*, 512-518.

⁶⁹ Bierbaum K., Grunze M., Baski A.A., Chi L.F., Schrepp W., Fuchs H. *Langmuir* **1995**, *11*, 2143-2150.

⁷⁰ Heid S., Effenberger F., Bierbaum K., Grunze M. *Langmuir* **1996**, *12*, 2118-2120.

⁷¹ Vallant T., Kattner J., Brunner H., Mayer U., Hoffmann H. *Langmuir* **1999**, *15*, 5339-5346.

A partir du 23-(trichlorosilyl)tricosanoate de méthyle, des monocouches bien ordonnées et compactes, présentant un groupement C=O orienté perpendiculairement à la silice, ont été mises en évidence par des mesures d'ellipsométrie, d'angle de contact et d'infrarouge.⁷² Par contre, selon des études menées au Laboratoire (ISM) dans le cas de l'acétate de 2-(22-trichlorosilyldocosy)éthyle, où le groupement acétate est plus volumineux, on observe une moins bonne organisation de la SAM due à des gênes stériques. Si la fonction alcool est déprotégée, la SAM a une meilleure organisation.⁷³ En effet, des liaisons hydrogène vont se former entre les groupements alcool ce qui donnera une meilleure cohésion à la monocouche.

e) *Les fonctions favorisant un auto-assemblage*

i. Les cycles aromatiques et les interactions π - π

L'ajout de cycles aromatiques dans les chaînes alkyle, via des interactions π - π , apporte de la stabilité et des propriétés optiques ou électroniques particulières à la monocouche.

Tillman *et al.* ont donc essayé d'obtenir des monocouches à partir d'agents de couplage comportant un groupement phénoxy intercalé dans la chaîne alkyle (Figure I-14).⁷⁴ Dans le cas des longues chaînes alkyle comme le 1-(trichlorosilyl)-11-(*p*-*n*-nonylphénoxy)undécane ($n = 20$) des SAMs de qualité comparable à celles obtenues à partir d'OTS ont été observées. De plus, le groupement phénoxy étant éloigné de la surface de la SAM, il n'influence pas les propriétés de mouillabilité de celle-ci. Pour les chaînes alkyle plus courtes ($n = 13$), l'ajout d'un tel groupement diminue l'ordre de la monocouche. En effet, cela a un effet similaire à celui observé lors de la réduction de la longueur de la chaîne alkyle de deux carbones. Enfin, ils ont aussi démontré que plus le groupement phénoxy est proche de la surface de la SAM, plus il va avoir d'influence sur les propriétés de mouillabilité de la monocouche.

⁷² Tillman N., Ulman A., Penner T.L. *Langmuir* **1989**, 5, 101-111.

⁷³ Choplin F., Navarre S., Bousbaa J., Babin P., Bennetau B., Bruneel J-L., Desbat B. *J. Raman Spectrosc.* **2003**, 34, 902-906.

⁷⁴ Tillman N., Ulman A., Schildkraut J.S., Penner T.L. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 6136-6144.

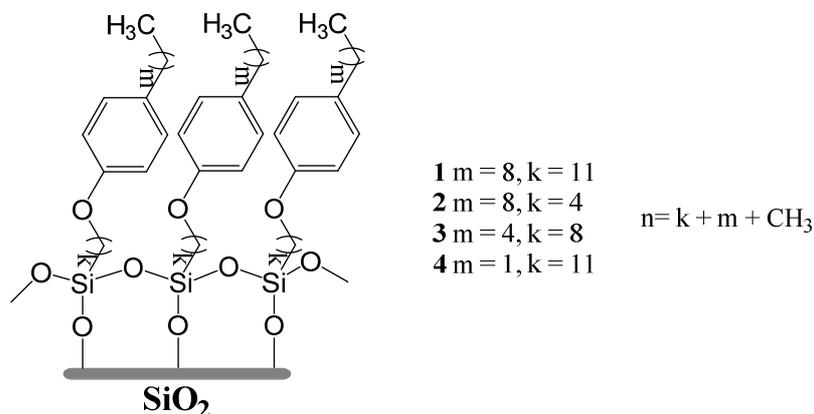


Figure I-14. Schéma des molécules utilisées par Tillman *et al.*⁷⁴

Il est aussi possible d'obtenir des monocouches bien ordonnées avec des organosilanes comportant une chaîne alkyle terminée par quatre cycles aromatiques successifs.⁷⁵ Pour cela, la température de greffage a été diminuée à 0°C afin de réduire l'agitation thermique et permettre l'assemblage des molécules grâce aux fortes interactions π - π .

Lorsque le groupement phényle est directement lié à l'atome de silicium, il est aussi possible d'obtenir des monocouches denses et bien organisées. Par contre, la longueur du groupement aromatique joue un rôle important dans l'organisation. En effet, une multicouche est obtenue pour le phényltriméthoxysilane, alors que pour le styryltriméthoxysilane (-Ph-CH=CH₂) et le méthylstilbényltriméthoxysilane (-Ph-CH=CH-Ph-CH₃) ce sont des monocouches.⁷⁶

ii. Les liaisons hydrogène intermoléculaires

La formation de liaisons hydrogène entre les différentes molécules d'une monocouche devrait aussi augmenter la stabilité d'une SAM. C'est pourquoi l'ajout d'une fonction amide au sein de la chaîne alkyle a été largement étudié. En général, cette fonction est créée par la réaction de la fonction amine terminale d'une chaîne courte (le plus souvent le 3-aminopropyltriéthoxysilane (APTES)) avec un acide⁷⁷, un chlorure d'acide⁷⁸ ou bien un anhydride.⁷⁹ Ren *et al.* ont fait réagir un acide à chaîne longue (l'acide stéarique) sur une

⁷⁵ Nam H., Granier M., Boury B., Park S.Y. *Langmuir* **2006**, *22*, 7132-7134.

⁷⁶ Moineau J., Granier M., Lanneau G.F. *Langmuir* **2004**, *20*, 3202-3207.

⁷⁷ Anderson A.S., Dattelbaum A.M., Montaña G.A., Price D.N., Schmidt J.G., Martinez J.S., Grace W.K., Grace K.M., Swanson B.I. *Langmuir* **2008**, *24*, 2240-2247.

⁷⁸ Fang J., Chen M-S., Shashidhar R. *Langmuir* **2001**, *17*, 1549-1551.

⁷⁹ Kim J., Cho J., Seidler P.M., Kurland N.E., Yadavalli V.K. *Langmuir* **2010**, *26*, 2599-2608.

surface de silice préalablement fonctionnalisée avec une couche d'APTÉS.⁸⁰ Bien que la fonctionnalisation de la surface avec l'acide entraîne une diminution de sa rugosité, les auteurs n'ont pas réussi à mettre en évidence la présence de liaisons hydrogène. En effet, en spectroscopie infrarouge par transmission les bandes caractéristiques de l'amide n'ont pu être identifiées. Le signal est relativement faible et les bandes caractéristiques de l'eau et de la silice apparaissent au même endroit.

Les substrats à base de silice n'étant pas adaptés aux caractérisations par spectroscopie infrarouge d'absorption-réflexion (IRRAS), il est difficile de mettre en évidence la présence de liaisons hydrogène dans les monocouches comportant une fonction amide. Pour essayer de contourner ce problème, un cristal ATR a été fonctionnalisé directement avec une monocouche.⁸¹ Cette technique est loin d'être idéale car elle nécessite de nettoyer le cristal avec un plasma d'argon pour enlever la monocouche ce qui peut accélérer son vieillissement. Kim et *al.* ont, quant à eux, fixé un wafer de silicium fonctionnalisé directement sur le cristal ATR pour enregistrer le spectre de la monocouche (la face fonctionnalisée orientée côté cristal).⁷⁹ La même technique a été utilisée pour caractériser une surface fonctionnalisée par la *N*-[3-(triméthoxysilyl)propyl]éthylènediamine sur laquelle ils ont fait réagir le chlorure de stéarolye.⁸² En observant la position des bandes amide I et II, ils ont mis en évidence l'existence probable de liaisons hydrogène dans le film. De plus, ils ont montré que la présence d'une fonction amine supplémentaire améliorerait la stabilité du film en formant une deuxième couche de liaisons hydrogène.

Certaines équipes ont aussi essayé de greffer directement le précurseur comportant la fonction amide sur une surface de silice. Par exemple, une surface a été fonctionnalisée avec le *N*-[(3-triéthoxysilyl)propyl]octadécanoylamide.⁸³ Grâce à la fonction amide, la monocouche présente une meilleure stabilité. Par contre, par spectroscopie infrarouge, ils ont montré que les chaînes alkyle étaient relativement peu organisées (valeurs de 2925 cm⁻¹ et 2854 cm⁻¹ contre 2930 cm⁻¹ et 2856 cm⁻¹ pour des chaînes totalement désordonnées⁸⁴). Cette désorganisation des chaînes alkyle peut être expliquée par la distance entre deux groupements amide (4,5-5 Å)⁸⁵, trop importante, pour que les interactions de Van der Waals entre les chaînes alkyle puissent avoir lieu.

Il est toutefois plus facile de mettre en évidence l'existence de liaisons hydrogène intermoléculaires dans le cas du greffage de thiols comportant une liaison amide sur des

⁸⁰ Ren S., Yang S., Zhao Y. *Langmuir* **2003**, *19*, 2763-2767.

⁸¹ Siewierski L.M., Brittain W.J., Petrash S., Foster M.D. *Langmuir* **1996**, *12*, 5838-5844.

⁸² Song S., Zhou J., Qu M., Yang S., Zhang J. *Langmuir* **2008**, *24*, 105-109.

⁸³ Song S., Ren S., Wang J., Yang S., Zhang J. *Langmuir* **2006**, *22*, 6010-6015.

⁸⁴ Snyder R.G., Strauss H.L., Elliger C.A. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86*, 5145-5150.

⁸⁵ Dieudonné P., Wong Chi Man M., Pichon B.P., Vellutini L., Bantignies J-L., Blanc C., Creff G., Finet S., Sauvajol J-L., Bied C., Moreau J.J.E. *Small* **2009**, *5*, 503-510.

surfaces d'or. En effet ces substrats sont adaptés pour une étude par spectroscopie infrarouge par réflexion. Tam-Chang et *al.* ont montré la présence de ces liaisons en étudiant par spectroscopie infrarouge polarisée par réflexion externe (PIERS) la fonctionnalisation d'une surface d'or par un thiol comportant une fonction amide.⁸⁶ L'étude de la position et de l'intensité relative des bandes de la fonction amide leur permet d'affirmer que la plupart des chaînes sont impliquées dans des liaisons hydrogène. La présence d'une fonction amide assure une meilleure stabilité des monocouches mais par contre elle tend à désorganiser les chaînes alkyles. Pour disposer d'un système ordonné, il faut utiliser des chaînes alkyles plus longues ($n = 14$).⁸⁷

La fonction urée a aussi été utilisée pour former des SAMs s'auto-assemblant par liaisons hydrogène sur des substrats de silice. Par exemple, une fonction urée a été créée en faisant réagir, après greffage, différentes amines (comme la dodécylamine par exemple) sur une SAM composée d'isocyanates ($n = 10$).⁸⁸ La présence de liaisons hydrogène a été mise en évidence par FTIR-ATR (Figure I-15).

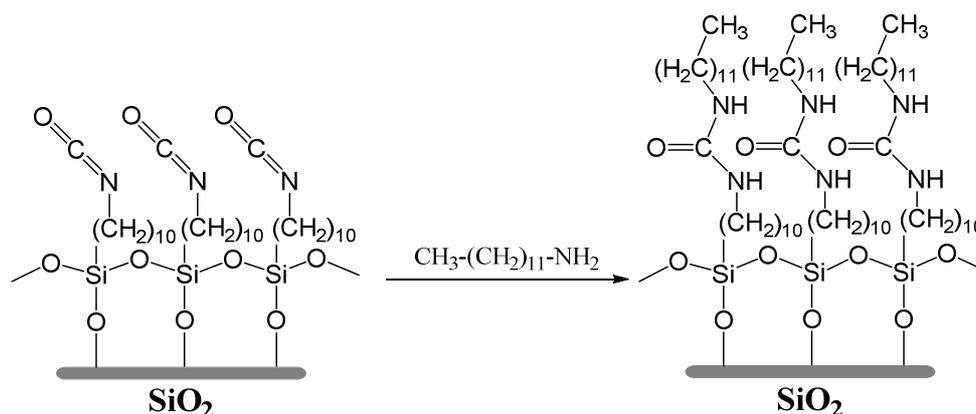


Figure I-15. Schéma de la réaction d'une monocouche terminée par un isocyanate avec la dodécylamine.

L'utilisation de longues chaînes comportant une fonction urée présente plusieurs avantages par rapport aux longues chaînes purement alkyle. D'une part, la synthèse de longues chaînes purement alkyle est souvent compliquée à mettre en œuvre et donne de faibles rendements. D'autre part, l'auto-assemblage par liaisons hydrogène permet d'avoir une meilleure cohésion de la SAM.

⁸⁶ Tam-Chang S-W., Biebuyck H.A., Whitesides G.M., Jeon N., Nuzzo R.G. *Langmuir* **1995**, *11*, 4371-4382.

⁸⁷ Clegg R.S., Hutchison J.E. *Langmuir* **1996**, *12*, 5239-5243.

⁸⁸ Ardès-Guisot N., Durand J-O., Granier M., Perzyna A., Coffinier Y., Grandidier B., Wallart X., Stievenard D. *Langmuir* **2005**, *21*, 9406-9408.

Pour obtenir une urée, la modification après le greffage, n'est pas la seule possibilité (Figure I-15). La synthèse et le greffage d'organosilanes fonctionnels comportant cette fonction peut aussi être envisagée. Cette synthèse, basée sur la chimie des isocyanates, est plus facile à mettre en œuvre et permet d'obtenir de meilleurs rendements.

Au Laboratoire (ISM) la synthèse d'organosilanes fonctionnels comportant une fonction urée a été réalisée (Figure I-16).⁸ Pour cela, tout d'abord, la fonction acide carboxylique de l'acide 12-aminododécanoïque est protégée sous forme d'ester méthylique. Celui-ci est ensuite couplé avec l'isocyanate insaturé obtenu suite à une réaction de Curtius pour synthétiser le précurseur insaturé. Pour finir, l'organosilane est réalisé grâce à l'hydrosilylation du précurseur insaturé.

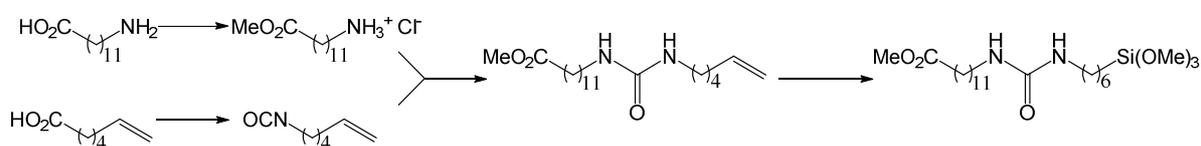


Figure I-16. Schéma de la synthèse d'un organosilane fonctionnel comportant une fonction urée.⁸

Des monocouches formées à partir de cet organosilane ont été réalisées sur des lames d'or recouvertes d'une fine couche de silice, pouvant être ensuite caractérisées par PM-IRRAS (Spectroscopie InfraRouge de Réflexion-Absorption par Modulation de Polarisation). Cette technique permet d'avoir des informations sur l'organisation des molécules au sein de la SAM. Il est, par exemple, possible de déterminer l'orientation du groupement urée. Les liaisons C=O et N-H étant orientées préférentiellement parallèlement à la surface, les liaisons hydrogène intermoléculaires sont donc favorisées. L'écart entre les deux bandes caractéristiques de l'urée permet aussi de confirmer la présence de liaisons hydrogène.⁸ Erreur ! Signet non défini.

Toujours en utilisant la chimie des isocyanates, il est possible de synthétiser des organosilanes avec d'autres fonctions terminales (époxyde, vinyle⁸⁹ par exemple) et de faire varier la position de la fonction urée dans la chaîne. Les SAMs réalisées à partir de ces organosilanes ont aussi été caractérisées par PM-IRRAS (Figure I-17).

⁸⁹ Ramin M.A., Le Bourdon G., Heuze K., Degueil M., Belin C., Buffeteau T., Bennetau B., Vellutini L. *Langmuir* **2012**, 28, 17672-17680.

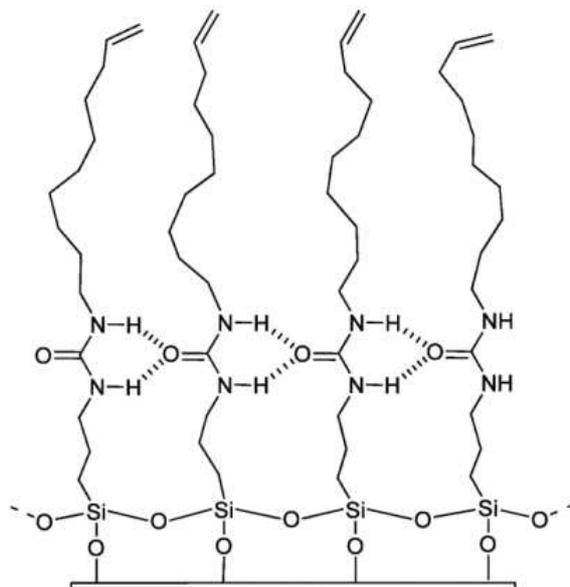


Figure I-17. Schéma d'une SAM formée à partir d'un organosilane comportant une fonction urée et terminée par une double liaison.⁸⁹

L'analyse par PM-IRRAS permet, d'une part d'avoir des informations sur l'organisation des molécules (ordre ou désordre des chaînes alkyle), d'autre part de suivre les modifications chimiques sur la fonction terminale.⁸⁹

3. Formation de SAMs mixtes

Il est possible de modifier les propriétés de la surface (mouillabilité, adhésion...) en faisant varier les proportions relatives de deux ou plusieurs composants. Le développement de SAMs mixtes peut aussi présenter un intérêt dans le domaine des biotechnologies. Ainsi, en diluant un organosilane réactif au milieu d'autres « inertes », les biomolécules immobilisées sur la surface peuvent être espacées.

Pour former des SAMs mixtes, deux méthodes sont possibles. La première consiste à mélanger deux molécules et à les greffer en une seule fois. La deuxième est d'ajouter d'abord une première molécule de façon à former une monocouche incomplète et ensuite de la compléter avec une seconde molécule (Figure I-18).

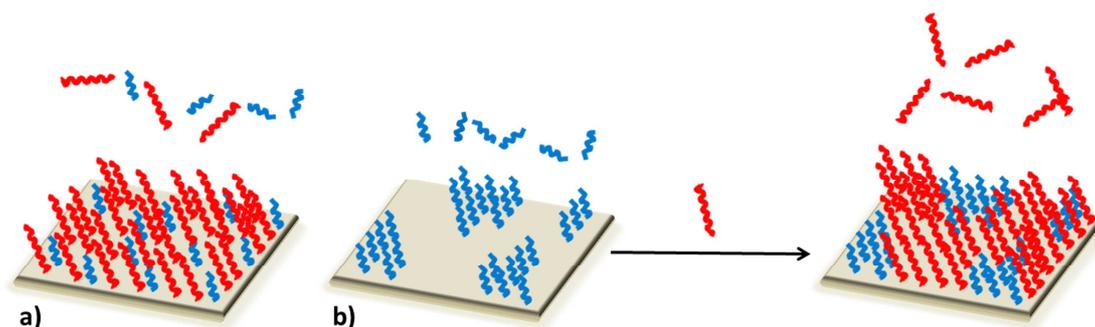


Figure I-18. Schéma de préparation des SAMs mixtes : a) par co-adsorption et b) par additions successives.

a) *Par co-adsorption de deux molécules*

La première approche consiste à greffer sur une surface un mélange de deux molécules dont la proportion relative peut varier. Le principal inconvénient de cette méthode est que, suivant les propriétés respectives des deux molécules, la proportion relative des molécules greffées sur la surface ne correspond pas toujours à celle de la solution de départ.

Une étude sur des SAMs mixtes composées d'alkyltrichlorosilanes de différentes longueurs ($n = 4, 8, 12, 16, 18$), avec des groupements terminaux d'encombrements différents (méthyle ou tert-butyle), a montré que la composition de la monocouche était gouvernée par des facteurs cinétiques.⁹⁰ Les chaînes linéaires terminées par un groupement méthyle s'adsorbent avec une bien meilleure efficacité que celles avec un groupement terminal encombré.

Lorsque les deux molécules constituant la monocouche ont une structure ou des propriétés similaires, la proportion des deux molécules sur la surface va correspondre à celle dans la solution. Par exemple, une étude a montré que pour des monocouches composées de deux molécules similaires telles que le HTS (hexadécyltrichlorosilane) et le Br-HTS, la proportion des molécules sur la surface correspond à celle dans la solution.⁹¹ Au Laboratoire (ISM) des monocouches mixtes d'OTS et de (21-aminohénicosyl)trichlorosilane (protégé par un groupement phthalimide pour le greffage) ont été développées.⁹² Des SAMs homogènes ont été obtenues et comme les deux molécules sont relativement semblables, la proportion des molécules dans la solution correspond à celle sur la surface.

⁹⁰ Offord D.A., Griffin J.H. *Langmuir* **1993**, 9, 3015-3025.

⁹¹ Fryxell G.E., Rieke P.C., Wood L.L., Engelhard M.H., Williford R.E., Graff G.L., Campbell A.A., Wiacek R.J., Lee L., Halverson A. *Langmuir* **1996**, 12, 5064-5075.

⁹² Martin P., Marsaudon S., Thomas L., Desbat B., Aimé J-P., Bennetau B. *Langmuir* **2005**, 21, 6934-6943.

Par contre, si les deux molécules ont des structures différentes, une adsorption préférentielle d'une des deux molécules dans la SAM peut être notée. Par exemple, pour des monocouches constituées à partir de DTS (décyltrichlorosilane) et TFEE (1-(trichlorosilyl)-11-[(2,2,2-trifluoroéthoxy)carbonyl]-undécane) et avec l'utilisation d'un solvant apolaire (cyclohexane), une adsorption préférentielle de l'ester est observée. Des liaisons hydrogène se forment entre les molécules d'ester.⁹¹ Une différence de vitesse d'adsorption ou une pré-agrégation des molécules en solution peut aussi favoriser l'adsorption d'une des molécules. Ce phénomène est, par exemple, remarqué pour des SAMs mixtes composées d'ODS (octadécyltriméthoxysilane) et d'APTES dans lesquelles ce dernier est préférentiellement adsorbé.⁹³ Des molécules fluorées (tridécafluoro-1,1,2,2-tétrahydrooctyl)-1-trichlorosilane) s'adsorbent environ dix fois plus rapidement que l'octyltrichlorosilane dans le cas d'une SAM mixte formée avec ces deux composés.⁹⁴ Cette différence d'adsorption peut aussi être observée pour des SAMs mixtes composées de deux molécules terminées par une fonction ayant une réactivité orthogonale (ne réagissant pas l'une sur l'autre et ayant chacune leurs réactifs spécifiques). En effet pour des SAMs mixtes contenant une molécule terminée amine et une molécule terminée azide, la molécule terminée amine va avoir une adsorption préférentielle (Figure I-19).⁹⁵

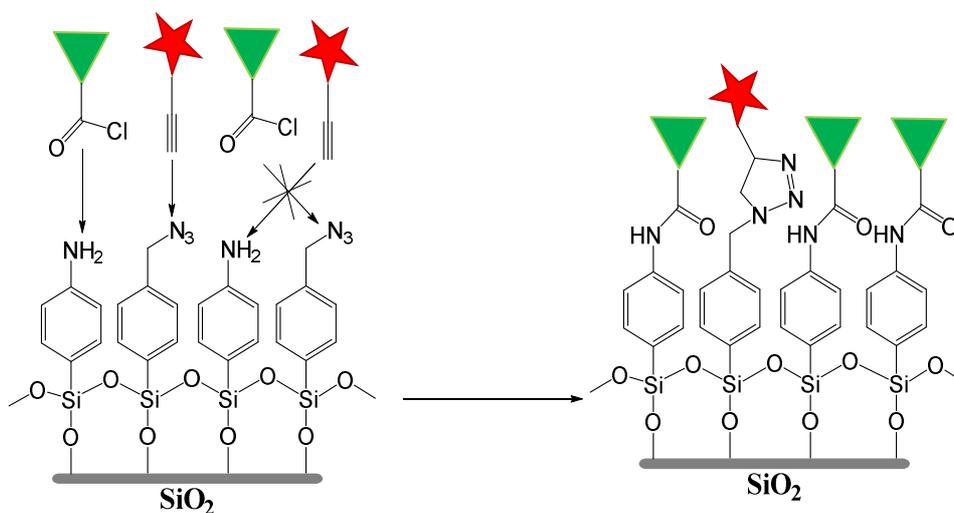


Figure I-19. Schéma d'une SAM mixte bi-fonctionnelle avec une réactivité orthogonale.

Vu l'importance de connaître la proportion de molécules réellement adsorbées sur la surface de silice, Min et *al.* ont développé une technique permettant de quantifier la

⁹³ Tong Y., Tyrode E., Osawa M., Yoshida N., Watanabe T., Nakajima A., Ye S. *Langmuir* **2011**, 27, 5420-5426.

⁹⁴ Lagutchev A.S., Song K.J., Huang J.Y., Yang P.K., Chuang T.J. *Surf. Coat. Tech.* **1997**, 94-95, 383-389.

⁹⁵ Azam M.S., Fenwick S.L., Gibbs-Davis J.M. *Langmuir* **2011**, 27, 741-750.

proportion de chaque molécule dans une SAM mixte au moyen de spectroscopie infrarouge (FT-IR) ou de spectroscopie de masse (TOF-SIMS (Time Of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry)).⁹⁶

De plus, lors de la formation de monocouches mixtes par co-adsorption de deux molécules, un autre type de phénomène peut être constaté. En effet, il n'y a pas toujours une dispersion homogène des deux molécules. Lorsque les deux molécules ont des structures qui leur donnent des propriétés d'assemblages différentes, il peut y avoir une ségrégation de phase. Dans ce cas, un regroupement des molécules d'un même type par nano-domaines va avoir lieu. Par exemple, dans le cas d'une SAM mixte composée d'OTS et d'aminophényltriméthoxysilane (APhMS), on note l'apparition d'« îlots » d'une des molécules au milieu d'une phase continue constituée par l'autre.⁹⁷ En effet le cycle aromatique du groupement phényle (interactions π - π) et la fonction amine (liaisons hydrogène) vont faire se regrouper les molécules d'APhMS ensemble. La polarité du solvant utilisé ou le rapport entre les deux molécules, permet de choisir quelle molécule s'assemble en îlots. Ce phénomène de ségrégation de phase est aussi observé dans le cas du mélange de phénylalkyltrichlorosilanes avec des molécules d'OTS.⁹⁸ Avec une SAM mixte composée de deux phénylalkyltrichlorosilanes (PBTCI (phénylbutyltrichlorosilane) et PFPTCI (pentafluoro-phénylpropyltrichlorosilane)) dilués dans de l'OTS, la taille des îlots peut être drastiquement diminuée (environ 100 nm de diamètre).

Ce phénomène de ségrégation de phase peut aussi être constaté lors du développement de SAMs mixtes composées de longues chaînes alkyles ayant de fortes différences de longueur ($n = 30$ et soit $n = 16, 18$ ou 20). Suivant les conditions utilisées trois types différents de ségrégation de phase peuvent être distingués⁹⁹ :

- des « îlots » : îlots de la molécule la plus longue entourés d'une phase continue de la molécule la plus courte (Figure I-20 a)),
- des « trous » : îlots de la molécule la plus courte entourés d'une phase continue de la molécule la plus longue (Figure I-20 b)),
- des « filaments » de la molécule la plus longue dans une phase continue de la molécule la plus courte (Figure I-20 c)).

⁹⁶ Min H., Yu H., Son M., Moon D.W., Lee T.G. *Surf. Interface Anal.* **2011**, *43*, 397-401.

⁹⁷ Fan F., Maldarelli C., Couzis A. *Langmuir* **2003**, *19*, 3254-3265.

⁹⁸ Patrone L., Gadenne V., Desbief S. *Langmuir* **2010**, *26*, 17111-17118.

⁹⁹ Desbief S., Patrone L., Goguenheim D., Vuillaume D. *RSC Advances* **2012**, *2*, 3014-3024.

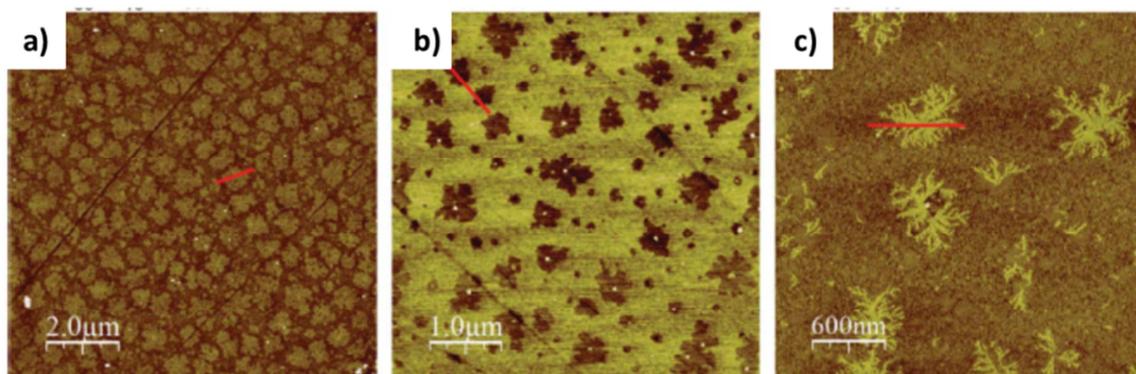


Figure I-20. Trois types de ségrégation de phase possibles pour les SAMs mixtes (a) îlots, b) trous et c) filaments).

Au Laboratoire (ISM), il a été montré que, pour des SAMs mixtes formées sur des wafers de silicium à partir d'un agent de couplage dendritique de 1^{ère} génération (Figure I-21) et de décyltrichlorosilane, il était possible d'obtenir, au choix, une surface homogène ou des « îlots » suivant le solvant utilisé.¹⁵

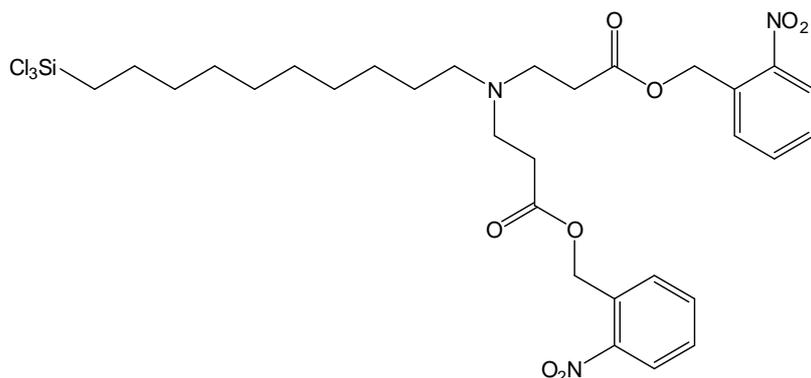


Figure I-21. Structure de l'agent de couplage dendritique de 1^{ère} génération.

En effet, lorsque le solvant utilisé est un mélange de chloroforme et de cyclohexane (25/75) une surface homogène est obtenue. Par contre, lors de l'utilisation de toluène, on assiste à la formation de nano-domaines (Figure I-22).

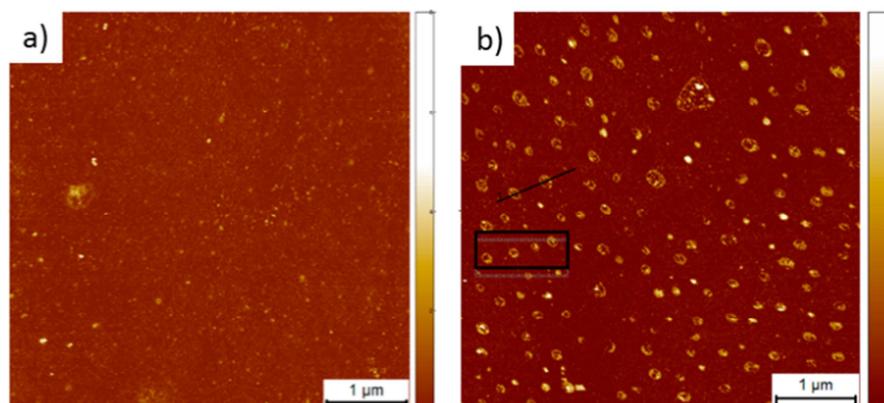


Figure I-22. Images AFM obtenues pour le greffage de SAMs mixtes composées d'un dendron de 1^{ère} génération et de décyltrichlorosilane (a) dans $\text{CHCl}_3/\text{C}_6\text{H}_{12}$ (25/75) ; b) dans le toluène).¹⁵

b) *Par additions successives de deux molécules.*

Pour certaines applications, il est nécessaire d'avoir un meilleur contrôle des proportions respectives de chacun des composés formant une SAM mixte. Dans ce cas, il est possible d'ajouter successivement les deux molécules.

Mathauer *et al.* ont étudié, par fluorescence, des SAMs mixtes composées d'OTS et de 11-(2-naphtyl)undécyltrichlorosilane (2-Np).⁴⁷ Des monocouches partielles d'OTS ou de 2-Np sont formées. En raison d'un trop grand espacement des molécules dans les monocouches partielles, les molécules ne sont pas organisées. Les SAMs mixtes sont ensuite préparées par comblement avec respectivement 2-Np ou OTS. Après le comblement, les molécules étant plus proches les unes des autres et donc la SAM plus dense, les molécules sont mieux ordonnées.

Une étude par AFM de SAMs mixtes formées par addition successive d'APS ((3-aminopropyl)triméthoxysilane) et d'OTMS montre la formation d'îlots d'APS entouré d'OTMS.¹⁰⁰ Cela est vérifié par l'immobilisation de nanoparticules d'or qui se déposent sélectivement sur les molécules d'APS (Figure I-23). Cette technique d'additions successives permet d'avoir un meilleur contrôle de la ségrégation des molécules et du design des surfaces.

¹⁰⁰ Choi I., Kim Y., Kang S.K., Lee J., Yi J. *Langmuir* **2006**, 22, 4886-4889.

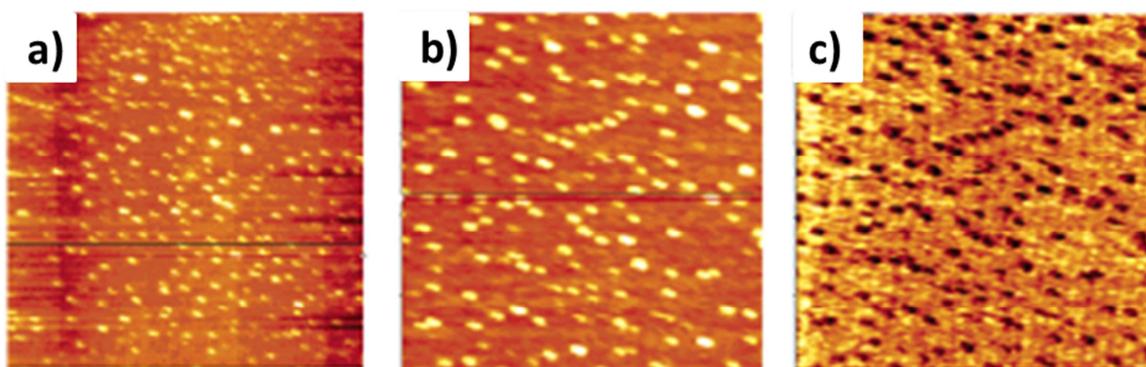


Figure I-23. a) image AFM de hauteur d'une SAM composée d'APS et d'OTMS ; b) et c) images AFM de hauteur et de LFM (Lateral Force Microscopy) de la même SAM avec des nanoparticules d'or.¹⁰⁰

Elle permet aussi d'obtenir une bonne organisation des molécules, ce qui ne serait pas le cas, si elles étaient greffées seules. C'est, par exemple, ce qui est constaté pour des SAMs mixtes composées de (17-aminoheptadécyl)triméthoxysilane (AHTMS) et d'OTS.¹⁰¹ En effet, l'adsorption d'AHTMS sur des îlots pré-adsorbés d'OTS permet d'avoir une organisation des longues chaînes terminées par des fonctions amines.

En jouant sur des groupements hydrolysables différents et sur l'ordre d'addition, il est possible d'obtenir soit une surface homogène, soit une organisation par îlots. En effet, lors du greffage successif d'OTS et d'octyltriéthoxysilane (C8TES), il est possible d'obtenir les deux types de surface.¹⁰² Si le C8TES est greffé d'abord, celui-ci va former un réseau tridimensionnel. La molécule d'OTS est juste assez grande pour venir se mettre dans les trous laissés par le réseau de C8TES. La formation d'une surface homogène a donc lieu. Par contre si l'ordre est inversé, l'OTS va former des « îlots » et le C8TES va venir combler les espaces. Une ségrégation de phase et l'apparition de domaines de C8TES et d'OTS dont la taille varie avec le temps de réaction est remarquée (Figure I-24).

¹⁰¹ Harder P., Bierbaum K., Woell C., Grunze M., Heid S., Effenberger F. *Langmuir* **1997**, *13*, 445-454.

¹⁰² Feng J., Xu G.H., An Y., Zeng X. *Colloid Surface A* **2008**, *316*, 194-201.

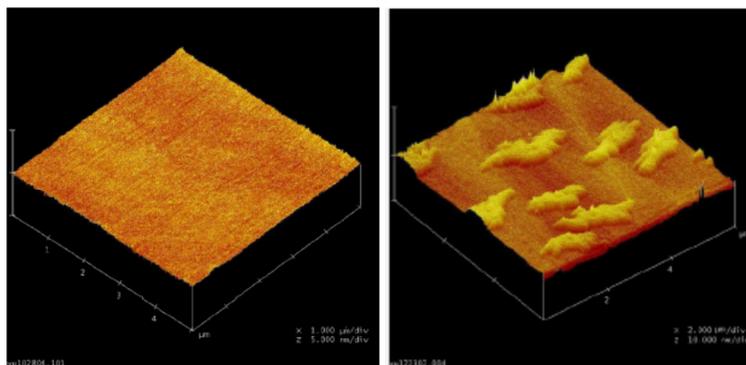


Figure I-24. Images AFM de SAM mixtes C8TES/OTS (à gauche le C8TES est greffé en 1^{er} ; à droite c'est l'OTS).¹⁰²

Parmi les deux méthodes présentées ici (co-adsorption ou additions successives), chacune a ses avantages. En effet, si les deux molécules ont des propriétés chimiques proches, il va être préférable d'utiliser la méthode par co-adsorption car elle est plus facile à mettre en œuvre et la proportion dans la solution sera la même que celle sur la surface. Par contre, dans le cas de molécules de propriétés chimiques différentes, pour connaître de manière précise la proportion relative de chaque molécule, il sera plus avantageux de procéder par additions successives.

C. Résumé

Au cours de cette étude bibliographique, les différents moyens d'immobilisation des objets biologiques sur les SAMs ont été envisagés : de façon non covalente (par adsorption physique ou affinité biologique) ou covalente (à l'aide de fonctions acide carboxylique, amine, époxyde...).

Dans le cadre du développement de biocapteurs ou de biomatériaux, la limitation de l'adhésion non-spécifique des biomolécules sur une surface peut revêtir une importance toute particulière. Différentes techniques existent pour cela, mais la plus souvent utilisée consiste à ajouter des chaînons éthylène glycol à l'extrémité des molécules greffées sur les surfaces.

Ensuite, nous avons présenté le principe de la formation des SAMs sur silice ainsi que les différents paramètres pouvant influencer la formation et l'organisation de celles-ci tels que :

Chapitre I : Etude bibliographique sur l'immobilisation d'objets biologiques sur des surfaces chimiquement modifiées et la formation des monocouches auto-assemblées.

- la quantité d'eau présente et le solvant utilisé
- la température de greffage
- la longueur de la chaîne carbonée ainsi que le groupement terminal utilisé
- la présence de fonctions pouvant favoriser un auto-assemblage.

De plus, le développement des SAMs mixtes permet de faire varier plus progressivement les propriétés d'une surface (hydrophobicité, adhésion...) ou de diluer un organosilane réactif au milieu d'organosilanes inertes pour espacer les biomolécules immobilisées sur la surface. Il existe deux approches différentes pour former ce type de monocouches. Il est possible soit d'ajouter les deux composants ensemble, soit de procéder par additions successives. Chacune des deux méthodes présente ses avantages et ses inconvénients suivant les molécules utilisées et le but recherché.

Au vu de tous les éléments présentés ici, nous avons décidé, pour la suite de notre étude, de développer des SAMs formées à partir d'organosilanes comportant un groupement urée pour l'auto-assemblage par liaisons hydrogène ainsi qu'une fonction acide, protégée par un ester photolabile, pour l'immobilisation de biomolécules.

Puis, nous formerons des SAMs mixtes, afin de diluer l'organosilane réactif au milieu d'organosilanes inertes plus courts afin d'espacer les sites de fixation et de les rendre plus accessibles.

Pour finir, afin de diminuer au maximum l'adhésion non spécifique des biomolécules lors de leur immobilisation, des SAMs formées à partir d'organosilanes comportant un motif polyéthylène glycol seront aussi envisagées.

II. Chapitre II :

Elaboration des monocouches auto-assemblées (SAMs)

Lors de l'immobilisation de biomolécules sur une surface solide, il est important de contrôler ce processus pour pouvoir maintenir les propriétés biologiques de la biomolécule. En effet, nous avons vu lors du chapitre précédent qu'il était essentiel que l'objet biologique immobilisé sur une surface solide ne soit pas détériorée afin de permettre la mesure d'interactions par Spectroscopie Dynamique de Force (DFS). Pour cela, il faut pouvoir fonctionnaliser à façon une surface et contrôler de manière précise la chimie de surface.

Le greffage sur surfaces de silice a été préféré à celui sur lames d'or en raison de la meilleure stabilité des SAMs formées. Dans ce chapitre, nous étudierons donc la synthèse des différents agents de couplage siliciés utilisés et leur greffage sur des surfaces de type wafer de silicium pour les études en AFM et des miroirs d'or recouverts d'une fine couche de silice (20 nm) pour les études en infrarouge en mode réflexion. Nous étudierons les différents paramètres qui influencent le greffage de manière à obtenir une SAM la plus homogène possible avec une rugosité faible (≤ 1 nm).

Deux séries d'agents de couplage différentes seront présentées dans ce chapitre. Dans une première partie, des monocouches formées à partir d'agents de couplage dont la longue chaîne alkyle comporte un motif urée seront étudiées. Le motif urée permet un auto-assemblage par liaisons hydrogène qui devrait assurer une bonne cohésion de la monocouche. Dans un deuxième temps, dans le but de diminuer au maximum l'adhésion non spécifique et donc de favoriser l'accroche covalente, des monocouches formées à partir d'agents de couplage présentant un chaînon PEG seront présentées. En effet, dans la littérature^{1,2,3}, il est montré que des monocouches formées à partir de molécules présentant un chaînon PEG limitent l'adhésion non spécifique des biomolécules sur une surface.

A. Synthèse des SAMs présentant un motif urée

Pour pouvoir mesurer correctement des interactions uniques, l'écartement des biomolécules entre elles est capital. Pour cela les SAMs mixtes peuvent présenter un grand intérêt. Elles permettent la « dilution » de la fonction d'attache au milieu d'autres chaînes non réactives. De plus, une chaîne alkyle non réactive, plus courte que la réactive, favorise une meilleure accessibilité des fonctions d'attache.

¹ Soteropoulos C.E., Zurick K.M., Bernards M.T., Hunt H.K. *Langmuir* **2012**, 28, 15743-15750.

² Cheng J., Zhu G., Wu L., Du X., Zhang H., Wolfrum B., Jin Q., Zhao J., Offenhäusser A., Xu Y. *J. Neurosci. Methods* **2013**, 213, 196-203.

³ a) Bennetau B., Bousbaa J., Choplin F. Brevet Mondial WO0153303 **2001** ; b) Bennetau B., Bousbaa J., Choplin F., Souteyrand E., Martin J-R., Cloarec J-P. Brevet Mondial WO0153523 **2001**.

C'est pourquoi, pour fonctionnaliser les surfaces de silice, notre choix s'est porté sur les trois agents de couplage représentés en Figure II-1. Ils sont constitués :

- d'une longue chaîne alkyle comprenant une fonction urée permettant l'auto-assemblage par liaisons hydrogène intermoléculaires.
- d'un groupement silicié $-\text{SiR}_3$ ($\text{R} = \text{Cl}$ ou OMe) permettant le greffage de la molécule sur la surface de silice par réaction avec les silanols de celle-ci.
- d'un groupement fonctionnel GF constitué :
 - o soit d'une fonction acide carboxylique protégée par un ester nitrobenzylique permettant l'immobilisation covalente de la biomolécule
 - o soit d'un groupement méthyle non réactif impliqué dans l'élaboration des SAMs mixtes.

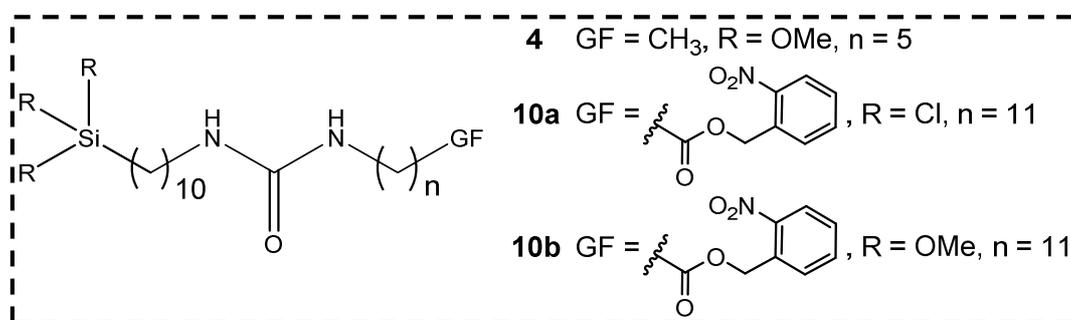


Figure II-1. Schéma des agents de couplage siliciés comportant un motif urée.

1. Synthèse des agents de couplage siliciés

a) Organosilane terminé par un groupement méthyle

La stratégie de synthèse utilisée pour réaliser l'organosilane terminé par un groupement méthyle est la suivante (Figure II-2).

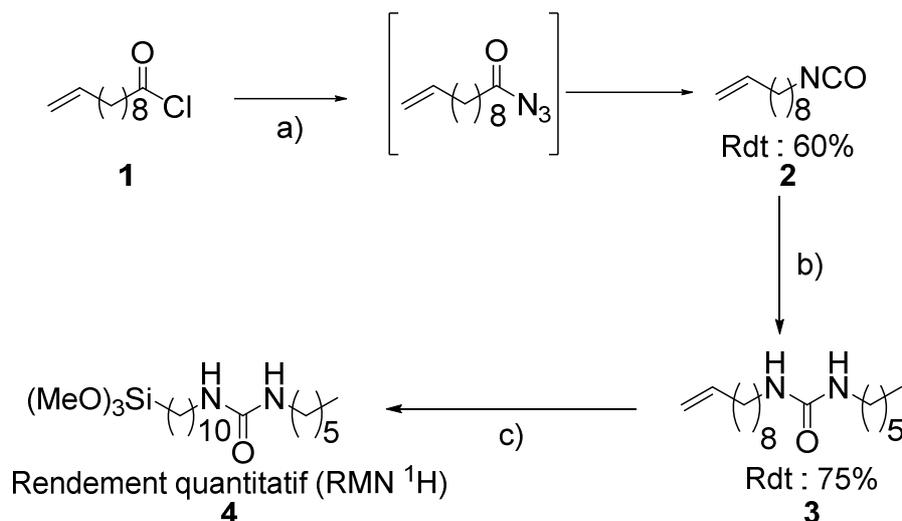


Figure II-2. Réactifs et conditions : a) NaN_3 (2 éq. +1 éq. après 3 h), toluène, 75°C , 20 h ; b) hexylamine (1 éq.), CH_2Cl_2 , 25°C , 16 h ; c) $\text{HSi}(\text{OMe})_3$ (5 éq.), cat. Karstedt (0,025 éq. en Pt), toluène, 65°C , 3 h.

Elle met en jeu la réaction d'un isocyanate insaturé, avec une amine primaire pour créer la fonction urée⁴. Puis l'hydrosilylation du précurseur insaturé conduit à l'agent de couplage organosilicié attendu.

i. Synthèse du 10-isocyanatodéc-1-ène

Le 10-isocyanatodéc-1-ène **2** est obtenu grâce à un réarrangement de Curtius à partir du chlorure de 10-undécénoyle (Figure II-3).⁵ Pour cela le chlorure d'acide est transformé en azoture carboxylique par réaction avec l'azoture de sodium. L'isocyanate est ensuite obtenu par décomposition thermique de l'azoture pour donner un intermédiaire électrophile (α -cétonitrène) qui subira ensuite un réarrangement sigmatropique suprafacial [1,2] avec une rétention de configuration pour conduire à l'isocyanate correspondant **2**.

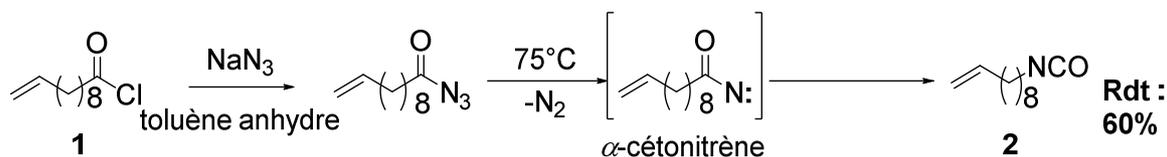


Figure II-3. Réarrangement de Curtius pour la préparation du 10-isocyanatodéc-1-ène.

⁴ Ardès-Guisot N., Durand J-O., Granier M., Perzyna A., Coffinier Y., Grandidier B., Wallart X., Stievenard D. *Langmuir* **2005**, 21, 9406-9408.

⁵ Ramin M.A., Le Bourdon G., Heuzé K., Degueil M., Belin C., Buffeteau T., Bennetau B., Vellutini L. *Langmuir* **2012**, 28, 17672-17680.

ii. Couplage entre l'amine et l'isocyanate

Pour obtenir l'urée insaturée **3**, le couplage entre *10-isocyanatodéc-1-ène 2* et l'*hexylamine* est réalisé dans le dichlorométhane anhydre pendant 16 h. La réaction n'étant pas complète, le produit final peut être isolé du milieu réactionnel par simple lavage au pentane, les réactifs de départ étant insolubles dans celui-ci.

iii. Hydrosilylation de l'urée insaturée

La réaction d'hydrosilylation est une des réactions les plus souvent utilisées, en synthèse organique.⁶ Elle permet, en effet, de former des organosilanes du type $RCH_2CH_2SiX_3$ en faisant réagir un trichlorosilane ou trialkoxysilane sur des composés éthyléniques en présence d'un catalyseur à base de platine. Cette réaction, en milieu anhydre, présente l'avantage d'être compatible avec la plupart des groupements fonctionnels (ester, urée...). Le plus souvent, le catalyseur de Karstedt, qui est un complexe de platine (0) coordonné à du divinyltétraméthylidisiloxane $O(SiMe_2CH=CH_2)_2Pt$, est utilisé (Figure II-4).

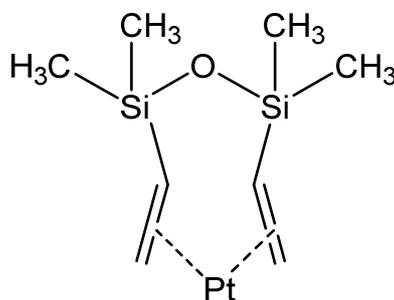


Figure II-4. Représentation du catalyseur de Karstedt.

Le mécanisme de cette réaction a fait l'objet de nombreux travaux pour comprendre quelles espèces étaient mises en jeu lors du cycle catalytique. Le mécanisme de Chalk-Harrod est cependant celui le plus communément accepté (Figure II-5).⁷

⁶ Marciniec B., Maciejewski H., Pietraszuk C., Pawluć P. *Hydrosilylation. A Comprehensive Review on Recent Advances*, Marciniec B., Ed., *Advances in Silicon Science*, Vol 1, Springer, 2009.

⁷ Harrod J.F., Chalk A.J. *Organic Synthesis via Metal Carbonyls*, Wender I. and Pino P., eds., Vol. 2, Wiley, 1977, p. 673.

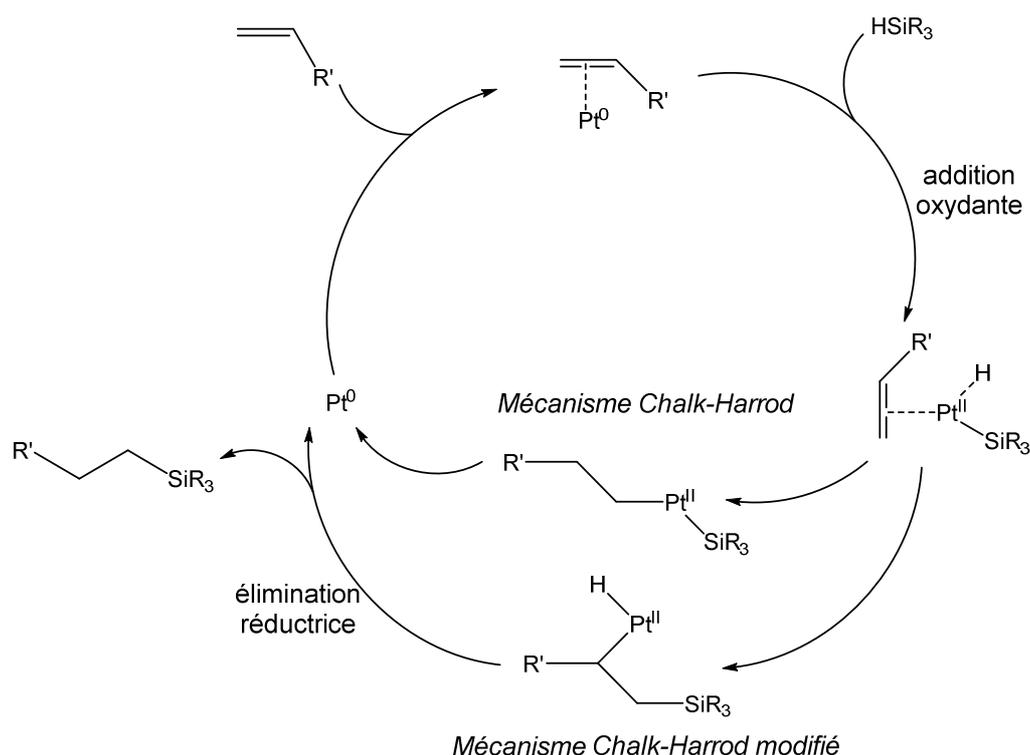


Figure II-5. Mécanisme de la réaction d'hydrosilylation selon Chalk et Harrod.

Le cycle catalytique commence par la coordination entre l'oléfine et le Pt^0 . Ensuite vient l'insertion de $HSiR_3$, par addition oxydante, donnant un complexe de Pt^{II} , puis la migration de l'oléfine entre la liaison H-Pt. Pour finir, une élimination réductrice permet d'obtenir l'organosilane et de régénérer le catalyseur de Pt^0 dans le cycle catalytique. Une version modifiée de ce mécanisme a été proposée pour expliquer la formation des vinylsilanes. Cette version, où l'oléfine migre entre la liaison Pt-SiR₃, a été confirmée par Sakaki et *al.* en 1998.⁸

Dans le cadre des oléfines terminales, il est possible d'obtenir deux isomères (α et β). Le catalyseur de Karstedt est connu pour favoriser la formation de l'isomère β (Figure II-6).

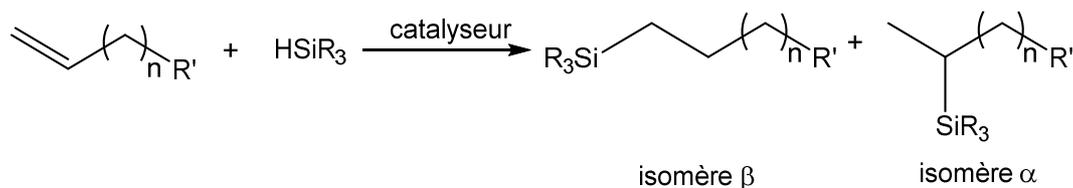


Figure II-6. Obtention de deux isomères dans le cadre des oléfines terminales.

⁸ Sakaki S., Mizoe N., Sugimoto M. *Organometallics* **1998**, *17*, 2510-2523.

Dans le cas de notre étude, le composé **3** a été solubilisé dans le toluène anhydre (précaution nécessaire pour éviter l'hydrolyse du silane). L'ajout d'un large excès de *triméthoxysilane* (5 éq.) et de *catalyseur de Karstedt* (0,025 éq. en Pt) pendant 3 h à 65°C a permis d'obtenir l'agent de couplage **4**.

L'obtention du composé **4** est vérifiée par RMN ^1H et ^{13}C . Sur le spectre ^{13}C du composé **4** (Figure II-7), la disparition des deux pics, qui correspondent aux carbones éthyléniques, situés à 139,3 ppm et 114,3 ppm (notés ★), est observée et de même pour l'apparition de deux nouveaux signaux, correspondant aux carbones (sp_3) formés, à 22,7 ppm et 9,2 ppm (notés ●). Ce dernier étant le pic correspondant au CH_2 lié au silicium. Un pic correspondant aux CH_3 du groupement triméthoxysilyle apparaît à 50,5 ppm (noté ▲).

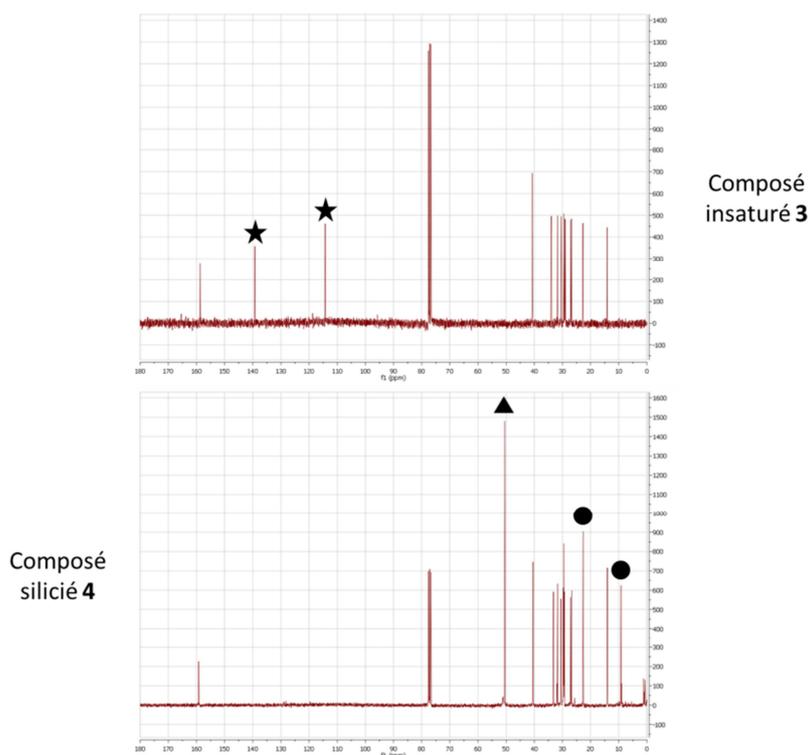


Figure II-7. Comparatif des spectres RMN ^{13}C des composés **3** et **4**.

b) *Organosilane terminé par une fonction ester nitrobenzylique*

Pour synthétiser l'organosilane terminé par une fonction ester nitrobenzylique, la stratégie suivante est utilisée (Figure II-8).

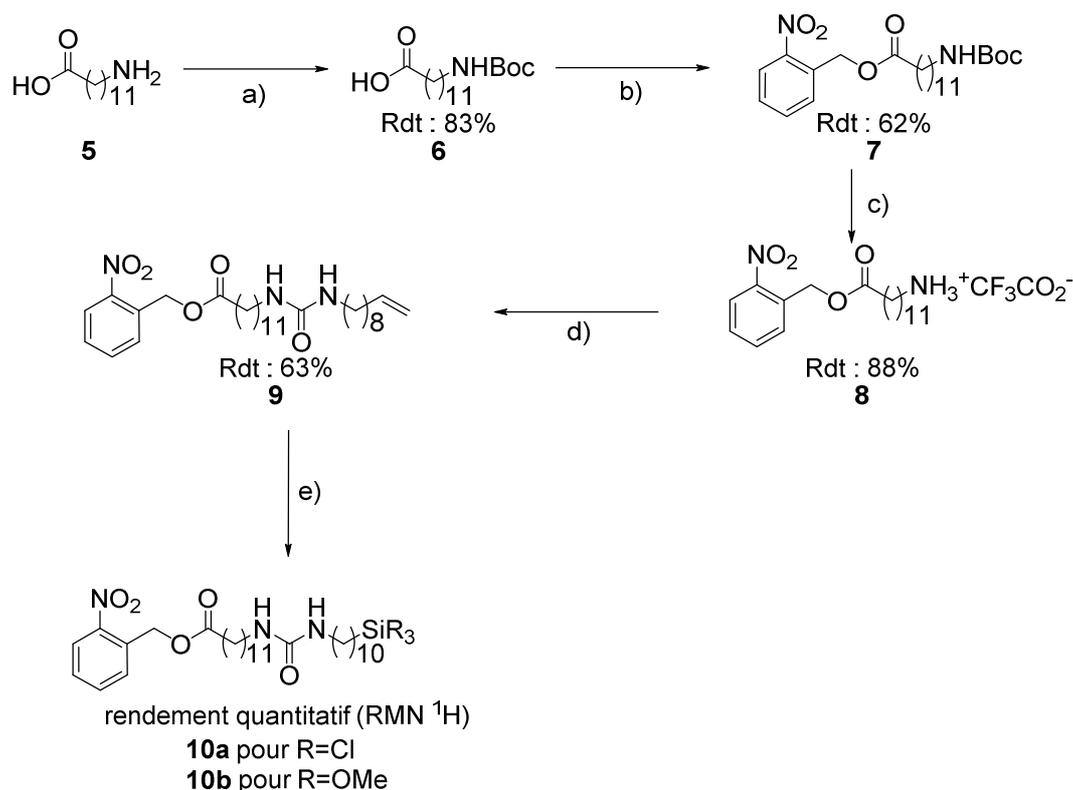


Figure II-8. Réactifs et conditions : a) Boc₂O (1,4 éq.), tert-butanol/H₂O (3/1), pH 13, 16 h ; b) alcool 2-nitrobenzylique (0,8 éq.), DCC (1 éq.), DMAP (1 éq.), CH₂Cl₂, 20 h ; c) TFA (12 éq.), CH₂Cl₂, 4 h ; d) 10-isocyanatodéc-1-ène (1,3 éq.), Et₃N (1,1 éq.), CH₂Cl₂, 16 h ; e) HSiR₃ (R=OMe ou Cl) (5 éq. pour OMe ou 16 éq. pour Cl), cat. Karstedt (0,025 éq. en Pt pour OMe ou 0,1 éq. en Pt pour Cl), toluène, 65°C pour OMe ou 40°C pour Cl, 3 h.

Après la protection de la fonction amine avec un groupement Boc, l'acide carboxylique est protégé par la formation d'un ester nitrobenzylique. Ensuite la fonction amine est déprotégée pour permettre le couplage avec l'isocyanate insaturé et donner la fonction urée. Pour finir, l'hydrosilylation du précurseur insaturé conduit aux agents de couplage organosiliciés désirés.

i. Protection de la fonction amine et formation de l'ester nitrobenzylique

L'acide 12-aminododécanoïque **5** peut, dans les conditions d'estérification avec l'alcool 2-nitrobenzylique, réagir sur lui-même et entraîner la formation d'une liaison amide. Pour éviter cette réaction parasite, la fonction amine est protégée par le groupement Boc.⁹

⁹ Jakobsen C.M., Denmeade S.R., Isaacs J.T., Gady A., Olsen C.E., Christensen S.B. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4696-4703.

Lors du greffage, une protection de la fonction acide est nécessaire pour éviter des réactions secondaires. En effet, la fonction acide pourrait former des liaisons hydrogène avec les silanols présents à la surface ou alors être complexée avec le catalyseur à base de platine utilisé pour l'hydrosilylation. Pour cela, l'ester nitrobenzylique est utilisé.¹⁰ Il présente l'avantage d'être photolabile (déprotection sous irradiation UV) et donc de permettre une déprotection douce qui évite une dégradation de la SAM. L'acide 12-(*tert*-butoxycarbonylamino)dodécanoïque **6**, en présence de *dicyclohexylcarbodiimide* (DCC), conduit à un intermédiaire réactionnel *o*-acylisourée qui réagit ensuite avec la *diméthylaminopyridine* (DMAP) pour donner un amide très réactif vis-à-vis des alcools (Figure II-9). La dicyclohexylurée (DCU), un sous-produit formé au cours de la réaction et insoluble dans le solvant de réaction, est facilement éliminée par filtration.

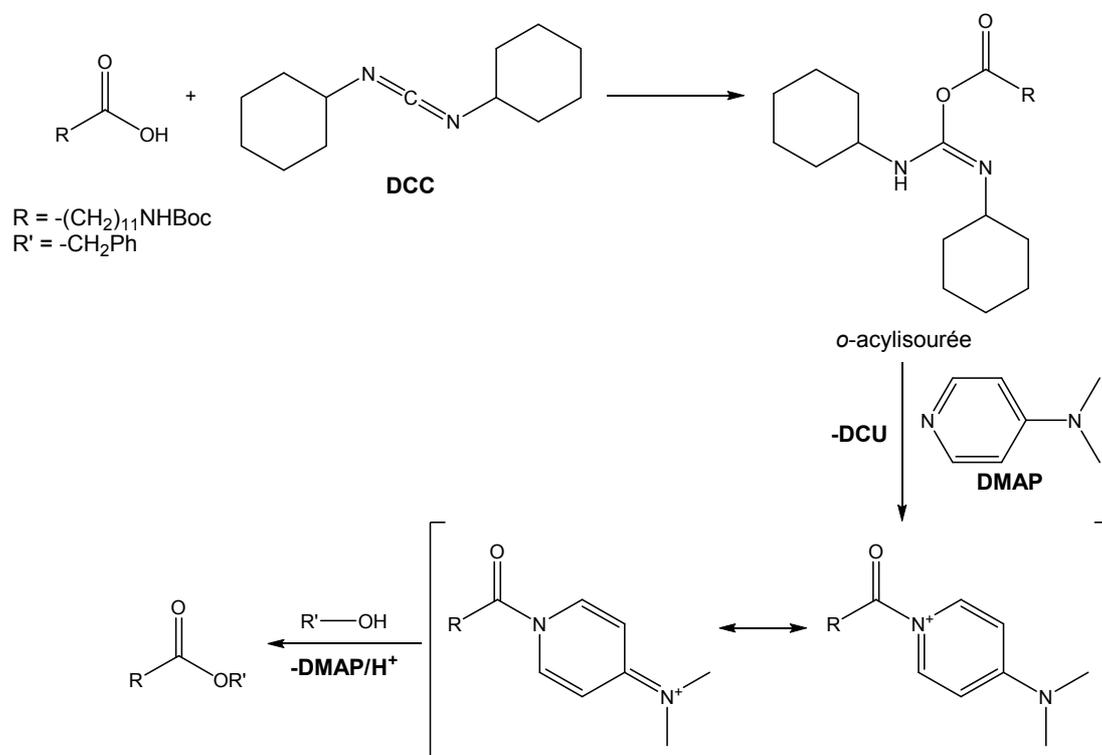


Figure II-9. Estérification en présence de DCC et DMAP.

ii. Déprotection de la fonction amine et réaction avec l'isocyanate

Cette étape consiste à déprotéger la fonction amine de l'ester *o*-nitrobenzylique **7** avant réaction avec le *10-isocyanatodéc-1-ène* **2**. Cette déprotection est réalisée en milieu

¹⁰Nakanishi J., Kikuchi Y., Takarada T., Nakayama H., Yamaguchi K., Maeda M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16314-16315.

acide, en présence d'acide trifluoroacétique (TFA).¹¹ Dans ces conditions, il n'y a pas d'hydrolyse de l'ester photolabile formé précédemment. L'excès d'acide est facilement éliminé par distillation azéotropique avec le toluène. On obtient alors le sel de *trifluoroacétate d'ammonium* **8**.

Le couplage de ce sel **8** avec le *10-isocyanatodéc-1-ène* **2** est ensuite réalisé. Il est nécessaire d'ajouter de la *triéthylamine* au milieu réactionnel pour piéger les protons afin de rendre l'amine nucléophile pour que la formation de l'urée insaturée **9** puisse avoir lieu.

iii. Hydrosilylation de l'urée insaturée

L'hydrosilylation de l'urée insaturée **9** a été réalisée dans les conditions décrites précédemment (cf. p. 50) pour obtenir le composé **10b**. Si du *trichlorosilane* (16 éq.) est ajouté en présence de catalyseur (0,1 éq. en Pt) et le milieu réactionnel laissé pendant 3h à 40°C, le composé **10a** est obtenu. Ces deux organosilanes sont caractérisés par RMN ¹H et ¹³C. On observe bien la disparition des pics correspondants aux groupements éthyléniques.

A l'issue de ce travail de synthèse, nous disposons de trois agents de couplages siliciés différents. Les parties terminales sont constituées de groupements variables trichlorosilyle ou triméthoxysilyle et ester photolabile ou méthyle. Par contre ils possèdent tous une fonction urée au sein de la chaîne alkyle, celle-ci ayant la particularité de favoriser l'auto-assemblage des molécules par liaisons hydrogène intermoléculaires (Figure II-10).

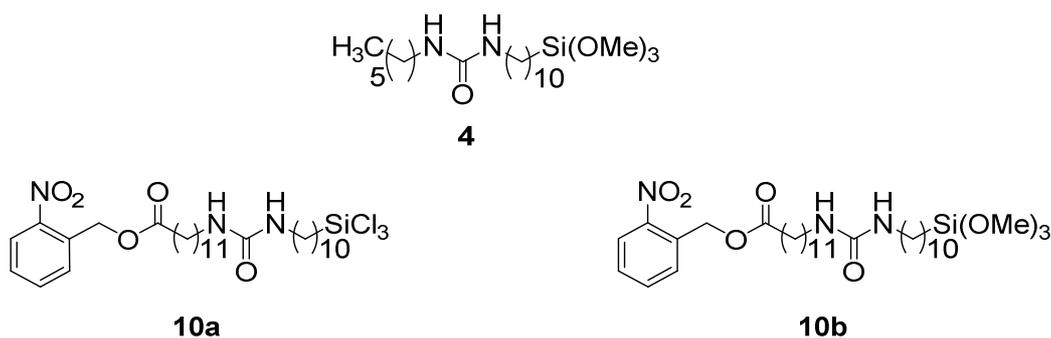


Figure II-10. Récapitulatif des agents de couplages synthétisés et capables d'auto-assemblage par liaisons hydrogène.

¹¹ Greene T.W., Wuts P.G.M. in *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed, Wiley, 1999, p. 520.

2. Synthèse et caractérisation des SAMs-urée

a) *Rappels sur les substrats utilisés*

Les caractérisations des surfaces par infrarouge en mode PM-IRRAS et par AFM nécessitent deux types de substrats différents.

Pour l'infrarouge, les substrats utilisés sont des miroirs d'or recouverts d'une couche d'environ 20 nm de silice. La couche d'or en exaltant le champ électrique proche de la surface métallique, améliore la qualité des spectres enregistrés. En effet, ces substrats adaptés pour une étude en PM-IRRAS rendent accessible une plus grande fenêtre spectrale (1300-4000 cm^{-1}) contrairement au mode transmission (2500-4000 cm^{-1}). Les spectres obtenus en PM-IRRAS permettent donc d'avoir accès non seulement à la région des groupements CH_2 de la chaîne alkyle, mais aussi à celle des groupements carbonyle.

Pour l'AFM, nous avons choisi des wafers de silicium, prédécoupés de 1 cm x 1 cm dont la taille est adaptée à l'appareil utilisé pour l'étude de DFS. Ils sont recouverts d'une couche native de SiO_2 nécessaire à la réalisation des greffages. De plus, ces substrats ont une rugosité (Rms) de 0,22 nm nettement inférieure à celle des substrats utilisés pour l'infrarouge (1 nm).

Pour pouvoir greffer les agents de couplage sur les substrats, une étape d'activation préalable est nécessaire. Celle-ci permet l'élimination de tous les contaminants organiques éventuellement présents, ainsi que l'augmentation du nombre de groupements silanols à la surface. Pour réaliser cette activation, nous utilisons un traitement UV/ O_3 en exposant, sous air, les substrats sous des lampes UV ($\lambda = 185\text{-}254$ nm). Cette méthode présente l'avantage d'être beaucoup plus respectueuse des surfaces par rapport à celles couramment employées (solution « piranha » ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) ou solution de tensioactif basique (par exemple de l'Hellmanex®). Un angle de contact de 0° (mouillage total) mesuré en plusieurs points, après activation, confirme l'obtention d'une surface hydrophile avec un grand nombre de silanols présents à la surface. Les wafers de silicium ont aussi été imagés en AFM, en mode contact intermittent, après le traitement UV/ O_3 afin de vérifier l'état de la surface. Celle-ci n'est pas dégradée.

Pour commencer, nous allons étudier la synthèse de la SAM-urée- NO_2 100% puis de la SAM-urée- CH_3 100% afin de déterminer les meilleures conditions de greffage des molécules. Puis nous réaliserons la synthèse de SAM mixtes. Ces monocouches, en permettant de diluer l'agent de couplage réactif au milieu d'un autre agent de couplage non réactif, peuvent favoriser la mesure d'interactions uniques par DFS.

b) Synthèse et caractérisation de la SAM-urée-NO₂ 100%

i. Greffage des molécules avec un groupement trichlorosilyle

Les trichlorosilanes ayant une réactivité plus rapide (environ 1h) que les triméthoxysilanes (> 10h), ils présentent un grand intérêt lors de l'élaboration des SAMs. Pour cette raison, nous avons commencé par essayer de greffer le composé **10a** terminé par un groupement trichlorosilyle.

Le greffage est réalisé à une température de 18°C, dans le toluène anhydre. La concentration en agent de couplage silicié, dans le réacteur, a été fixée à 2,5.10⁻⁴ M. Celle-ci a été choisie en se basant sur des travaux réalisés précédemment au sein du Laboratoire (ISM) sur des couches auto-assemblées.¹² Différentes concentrations ont été testées (1.10⁻⁴ M, 2,5.10⁻⁴ M, 5.10⁻⁴ M) et celle de 2,5.10⁻⁴ M conduit à la meilleure monocouche (après analyses FT-IR et ellipsométrie). Le temps de réaction choisi pour ce greffage est de 45 min. Il a été optimisé au Laboratoire (ISM), lors d'une étude menée à partir d'un agent de couplage de structure similaire.¹³

Les substrats greffés sont analysés par PM-IRRAS. Cette technique permet d'identifier facilement les groupements fonctionnels présents ou non à la surface du substrat. De plus, l'intensité des pics liée à la quantité de matière greffée à la surface permet une mesure quantitative.

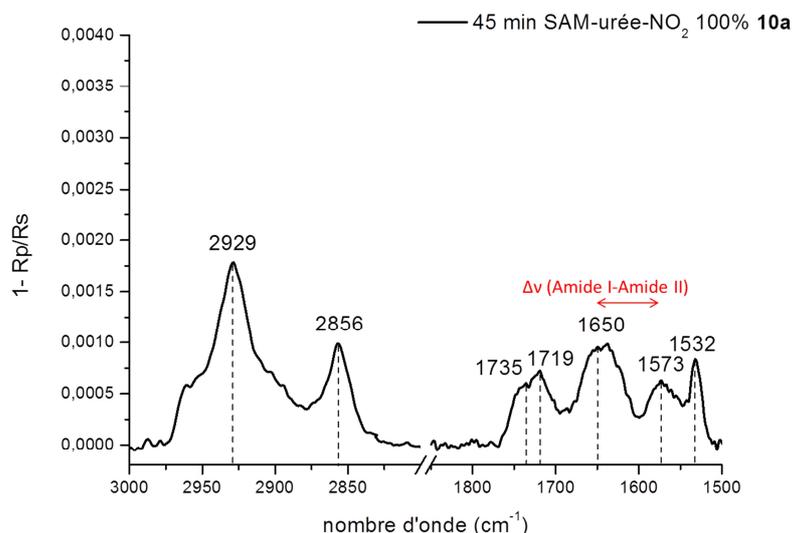


Figure II-11. Spectre PM-IRRAS de la SAM-urée-NO₂ 100% **10a**.

¹² Dinh D.H., Vellutini L., Bennetau B., Dejous C., Rebière D., Pascal E., Moynet D., Belin C., Desbat B., Labrugère C., Pillot J.-P. *Langmuir* **2009**, 25, 5526-5535.

¹³ Ramin M., *Thèse Université Bordeaux I*, **2010**.

Le spectre PM-IRRAS enregistré pour la SAM-urée-NO₂ 100% **10a** (Figure II-11) révèle les modes de vibrations correspondant aux principaux groupements fonctionnels. En effet, les bandes de vibration d'élongation des CH₂ de la chaîne alkyle asymétrique et symétrique sont respectivement à 2929 cm⁻¹ (v_{as}) et 2856 cm⁻¹ (v_s). Celles correspondant à l'élongation du carbonyle de l'ester se trouvent à 1735 cm⁻¹ et 1719 cm⁻¹. Les bandes d'élongation amide I et de déformation amide II, correspondant au groupement urée, sont respectivement visibles à 1650 cm⁻¹ et 1573 cm⁻¹ (Figure II-12). Pour finir, celle due au mode d'élongation asymétrique du groupe NO₂ de l'ester nitrobenzylique est à 1532 cm⁻¹.

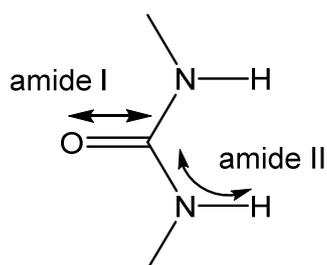


Figure II-12. Vibrations caractéristiques de la fonction urée.

La double bande observée pour le carbonyle de l'ester, peut être due à la formation de liaisons hydrogène entre une partie des esters et les molécules d'eau proches de la surface. La présence d'une double bande a été de même observée par Engquist et *al.* dans le cas d'une couche d'alcanethiol terminée par un ester méthylique.¹⁴ Ils attribuent cette seconde bande à une portion d'ester qui est engagée dans des liaisons hydrogène avec l'eau adsorbée.

La présence de l'ensemble de ces bandes sur le spectre confirme bien la formation de la SAM-urée NO₂ 100% **10a**. Par contre leur intensité relative est plus faible, maximum observé à $1,58 \cdot 10^{-3}$ alors qu'il est de $4,56 \cdot 10^{-3}$ pour la même molécule terminée par un groupement Si(OMe)₃.¹³ Comme l'intensité des bandes est liée à la quantité de matière greffée à la surface, il semblerait qu'une faible quantité de l'agent de couplage trichlorosilicié **10a** ait été greffée sur le substrat comparé à son homologue triméthoxysilicié **10b**.

*Pour conclure, nous avons voulu réaliser le greffage de l'agent de couplage trichlorosilicié **10a**, dans le but de diminuer les temps de réaction. La caractérisation du greffage par infrarouge en mode PM-IRRAS nous permet de constater que la molécule est bien présente sur la surface. La faible intensité des bandes tend à montrer la difficulté à greffer une monocouche complète en utilisant un agent de couplage trichlorosilicié.*

¹⁴ Engquist I., Lestelius M., Liedberg B. *J. Phys. Chem.* **1995**, 99, 14198-14200.

ii. Greffage des molécules avec un groupement triméthoxysilyle.

Le greffage de l'agent de couplage **10b**, terminé par un groupement triméthoxysilyle, est réalisé dans le toluène anhydre, à une température de 18°C. La concentration d'organosilane dans le réacteur est identique à celle utilisée pour le greffage du composé **10a**. Contrairement aux agents de couplage trichlorosiliciés, lorsque le groupement hydrolysable est Si(OMe)₃, il est nécessaire d'ajouter un catalyseur acide pour activer l'hydrolyse.¹² Lors d'une étude réalisée au Laboratoire (ISM)¹³ dans le cas du greffage d'une molécule similaire terminée par un groupement triméthoxysilyle, différents catalyseurs, à diverses concentrations ont été testés. Les meilleures monocouches ont été obtenues avec l'acide trichloracétique (TCA) comme catalyseur, à 10% molaire par rapport au composé **10b** et avec un temps de greffage de 12h.

▪ Caractérisation du greffage par PM-IRRAS

Le spectre PM-IRRAS obtenu avec la SAM-urée-NO₂ 100% **10b** est comparé avec celui obtenu avec la SAM-urée-NO₂ 100% **10a** (Figure II-13).

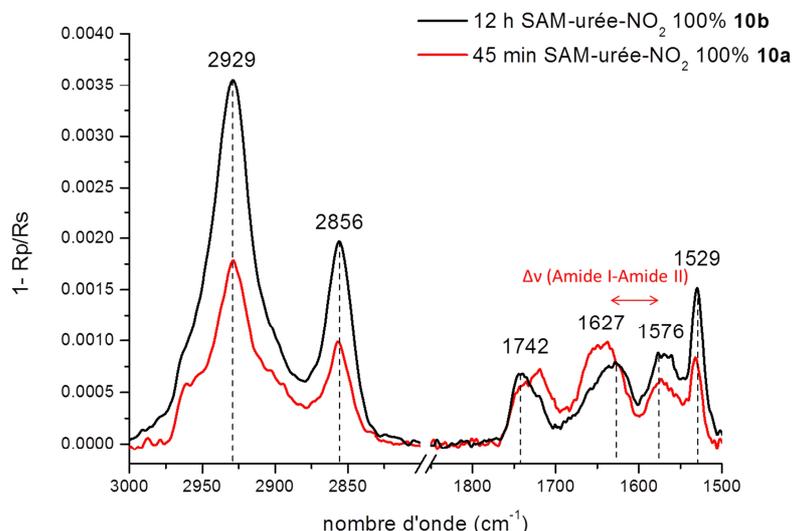


Figure II-13. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-NO₂ 100% **10a** et de la SAM-urée-NO₂ 100% **10b**.

La comparaison de ces deux spectres révèle en premier lieu une intensité des bandes de vibration des CH₂ de la chaîne alkyle (ν_{as} et ν_s) plus importante dans le cas du composé **10b** comparé à son homologue trichlorosilylé **10a**.

Pour le carbonyle de l'ester, une seule bande large est observée à 1742 cm^{-1} contrairement au cas du composé **10a**. Il ne semble pas y avoir de formation de liaisons hydrogène avec l'eau adsorbée dans le cadre des triméthoxysilanes.

Sur le spectre PM-IRRAS, l'écart entre les deux bandes amide I et II, noté $\Delta\nu$, permet de caractériser l'intensité des interactions par liaisons hydrogène au niveau du groupement urée. Pour la SAM-urée-NO₂ 100% **10b**, elle est de 51 cm^{-1} (Figure II-13) alors que pour la SAM-urée-NO₂ 100% **10a** elle était de 77 cm^{-1} (Figure II-11). Or, lorsque le spectre infrarouge est effectué avec le précurseur insaturé 9 en solution très diluée ($C = 5.10^{-3}\text{ mol.L}^{-1}$ dans du chloroforme) une valeur de 133 cm^{-1} est observée ; par contre pour le spectre du précurseur solide, elle est de 41 cm^{-1} . Cela tend à montrer que les liaisons hydrogène intermoléculaires formées au niveau du groupement urée sont plus fortes pour le composé avec le groupement triméthoxysilyle que pour celui avec le groupement trichlorosilyle. Une plus grande cohésion est notée pour la SAM-urée-NO₂ 100% **10b** en raison d'une plus grande densité de greffage.

La position des bandes correspondant aux modes d'élongation des CH₂ (2929 cm^{-1} pour ν_{as} et 2856 cm^{-1} pour ν_s) révèle un certain désordre des chaînes alkyle. En effet, il a été montré dans la littérature qu'un plus grand nombre d'onde impliquait un plus grand désordre des chaînes alkyle (valeurs de 2930 cm^{-1} et 2856 cm^{-1} pour des chaînes totalement désordonnées).¹⁵

▪ Caractérisation du greffage par AFM

Les substrats modifiés avec la SAM-urée-NO₂ 100% **10b** ont aussi été caractérisés en AFM. Les images de hauteur et de phase (Figure II-14) montrent bien que la surface obtenue est homogène, sans agrégats et de faible rugosité ($R_{ms} = 0,63\text{ nm}$).

¹⁵ Snyder R.G., Strauss H.L., Elliger C.A. *J. Phys. Chem.* **1982**, 86, 5145-5150.

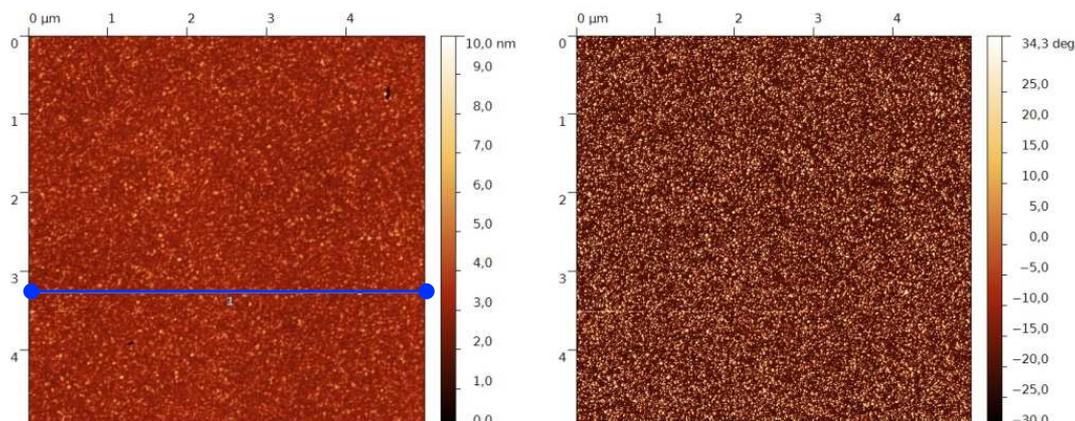


Figure II-14. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) (5 µm x 5 µm) de la SAM-urée-NO₂ 100% 10b.

La phase étant liée aux propriétés mécaniques de surface, le fait d'avoir un faible contraste montre que toute la surface est couverte de manière homogène et présente la même nature chimique.

Un profil de hauteur effectué sur la surface (Figure II-15) montre que la hauteur ne varie pas beaucoup en dehors des rares agrégats.

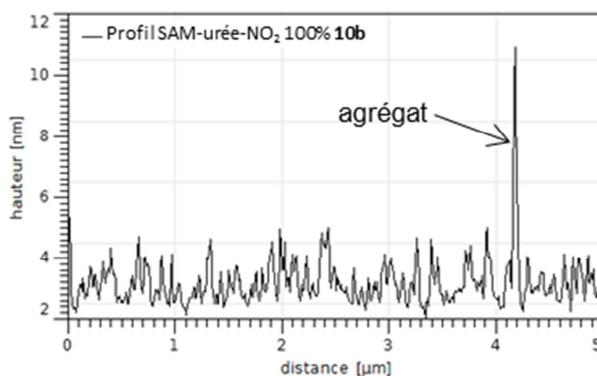


Figure II-15. Profil de hauteur pour la SAM-urée-NO₂ 100% 10b.

En conclusion, les analyses par PM-IRRAS et AFM de la SAM-urée-NO₂ 100% 10b nous montrent l'obtention de monocouches de bien meilleure qualité en utilisant Si(OMe)₃ comme groupement hydrolysable au lieu de SiCl₃. En effet, la PM-IRRAS montre une quantité de matière plus importante déposée sur la surface, compatible avec l'existence d'une monocouche. De plus, bien que les chaînes alkyle soient désordonnées, les liaisons hydrogène au niveau de la fonction urée sont plus fortes pour le composé triméthoxysilicié que celles observées avec le composé trichlorosilicié. Cela montre une meilleure cohésion de la SAM.

L'AFM révèle une surface homogène peu rugueuse, avec un Rms de 0,63 nm. De plus, ces mesures sont reproductibles en plusieurs zones d'un même substrat.

N.B. : Pour la suite de ce travail, seule la SAM-urée-NO₂ élaborée à partir du composé **10b** nommée jusqu'ici SAM-urée-NO₂ 100% **10b** sera prise en compte et notée plus simplement SAM-urée-NO₂ 100%.

Compte tenu des résultats obtenus précédemment, nous allons examiner le greffage du composé **4**. Dans le but de faire des SAMs mixtes, il est important de vérifier que ses conditions de greffage sont compatibles avec celles de la SAM-urée-NO₂ 100%.

c) Synthèse et caractérisation de la SAM-urée-CH₃ 100%

Le greffage de la SAM-urée-CH₃ 100% a été réalisé à l'aide du composé **4** avec une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M dans le toluène à 18°C. Les substrats ont été laissés pendant 12 h dans le réacteur avec l'ajout de 10% molaire de TCA comme catalyseur pour accélérer l'hydrolyse des groupements triméthoxysilyles.

i. Caractérisation du greffage par PM-IRRAS

Les substrats modifiés avec la SAM-urée-CH₃ 100% sont analysés en PM-IRRAS dans les mêmes conditions que ceux greffés avec la SAM-urée-NO₂ 100% de manière à pouvoir comparer les spectres obtenus (Figure II-16).

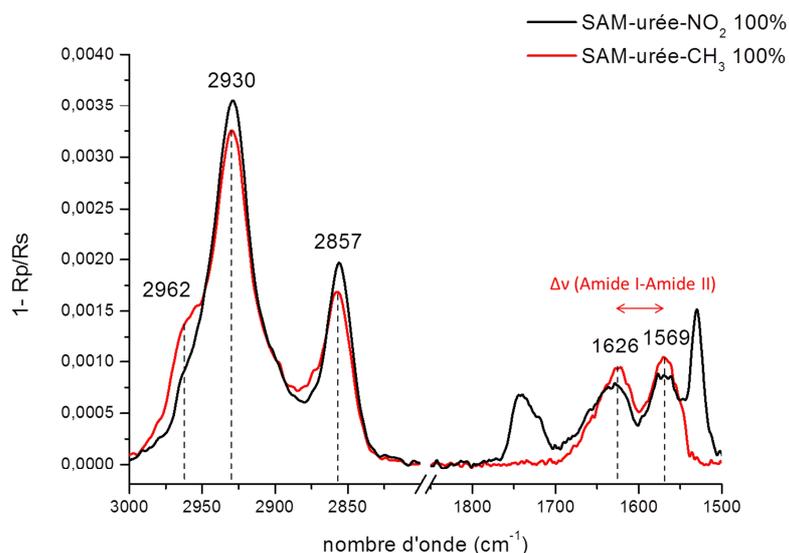


Figure II-16. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-NO₂ 100% et de la SAM-urée-CH₃ 100%.

Une intensité des bandes correspondantes aux différents groupements de la molécule quasi identique est observée pour les deux types de SAMs. Cela veut dire que la quantité de matière greffée sur la surface est sensiblement la même. On remarque aussi que les modes de vibration des CH₂ de la chaîne alkyle sont à des nombres d'onde similaires (2930 cm⁻¹ pour ν_{as} et 2857 cm⁻¹ pour ν_s). Les chaînes alkyle sont donc également désorganisées pour la SAM-urée-CH₃ 100% comme pour la SAM-urée-NO₂ 100%. De plus, un petit épaulement est constaté à 2962 cm⁻¹ correspondant au mode de vibration d'élongation asymétrique du groupement CH₃ terminal de la chaîne alkyle.

La différence de nombre d'onde $\Delta\nu$ entre les bandes amide I et II du groupement urée, situées respectivement à 1626 cm⁻¹ et 1569 cm⁻¹ est de 57 cm⁻¹ (Figure II-16). Cette valeur est légèrement plus élevée que celle observée pour la SAM-urée-NO₂ 100% (51 cm⁻¹). Il semble donc que les interactions par liaisons hydrogène soient sensibles à la longueur des chaînes alkyle.

ii. Caractérisation du greffage par AFM

Les SAMs-urée-CH₃ 100% ont été caractérisées en AFM. Les images de hauteur et de phase (Figure II-17), révèlent une surface relativement homogène de faible rugosité avec un Rms de 0,98 nm (sur l'ensemble de l'image). Cette valeur un peu plus élevée que dans le cas précédent (SAM-urée-NO₂ 100%) est justifiée par la présence de quelques petits agrégats.

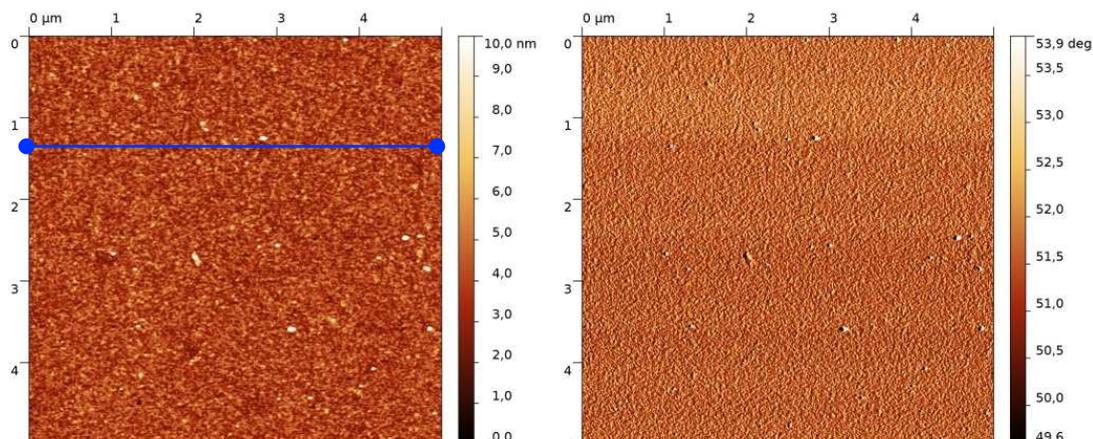


Figure II-17. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) (5 µm x 5 µm) de la SAM-urée-CH₃ 100%.

Un profil effectué sur la surface (Figure II-18) permet de constater qu'en dehors des agrégats la hauteur ne varie pas beaucoup.

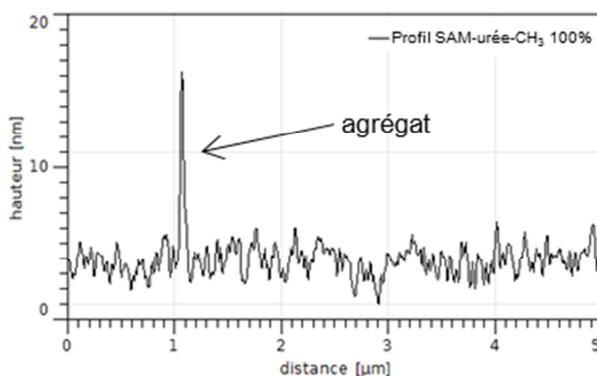


Figure II-18. Profil de hauteur pour SAM-urée-CH₃ 100%.

L'ensemble de cette étude, après analyse PM-IRRAS et AFM, dans des conditions opératoires identiques, montre un comportement tout à fait similaire des agents de couplage 4 et 10b, lors de leur greffage :

- les chaînes alkyle sont désordonnées (respectivement 2929 cm^{-1} pour ν_{as} et 2856 cm^{-1} pour ν_s pour la SAM-urée-NO₂ 100% et 2930 cm^{-1} pour ν_{as} et 2857 cm^{-1} pour ν_s pour la SAM-urée-CH₃ 100%)
- des liaisons hydrogène intermoléculaires sont présentes au niveau du groupement urée et assure la cohésion de la SAM ($\Delta\nu$ en moyenne 54 cm^{-1}).

Les SAMs sont homogènes et de faible rugosité, ainsi que reproductibles, sur plusieurs zones d'un même substrat, plusieurs substrats issus d'un même greffage et plusieurs greffages.

Dans ces conditions, il paraît donc possible d'envisager l'élaboration de SAMs mixtes à partir des agents de couplage **4** et **10b**.

d) Synthèse et caractérisation de SAMs-urée mixtes

Pour l'étude des interactions entre molécules biologiques, il peut être intéressant d'avoir une densité faible d'objets biologiques immobilisés sur la surface, afin de favoriser la mesure d'interactions uniques. Les SAMs mixtes peuvent permettre d'atteindre cet objectif en diluant à la surface, le silane fonctionnel avec un autre silane non fonctionnel.

Pour contrôler la densité de fonctions à la surface, nous avons choisi de faire varier la composition du mélange suivant les proportions suivantes :

- 30% du composé **10b** et 70% du composé **4** (SAM-urée-NO₂ 30%)
- 10% du composé **10b** et 90% du composé **4** (SAM-urée-NO₂ 10%).

Pour élaborer ces SAM mixtes, il a été choisi de procéder par co-adsorption des deux molécules. Pour cela, un mélange des précurseurs insaturés correspondants est effectué préalablement à l'hydrosilylation. Comme le rendement de cette réaction est quantitatif, un mélange des composés siliciés **4** et **10b** est obtenu. Le greffage des molécules est effectué dans les conditions utilisées pour les molécules seules (concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M dans le toluène à 18°C pendant 12 h avec 10% molaire de TCA comme catalyseur).

i. Greffage de la SAM-urée-NO₂ 30%

- Caractérisation du greffage par PM-IRRAS

Les substrats modifiés avec la SAM-urée-NO₂ 30%, sont analysés en PM-IRRAS dans les mêmes conditions que la SAM-urée-NO₂ 100% et la SAM-urée-CH₃ 100% de manière à pouvoir comparer les spectres obtenus (Figure II-19).

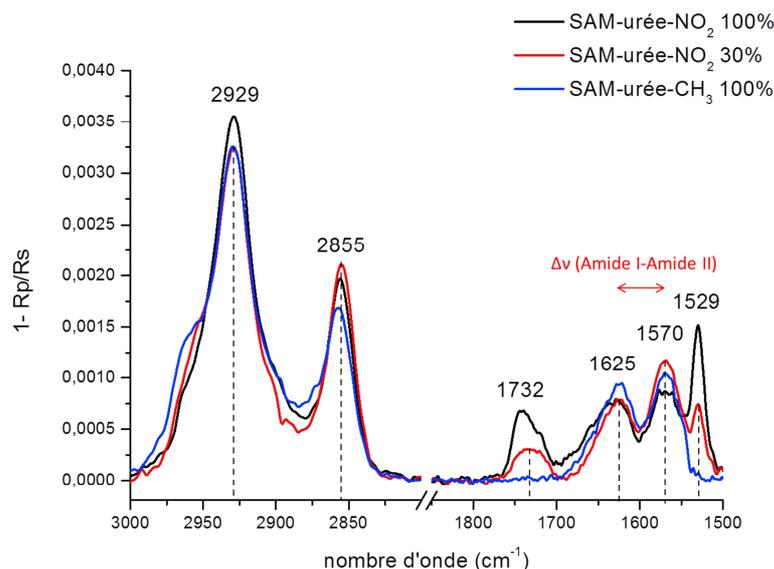


Figure II-19. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-NO₂ 100%, de la SAM-urée-NO₂ 30% et de la SAM-urée-CH₃ 100%.

La comparaison des spectres PM-IRRAS des trois types de SAM montre une intensité des bandes correspondant aux groupes CH₂ de la chaîne alkyle équivalente. La quantité de matière greffée sur la surface est donc sensiblement la même. De plus, les modes de vibration des CH₂ de la chaîne alkyle sont à des nombres d'onde similaires (2929 cm⁻¹ pour ν_{as} et 2855 cm⁻¹ pour ν_s), indiquant un désordre des chaînes alkyle dans la monocouche mixte.

Les bandes amide I et II du groupement urée sont respectivement à 1625 cm⁻¹ et 1570 cm⁻¹. La différence $\Delta\nu$ entre les deux bandes est donc de 55 cm⁻¹ (Figure II-19). Cette valeur est située entre celles observées pour les SAMs avec un seul composé (51 cm⁻¹ pour la SAM-urée-NO₂ 100% et 57 cm⁻¹ pour la SAM-urée-CH₃ 100%). Cette valeur, intermédiaire entre les deux, indique donc un auto-assemblage de la SAM mixte par liaisons hydrogène.

Les bandes de vibrations relatives au carbonyle du groupement de l'ester à 1732 cm⁻¹ et au groupement NO₂ à 1529 cm⁻¹ sont plus faibles en intensité pour la SAM-urée-NO₂ 30% que celles de la SAM-urée-NO₂ 100%.

En considérant que l'orientation du groupement NO₂ est la même dans les deux SAMs, l'aire de la bande du groupement NO₂ peut être directement reliée à la quantité de fonctions réactives dans la SAM. Le rapport des aires correspond donc à la proportion relative de fonctions NO₂. Ainsi via le logiciel Origin, une aire de 0,006 est trouvée pour la bande de vibration ν_{as} NO₂ de la SAM-urée-NO₂ 30% et de 0,016 pour celle de la SAM-urée-NO₂ 100%, correspondant à 37% de fonctions réactives dans la SAM-urée-NO₂ 30%. Cette valeur est proche du pourcentage théorique (30%). La zone observée est donc représentative de l'échantillon.

▪ Caractérisation du greffage par AFM

Les substrats modifiés par la SAM-urée-NO₂ 30% ont été caractérisés en AFM. Les images de hauteur et de phase (Figure II-20) montrent bien que la surface obtenue est homogène et presque sans agrégat. Elle a une faible rugosité (Rms = 0,77 nm sur l'ensemble de l'image).

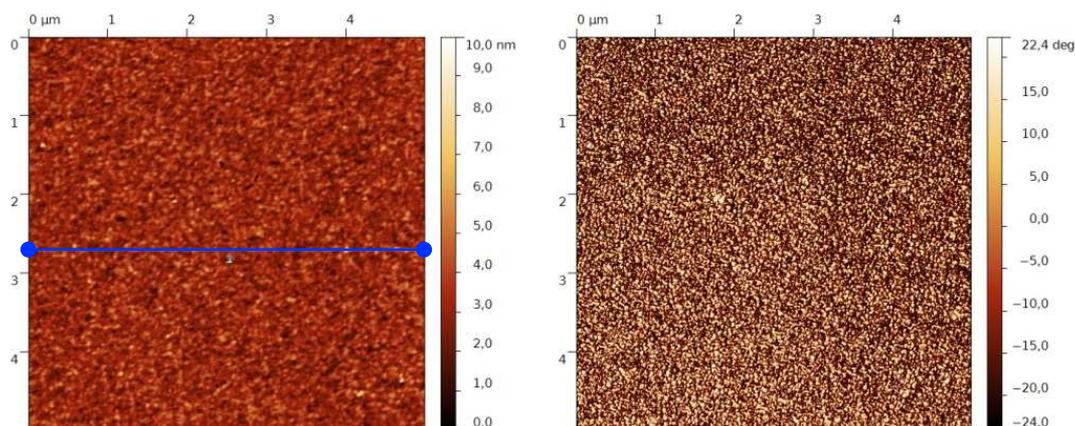


Figure II-20. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) (5 µm x 5 µm) pour la SAM-urée-NO₂ 30%.

Sur un profil effectué sur la surface (Figure II-21), une faible variation de la hauteur est constatée en dehors des agrégats.

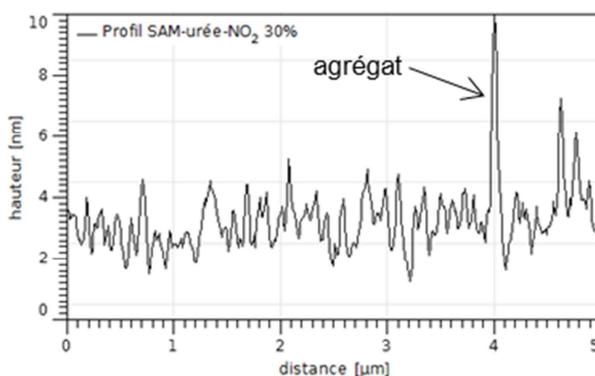


Figure II-21. Profil de hauteur pour la SAM-urée-NO₂ 30%.

En conclusion, les analyses par PM-IRRAS et AFM de la SAM-urée-NO₂ 30% montrent la réalisation d'une monocouche avec une organisation et une cohésion similaire à celles des SAMs constituées d'un seul composé. La surface obtenue est homogène et de faible rugosité (Rms = 0,77 nm). De plus ces résultats sont reproductibles en plusieurs zones d'un même substrat, sur plusieurs substrats issus du même greffage et sur plusieurs greffages.

ii. Greffage de SAM-urée-NO₂ 10%

Dans le but de diluer encore plus la fonction réactive, une SAM-urée-NO₂ 10% a été développée. Celle-ci a été réalisée dans les mêmes conditions que la SAM-urée-NO₂ 30%, la proportion relative des deux composés dans le mélange étant le seul paramètre modifié (10% de composé **10b**, 90% de composé **4**).

▪ Caractérisation du greffage par PM-IRRAS

Les substrats modifiés avec la SAM-urée-NO₂ 10% sont analysés en PM-IRRAS, dans les mêmes conditions que les greffages des composés seuls, de manière à pouvoir comparer les spectres obtenus (Figure II-22).

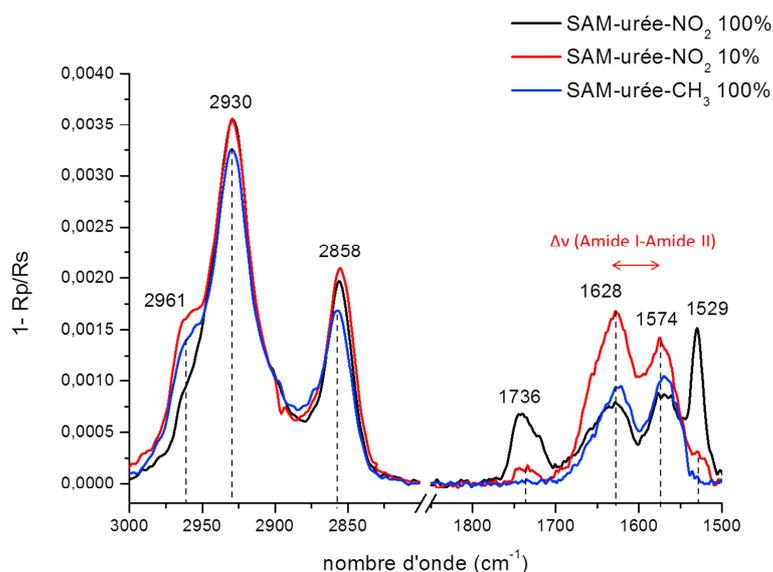


Figure II-22. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-NO₂ 100%, de la SAM-urée-NO₂ 10% et de la SAM-urée-CH₃ 100%.

Quel que soit le type de greffage réalisé, l'intensité des bandes correspondantes aux groupes CH₂ de la chaîne alkyle ne varie presque pas. La quantité de matière greffée ne subit pas de grosses variations. De plus, les nombres d'onde observés pour les modes de vibration des CH₂ de la chaîne alkyle ne varient pas beaucoup (2930 cm⁻¹ pour ν_{as} et 2858 cm⁻¹ pour ν_s). Cela montre que les chaînes alkyle sont toujours aussi désorganisées que celles des SAMs composées d'un seul organosilane.

Les bandes amide I et II du groupement urée sont respectivement à 1628 et 1574 cm^{-1} . La différence $\Delta\nu$ est de 54 cm^{-1} (Figure II-22). Cette valeur se situe entre celles observées dans le cas des SAMs constituées d'un seul composé (51 cm^{-1} pour la SAM-urée- NO_2 100% et 57 cm^{-1} pour la SAM-urée- CH_3 100%).

Les bandes de vibration dues au carbonyle du groupement ester à 1736 cm^{-1} et au groupement NO_2 à 1529 cm^{-1} ont une intensité encore plus faible que celles de la SAM-urée- NO_2 30% mais elles restent détectables par PM-IRRAS.

Comme précédemment, la proportion de fonctions réactives dans la SAM-urée- NO_2 10% peut être vérifiée. Le rapport des aires de la bande de vibration ν_{asNO_2} entre la SAM-urée- NO_2 10% et la SAM-urée- NO_2 100% est donc de $0,002/0,016$ soit 12,5%, proche de la valeur théorique de 10%. La zone observée est donc représentative de l'ensemble de l'échantillon.

▪ Caractérisation du greffage par AFM

Les substrats modifiés avec la SAM-urée- NO_2 10% ont été caractérisés en AFM. Les images de hauteur et de phase (Figure II-23) montrent bien que la surface obtenue est homogène, sans agrégat et de faible rugosité ($R_{\text{ms}} = 0,51\text{ nm}$ sur l'ensemble de l'image).

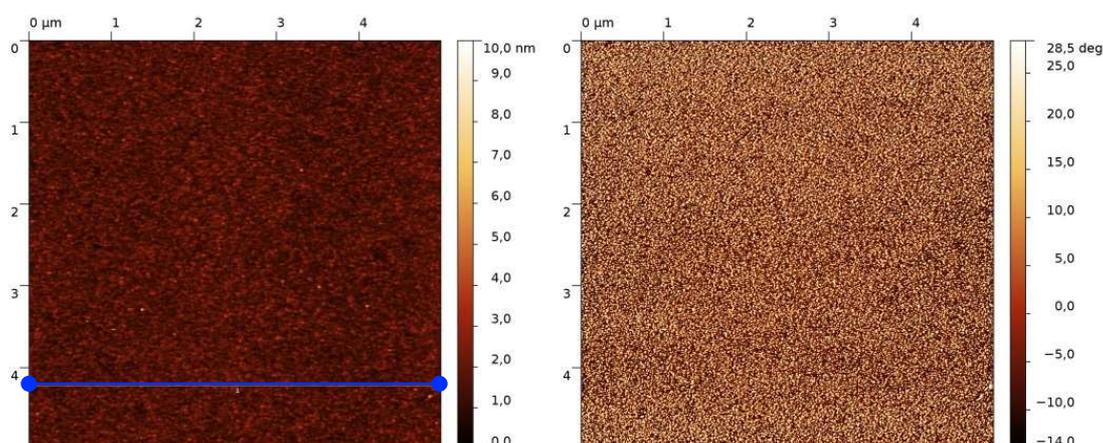


Figure II-23. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) ($5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$) pour la SAM-urée- NO_2 10%.

Un profil de hauteur effectué sur la surface (Figure II-24) permet de constater que la hauteur, en dehors des agrégats ne varie pas beaucoup.

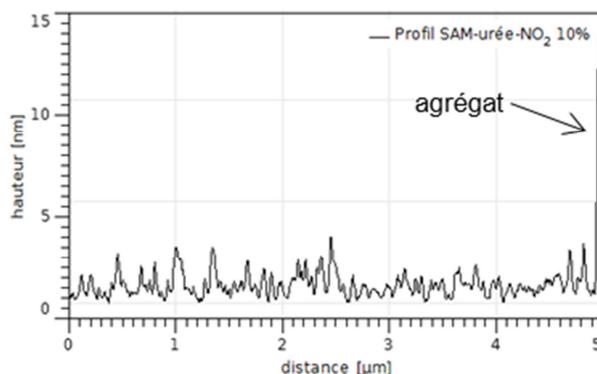


Figure II-24. Profil de hauteur pour la SAM-urée-NO₂ 10%.

En conclusion, dans cette partie nous avons montré, à l'aide d'analyse PM-IRRAS et AFM, que nous maîtrisons l'élaboration de SAMs mixtes homogènes et de faible rugosité dont il est possible de contrôler la composition (SAM-urée-NO₂ 30% et SAM-urée-NO₂ 10%). Cela permet donc de pouvoir diluer les sites de fixation sur la surface en jouant sur la proportion de chaînes fonctionnelles et donc de les rendre plus accessibles.

B. Synthèse de SAMs présentant un chaînon PEG

Pour essayer de limiter l'adsorption non spécifique des biomolécules sur les monocouches, il a été envisagé d'utiliser des agents de couplage présentant plusieurs groupements EG. En effet, il a été montré dans la littérature^{1,2,3} que la présence de groupements PEG, à l'extrémité de molécules greffées sur silice, augmentait les propriétés répulsives des monocouches formées vis-à-vis des biomolécules.

Dans ce but, deux nouveaux organosilanes fonctionnels ont été synthétisés (Figure II-25). Ils sont constitués d'une longue chaîne alkyle ($m = 11$) à l'extrémité de laquelle seront ajoutés trois groupements EG. Du côté de la chaîne alkyle, un groupement silicié $-\text{SiR}_3$ ($\text{R} = \text{Cl}$ ou OMe) terminal permet l'accroche de la molécule sur la silice. A l'extrémité du chaînon PEG, une fonction acide carboxylique, masquée par un ester photolabile, sera insérée pour assurer l'immobilisation de la biomolécule.

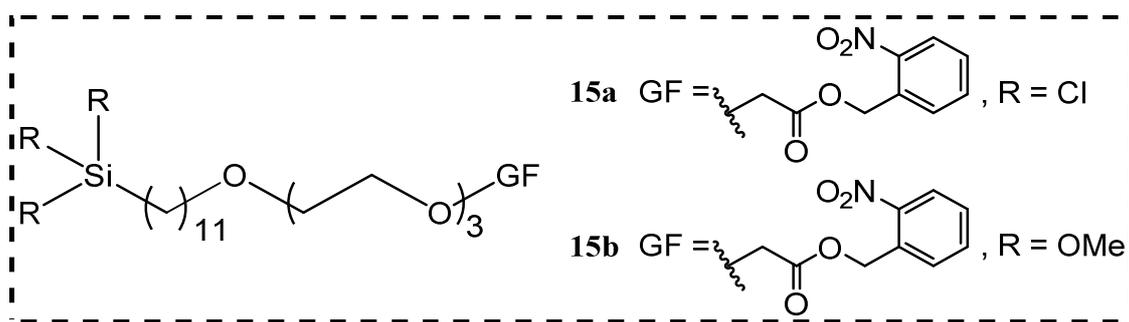


Figure II-25. Schéma des agents de couplage siliciés comportant un chaînon PEG.

1. Synthèse de l'organosilane terminé par une fonction ester nitrobenzylique

La synthèse de l'organosilane terminé par une fonction ester nitrobenzylique est réalisée suivant le schéma réactionnel présenté en Figure II-26.

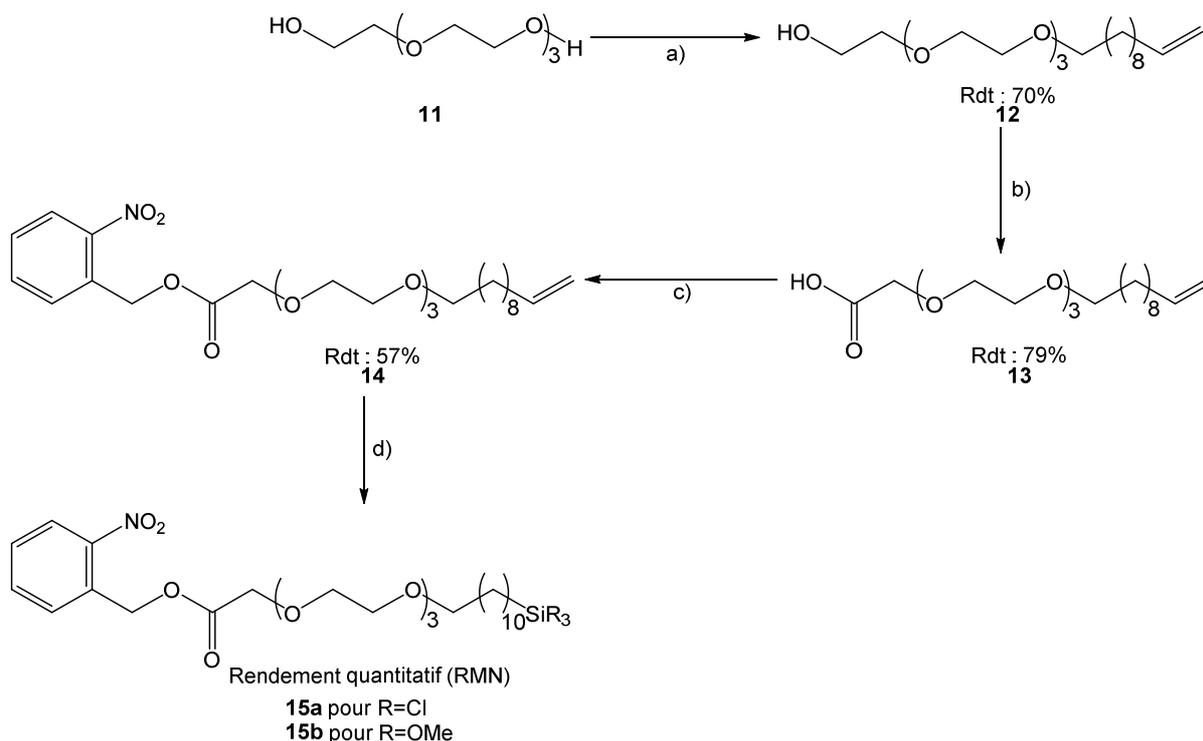


Figure II-26. Réactifs et conditions : a) NaH (0,6 éq.), 11-bromoundécène (0,1 éq.), THF, 12 h ; b) CrO₃ (3,8 éq.), H₂SO₄ (9 éq.), acétone, 2 h ; c) alcool 2-nitrobenzylique (0,8 éq.), DCC (1 éq.), DMAP (1 éq.), CH₂Cl₂, 20 h ; d) HSiR₃ (R=OMe ou Cl) (5 éq. pour OMe ou 16 éq. pour Cl), cat. Karstedt (0,025 éq. en Pt pour OMe ou 0,1 éq. en Pt pour Cl), toluène, 65°C pour OMe ou 40°C pour Cl, 3 h.

La mono-alkylation du tétraéthylène glycol est tout d'abord réalisée afin d'introduire la chaîne alkyle. Après oxydation de l'alcool terminal en acide carboxylique, celui-ci est protégé sous forme d'ester. Pour finir, l'hydrosilylation de la double liaison terminale permet l'obtention des précurseurs insaturés désirés.

a) Couplage entre la chaîne alkyle et le groupement PEG

La première étape consiste à réaliser une réaction de Williamson entre le *11-bromoundécène* et le *tétraéthylène glycol* **11** pour obtenir l'alcool **12**. Le *11-bromoundécène* a été choisi pour que la chaîne alkyle ait sensiblement la même longueur que celle située entre l'atome de silicium et le groupement urée dans les organosilanes décrits précédemment. Le *tétraéthylène glycol* a été choisi pour disposer d'une molécule finale ayant une longueur équivalente à celle des organosilanes précédents.

Comme le *tétraéthylène glycol* est un diol, des précautions sont nécessaires pour éviter une double alkylation. Pour cela, les conditions suivies sont celles décrites par Böcking et *al.* lors de la formation de monocouches terminées par un groupement tétraéthylène glycol sur des wafers de silicium (111).¹⁶ L'utilisation du *tétraéthylène glycol* dilué, de l'*hydrure de sodium* en défaut et l'ajout de l'halogénure d'alkyle lentement suffisent à favoriser la formation du produit monosubstitué (Rdt : 70%).

La purification du produit par chromatographie sur gel de silice, nécessite au préalable l'élimination du tétraéthylène glycol en excès. Celle-ci est réalisée par lavages à l'eau après redissolution du brut réactionnel dans le pentane.

b) Oxydation de la fonction alcool et protection de l'acide

Afin de pouvoir immobiliser des biomolécules sur les monocouches, il est nécessaire de créer une fonction acide carboxylique terminale. Pour cela, une oxydation de Jones est réalisée sur l'alcool **12** selon les conditions expérimentales décrites par Millar et *al.*¹⁷

Comme pour les organosilanes précédents, afin d'éviter des réactions secondaires, il est important de protéger la fonction acide par la formation d'un ester photolabile, avant le greffage sur la surface. L'estérification par l'alcool 2-nitrobenzylique en présence de DCC et DMAP conduit au composé **14**.

¹⁶ Böcking T., Kilian K.A., Hanley T., Ilyas S., Gaus K., Gal M., Gooding J.J. *Langmuir* **2005**, *21*, 10522-10529.

¹⁷ Millar J.G., Oehlschlager A.C., Wong J.W. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4404-4407.

c) *Hydrosilylation de l'ester insaturé*

L'hydrosilylation de l'*ester insaturé* **14** est effectuée dans les conditions décrites pour l'obtention des organosilanes précédents. Les composés **15a** et **15b** obtenus respectivement à partir de HSiCl_3 et HSi(OMe)_3 sont caractérisés par RMN ^1H .

La synthèse de deux agents de couplage esters photolabiles terminés par des groupes trichloro- ou triméthoxysilyle, comportant un chaînon triéthylène glycol dans le but de limiter l'adsorption non-spécifique des biomolécules a donc été réalisée (Figure II-27).

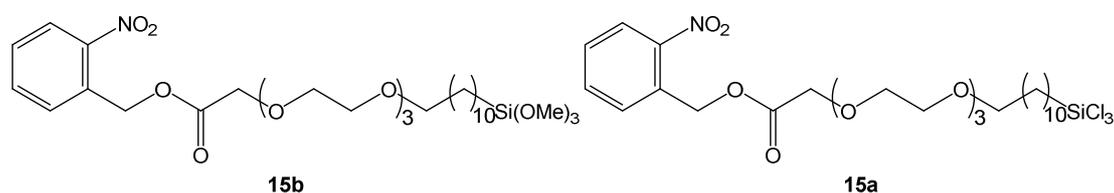


Figure II-27. Récapitulatif des agents de couplage synthétisés.

2. Synthèse et caractérisation des SAMs-PEG-NO₂

a) *Greffage du composé avec un groupement triméthoxysilyle*

Compte tenu des bons résultats obtenus pour les greffages des agents de couplage triméthoxysilyle en série urée, les premiers essais de greffages avec ceux contenant un chaînon PEG ont été réalisés en utilisant les mêmes conditions. L'agent de couplage **15b**, à une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M dans le toluène à 18°C, en présence du catalyseur TCA, à 10% molaire est déposé pendant 12 h sur la surface.

i. Caractérisation du greffage par PM-IRRAS

Les SAM-PEG-NO₂ **15b** sont analysés en PM-IRRAS dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la SAM-urée-NO₂ 100% de manière à pouvoir comparer les spectres obtenus (Figure II-28).

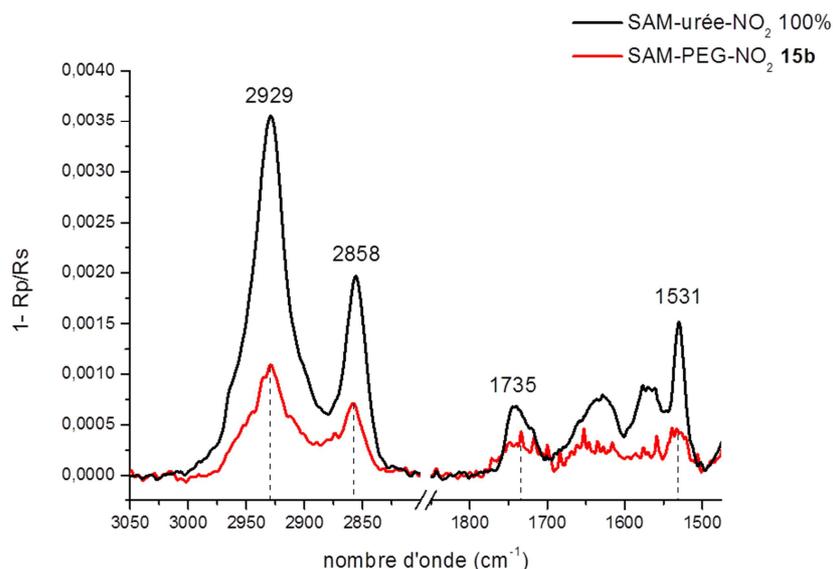


Figure II-28. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-PEG-NO₂ 15b et de la SAM-urée-NO₂ 100%.

L'intensité des bandes du spectre PM-IRRAS de la SAM-PEG-NO₂ **15b** est beaucoup plus faible que celle observée précédemment pour la SAM-urée-NO₂ 100%. La quantité de matière greffée sur la surface est donc moins importante. Dans le cas de l'agent de couplage avec un chaînon PEG, les bandes caractéristiques du groupement NO₂ ($\nu_{as}NO_2$) et du groupement carbonyle de l'ester sont difficilement différenciable du bruit de fond.

De plus, les positions des bandes observées pour les modes de vibration des CH₂ de la chaîne alkyle sont respectivement à 2929 cm⁻¹ (ν_{as}) et 2858 cm⁻¹ (ν_s). Ces chaînes alkyle présentent un désordre comparable aux CH₂ des chaînes alkyle de la SAM-urée-NO₂ 100% (2929 cm⁻¹ pour ν_{as} et 2856 cm⁻¹ pour ν_s).

ii. Caractérisation du greffage par AFM

Les substrats modifiés avec la SAM-PEG-NO₂ **15b** ont été caractérisés en AFM. La SAM caractérisée par les images de hauteur (Figure II-29), présente un Rms de 0,37 nm sur l'ensemble de l'image et donc une faible rugosité, très proche de celle du substrat vierge (0,22 nm).

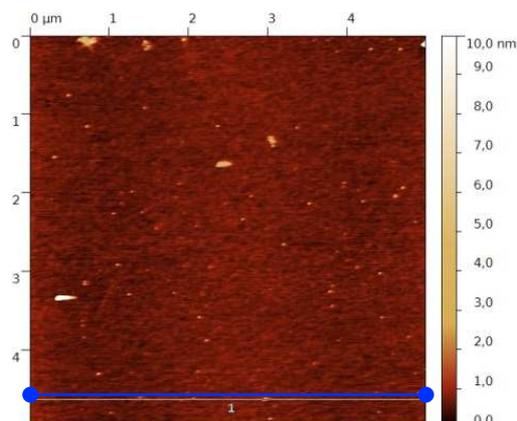


Figure II-29. Images de hauteur (5 µm x 5 µm) pour la SAM-PEG-NO₂ 15b.

Un profil réalisé sur la surface (Figure II-30), montre qu'en dehors des agrégats la surface est homogène.

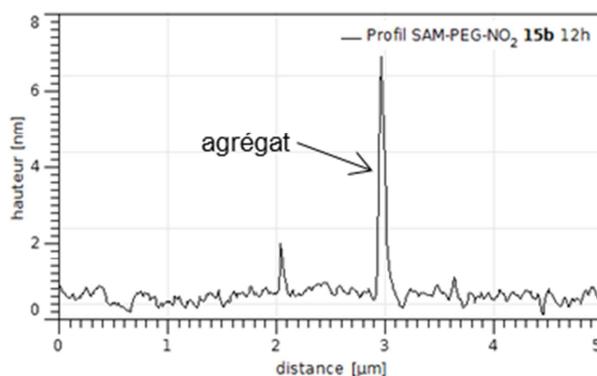


Figure II-30. Profil de hauteur pour le greffage de la SAM-PEG-NO₂ 15b.

Les conditions utilisées pour les SAMs-urée ne sont pas appropriées pour le greffage du composé 15b. La présence d'un chaînon PEG semble ralentir la cinétique de greffage de l'agent de couplage. Divers essais avec des temps de greffage supérieurs (15 h et 20 h) ont été effectués.

b) Optimisation du temps de greffage pour le composé avec un groupement triméthoxysilyle

Pour optimiser le temps de greffage du composé 15b, divers essais ont été menés dans des conditions identiques de concentration, nature du solvant, température, et quantité de catalyseur mais durant 15 h ou 20 h.

i. Caractérisation du greffage par PM-IRRAS

L'ensemble des spectres PM-IRRAS, caractérisant le dépôt des composés **15b** et **10b** sur la surface, est présenté Figure II-31.

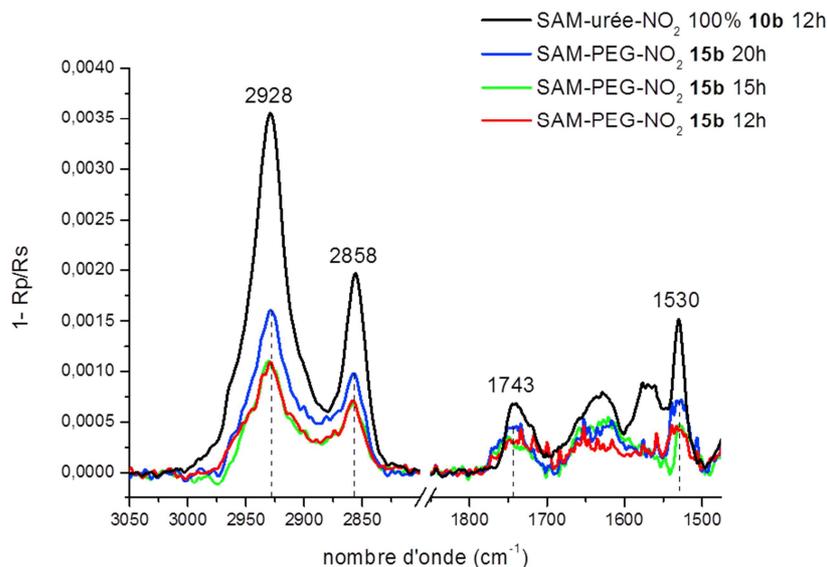


Figure II-31. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-NO₂ 100% **10b** (12 h de greffage) et la SAM-PEG-NO₂ **15b** (12 h, 15 h, 20 h de greffage).

La comparaison des spectres relatifs au composé **15b** montre une légère augmentation de l'intensité des bandes pour un temps de greffage de 20 h. La quantité de matière greffée sur la surface augmente donc au cours du temps. Cependant, cette augmentation n'est pas suffisante pour atteindre la quantité de matière greffée dans le cas de la SAM-urée-NO₂ 100% avec 12 h de greffage.

ii. Caractérisation du greffage par AFM

Avant de poursuivre l'optimisation des conditions de greffage, une analyse AFM de l'état de surface de la SAM-PEG-NO₂ **15b** après 20 h de greffage est réalisée. Des images de hauteur et de phase de la SAM-PEG-NO₂ **15b** sont enregistrées (Figure II-32). La rugosité de la surface est plus importante ($R_{ms} = 1,12$ nm sur l'ensemble de l'image), mais la surface n'est pas homogène.

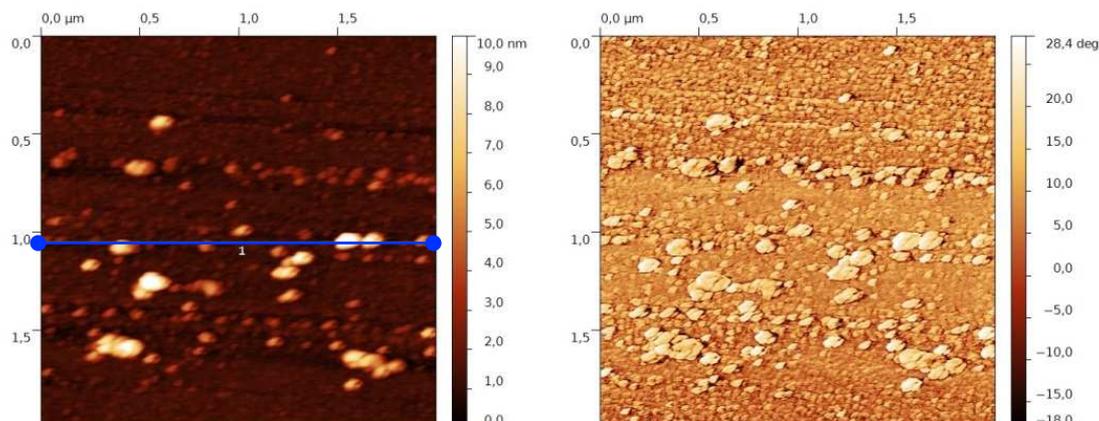


Figure II-32. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$) pour la SAM-PEG-NO₂ 15b (20 h de greffage).

La présence d'agrégats est notée sur l'image de hauteur et le faible contraste sur l'image de phase montre qu'il s'agit bien d'agrégats de matière organique sur la surface.

Un profil sur la surface (Figure II-33) met en évidence la présence de nombreux agrégats dont la hauteur varie entre 5 et 15 nm.

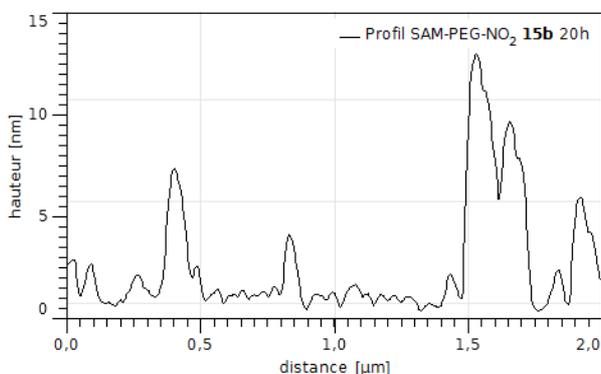


Figure II-33. Profil de hauteur pour le greffage de la SAM-PEG-NO₂ 15b (20 h de greffage).

En conclusion, une augmentation du temps de greffage conduit à une augmentation de la quantité de matière déposée sur la surface. Cependant, de nombreux agrégats apparaissent sur la surface, limitant ainsi l'effet bénéfique du paramètre temps. Le choix d'un agent de couplage comportant un groupement trichlorosilyle plus réactif s'avère donc, a priori, préférable.

c) *Greffage du composé avec un groupement trichlorosilyle*

Ainsi, des essais de greffage à partir du composé **15a** ont été effectués. La meilleure réactivité de cet agent de couplage est due à une meilleure hydrolyse à cause l'acide chlorhydrique libéré qui autocatalyse la réaction.

Ce greffage est effectué dans le toluène à 18°C avec une concentration en composé **15a** de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Comme dans le cas du composé triméthoxysilylé **15b**, c'est avec 20 h de greffage que la meilleure intensité en PM-IRRAS est obtenue.

i. Caractérisation du greffage par PM-IRRAS

L'analyse des SAM-PEG-NO₂ **15a** par PM-IRRAS a été effectuée dans les conditions utilisées pour les substrats précédents de manière à pouvoir comparer les spectres obtenus (Figure II-34).

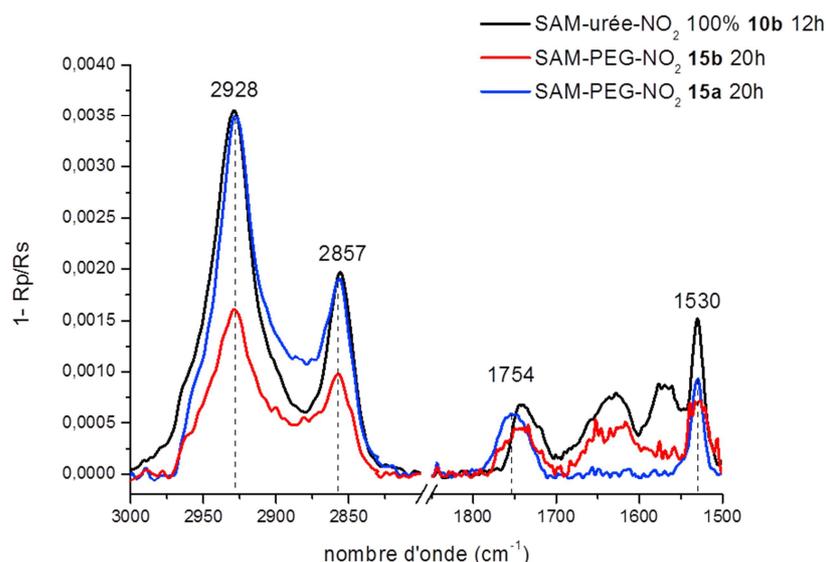


Figure II-34. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-NO₂ 100% **10b** (12 h de greffage), de la SAM-PEG-NO₂ **15b** (20 h de greffage) et de la SAM-PEG-NO₂ **15a** (20 h de greffage).

Dans le cas de la SAM-PEG-NO₂ **15a** (20 h de greffage) les intensités des bandes de vibration du spectre PM-IRRAS sont comparables à celles observées pour la SAM-urée-NO₂ 100% **10b** (12 h de greffage). De plus, les bandes de vibration sont mieux résolues que celles obtenues pour la SAM-PEG-NO₂ **15b**.

Les nombres d'onde observés pour les modes de vibration des CH₂ de la chaîne alkyle (2928 cm⁻¹ pour ν_{as} et 2857 cm⁻¹ pour ν_s) sont proches de ceux obtenus pour la SAM-urée-

NO₂ 100% **10b** (2929 cm⁻¹ pour ν_{as} et 2856 cm⁻¹ pour ν_s). Cela montre que les chaînes alkyle sont aussi désordonnées que dans le cas des SAMs-urée-NO₂ 100%.

ii. Caractérisation du greffage par AFM

Les substrats greffés pendant 20 h avec le composé **15a** ont été caractérisés en AFM. Les images de hauteur et de phase enregistrées pour la SAM-PEG-NO₂ **15a** pour un temps de greffage de 20 h (Figure II-35) montrent que la surface est bien plus homogène que celle de la SAM-PEG-NO₂ **15b** obtenue avec le même temps de greffage. En effet, à part la présence d'un défaut du substrat (visible aussi sur l'image de phase), peu d'agrégats sont observés et le Rms est de 0,53 nm.

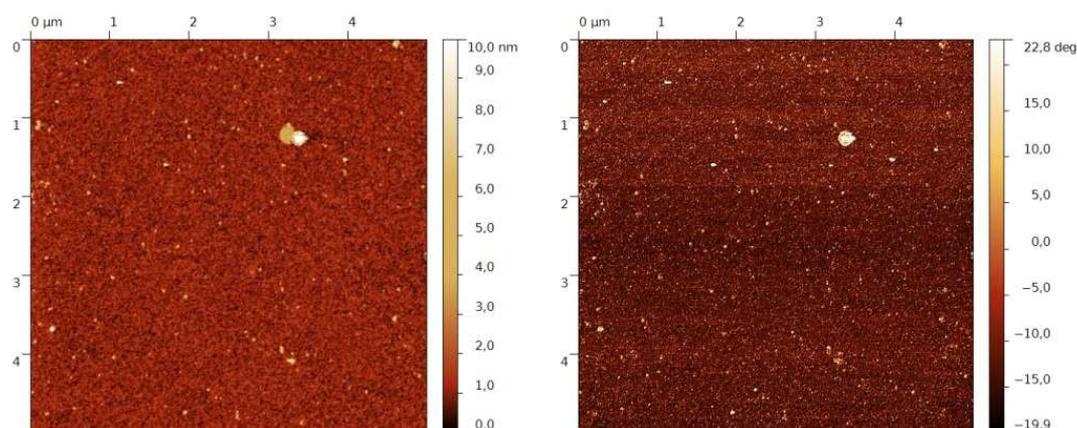


Figure II-35. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) (5 μm x 5 μm) pour la SAM-PEG-NO₂ **15a** (20 h de greffage).

*En conclusion, les analyses par PM-IRRAS et AFM des SAMs-PEG-NO₂ **15a** montrent qu'avec un temps de greffage de 20 h, les monocouches obtenues sont beaucoup plus homogènes et de bien meilleure qualité que celles qui étaient obtenues avec le composé triméthoxysilylé **15b**.*

C. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons dans une première partie décrit la synthèse de trois agents de couplages organosiliciés (**4**, **10a**, **10b**) comportant une fonction urée

permettant l'auto-assemblage par liaisons hydrogène et terminées par un groupement silyle (SiCl_3 ou $\text{Si}(\text{OMe})_3$) permettant de les greffer sur des substrats de silice.

Deux d'entre eux (**10a** et **10b**) comportent une fonction acide protégée par un ester photolabile pour l'immobilisation des biomolécules. L'analyse par PM-IRRAS et AFM des substrats greffés avec ces agents de couplage, permet de déterminer que les SAMs de meilleure qualité sont obtenues avec le composé comportant un groupement triméthoxysilyle comme groupement hydrolysable.

Dans le but d'espacer les fonctions d'accroche sur la surface et de les rendre plus accessibles pour pouvoir mesurer des interactions uniques par DFS, des surfaces mixtes ont été développées. Pour cela, l'organosilane fonctionnel **10b** est mélangée dans les proportions (30/70 et 10/90) avec un organosilane non-fonctionnel **4**. Une caractérisation par PM-IRRAS et AFM permet de démontrer l'obtention de SAMs mixtes de faible rugosité et homogènes.

Dans une seconde partie, la synthèse d'un organosilane, comportant un chaînon PEG, pour essayer de limiter l'adhésion non-spécifique, a été décrite (**15a** pour celui avec un groupement trichlorosilyle et **15b** pour celui avec un groupement triméthoxysilyle). Les agents de couplage triméthoxysiliciés ne permettent pas d'obtenir des SAMs de bonne qualité. Suivant les conditions utilisées, l'analyse PM-IRRAS et AFM montre soit l'insuffisance du dépôt de matière pour former une monocouche, soit une tendance des molécules à former des agrégats. Le greffage de l'agent de couplage **15a** sur des substrats de silice a, quant à lui, été optimisé. Pour obtenir des surfaces de bonne qualité, il est nécessaire d'utiliser l'agent de couplage trichlorosilicié avec un temps de greffage de 20 h.

De plus, il peut être noté que la synthèse des SAMs dépend non seulement de la nature du groupement silicié de l'organosilane, mais également de la nature de son squelette carboné. En effet, cette étude confirme que les SAMs-urée ont une capacité à l'auto-assemblage beaucoup plus rapide (12 h de greffage) que les SAMs-PEG dont l'auto-assemblage est principalement assuré par des interactions de Van der Waals (20 h de greffage).

III. Chapitre III :
Fonctionnalisation des SAMs

L'immobilisation de biomolécules sur une surface est une étape clé lors du développement de biocapteurs. La biomolécule doit être fixée de façon robuste, tout en gardant sa structure et son activité. La voie covalente permet une immobilisation sur des SAMs, stable dans le temps.¹ Les fonctions amine des résidus lysine des protéines sont mises en jeu pour immobiliser des protéines sur des monocouches fonctionnalisées terminées par des groupements acide carboxylique.^{2,3} L'activation de la fonction acide de surface par la chimie des carbodiimides, en particulier le couple NHS/EDC, est souvent utilisée pour conduire à un ester activé qui va ensuite réagir avec les groupements amine de la protéine pour former une liaison amide stable. La maîtrise de plusieurs paramètres, tels que le temps de réaction, le pH du milieu, la force ionique et la concentration en protéine, est importante pour assurer le succès de cette immobilisation.⁴

Dans ce chapitre, dans une première partie, la possibilité d'immobiliser, sur les SAMs-urée-NO₂ et SAMs-PEG-NO₂, des objets biologiques sera démontrée à l'aide de nanoparticules d'or recouvertes de protéine A.

Dans un deuxième temps, des nanoparticules recouvertes d'une couche de polymère à base de chaînons PEG seront choisies pour l'étude de la répartition des sites de fixation sur les différentes SAMs-urée-COOH (100% et mixtes). Les chaînons PEG des nanoparticules permettent de s'affranchir de l'adhésion non-spécifique.

Dans une troisième partie, le Virus de la Mosaique du Tabac (TMV), un modèle souvent utilisé par les biologistes, servira pour vérifier la non-déformation d'un objet biologique lors de son immobilisation sur une SAM.

A. Biofonctionnalisation des SAMs avec des nanoparticules recouvertes de protéine A

Pour faciliter la caractérisation de ces surfaces fonctionnalisées, par AFM, nous avons choisi d'employer des nanoparticules d'or de 20 nm de diamètre, recouvertes de protéines A (fournisseur British BioCell International), notées NP-pA par la suite.

¹ Wong L.S., Khan F., Micklefield J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4025-4053.

² Su X., Chew F.T., Li S.F.Y. *Anal. Biochem.* **1999**, *273*, 66-72.

³ Patel N., Davies M.C., Hartshorne M., Heaton R.J., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M. *Langmuir*, **1997**, *13*, 6485-6490.

⁴ Rusmini F., Zhong Z., Feijen J. *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 1775-1789.

La protéine A est souvent utilisée pour l'élaboration de biocapteurs sensibles et spécifiques.^{3,5} En effet, cette protéine membranaire de 42 kDa, trouvée dans les parois des bactéries *Staphylococcus aureus*, est connue pour permettre l'immobilisation d'anticorps en raison de sa forte affinité pour ceux-ci.⁶ La protéine A est composée de cinq sous-unités. Trois d'entre elles vont être inactivées par le dépôt de la protéine sur le substrat. Il en reste donc deux de disponibles qui permettent l'immobilisation de deux anticorps. Ceux-ci vont être accrochés par leur extrémité F_c.^{7,8} Cela permet aux anticorps d'être fixés de façon stable et en préservant leur activité. En effet, les régions spécifiques (F_{ab}) sont tournées vers l'extérieur et donc accessibles pour un antigène.

1. SAMs avec motif urée

a) Immobilisation covalente des NP-pA

Les SAM-urée-NO₂ 100%, sont irradiées sous UV ($\lambda > 300$ nm) à l'air, de manière à déprotéger les fonctions acide carboxylique. Celles-ci sont ensuite transformées en esters activés, en présence d'EDC et NHS. Pour finir, les NP-pA sont immobilisées sur les surfaces par un couplage peptidique (Figure III-1).

⁵ a) Briand E., Salmain M., Compère C., Pradier C.-M. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 2884-2890 ; b) Lee W., Lee D.-B., Oh B.-K., Lee W.H., Choi J.-W. *Enz. Microbiol. Technol.* **2004**, 35, 678-682.

⁶ Srivatsa V., Anderson W.K., Bachas L.G. *Microchim. Acta* **1998**, 128, 127-143.

⁷ Moks T., Abrahmsen L., Nilsson B., Hellman U., Sjöquist J., Uhlén M. *Eur. J. Biochem.* **1986**, 156, 637-643.

⁸ Yang L., Biswas M.E., Chen P. *Biophys. J.* **2003**, 84, 509-522.

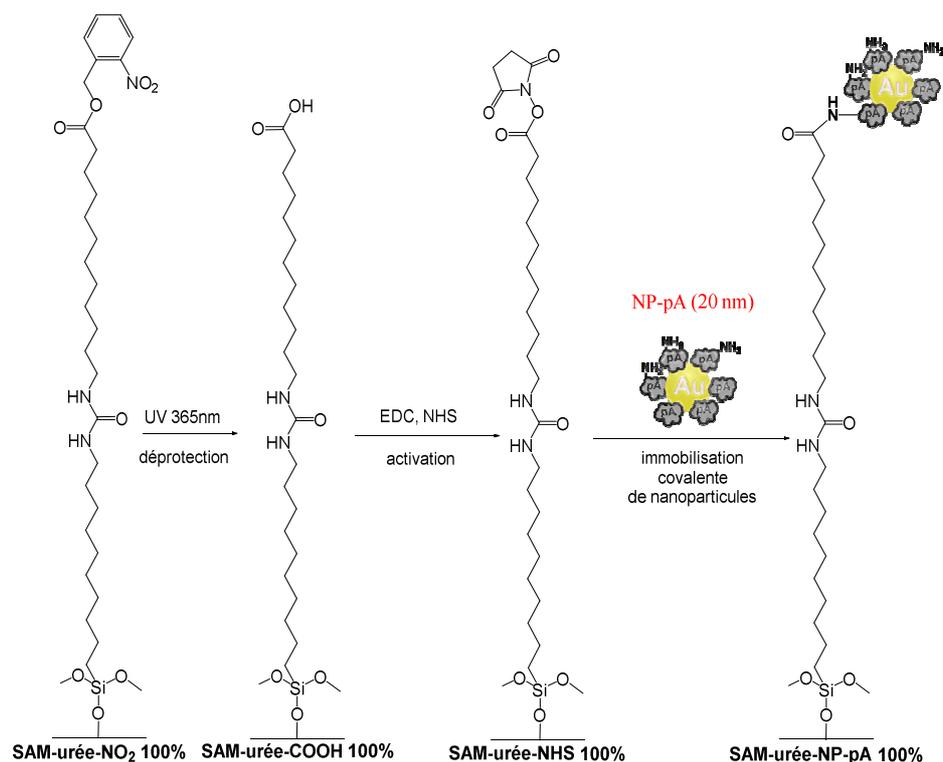


Figure III-1. Schéma de l'immobilisation des NP-pA sur la SAM-urée-NO₂ 100%.

i. Photodéprotection des fonctions acide carboxylique

Le photoclivage de la fonction ester nitrobenzylique, après excitation du chromophore libère deux fragments : le *o*-nitrosobenzaldéhyde et l'acide carboxylique. Patchornik et *al.*⁹ ont montré que le mécanisme (Figure III-2) consistait en l'arrachement d'un proton benzylique par le groupe nitro suivi du réarrangement intramoléculaire rapide en *o*-nitrosobenzaldéhyde et de la libération de l'acide carboxylique (réaction Norrish II).¹⁰

⁹ Patchornik A., Amit B., Woodward R.B. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, 92, 6333-6335.

¹⁰ Bochet C.G. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2002**, 2, 125-142.

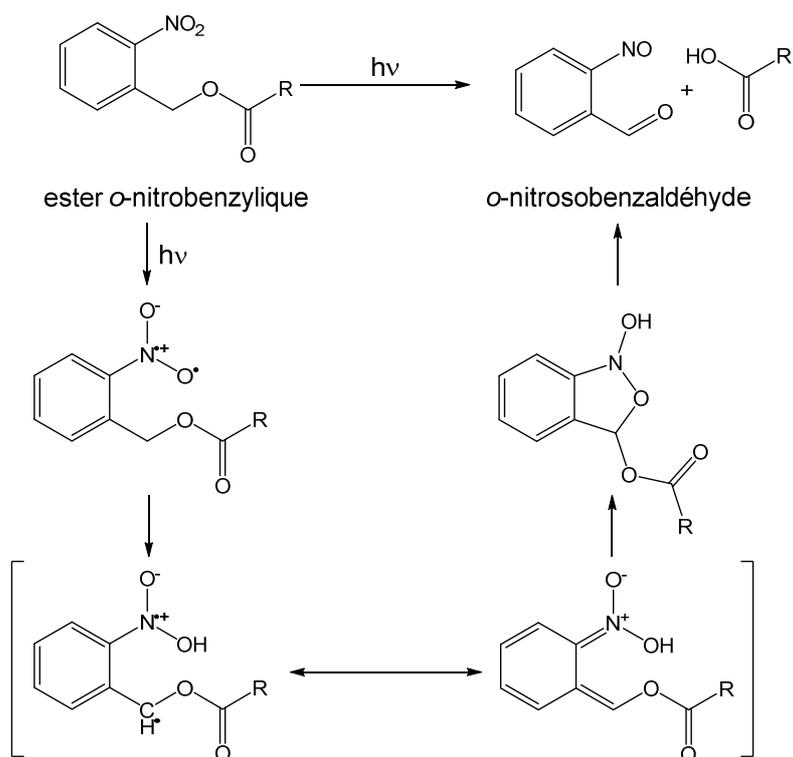


Figure III-2. Mécanisme de la photodéprotection de l'ester *o*-nitrobenzylique selon Patchornik.¹⁰

Les substrats (lames d'or et wafers de silicium) sont irradiés sous une lampe UV ($\lambda = 365$ nm). Une plaque de Pyrex[®], placée entre les échantillons et la lampe, permet de retenir toutes les longueurs d'ondes inférieures à 300 nm.¹¹ Afin d'éviter la dégradation de la monocouche, le temps d'irradiation optimal est de 30 minutes (déterminée par PM-IRRAS). Les substrats sont ensuite nettoyés aux ultrasons dans le chloroforme de manière à éliminer l'*o*-nitrosobenzaldéhyde.

¹¹ Yamaguchi K., Nakayama H., Futami T., Shimizu T. *J. Photopolym. Sci. Technol.* **2008**, *21*, 519-524.

Le spectre PM-IRRAS de la SAM-urée-COOH 100% est donné ci-dessous (Figure III-3).

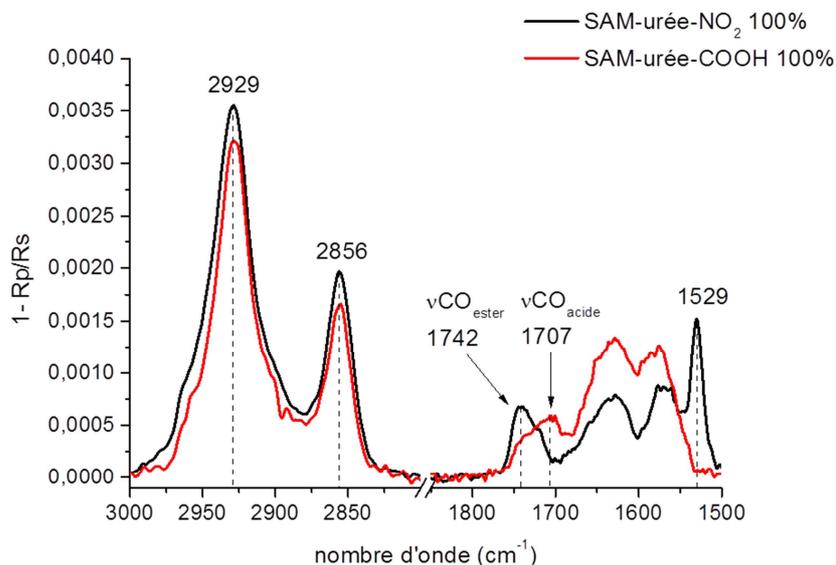


Figure III-3. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-NO₂ 100% et de la SAM-urée-COOH 100%.

Cette analyse permet de vérifier l'absence de dégradation de la surface au cours de la modification chimique de celle-ci. En effet, l'intensité des bandes correspondant aux groupes CH₂ de la chaîne alkyle ne varie presque pas. De plus, le contrôle de la modification chimique de surface peut se faire par PM-IRRAS à chaque étape. Ainsi, la transformation de l'ester en acide carboxylique¹² se traduit par la disparition des bandes νCO_{ester} à 1742 cm⁻¹ et ν_{as}NO₂ à 1529 cm⁻¹ ainsi que par l'apparition d'une nouvelle bande à 1707 cm⁻¹ associée à la νCO de la fonction acide.

Ces observations montrent clairement une déprotection totale des fonctions acide carboxylique de surface.

ii. Activation des fonctions acide carboxylique

Les fonctions acide carboxylique sont activées, à l'aide d'une solution aqueuse d'EDC et NHS, en présence d'un tampon MES (2-(acide *N*-morpholino)éthanesulfonique) pour maintenir le pH constant à 6. La réaction procède en deux étapes (Figure III-4). Tout d'abord le carbodiimide réagit avec la fonction acide carboxylique pour former une *O*-acylisourée

¹² Driscoll P.F., Milkani E., Lambert C.R., McGimpsey W.G. *Langmuir* **2010**, 26, 3731-3738.

réactive.¹³ Cette espèce pourrait directement réagir avec une amine pour former une liaison amide, mais avec un rendement moyen à cause du réarrangement possible en *N*-acylurée, non réactive. Par contre, en présence de NHS, ce réarrangement est défavorisé et l'*O*-acylisourée, avec le NHS, conduit à un ester plus stable. Le sous-produit de type urée formé au cours de cette réaction est éliminé par lavage des substrats aux ultrasons à l'eau et au chloroforme. Pour limiter la réaction d'hydrolyse compétitive, cet ester activé NHS est réalisé juste avant l'immobilisation des NP-pA.

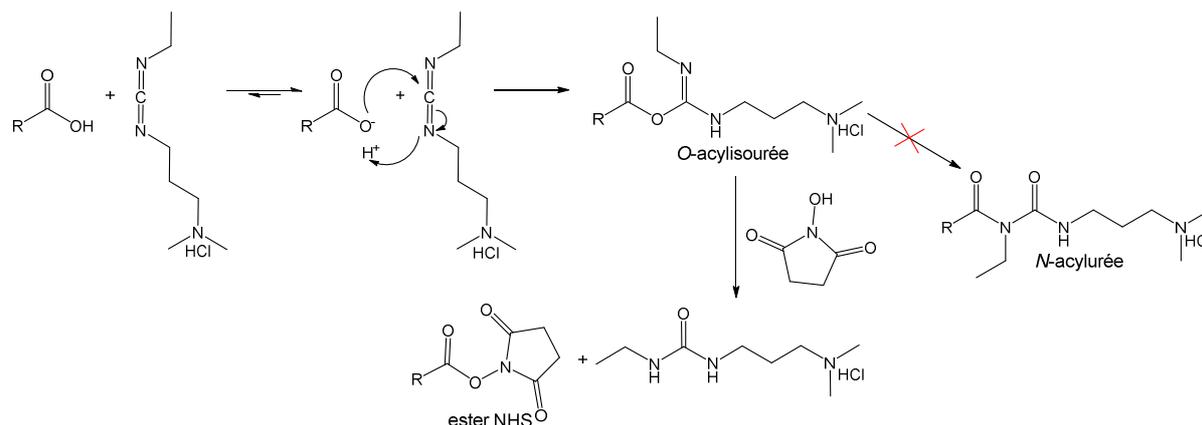


Figure III-4. Mécanisme de la réaction d'activation des acides carboxylique avec EDC/NHS.

Comme précédemment, l'analyse PM-IRRAS de la SAM-urée-NHS 100% (Figure III-5) révèle une bonne stabilité de la surface durant l'étape de formation de l'ester activé. L'intensité des bandes relatives aux groupes CH₂ de la chaîne alkyle, dans le cas de la SAM-urée-NHS 100% et la SAM-urée-COOH 100%, est comparable.

¹³ Richert L., Boulmedais F., Lavallo P., Mutterer J., Ferreux E., Decher G., Schaaf P., Voegel J.-C., Picart C. *Biomacromolecules* **2004**, 5, 284-294.

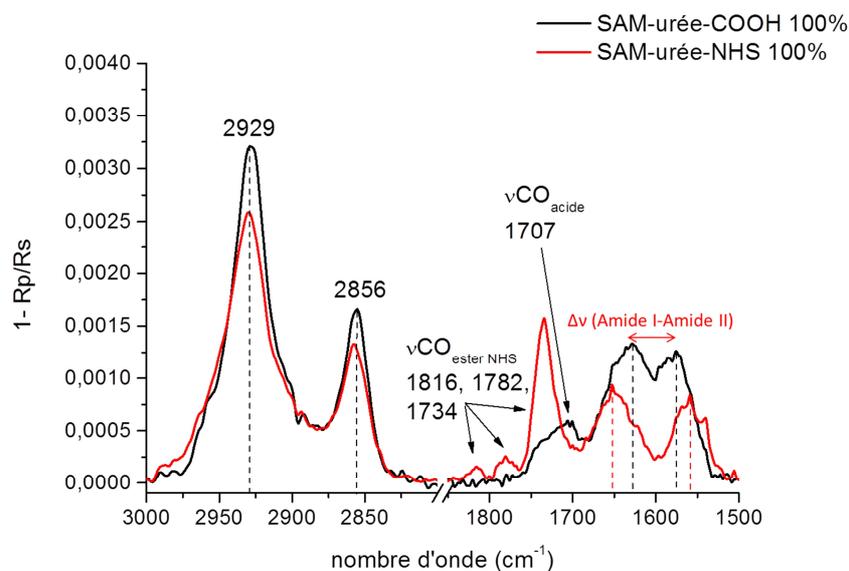


Figure III-5. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-COOH 100% et de la SAM-urée-NHS 100%.

La disparition de la bande de vibration du carbonyle de l'acide carboxylique à 1707 cm^{-1} et l'apparition de trois nouvelles bandes à 1816 cm^{-1} , 1782 cm^{-1} et 1734 cm^{-1} peuvent être observées. Ces trois bandes sont connues pour être caractéristiques de l'ester NHS. Toutefois, l'attribution exacte de ces trois bandes est toujours controversée. Le plus souvent, les bandes à 1782 cm^{-1} et 1734 cm^{-1} sont attribuées aux modes d'élongation symétriques et asymétriques des carbonyles du cycle par analogie avec les composés succinimides. La dernière bande à plus haut nombre d'onde (1816 cm^{-1}) serait quant à elle associée au carbonyle de l'ester *N*-hydroxysuccinimide.¹⁴ L'autre possibilité serait que la bande à 1816 cm^{-1} serait celle du mode symétrique des carbonyles du cycle NHS. En effet, ce mode présente une plus grande fréquence que le carbonyle d'un ester ainsi qu'une faible activité infrarouge. Les deux autres modes (1782 cm^{-1} et 1734 cm^{-1}), quant à eux, pourraient être dus à un couplage entre le mode d'élongation du carbonyle de l'ester et le mode d'élongation asymétrique des carbonyles du cycle.¹⁵

Ceci dit, dans notre cas, l'élément important est la présence de ces trois bandes et non pas leur attribution précise.

De plus, la différence $\Delta\nu$ observée entre les bandes amide I et amide II est plus importante pour la SAM-urée-NHS 100% (93 cm^{-1} pour la SAM-urée-NHS 100% contre 55 cm^{-1} pour la SAM-urée-COOH 100%). Plus cette différence est faible, plus les liaisons hydrogène intermoléculaires sont fortes. Le groupement ester NHS étant plus volumineux que

¹⁴ Frey B.L., Corn R.M. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3187-3193.

¹⁵ Moraillon A., Gouget-Laemmel A.C., Ozanam F., Chazalviel J.-N. *J. Phys. Chem. C* **2008**, 112, 7158-7167.

l'acide, des gênes stériques peuvent avoir lieu entre les molécules. Cela a pour effet d'éloigner les motifs urée et donc de diminuer les interactions par liaisons hydrogène.

iii. Immobilisation covalente des NP-pA

L'immobilisation des NP-pA est réalisée dans une solution aqueuse, contenant les NP-pA (PBS, tampon phosphate salin) ajustée à pH = 8 avec de la potasse. La solution utilisée comprend $1,75 \cdot 10^{11}$ nanoparticules ($V=10$ mL). Cette quantité de particules est, en théorie, suffisante pour avoir un recouvrement total de la surface. Les substrats sont immergés dans la solution pendant 2 h, à 37°C. Un pH légèrement basique permet la déprotonation des fonctions amine des résidus lysine de la protéine A et permet la réaction avec l'ester activé présent sur la surface. L'immobilisation des NP-pA se fait donc par création d'une liaison covalente amide entre la surface du support et la protéine A. Les substrats sont lavés abondamment à l'eau MilliQ pour éliminer les sels présents sur la surface, puis aux ultrasons dans l'eau MilliQ pendant 5 minutes pour éliminer les NP-pA physisorbées.

Une fois l'immobilisation covalente des NP-pA effectuée, la SAM-urée-NP-pA 100% est caractérisée en PM-IRRAS et AFM.

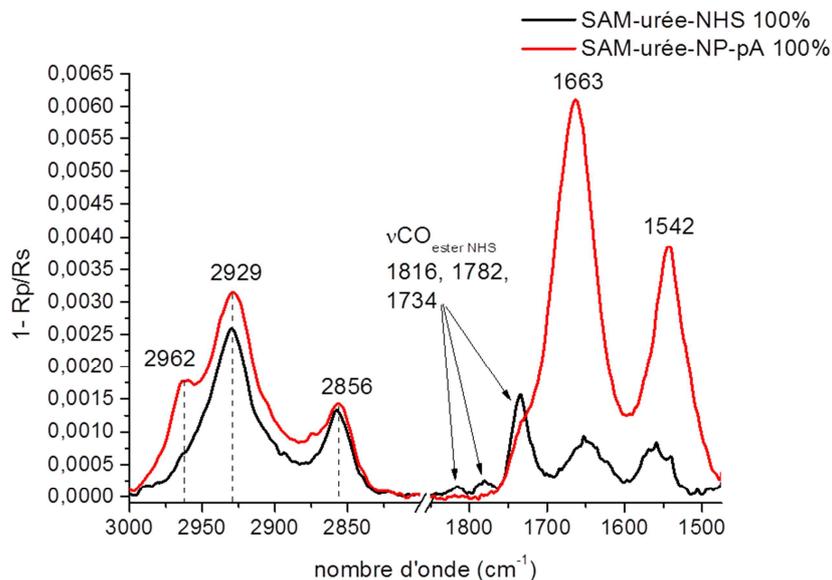


Figure III-6. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-NHS 100% et de la SAM-urée-NP-pA 100%.

Sur les spectres PM-IRRAS (Figure III-6), la présence de la protéine à la surface est confirmée par l'apparition d'une nouvelle bande à 2962 cm^{-1} caractéristique du mode d'élongation asymétrique du groupe CH_3 , présent dans plusieurs acides aminés de la protéine A.

La consommation de l'ester activé est contrôlée par la disparition des trois bandes relatives aux groupements NHS (1816 cm^{-1} , 1782 cm^{-1} et 1734 cm^{-1}). Mais surtout, la forte augmentation de l'intensité des bandes amide I (1663 cm^{-1}) et amide II (1542 cm^{-1}) confirme la création de liaisons peptidiques et donc l'immobilisation covalente de la protéine A sur la surface.

Les wafers de silicium ont aussi été analysés en AFM après immobilisation des NP-pA (Figure III-7).

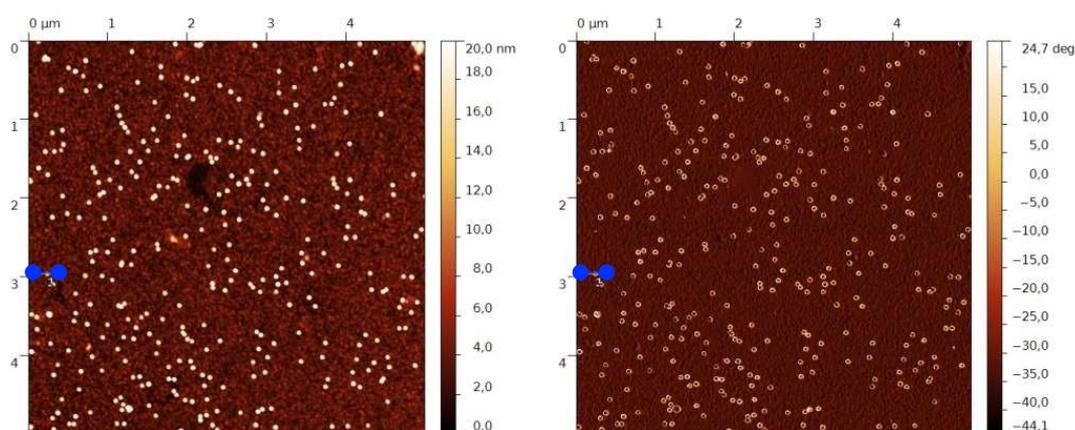


Figure III-7. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) ($5\text{ }\mu\text{m} \times 5\text{ }\mu\text{m}$) de la SAM-urée-NP-pA 100%.

L'image de hauteur montre la présence de particules plus hautes que le reste de la surface. L'image de phase révèle un contraste, et donc une composition chimique différente entre la surface et ces particules pouvant être alors considérées comme des NP-pA immobilisées. Les NP-pA sont réparties de façon homogène sur la surface. A partir des images AFM, il est possible d'estimer le nombre de NP-pA immobilisées sur la surface à environ $13,2\text{ NP-pA}/\mu\text{m}^2$.

Un profil effectué sur l'image de hauteur (Figure III-8) confirme que les particules observées ont bien une hauteur de 20 nm correspondant au diamètre des NP-pA. Cependant les largeurs mesurées sont d'environ 45 nm (à mi-hauteur). Mais une fois pris en compte le rayon de courbure de la pointe (10 nm), la largeur correspond environ à celle des NP-pA ($45 - 2 \times 10 = 25\text{ nm}$).

Sur un profil de phase effectué au même endroit que le profil de hauteur (Figure III-8), une variation de la phase est notée au niveau de la nanoparticule. En effet, celle-ci augmente (passage de -37° à 0°) au moment où la pointe arrive sur la couche de protéine qui est plus molle que la surface. Ensuite, la phase diminue (de 0° à -43°) lors du passage sur la

nanoparticule qui elle est plus dure. Puis, une nouvelle augmentation (de -43° à 2°) peut être observée lorsque la pointe traverse à nouveau une zone où il n'y a que la protéine. Pour finir, la phase diminue à nouveau au moment du retour sur la SAM. Cela confirme un changement de composition entre la SAM, la protéine et la nanoparticule d'or.

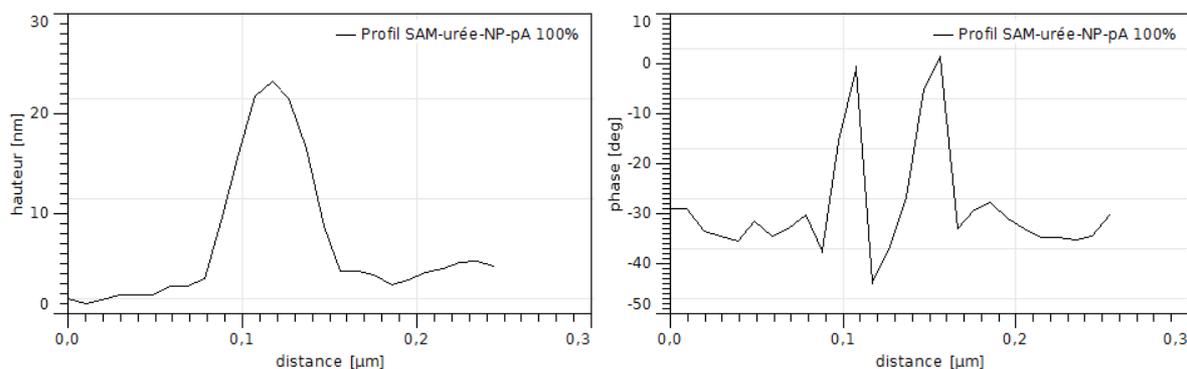


Figure III-8. Profils de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) de la SAM-urée-NP-pA 100%.

Sur l'image de phase (Figure III-9), deux zones différentes peuvent être clairement distinguées au niveau des nanoparticules. En effet, au centre, apparaît une zone plus sombre correspondant au noyau d'or. Cette zone est encerclée d'une zone plus claire qui correspond à la couche de protéine A déposée sur la nanoparticule. La différence de composition entre les deux parties de la NP-pA est donc clairement mise en évidence.

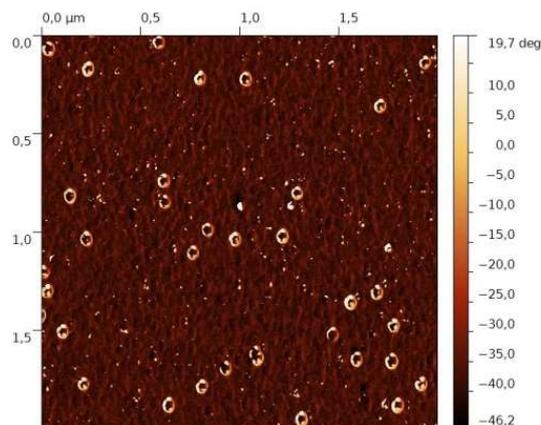


Figure III-9. Image de phase ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$) de la SAM-urée-NP-pA 100%.

En conclusion, nous avons ici démontré l'immobilisation covalente de NP-pA sur une SAM-urée- NO_2 100%. En effet, les différentes étapes de l'immobilisation (déprotection et activation des fonctions acide et immobilisation covalente des NP-pA) ont été caractérisées par PM-IRRAS. L'analyse par AFM des substrats après l'immobilisation permet aussi de

confirmer la présence de NP-pA d'un diamètre de 20 nm, réparties de manière homogène sur la surface.

b) Adhésion non-spécifique des NP-pA

Afin de vérifier que l'immobilisation des NP-pA, réalisée précédemment, est bien covalente et non pas une simple adhésion non-spécifique, nous avons déposé les NP-pA, sur la SAM-urée-COOH 100%, sans activation préalable de la fonction acide (Figure III-10).

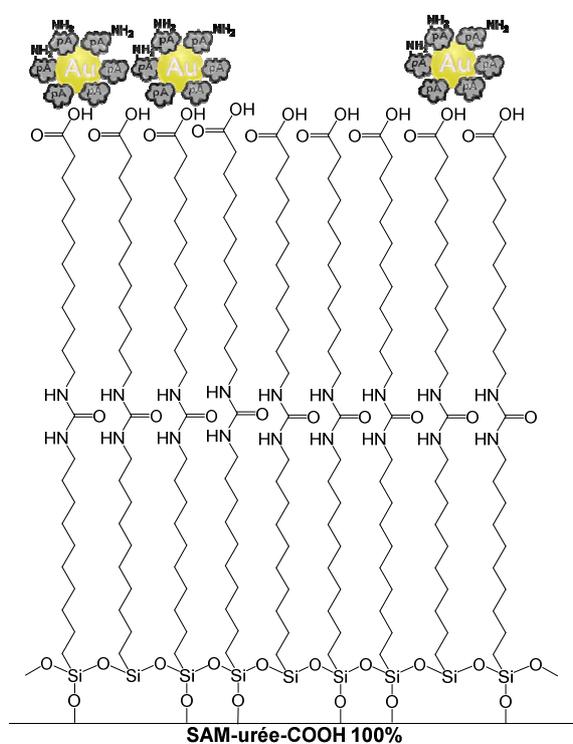


Figure III-10. Schéma représentant l'adhésion non-spécifique des NP-pA sur la SAM-urée-COOH 100%.

Une fois l'exposition des substrats aux NP-pA réalisée, ceux-ci sont caractérisés par AFM.

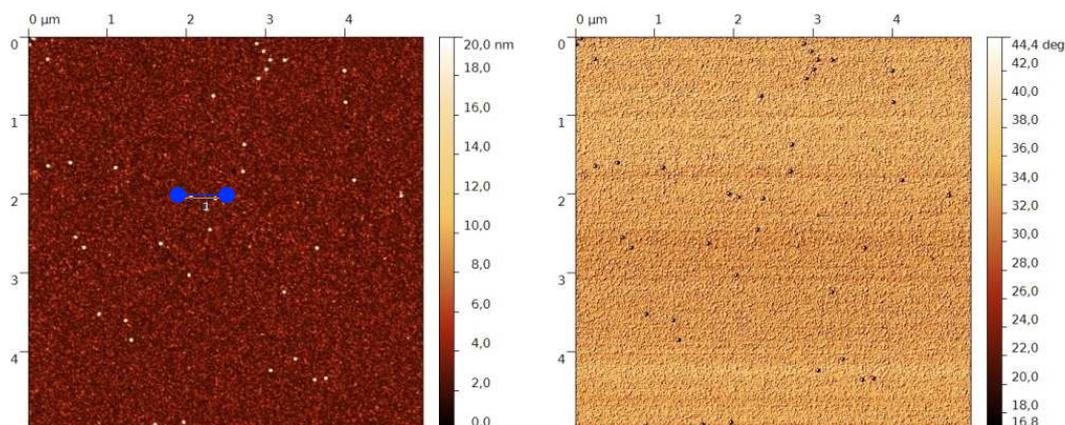


Figure III-11. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) du dépôt NP-pA sur la SAM-urée-COOH 100%, sans activation NHS/EDC.

L'image de hauteur (Figure III-11) met en évidence la présence de quelques particules plus hautes que le reste de la surface. Sur l'image de phase, ces particules ont un contraste par rapport au reste de la surface. Le contraste indique une composition chimique différente, confirmant la présence des NP-pA à la surface. Les quelques NP-pA observées sur la surface sont réparties de façon homogène. A partir des images AFM, il est possible d'estimer le nombre de NP-pA immobilisées sur la surface à environ $1,4\ \text{NP-pA}/\mu\text{m}^2$.

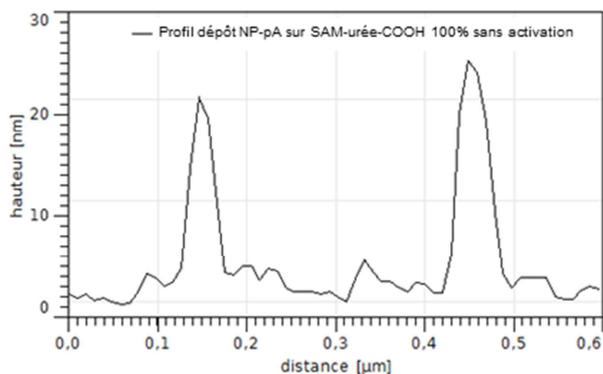


Figure III-12. Profil de hauteur du dépôt de NP-pA sur la SAM-urée-COOH 100%, sans activation EDC/NHS.

Un profil effectué sur l'image de hauteur (Figure III-12) permet d'observer que les particules ont bien une hauteur de 20 nm correspondant au diamètre des NP-pA.

Pour conclure, en l'absence d'activation préalable de la SAM-urée-COOH 100%, seulement quelques NP-pA sont déposées sur la surface. En effet, la quantité de NP-pA immobilisée passe de $13,2\ \text{NP-pA}/\mu\text{m}^2$ pour la voie covalente à seulement $1,4\ \text{NP-pA}/\mu\text{m}^2$

(rapport $\approx 1/10$) pour la voie non covalente. L'adhésion non-spécifique des NP-pA, sur ce type de surface, est donc assez limitée, ce qui est un résultat plutôt inattendu.

2. SAMs avec chaînon PEG

Dans la littérature, différents auteurs ont montré que des SAMs réalisées avec des molécules possédant des segments PEG augmentaient les propriétés répulsives des monocouches formées vis-à-vis des biomolécules et limitaient ainsi l'adhésion non-spécifique sur les surfaces.^{16,17,18}

C'est pourquoi, en vue d'éliminer totalement l'adhésion non-spécifique, nous avons choisi de déposer des NP-pA sur les SAM-PEG-COOH précédemment synthétisées.

a) Immobilisation covalente des NP-pA

Des NP-pA ont été immobilisées de manière covalente sur des lames d'or recouvertes d'une fine couche de silice (20 nm) et des wafers de silicium fonctionnalisés avec la SAM-PEG-NO₂ (Figure III-13) en suivant le même protocole que celui décrit précédemment pour la SAM-urée-NO₂ 100%. Les substrats ont donc tout d'abord été irradiés sous UV ($\lambda > 300$ nm), de manière à déprotéger les fonctions acide carboxylique, puis celles-ci ont été transformées en ester activés en présence d'EDC et NHS (tampon MES, pH = 6) et pour finir immobiliser les NP-pA sur les surfaces, par un couplage peptidique.

¹⁶ Soteropoulos C.E., Zurick K.M., Bernards M.T., Hunt H.K. *Langmuir* **2012**, 28, 15743-15750.

¹⁷ Cheng J., Zhu G., Wu L., Du X., Zhang H., Wolfrum B., Jin Q., Zhao J., Offenhäusser A., Xu Y. *J. Neurosci. Methods* **2013**, 213, 196-203.

¹⁸ a) Bennetau B., Bousbaa J., Choplin F. Brevet Mondial WO0153303 **2001** ; Bennetau B., Bousbaa J., Choplin F., Souteyrand E., Martin J-R., Cloarec J-P. Brevet Mondial WO0153523 **2001**.

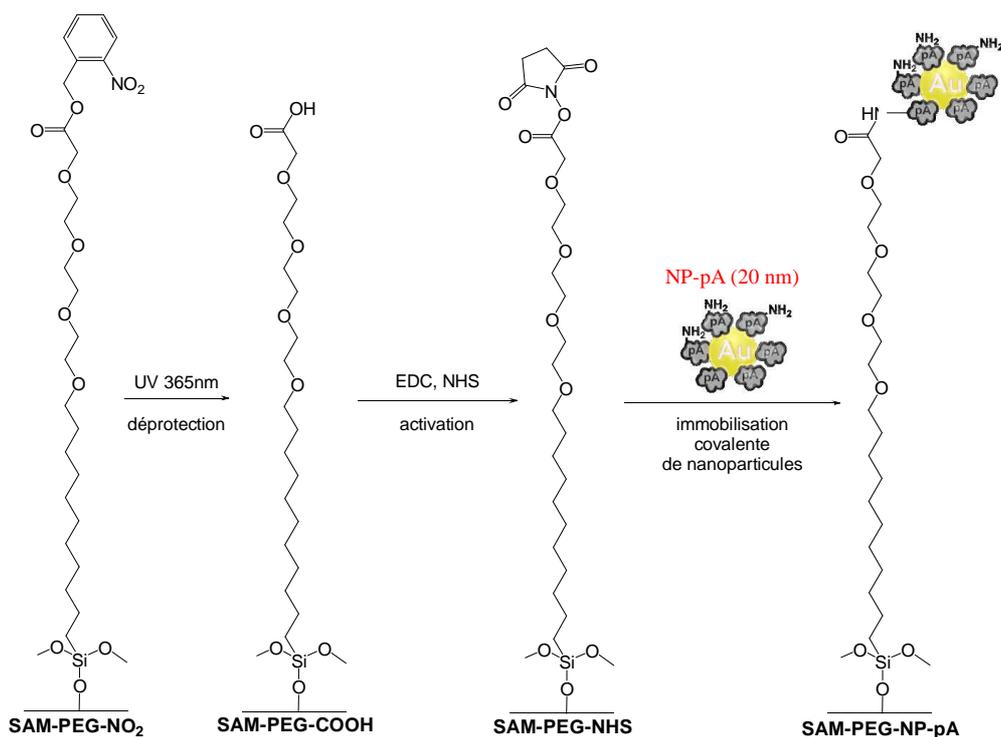


Figure III-13. Schéma de l'immobilisation des NP-pA sur la SAM-PEG-NO₂.

i. Photodéprotection des fonctions acide carboxylique

Les substrats sont analysés en PM-IRRAS une fois la déprotection terminée (Figure III-14).

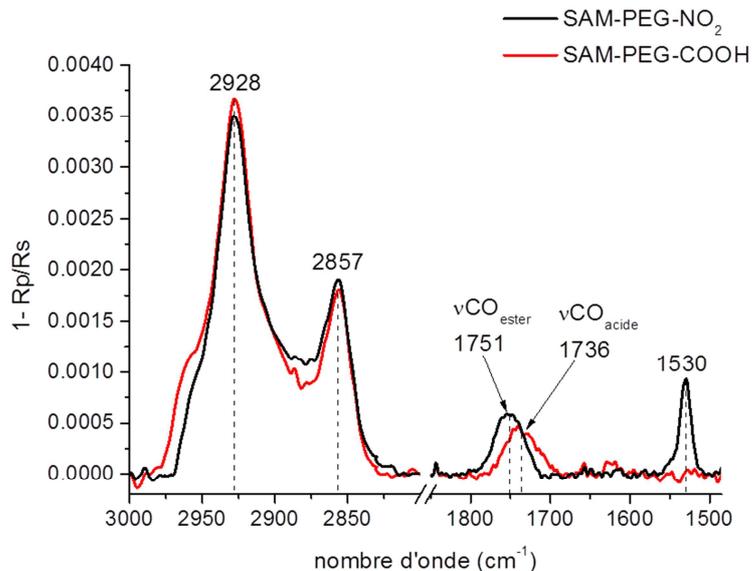


Figure III-14. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-PEG-NO₂ et de la SAM-PEG-COOH.

Les spectres PM-IRRAS ne montrent pratiquement aucune variation de l'intensité des bandes correspondantes aux groupes CH_2 de la chaîne alkyle et donc une bonne conservation de celle-ci.

La disparition de la bande $\nu\text{CO}_{\text{ester}}$ à 1751 cm^{-1} et ν_{asNO_2} à 1530 cm^{-1} ainsi que l'apparition d'une nouvelle bande à 1736 cm^{-1} ($\nu\text{CO}_{\text{acide}}$) confirme la déprotection totale des fonctions acide carboxylique.

ii. Activation des fonctions acide carboxylique

Comme précédemment pour la SAM-urée-COOH 100%, les fonctions acide carboxylique de la SAM-PEG-COOH sont activées à l'aide d'une solution aqueuse d'EDC/NHS en présence d'un tampon MES pour maintenir le pH constant à 6. Une fois l'activation terminée, les substrats sont analysés en PM-IRRAS (Figure III-15).

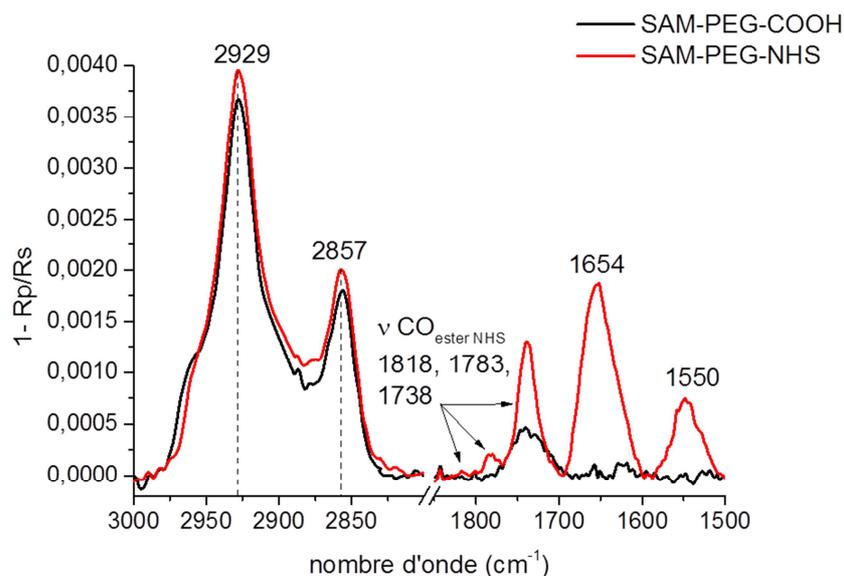


Figure III-15. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-PEG-COOH et de la SAM-PEG-NHS.

Sur le spectre PM-IRRAS enregistré pour la SAM-PEG-NHS, pratiquement aucune variation d'intensité des bandes correspondantes aux groupes CH_2 de la chaîne alkyle n'est observée. La SAM n'est donc pas dégradée au cours de cette étape d'activation.

De plus, l'apparition des trois bandes caractéristiques de l'ester NHS à 1818 cm^{-1} , 1783 cm^{-1} et 1738 cm^{-1} confirme l'activation des fonctions acide carboxylique. Les deux bandes observées à 1654 cm^{-1} et 1550 cm^{-1} (correspondant respectivement à des bandes amide I et amide II) pourraient être expliquées par la présence d'un produit secondaire de type *N*-

acylurée non-réactive formé, suite au réarrangement de l'*O*-acylisourée, lors de l'activation de la SAM avec EDC.

iii. Immobilisation covalente des NP-pA

L'immobilisation des NP-pA sur la SAM-PEG-NHS est réalisée selon le protocole décrit dans le cas de la SAM-urée-NHS 100% (cf. p.88). Une fois l'immobilisation de NP-pA effectuée, la SAM-PEG-NP-pA est caractérisée en PM-IRRAS et AFM (Figure III-16).

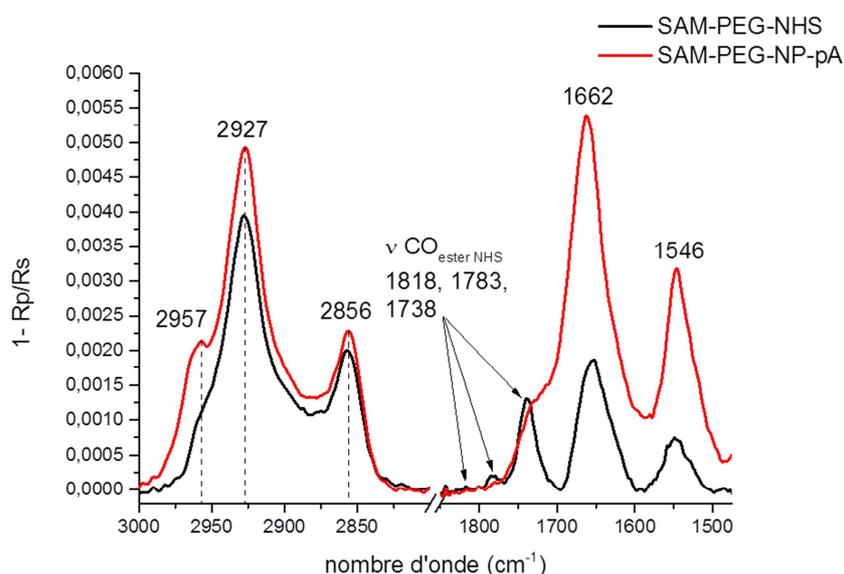


Figure III-16. Comparatif des spectres PM-IRRAS de la SAM-PEG-NHS et de la SAM-PEG-NP-pA.

L'apparition d'une bande à 2957 cm^{-1} , caractéristique du mode d'élongation asymétrique du groupe CH_3 présent dans plusieurs acides aminés de la protéine A, confirme la présence de celle-ci.

De plus, la consommation de l'ester activé est mise en évidence par la disparition des trois bandes caractéristiques du groupement NHS (1818 cm^{-1} , 1783 cm^{-1} et 1738 cm^{-1}). Mais surtout, l'immobilisation covalente de la protéine A sur la surface est confirmée par la forte augmentation de l'intensité des bandes amide I (1662 cm^{-1}) et amide II (1546 cm^{-1}) due à la création de liaisons peptidiques.

Afin de caractériser complètement l'immobilisation des NP-pA, les wafers de silicium ont été analysés en AFM (Figure III-17).

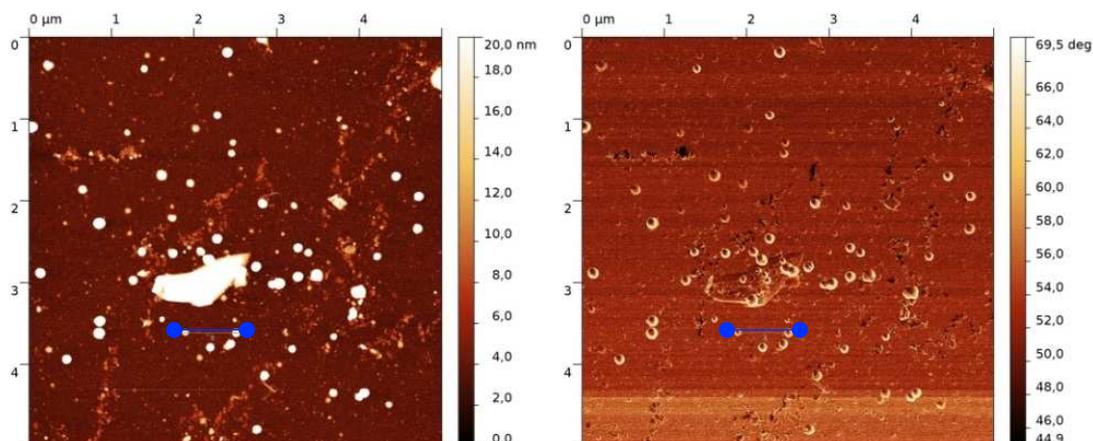


Figure III-17. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) (5 µm x 5 µm) de la SAM-PEG-NP-pA.

L'image de hauteur obtenue, montre la présence de particules plus hautes que le reste de la surface. Sur l'image de phase, un faible contraste est présent confirmant l'immobilisation de NP-pA. Par contre, les nanoparticules sur la SAM-PEG-NP-pA ont tendance à se regrouper par amas. Les spots correspondants aux NP-pA sont plus larges que ceux observés sur la SAM-urée-NP-pA 100%, où les NP-pA sont immobilisées de façon individuelle. Il est donc difficile de déterminer le nombre de particules dans chaque amas et par conséquent le nombre de nanoparticules immobilisées sur la surface.

Un profil effectué sur l'image de hauteur (Figure III-18) confirme bien l'immobilisation des nanoparticules. Par contre, la hauteur observée est plus importante que celle dans le cas de la SAM-urée pA (entre 40 et 60 nm). Les largeurs mesurées à mi-hauteur sont d'environ 70 nm à 90 nm. Cette différence par rapport à la taille des NP-pA ne peut être expliquée uniquement par le rayon de courbure de la pointe (influence sur la largeur uniquement et pas sur la hauteur). Cela confirme que les nanoparticules se regroupent par amas. Sur un profil de phase effectué au même endroit que le profil de hauteur, la phase augmente au moment du passage sur l'amas de NP-pA et donc un changement de composition entre la SAM et les NP-pA.

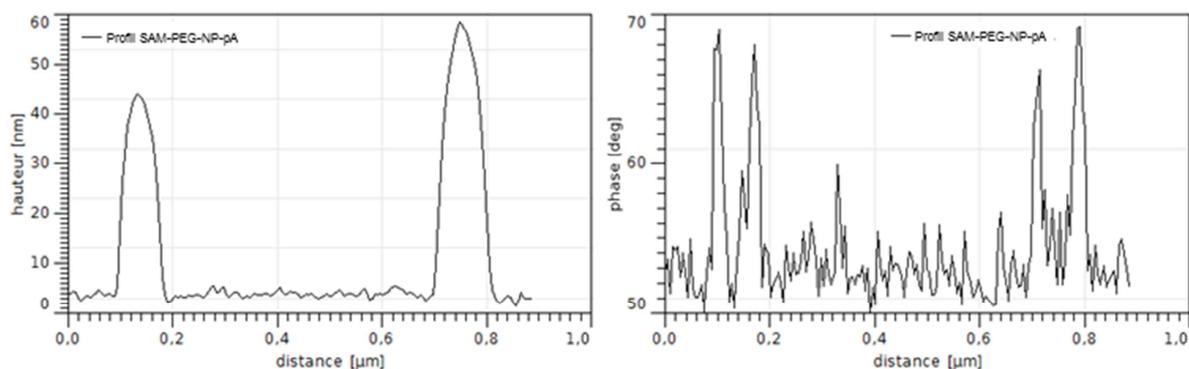


Figure III-18. Profils de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) de la SAM-PEG-NP-pA.

Il est possible d'expliquer ce regroupement des NP-pA, sous forme d'amas d'une taille allant de 50 à 100 nm de large, par une moins bonne accessibilité des fonctions acide carboxylique dans la SAM-PEG-COOH. En effet, la présence de nombreux atomes d'oxygène dans les chaînons PEG peut amener à la formation de liaisons hydrogène entre l'acide et ces atomes d'oxygène. Cela pourrait entraîner un repliement des chaînes dans la monocouche et rendre les fonctions acide carboxylique difficilement accessibles pour l'immobilisation des NP-pA.

Pour conclure, l'immobilisation covalente de NP-pA sur une SAM-PEG-NO₂ a été ici démontrée. Les différentes étapes nécessaires à leur immobilisation (déprotection et activation des fonctions acides et immobilisation covalente des NP-pA) ont, en effet, été caractérisées par PM-IRRAS. De plus, l'analyse par AFM des substrats après l'immobilisation, permet de confirmer la présence de NP-pA sur la surface avec une tendance à se regrouper par amas. Cette observation pourrait s'expliquer par une moins bonne accessibilité des fonctions d'accroche.

b) Adhésion non-spécifique des NP-pA

Une expérience a été réalisée, afin de vérifier si les SAMs-PEG limitaient l'adhésion non spécifique sur les surfaces, par rapport aux SAMs-urée. Pour cela, des SAMs-PEG-NO₂ ont été déprotégés sous UV pour conduire aux SAMs-PEG-COOH. Les NP-pA ont ensuite été déposées suivant le protocole décrit précédemment (cf. p. 88), mais sans étape d'activation préalable des fonctions acide carboxylique avec EDC/NHS. Après l'exposition des substrats aux NP-pA, ceux-ci sont caractérisés par AFM.

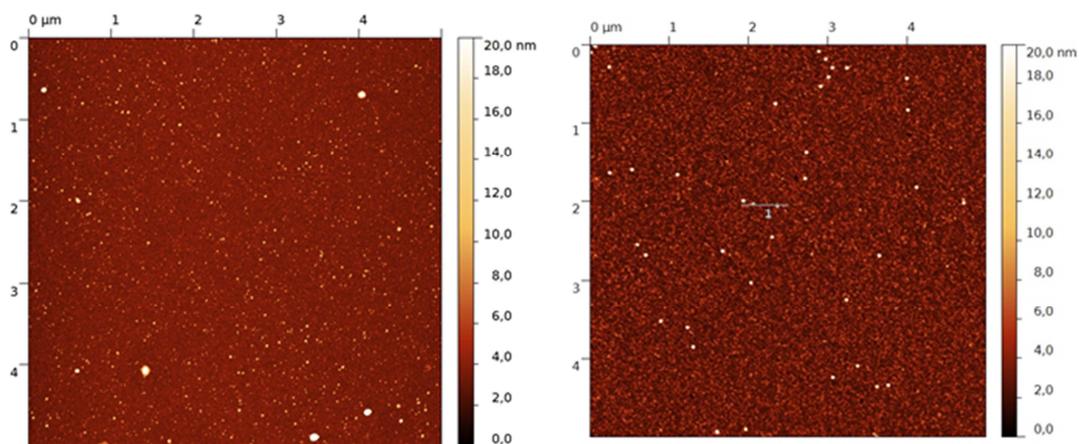


Figure III-19. Images de hauteur (5 µm x 5 µm) du dépôt de NP-pA sur la SAM-PEG-COOH (à gauche) et sur la SAM-urée-COOH 100% (à droite) sans activation EDC/NHS.

La comparaison des images de hauteur obtenues pour le dépôt de NP-pA sur les SAMs-PEG-COOH et les SAMs-urée-COOH 100% (Figure III-19) semble montrer une adhésion non-spécifique moindre sur la SAM-PEG-COOH (environ $0,6 \text{ NP-pA}/\mu\text{m}^2$ pour cette dernière au lieu d'environ $1,4 \text{ NP-pA}/\mu\text{m}^2$).

B. Fonctionnalisation des SAMs-urée avec des NP-PEG-NH₂

Dans le but d'étudier la répartition des fonctions acide carboxylique sur les SAMs mixtes, nous avons décidé d'utiliser des nanoparticules d'or recouvertes d'une couche de polymère à base de chaînes PEG terminés par une fonction amine (fournisseur : Biosciences ; diamètre : 20nm ; notées NP-PEG-NH₂). Leurs chaînes PEG devraient permettre de s'affranchir de l'adhésion non-spécifique et la fonction NH₂ d'établir une liaison covalente avec les acide carboxylique de surface.

Nous allons, dans cette partie, dans un premier temps, vérifier l'absence d'adsorption non-spécifique des NP-PEG-NH₂ sur les SAM-urée-CH₃ 100%.

Dans un deuxième temps, nous étudierons l'immobilisation covalente de ces nanoparticules sur les SAMs suivantes :

- SAM-urée-COOH 100%,
- SAM-urée-COOH 30%,
- SAM-urée-COOH 10%

dans le but de comparer leur répartition suivant la proportion d'agent de couplage réactif.

1. Adhésion non-spécifique des NP-PEG-NH₂ sur la SAM-urée-CH₃ 100%

L'agent de couplage utilisé ici constitue la majeure partie des SAMs mixtes étudiées ultérieurement (Figure III-20). Il est donc important d'avoir un minimum d'adhésion non-spécifique avec ces molécules.

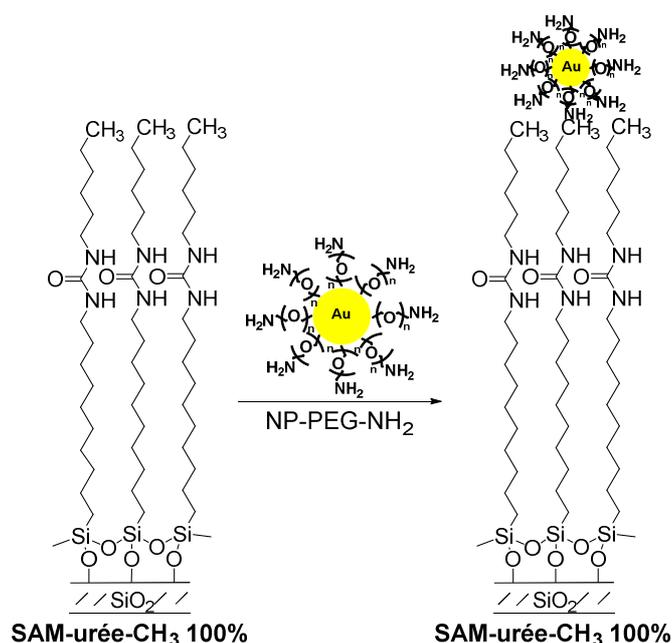


Figure III-20. Adhésion non-spécifique des NP-PEG-NH₂ sur la SAM-urée-CH₃ 100%.

Les substrats ont été immergés pendant 20 heures dans une solution aqueuse contenant des NP-PEG-NH₂ (tampon PBS, ajusté à pH = 8 avec de la potasse), maintenue à 37°C dans une étuve, puis ils ont été analysés par AFM.

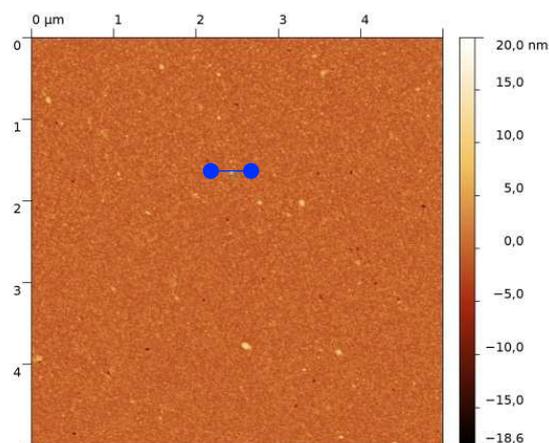


Figure III-21. Image de hauteur (5 μm x 5 μm) du dépôt de NP-PEG-NH₂ sur la SAM-urée-CH₃ 100%.

Sur l'image de hauteur (Figure III-21), seul quelques rares NP-PEG-NH₂, d'une hauteur d'environ 20 nm, sont observables sur la surface. Une absence quasi complète d'adhésion non-spécifique sur la SAM-urée-CH₃ 100% est constatée.

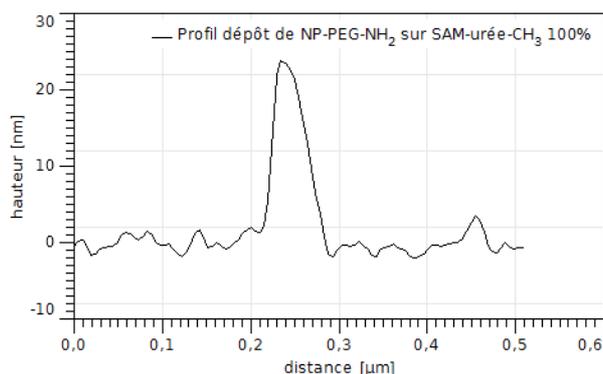


Figure III-22. Profil de hauteur du dépôt de NP-PEG-NH₂ sur la SAM-urée-CH₃ 100%.

La SAM-urée-CH₃ 100% et les SAMs-urée-COOH mixtes étant constituées en grande majorité des mêmes chaînes, il est donc raisonnable de penser que sur ces dernières aucune adhésion non-spécifique ne sera observée. Les NP-PEG-NH₂ déposées sur la surface seront donc uniquement dues à la création de liaisons covalentes entre les fonctions acide carboxylique des SAMs et les fonctions amine des nanoparticules.

Les expériences préliminaires valident l'utilisation de ces NP-PEG-NH₂ comme sondes pour étudier les SAMs-urée mixtes. Le dépôt de celles-ci sur la SAM-urée-COOH 100%, la SAM-urée-COOH 30% ou la SAM-urée-COOH 10%, nous permettra donc d'étudier leur répartition lors de la diminution du nombre de sites de fixation (acide carboxylique).

2. Immobilisation covalente des NP-PEG-NH₂ sur la SAM-urée-COOH 100%

Des NP-PEG-NH₂ ont été déposées sur une SAM-urée-COOH 100% préalablement activée (Figure III-23). Les substrats ont été immergés pendant 20 heures dans une solution aqueuse contenant des NP-PEG-NH₂ (tampon PBS, ajusté à pH = 8 avec de la potasse) maintenue à 37°C dans une étuve. La solution utilisée comprend $3,4 \cdot 10^{11}$ nanoparticules ($V = 10$ mL). Cette quantité est, en théorie, suffisante pour avoir un recouvrement total de la surface. Les substrats ont ensuite été analysés par AFM et MEB (Microscopie Electronique à Balayage).

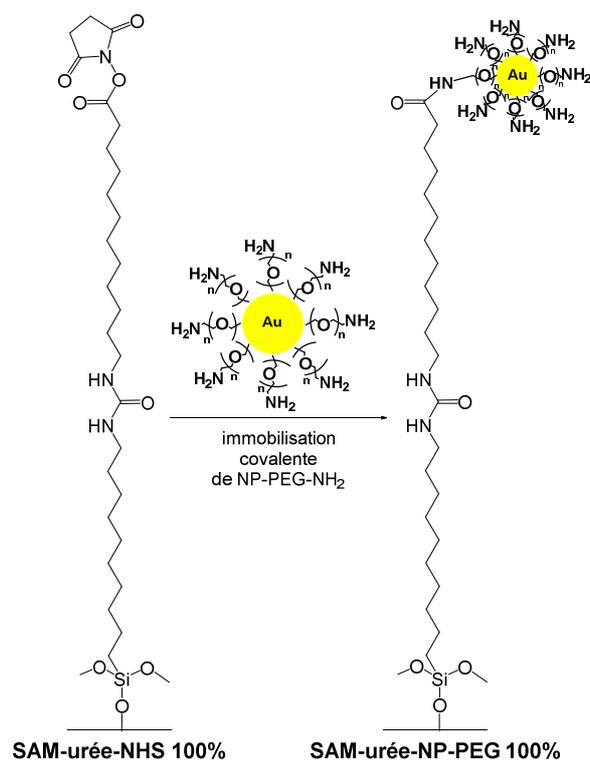


Figure III-23. Immobilisation covalente des NP-PEG-NH₂ sur une SAM-urée-NHS 100%.

L'observation d'une image de hauteur (Figure III-24), révèle la présence de NP-PEG-NH₂ sur la surface, confirmée par l'image de phase présentant un contraste qui correspond à deux matériaux aux propriétés mécaniques et élastiques différentes.

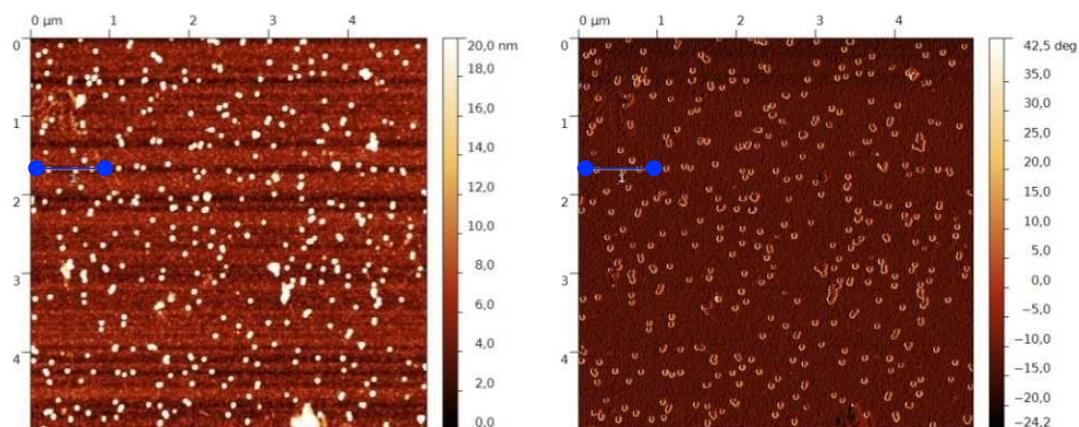


Figure III-24. Images de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) (5 μm x 5 μm) de la SAM-urée-NP-PEG 100%.

Un profil sur les images de hauteur et de phase permet d'observer d'une part que la hauteur des nanoparticules correspond bien à celle attendue (20 à 30 nm) et d'autre part une

différence de phase au niveau de la nanoparticule montrant une composition chimique différente entre celle-ci et la surface (Figure III-25). De plus, une répartition homogène des nanoparticules, bien isolées les unes des autres avec seulement quelques petits agrégats, est observée sur l'ensemble de la surface.

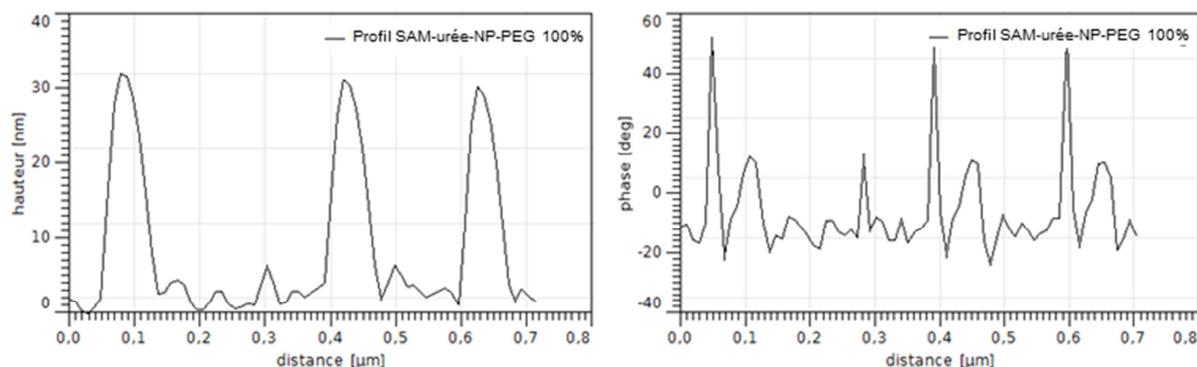


Figure III-25. Profils de hauteur (à gauche) et de phase (à droite) de la SAM-urée-NP-PEG 100%.

Ces surfaces ont aussi été caractérisées au MEB (Figure III-26) en mode BSEI (BackScattered Electron Imaging). Dans ce mode, les NP-PEG-NH₂ vont apparaître différemment de la SAM, en raison du numéro atomique de l'or, évitant de confondre un agrégat de matière avec une nanoparticule.

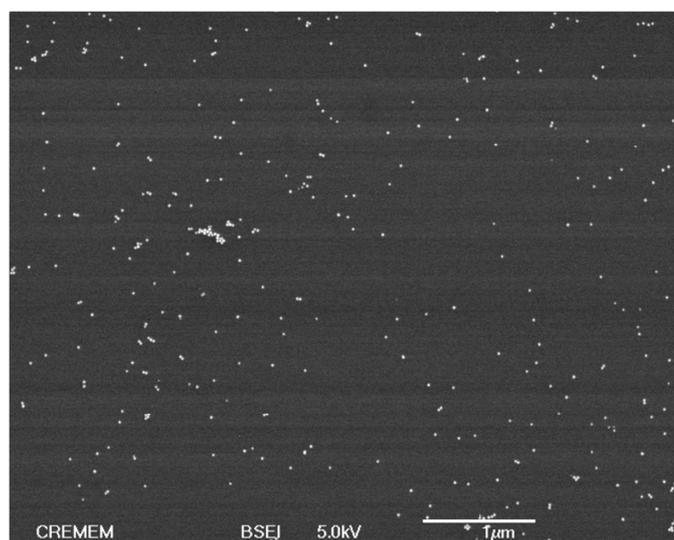


Figure III-26. Image MEB de la SAM-urée-NP-PEG 100% (6 μm x 4,8 μm) en mode BSEI.

L'image MEB confirme la répartition homogène de nombreuses NP-PEG-NH₂. Celles-ci sont disposées de manière isolées sur l'ensemble de la surface, malgré la présence de quelques petits agrégats de nanoparticules. A partir de l'image MEB, il est possible d'estimer

le nombre de NP-PEG-NH₂ immobilisées sur la surface soit environ 12,5 NP-PEG-NH₂/μm² (valeur comparable à celle obtenue pour l'immobilisation de NP-pA (13,2 NP-pA/μm²)).

Pour conclure, les caractérisations par AFM et MEB de la SAM-urée-COOH 100% montrent que la fonctionnalisation de la surface se fait avec une répartition homogène des nanoparticules. Celles-ci sont principalement disséminées de façon isolées sur la surface.

Maintenant nous allons observer la répartition des nanoparticules lorsque le nombre de sites de fixation (acide carboxylique) sur la SAM diminue et que ceux-ci sont dilués au milieu de chaînes non réactives, cas des SAMs mixtes.

3. Immobilisation covalente des NP-PEG-NH₂ sur la SAM-urée-COOH 30% et la SAM-urée-COOH 10%

Un protocole similaire à celui de l'immobilisation des NP-PEG-NH₂ sur la SAM-urée-COOH 100% (cf. p. 102), a été utilisé pour déposer les nanoparticules sur la SAM-urée-COOH 30% et sur la SAM-urée-COOH 10% préalablement activées. Après immobilisation des nanoparticules, les substrats ont été analysés par AFM et MEB pour caractériser la répartition des NP-PEG-NH₂ sur la surface.

Les SAM-urée-NP-PEG 30% et SAM-urée-NP-PEG 10% ont donc été imagés par AFM. Des images de hauteur et de phase effectuées sur les deux SAMs (Figure III-27), permettent d'observer l'immobilisation de NP-PEG-NH₂ sur les substrats.

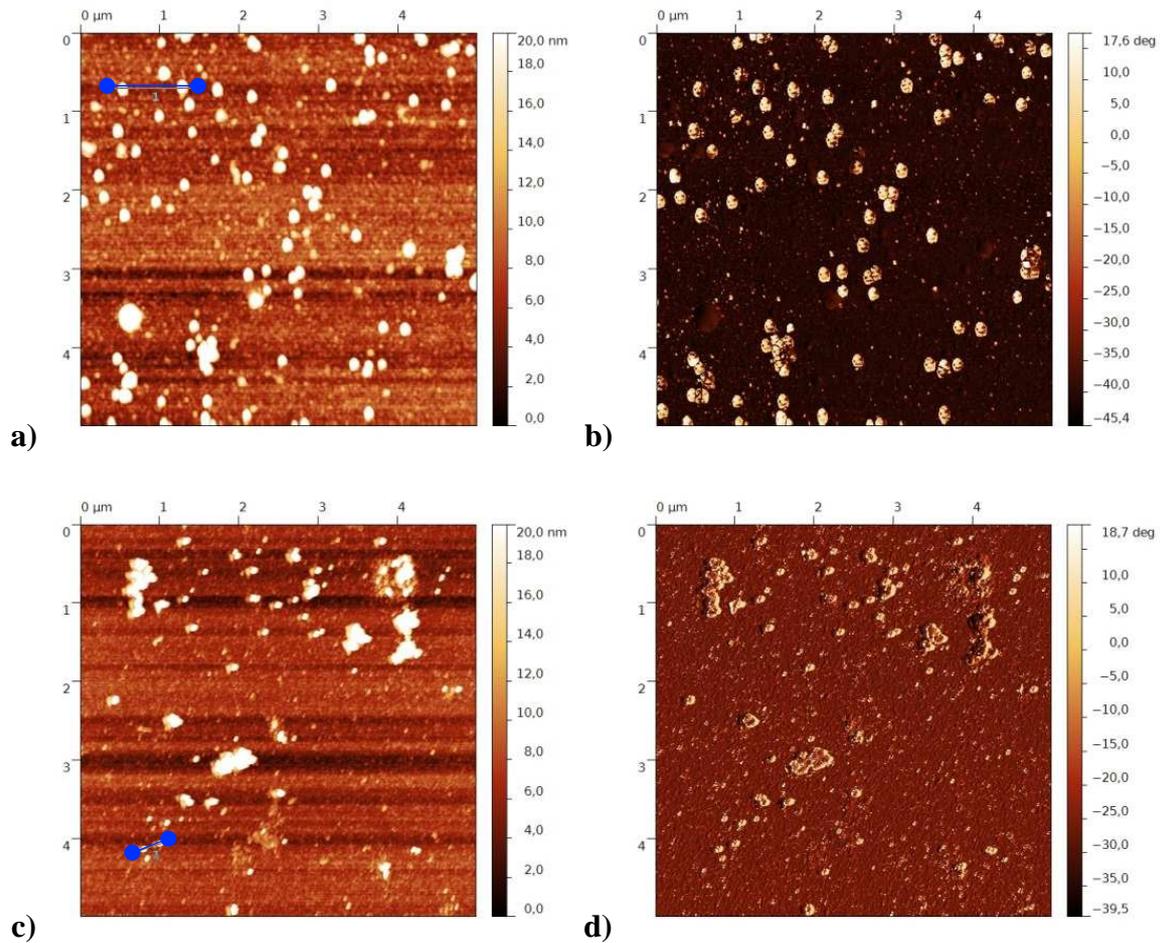


Figure III-27. Images de hauteur (a) et de phase (b) (5 μm x 5 μm) de la SAM-urée-NP-PEG 30% et de la SAM-urée-NP-PEG 10% (hauteur (c) et phase (d)).

Des profils sur les images de hauteur confirment la présence des NP-PEG-NH₂ avec des hauteurs de l'ordre de 20 à 30 nm (Figure III-28). De plus, l'image de phase montre un contraste au niveau de la NP-PEG-NH₂.

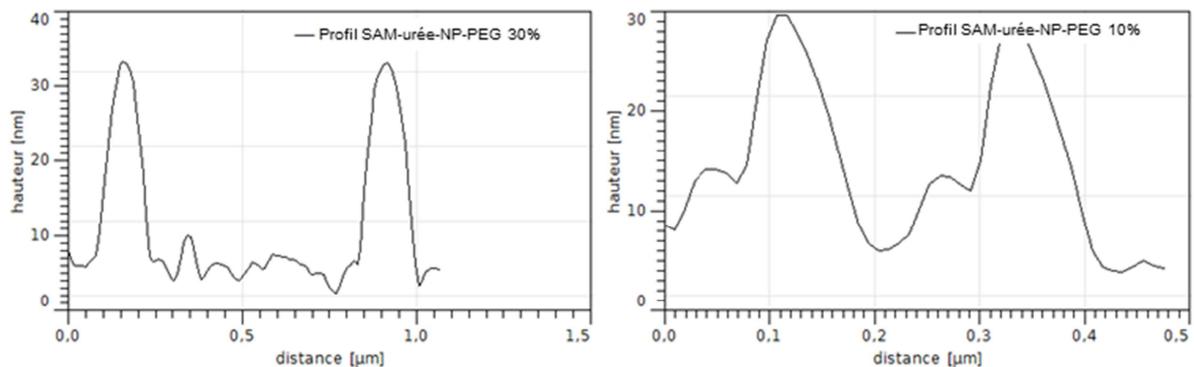


Figure III-28. Profils de hauteur de la SAM-urée-NP-PEG 30% (à gauche) et de la SAM-urée-NP-PEG 10% (à droite).

L'analyse comparée des images AFM des trois SAMs (SAM-urée-NP-PEG 100%, SAM-urée-NP-PEG 30% et SAM-urée-NP-PEG 10%) montre une diminution globale du nombre de NP-PEG-NH₂ à la surface cohérente avec celle du pourcentage de fonctions acide carboxylique. De plus, une tendance des NP-PEG-NH₂ à se regrouper sous forme d'agrégats est aussi observée lorsque la proportion de fonctions réactives diminue.

La répartition des NP-PEG-NH₂ sur ces substrats a aussi été examinée au MEB en mode BSEI (Figure 0-29). On confirme la diminution du nombre de NP-PEG-NH₂ sur la surface en fonction du nombre de sites réactifs ainsi que la tendance des nanoparticules à se regrouper par petits agrégats (de 50 à 150 nm pour la SAM-urée-NP-PEG 30% et de 150 à 300 nm pour la SAM-urée-NP-PEG 10%). Cette tendance suggère une structure en « îlots » pour la SAM-urée-COOH 30% et la SAM-urée-COOH 10%. De plus, la taille des « îlots » semble augmenter lorsque la proportion de fonctions acide carboxylique diminue.

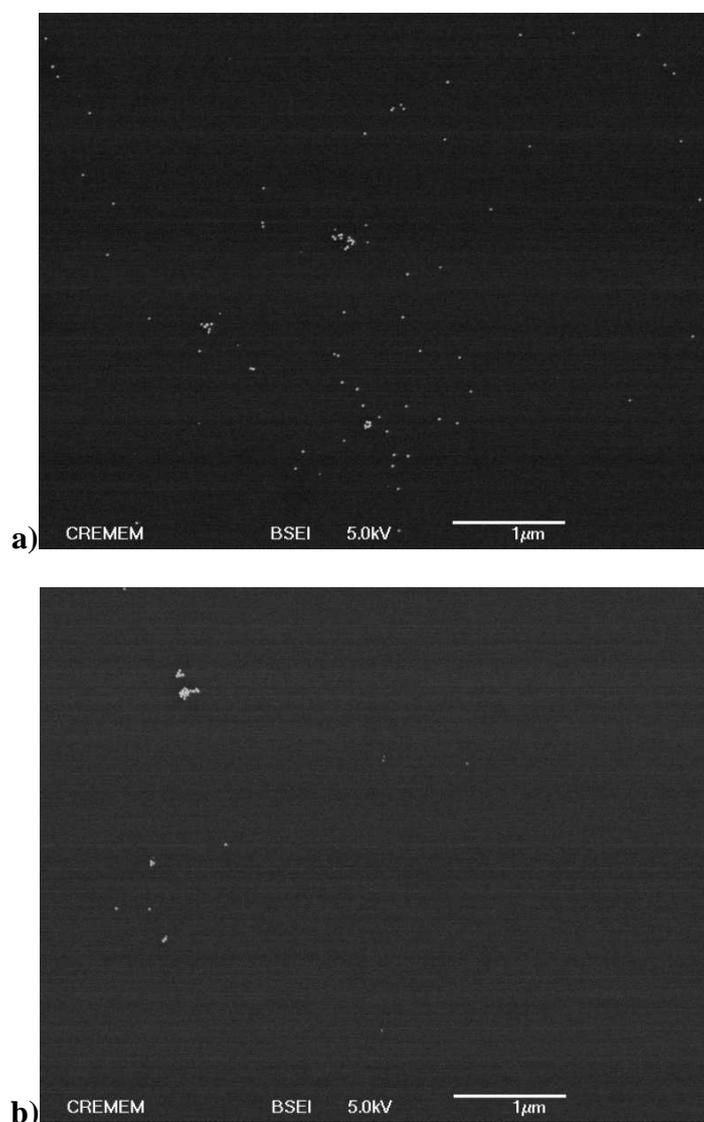


Figure 0-29. Images MEB en mode BSEI (6 μm x 4,8 μm) de la SAM-urée-NP-PEG 30% (a) et de la SAM-urée-NP-PEG 10% (b).

Il peut être remarqué que 12,5 NP-PEG-NH₂/μm², 3,0 NP-PEG-NH₂/μm² et 1,2 NP-PEG-NH₂/μm² sont immobilisées respectivement sur la SAM-urée-COOH 100%, la SAM-urée-COOH 30% et la SAM-urée-COOH 10%. Ces mesures révèlent clairement une diminution des fonctions réactives en surface. Si on prend comme référence la SAM-urée-COOH 100% (12,5 NP-PEG-NH₂/μm²) et que l'on calcule le pourcentage de fonctions acides accessibles pour les SAMs mixtes, il y a donc 24% de fonctions COOH pour la SAM-urée-COOH 30% (3,0 NP-PEG-NH₂/μm²) et 9,6% pour la SAM-urée-COOH 10% (1,2 NP-PEG-NH₂/μm²). Ces valeurs sont cohérentes avec la proportion d'agents de couplage fonctionnels présent dans chaque monocouche.

De plus, il peut aussi être noté que le nombre de NP-PEG-NH₂ immobilisées sur la SAM-urée-COOH 100% est sensiblement le même que pour les NP-pA (12,5 NP-PEG-NH₂/μm² et 13,2 NP-pA/μm²).

En conclusion, l'étude par AFM et MEB de l'immobilisation de NP-PEG-NH₂ sur les SAM-urée-COOH mixtes (30% et 10%) démontre que la réduction du nombre de sites de fixation possibles entraîne une diminution du nombre de NP-PEG-NH₂ immobilisées sur la surface. De plus, les nanoparticules ont aussi une plus grande tendance à se retrouver sous forme d'« îlots » (de 50 à 150 nm de large pour la SAM-urée-COOH 30% et de 150 à 300 nm de large pour la SAM-urée-COOH 10%). Cela suggère une structure en « îlots » pour les SAMs mixtes due à un phénomène de ségrégation de phase. La présence de ces « îlots » pourrait être une limitation dans le cas du dépôt d'objets biologiques de petites tailles tels que les anticorps (environ 15 nm de long). Toutefois, cela ne devrait pas être pénalisant dans le cas d'objets biologiques de grandes tailles comme les bactéries (de 200 nm à 2 μm).

Cependant, en ce qui concerne les SAMs-PEG-COOH, malgré leur très faible adhésion non-spécifique, ces monocouches présentent un comportement singulier pour l'immobilisation d'objets biologiques. En effet, lors de l'immobilisation covalente de NP-pA celles-ci se concentrent en îlots de 50 à 100 nm de large. Ce phénomène pourrait être dû à une moins bonne accessibilité des acides carboxyliques contrairement au SAM-urée-COOH 100% où l'on observe uniquement des NP-pA individualisées.

Pour ces diverses raisons, il nous a semblé préférable de choisir la série des SAM-urée-COOH lors de l'étude de l'immobilisation d'un véritable objet biologique. Nous avons donc déposé un virus sur la SAM-urée-COOH 100%.

C. Biofonctionnalisation de la SAM-urée-COOH 100% avec le Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV)

Dans cette partie, un système biologique bien calibré, le Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV), est choisi comme modèle et immobilisé de manière covalente sur la SAM-urée-COOH 100% (ce travail est réalisé en collaboration avec le laboratoire LIRM du CEA Marcoule) afin de voir s'il est déformé. Le TMV est un virus à ARN connu pour infecter les plantes, et plus particulièrement les plants de tabac. Il est constitué d'une capsidie formée de 2130 capsomères. Chaque capsomère est formée d'un seul type de protéine. Cette dernière est constituée de 158 acides aminés et à l'intérieur de celle-ci est enroulé, sous forme d'hélice, l'ARN monocaténaire du virus. Cela donne au virus l'aspect d'une particule cylindrique, qui a la forme d'un bâtonnet d'une longueur d'environ 300 nm pour un diamètre de 18,0 nm (Figure III-30).^{19,20} Son génome comporte 6400 nucléotides.

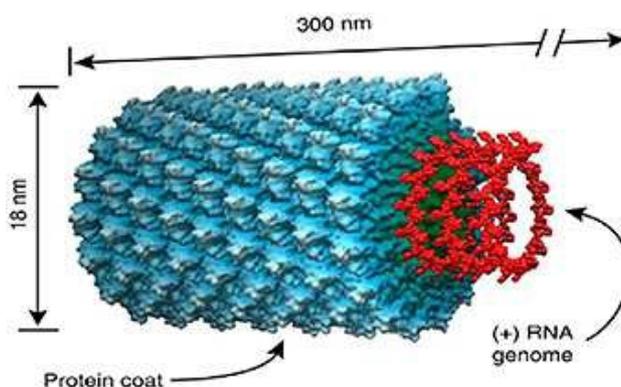


Figure III-30. Représentation du TMV.

1. Immobilisation covalente du TMV sur la SAM-urée-COOH 100%

Le protocole utilisé pour l'immobilisation du TMV, sur la SAM-urée-COOH 100%, est proche de celui utilisé pour les NP-pA et les NP-PEG-NH₂. Après une activation préalable en présence d'EDC et NHS, une solution de virus (1,5 mg/mL dans l'EDTA à 1 mM) est déposée sur les lames. Pour finir, les substrats sont rincés avec un tampon phosphate pour éliminer les virus physisorbés (Figure III-31).

¹⁹ Pattanayek R., Stubbs G. *J. Mol. Biol.* **1992**, 228, 516-528.

²⁰ Trinh M-H., Odorico M., Pique M.E., Teulon J-M., Roberts V.A., Ten Eyck L.F., Getzoff E.D., Parot P., Chen S-w. W., Pellequer J-L. *Structure* **2012**, 20, 113-120.

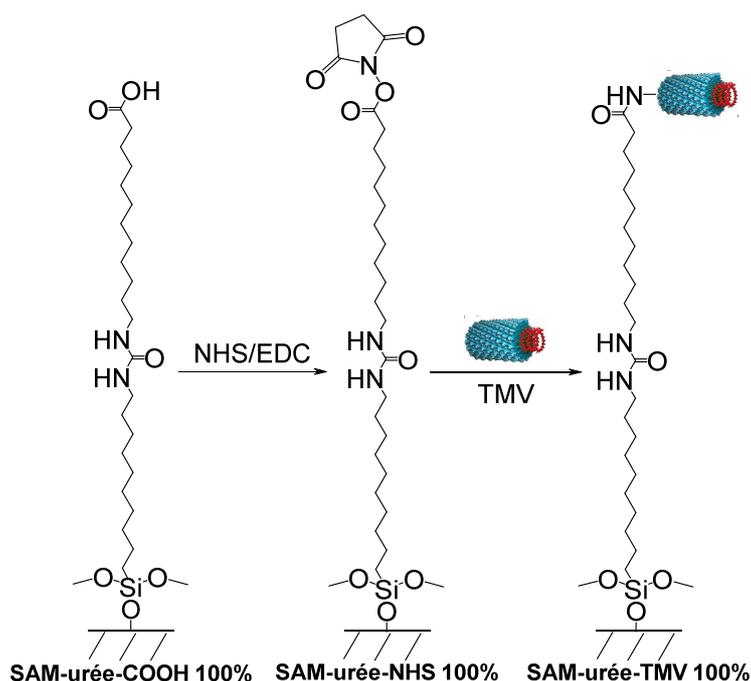


Figure III-31. Schéma récapitulatif des différentes étapes de l'immobilisation du TMV sur la SAM-urée-COOH 100%.

Après l'immobilisation covalente des virus sur les monocouches, les substrats sont imagés à l'air par AFM.

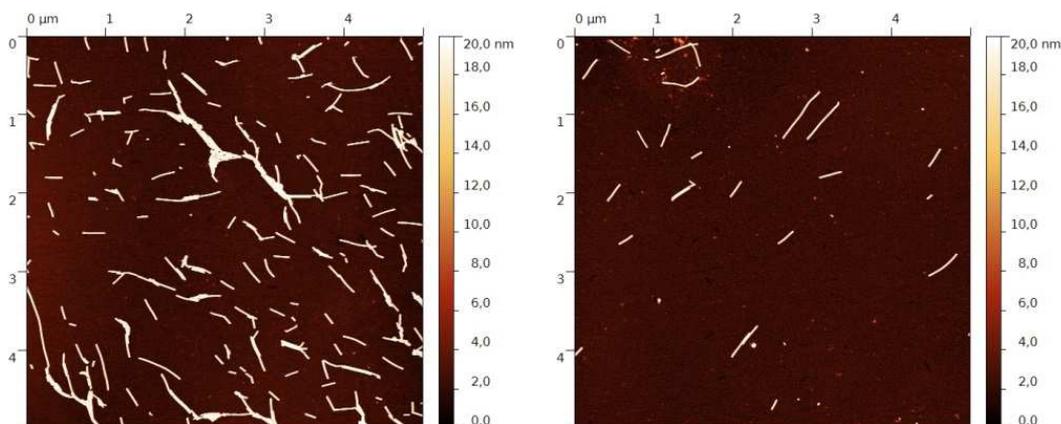


Figure III-32. Images de hauteur (5 µm x 5 µm) de la SAM-urée-TMV 100% (à gauche) et du dépôt sans activation EDC/NHS (à droite).

La comparaison d'images de hauteur d'un substrat après immobilisation du TMV avec ou sans activation EDC/NHS (Figure III-32) met en évidence l'immobilisation covalente du virus. En effet, de nombreuses particules virales ont été immobilisées sur la surface avec activation EDC/NHS, alors qu'il y en a peu sur celle sans activation. L'adsorption non-

spécifique, comme pour les nanoparticules, NP-pA ou NP-PEG-NH₂, reste donc limitée. De plus, il peut aussi être noté que les virus sont dispersés de façon homogène sur la surface même si parfois ils ont tendance à former des agrégats.

2. Contrôle de la hauteur du virus

Il est important qu'une biomolécule immobilisée sur une surface ne soit pas déformée pour garder son activité. C'est pourquoi, après un traitement pour éliminer le bruit de bande, la hauteur du virus sur la SAM-urée-COOH 100% est mesurée en ajustant une série d'ellipsoïdes effectués sur des particules de TMV isolées, dans la région située dans le cadre blanc (Figure III-33 image A). La hauteur trouvée sera comparée avec celle mesurée, dans la région située dans le cadre blanc, sur une surface de mica (Figure III-33 image B). Sur cette surface, le virus est déposé par simple physisorption.

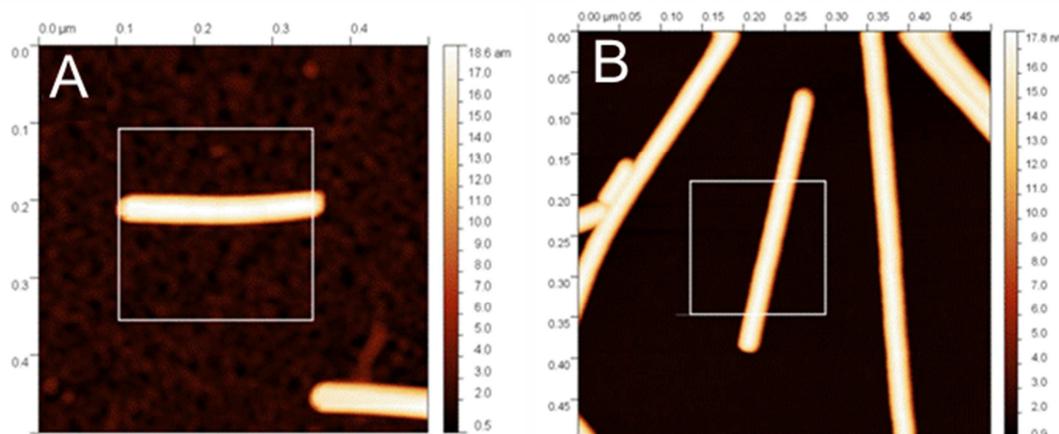


Figure III-33. Images de hauteur d'une particule isolée de TMV immobilisée sur une SAM-urée-COOH 100% (A) et physisorbée sur du mica (B).

La hauteur du virus mesurée pour l'immobilisation covalente sur la SAM-urée-COOH 100% est de $18,1 \pm 0,1$ nm ($N = 521$). La comparaison de cette valeur avec celle obtenue pour la physisorption du TMV sur une surface de mica ($17,0 \pm 0,1$ nm ($N = 802$)), ainsi que celle de référence obtenue par diffraction des rayons X ($18,0$ nm)¹⁹, permet de montrer que l'immobilisation du virus, sur la SAM-urée-COOH 100%, s'effectue sans aucune déformation.²¹ Par contre, sur le mica, une déformation est observée. Celle-ci est due aux forces d'adsorption du mica. En effet, le mica est un substrat minéral, dur et fortement chargé, créant de fortes interactions électrostatiques avec le virus, lui aussi chargé. Les SAMs

²¹ Meillan M., Ramin M.A, Buffeteau T., Marsaudon S., Odorico M., Chen S-w.W., Pellequer J-L., Degueil M., Heuzé K., Vellutini L., Bennetau B. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 11927-11930.

présentent donc un grand intérêt pour l'immobilisation de biomolécules puisqu'elles permettent la conservation de leurs structures tridimensionnelles et donc leurs activités.

Il est donc clairement montré que lors de l'immobilisation du virus sur les SAMs (Figure III-32), celui-ci ne subit aucune déformation. Pour comparaison, sur les images AFM de la Figure III-34, effectuées en mode peak force, sont observés des monobrins d'ARN (a) ou des morceaux de virus d'environ 50 nm de long (b)), éléments caractéristiques de TMV dénaturés.

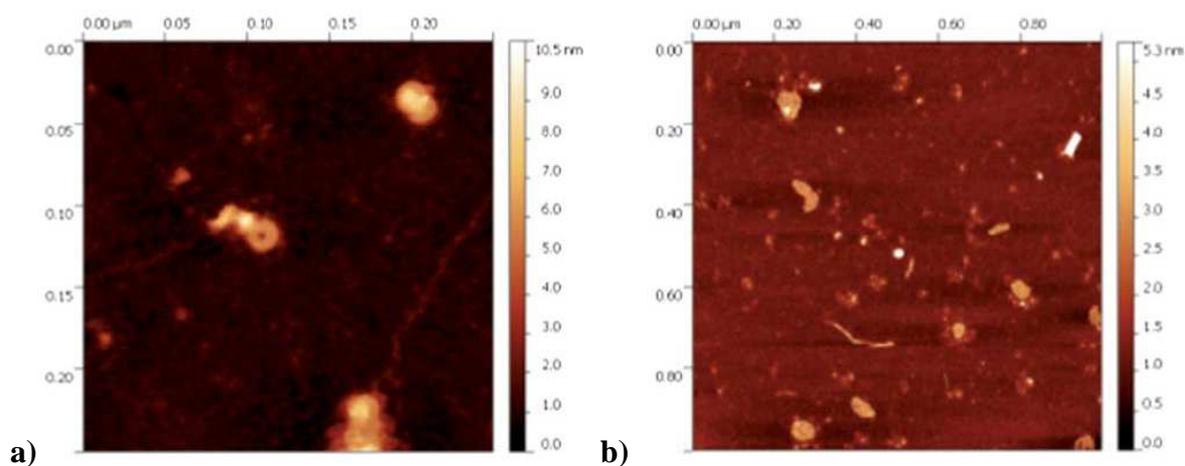


Figure III-34. Images AFM de TMV dénaturés.

Pour conclure, l'analyse par AFM de SAMs-urée-COOH 100% sur lesquelles ont été immobilisées des particules de TMV, met en évidence une faible adsorption non-spécifique des virus sur cette surface. De plus, lorsque les fonctions acides sont activées avec NHS/EDC, le TMV est immobilisé de manière covalente sur les SAMs. Une mesure de la hauteur du virus immobilisé sur les SAMs montre que ce dernier ne subit pas de déformation, comparé à la surface de mica souvent utilisée pour déposer le virus. Cela fait des SAMs une plateforme de choix pour l'immobilisation d'objets biologiques.

D. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré, dans une première partie, que l'immobilisation covalente de NP-pA était possible sur la SAM-urée-NO₂ 100%. En effet, après caractérisation par PM-IRRAS des différentes étapes de l'immobilisation (déprotection et activation des fonctions acides et immobilisation covalente des NP-pA), l'analyse des substrats par AFM confirme l'immobilisation de NP-pA d'un diamètre de 20 nm sur la surface. En l'absence de

l'étape d'activation des fonctions acide, nous avons observé un résultat inattendu puisque les SAMs-urée-COOH 100% avaient une adhésion non-spécifique très limitée.

Dans le but de diminuer cette adhésion non-spécifique, les NP-pA ont aussi été immobilisées de manière covalente sur la SAM-PEG-COOH. En l'absence d'activation EDC/NHS, l'adhésion non-spécifique est diminuée d'un facteur deux par rapport à la SAM-urée-COOH 100%. Par contre, lors de l'immobilisation covalente, l'analyse par AFM des substrats montre que les nanoparticules ont tendance à se regrouper pour former des amas de 50 à 100 nm de large.

Dans une seconde partie, des NP-PEG-NH₂ ont été immobilisées de manière covalente sur les différentes SAMs-urée (SAM-urée-COOH 100%, SAM-urée-COOH 30% et SAM-urée-COOH 10%). Il a été mis en évidence, que lorsque la proportion de sites de fixation diminuait, une diminution du nombre de nanoparticules immobilisées sur la surface était observée. Même si des nanoparticules isolées sont toujours observées, une plus forte tendance de celles-ci à se regrouper par « îlots » (de 50 à 150 nm pour la SAM-urée-COOH 30% et de 150 à 300 nm pour la SAM-urée-COOH 10%) est observée.

Pour immobiliser une biomolécule sur un substrat, la voie covalente est souvent privilégiée. En effet, celle-ci est plus robuste et évite le risque de désorption de la biomolécule qui pourrait avoir lieu avec une immobilisation non-covalente. De plus, il est important de contrôler que l'immobilisation covalente d'un objet biologique sur les SAMs se fait sans déformation de celui-ci. En effet, une déformation pourrait lui faire perdre son activité biologique. Pour cela dans une troisième partie, le TMV, a été immobilisé de manière covalente sur la SAM-urée-COOH 100% préalablement activée. Après analyse des substrats par AFM, une étude de la hauteur du virus montre qu'aucune déformation du virus n'a lieu au cours de l'immobilisation sur les SAMs contrairement à ceux qui est observé avec les substrats de mica. Cela fait de ces monocouches, un substrat de choix pour l'immobilisation covalente d'objets biologiques.

IV. Chapitre IV :

Etude bibliographique sur les nanotubes et leurs fonctionnalisations

A l'état naturel, le carbone existe sous deux formes cristallines. La première, le diamant, est considérée comme le matériau le plus dur qui soit. En effet, c'est une structure tridimensionnelle du carbone dans laquelle tous les atomes sont à l'état d'hybridation sp^3 et donc tétravalents. C'est cette structure qui lui confère sa dureté. Bien que différentes structures cristallines existent pour le diamant, la plus fréquente est, de loin, la structure de type cubique faces centrées (paramètre de maille : 0,356 nm et distance interatomique : 0,154 nm) (Figure IV-1).

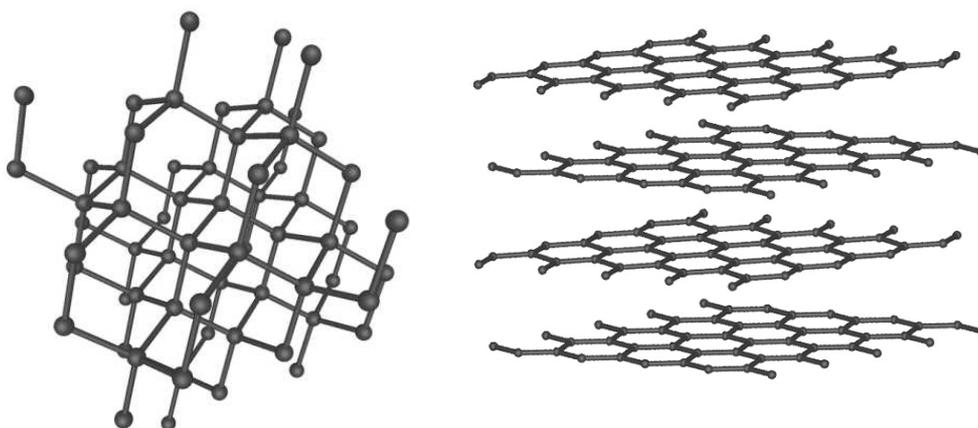


Figure IV-1. Structure du diamant (à gauche) et du graphite (à droite).

La seconde structure cristalline du carbone est le graphite. Il se présente sous la forme d'un matériau lamellaire noir et friable. Il est composé d'un empilement de feuillets. Chaque feuillet, ou plan de graphène, est constitué d'atomes de carbone à l'état d'hybridation sp^2 . Ceux-ci forment un réseau hexagonal (paramètre de maille : 0,243 nm et distance entre les atomes : 0,142 nm). Les plans de graphène sont empilés avec une distance entre chaque feuillet de 0,335 nm pour former le graphite hexagonal (Figure IV-1). Une autre structure rhomboédrique existe aussi.¹

A. Les nanotubes de carbone

La découverte, en 1985, des fullerènes, molécules de forme sphérique composées d'un grand nombre d'atomes de carbone, par Curl, Kroto et Smalley² a déclenché un grand engouement parmi les chercheurs pour la découverte de nouvelles nanostructures carbonées.

¹ Lipson H., Stokes A.R. *Nature* **1942**, 149, 328.

² Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E. *Nature* **1985**, 318, 162-163.

Cela a conduit à la découverte des nanotubes de carbone par Iijima quelques années plus tard.³ Ce sont des feuillets de graphène qui s'enroulent sur eux-mêmes pour former un cylindre. Ils sont six fois plus légers que l'acier (masse volumique respectivement de $1,3 \text{ g.cm}^{-3}$ pour les nanotubes et d'environ $7,5 \text{ g.cm}^{-3}$ pour l'acier) et trois cent fois plus résistants (résistance spécifique de 154 kN.m.kg^{-1} pour l'acier et d'environ $48000 \text{ kN.m.kg}^{-1}$ pour les nanotubes). Ils présentent de nombreux autres avantages comme le fait d'être conducteurs (pour 1/3 d'entre eux, les autres étant semi-conducteurs⁴) et de posséder de très bonnes propriétés mécaniques (par exemple un fort module de Young ainsi qu'une flexibilité et une résistance à la déformation⁵), thermiques (leur conductivité thermique peut varier de 600 à $2000 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ voire même plus de $3000 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour des MWCNT (MultiWall Carbon NanoTubes)⁶ ou SWCNT (SingleWall Carbon NanoTubes)⁷ isolés) et électroniques. Tout cela, en fait un composé de choix dans la conception de nouveaux matériaux ou dans le domaine de la nanoélectronique.

De plus, outre leurs propriétés mécaniques qui en font déjà une alternative intéressante aux pointes AFM commerciales en silicium, leur moindre réactivité vis-à-vis des objets biologiques présente aussi un grand intérêt. En effet, il est important de diminuer la contamination de la pointe car celle-ci modifie les interactions pointe-échantillon et donc l'image obtenue. La taille et le haut rapport d'aspect des nanotubes constituent aussi un avantage pour l'imagerie de surface. En effet, cela limite les effets de dilatation de pointe sur la forme de l'objet à imager et en particulier sur des objets avec des variations de hauteur très abruptes.

1. Différents types de nanotubes

Il existe deux types de nanotubes de carbone : les nanotubes multiparois (ou multifeuillets) et les nanotubes monoparois (ou monofeuillets). Ceux-ci diffèrent par leur structure, leur taille et donc leurs propriétés physico-chimiques.

³ Iijima S. *Nature* **1991**, 354, 56-58.

⁴ Saito R., Fujita M., Dresselhaus G., Dresselhaus M.S. *Appl. Phys. Lett.* **1992**, 60, 2204-2206.

⁵ Yakobson B.I., Brabec C.J., Bernholc J. *Phys. Rev. Lett.* **1996**, 76, 2511-2514.

⁶ Kim P., Shi L., Majumdar A., McEuen P.L. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 87, 215502, 1-4.

⁷ Pop E., Mann D., Wang Q., Goodson K., Dai H. *Nano Lett.* **2006**, 6, 96-100.

a) Les nanotubes multiparois (ou multifeuillets)

Les nanotubes mutiparois ont été les premiers découverts, par Iijima en 1991.³ Lors de la synthèse de fullerènes par arc électrique, des nanostructures graphitiques ont été observées à l'extrémité négative de l'électrode. Il s'agissait de nanotubes multiparois. Ceux-ci sont constitués de plusieurs feuillets de graphène repliés sur eux-mêmes de façon à former une série de cylindres concentriques (structure « poupées russes ») (Figure IV-2). Le diamètre du plus fin des feuillets, qui détermine la taille du canal central du MWCNT, est de l'ordre de deux nanomètres. Le nombre de feuillets peut aller jusqu'à cinquante et le diamètre du feuillet externe peut faire jusqu'à une vingtaine de nanomètres. Bien que la façon dont les feuillets s'empilent les uns sur les autres soit a priori aléatoire, la distance moyenne entre deux feuillets est de l'ordre de 0,34 nm. Cela rapproche donc cette structure de celle du graphite.

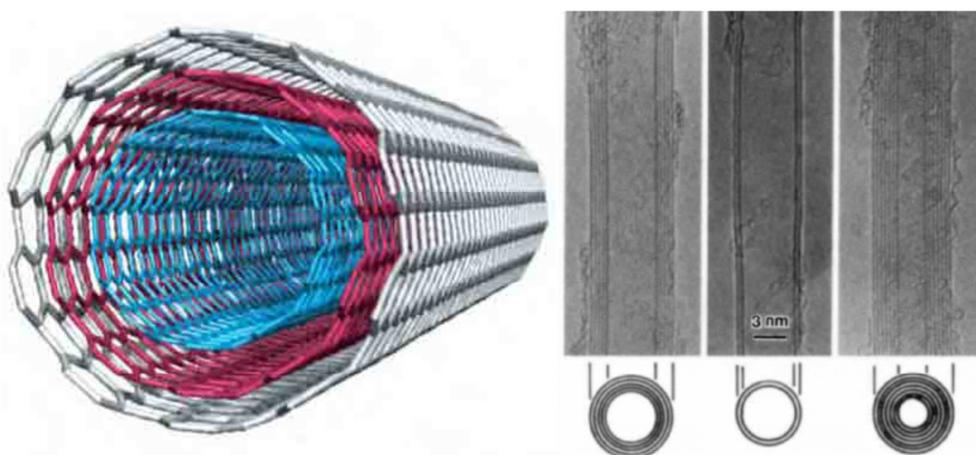


Figure IV-2. Représentation d'un MWCNT comprenant 3 feuillets concentriques (à gauche) et images MET (Microscopie Electronique à Transmission) de MWCNT à cinq, deux et sept feuillets (à droite).³

La structure à base de nanotubes concentriques est la plus communément acceptée. Cependant, d'autres structures ont été décrites. Une structure en forme de rouleau de parchemin (un seul feuillet enroulé sur lui-même) a par exemple été évoquée.⁸ La coexistence des deux types de structures a aussi été exposée.⁹ Les feuillets internes présentent une structure concentrique alors que les feuillets externes possèdent plutôt une structure de type parchemin. Mais une étude plus récente a montré que ces structures n'étaient observées que

⁸ Zhou O., Fleming R.M., Murphy D.W., Chen C.H., Haddon R.C., Ramirez A.P., Glarum S.H. *Science* **1994**, 263, 1744-1747.

⁹ Amelinckx S., Bernaerts D., Zhang X.B., Van Tendeloo G., Van Landuyt J. *Science* **1995**, 267, 1334-1338.

lors de l'utilisation de conditions expérimentales particulières et que sinon la structure de type « poupées russes » prévalait.¹⁰

b) Les nanotubes monoparois (ou monofeuillets)

Les nanotubes monoparois ont été découverts parallèlement par Iijima¹¹ et *al.* et Bethune¹² et *al.* deux ans après les multiparois. Ceux-ci sont en fait les nanotubes les plus simples puisqu'il s'agit d'un simple plan de graphène enroulé sur lui-même de manière à former un cylindre unique (Figure IV-3).

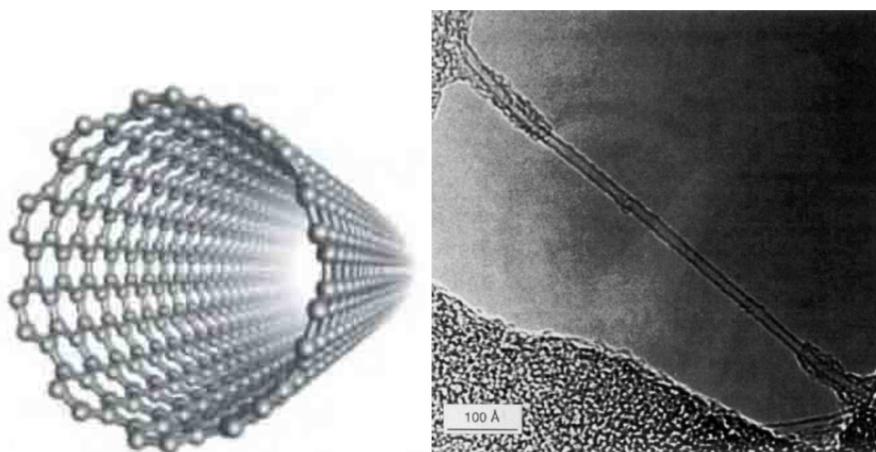


Figure IV-3. Schéma (à gauche) et image MET (à droite) d'un SWCNT.¹²

Pour les SWCNT, la notion de chiralité peut être évoquée, selon la façon dont le feuillet est entouré autour de son axe. Le diamètre du nanotube (D) et l'angle d'inclinaison par rapport à l'axe du nanotube (α) permettent de la caractériser. Hamada et *al.* ont décrit une notation où un couple (m,n) permet de caractériser les SWCNT et de les classer par chiralité (m représente le $m^{\text{ième}}$ hexagone depuis l'origine $(0,0)$ selon le vecteur m et n le $n^{\text{ième}}$ selon le vecteur n (Figure IV-4)).¹³ Cette chiralité est importante car elle permet de définir les propriétés des SWCNT et plus particulièrement leurs propriétés électriques. Les SWCNT conducteurs ou semi-conducteurs peuvent ainsi être différenciés.

¹⁰ Ruland W., Schaper A.K., Hou H., Greiner A. *Carbon* **2003**, 41, 423-427.

¹¹ Iijima S., Ichihashi T. *Nature* **1993**, 363, 603-605.

¹² Bethune D.S., Klang C.H., de Vries M.S., Gorman G., Savoy R., Vazquez J., Beyers R. *Nature* **1993**, 363, 605-607.

¹³ Hamada N., Sawada S., Oshiyama S. *Phys. Rev. Lett.* **1992**, 68, 1579-1581.

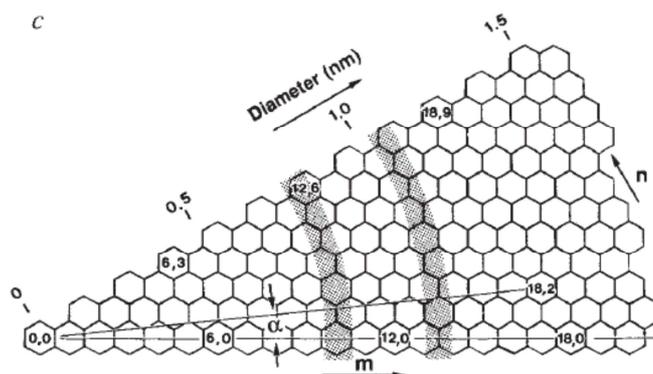


Figure IV-4. Représentation schématique d'un CNT selon la notation d'Hamada.¹¹

2. Propriétés des nanotubes

De nombreuses études ont montré que les nanotubes de carbone en dépit de leur taille nanométrique présentaient de nombreuses propriétés intéressantes. Leurs propriétés mécaniques, celles que nous utiliserons le plus, peuvent, en particulier, être décrites mais leurs propriétés thermiques et électroniques seront aussi brièvement exposées.

a) Propriétés mécaniques

Depuis leur découverte, il a toujours été supposé que les nanotubes de carbone pouvaient avoir des propriétés mécaniques remarquables par analogie avec le graphite et le diamant dont le module de Young (coefficient mesurant l'élasticité d'une substance) est très important ($E \approx 1$ TPa).

C'est pourquoi, rapidement, de nombreuses études ont été menées afin de déterminer leur module de Young. Que ce soit à l'aide de modélisations¹⁴ ($E = 0,97$ TPa pour les SWCNT et $E = 1,1$ TPa pour les MWCNT), ou par la voie d'expériences ($E = 1,25$ TPa pour les SWCNT en mesurant leurs vibrations sous MET¹⁵ et $E = 1,28$ TPa pour les MWCNT en mesurant la force latérale à différentes positions lors de la courbure du MWCNT à l'aide d'une pointe AFM¹⁶ (Figure IV-5)), la valeur trouvée est effectivement très proche de celles du graphite ou du diamant.

¹⁴ Lu J.P. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 79, 1297-1300.

¹⁵ Krishnan A., Dujardin E., Ebbesen T.W., Yoanilos P.N., Treacy M.M.J. *Phys. Rev. B* **1998**, 58, 14013-14019.

¹⁶ Wong E.W., Sheehan P.E., Lieber C.M. *Science* **1997**, 277, 1971-1975.

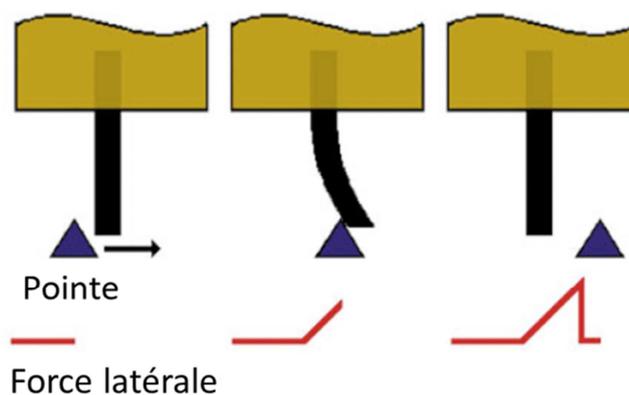


Figure IV-5. Représentation du déplacement d'un CNT à l'aide d'une pointe AFM pour déterminer son module de Young.¹⁶

Cependant, malgré ce module de Young exceptionnel, il a aussi rapidement été mis en évidence quelques inconvénients. Par exemple, lors de la mesure expérimentale du module de Young pour des cordes de SWCNT par extension sous AFM, une forte diminution de celui-ci est observée.¹⁷ Cette diminution peut être expliquée par les faibles interactions entre les différents nanotubes composant la corde.¹⁸ De plus, il a été montré par modélisation que même si la présence de petits défauts n'avait que peu d'influence sur le module de Young du nanotube (diminution de 3% pour une vacance simple)¹⁹, de plus gros défauts pouvaient causer une forte diminution du module de Young.^{19,20} Mais, il a aussi été mis en évidence que les nanotubes présentaient une capacité à s'auto-réparer par une optimisation de leur structure atomique.²¹

Malgré ces inconvénients, les nanotubes ont quand même gardé un grand intérêt pour de nombreuses applications grâce à d'autres de leurs propriétés. Ainsi l'excellente résistance des nanotubes leur permet de subir de fortes déformations sans montrer de signes de fragilité, de plasticité ou de réarrangements atomiques (Figure IV-6).^{5,22}

¹⁷ Yu M.-F., Files B.S., Arepalli S., Ruoff R.S. *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *84*, 5552-5555.

¹⁸ Salvétat J.-P., Briggs G.A.D., Bonard J.-M., Bacsá R.R., Kulik A.J., Stöckli T., Burnham N.A., Forró L. *Phys. Rev. Lett.* **1999**, *82*, 944-947.

¹⁹ Sammalkorpi M., Krasheninnikov A., Kuronen A., Nordlund K., Kaski K. *Phys. Rev B* **2004**, *70*, 245416, 1-8.

²⁰ Borders T.L., Fonseca A.F., Zhang H., Cho K., Rusinko A. III *J. Chem. Inf. Model.* **2013**, *53*, 773-782.

²¹ Kis A., Jensen K., Aloni S., Mickelson W., Zettl A. *Phys. Rev. Lett.* **2006**, *97*, 025501, 1-4.

²² Avouris P., Hertel T., Martel R., Schmidt T., Shea H.R., Walkup R.E. *Appl. Surf. Sci.* **1999**, *141*, 201-209.

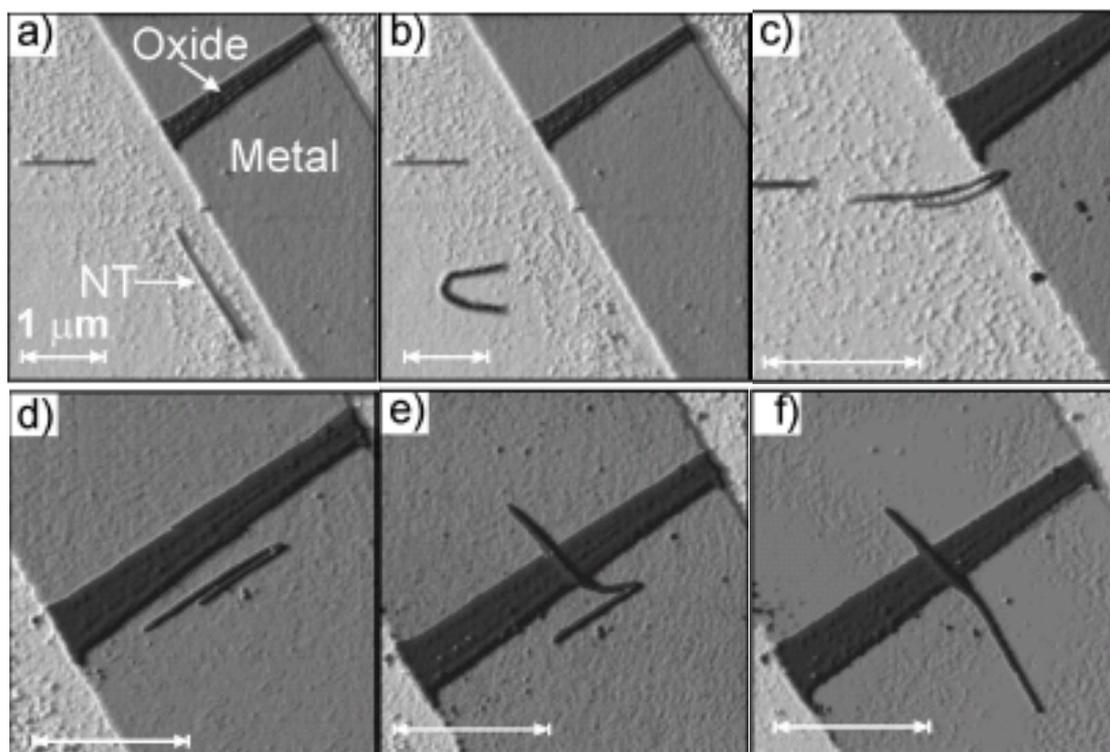


Figure IV-6. Schéma d'une nanomanipulation d'un CNT par AFM (échelle : 1 μm).²²

Malgré la grande importance que peuvent avoir l'existence de défaut sur les nanotubes ou la chute du module d'Young, et principalement en raison de leur forte résistance à la déformation, les nanotubes restent des candidats de choix pour une utilisation dans des matériaux composites²³ ou comme sondes AFM.²⁴

b) Propriétés thermiques

Les nanotubes de carbone sont connus pour être d'excellents conducteurs thermiques. Leurs propriétés thermiques sont directement reliées à leur structure unique et leur petite taille.

La conductivité thermique montre une dépendance vis-à-vis de la température. Partant d'une faible valeur à basse température, elle peut atteindre un maximum de $3000 \text{ W.K}^{-1}.\text{m}^{-1}$ pour les MWCNT (Figure IV-7)⁶ et $3500 \text{ W.K}^{-1}.\text{m}^{-1}$ pour les SWCNT⁷ à température ambiante. A plus haute température, une décroissance de celle-ci est observée. Une

²³ Hu Y., Jang I., Sinnott S.B. *Compos. Sci. Technol.* **2003**, 63, 1663-1669.

²⁴ Marsaudon S. *Imaging & Microscopy* **2013**, 30-33.

augmentation de celle-ci, en fonction de la longueur du nanotube, peut aussi être notée.⁷ Cependant, une forte baisse de la conductivité thermique est constatée dans le cas d'un faisceau de nanotubes. En effet, des jonctions résistives vont avoir lieu entre les différents nanotubes.⁶ La conductivité thermique peut, par exemple, descendre jusqu'à environ $200 \text{ W.K}^{-1}.\text{m}^{-1}$ pour un faisceau de SWCNT.²⁵

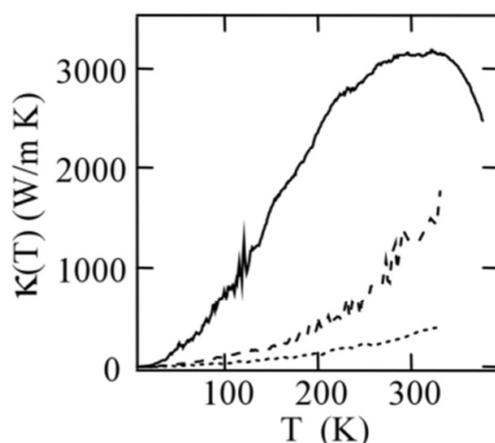


Figure IV-7. Evolution de la conductivité thermique, en fonction de la température (trait plein : MWCNT isolé ; tiret : faisceau de MWCNT ($d = 80 \text{ nm}$) ; point : faisceau de MWCNT ($d = 200 \text{ nm}$)).⁶

En raison de leurs excellentes propriétés thermiques, les nanotubes sont en principe des candidats idéaux pour la dissipation de chaleur dans des dispositifs de refroidissement en microélectronique. Malheureusement, la fréquente présence de défauts dans les nanotubes conduit à une diminution de la conductivité thermique et donc de leur potentiel en tant que dispositifs de refroidissement.²⁶ Cependant, celui-ci reste meilleur sous pression ou en présence d'eau qu'à pression ambiante.

c) Propriétés électroniques

Les propriétés électroniques des nanotubes de carbone dépendent fortement de leur diamètre, du nombre de feuillets concentriques (pour les MWCNT) et de leur chiralité (uniquement pour les SWCNT). En effet, la chiralité, par exemple, va déterminer si un nanotube va avoir un comportement semi-conducteur ou métallique. Pour qu'un nanotube soit métallique, il faut que $2n + m$ soit un multiple de 3 (n et m sont les nombres permettant de caractériser le nanotube (voir 1.b)).⁴ Ceux de type chaise, définis par (n, n) , sont tous

²⁵ Hone J., Llaguno M.C., Biercuk M.J., Johnson A.T., Batlogg B., Benes Z., Fischer J.E. *Appl. Phys. A.* **2002**, 74, 339-343.

²⁶ Pérez Paz A., Garcia-Lastra J.M., Markusen T., Sommer Thygesen K., Rubio A. *Eur. Phys. J. B.* **2013**, 86, 234, 1-14.

métalliques, alors que ceux de type zigzag sont métalliques, si n est un multiple de 3, dans le cas contraire, ils sont semi-conducteurs. Il y a donc 1/3 de nanotubes métalliques et 2/3 de semi-conducteurs (Figure IV-8).

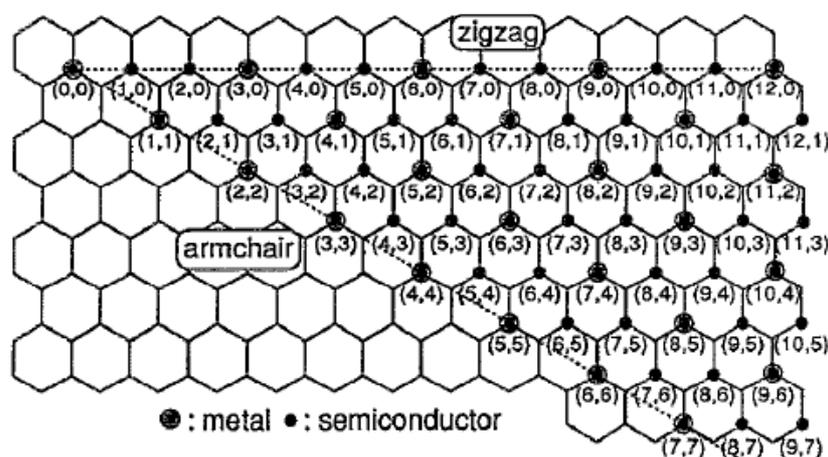


Figure IV-8. Répartition des nanotubes métalliques et semi-conducteurs.⁴

Les nanotubes métalliques présentent des propriétés électriques très intéressantes. En effet, par exemple, ils ont une résistivité de 0,03 - 0,1 m Ω .cm à 300 K²⁷. Celle-ci augmente linéairement avec la température et est relativement plus importante que celle des principaux métaux (17.10⁻⁴ m Ω .cm pour le cuivre, par exemple). Ils peuvent aussi porter des densités de courant très importantes (4.10⁹ A.cm⁻² pour les nanotubes²⁸ contre seulement environ 10⁶ A.cm⁻² pour les métaux usuels comme le cuivre).

D'autres facteurs peuvent faire varier les propriétés électroniques des nanotubes comme, par exemple, l'adsorption de molécules à leurs surfaces²⁹ ou l'application d'un champ électrique à proximité.³⁰

3. Méthodes de synthèse des nanotubes

Dès leur découverte, de nombreux efforts ont été faits pour développer de nouvelles techniques afin d'améliorer la synthèse des nanotubes. A l'origine, ils étaient synthétisés à l'aide d'un arc électrique appliqué dans un environnement rempli d'un gaz inerte, en présence d'électrodes en graphite. Cette méthode avait l'avantage de produire des quantités importantes

²⁷ Fischer J.E., Dai H., Thess A., Lee R., Hanjani N.M., Dehaas D.L., Smalley R.E. *Phys. Rev. B.* **1997**, 55, R4921-R4924.

²⁸ Hong S., Myung S. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, 2, 207-208.

²⁹ Larciprete R., Goldoni A., Lizzit S., Petaccia L. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, 248, 8-13.

³⁰ Yamanaka A., Okada S. *Appl. Phys. Express* **2012**, 5, 095101, 1-3.

de nanotubes, à moindre coût, mais aussi de nombreuses impuretés telles que du carbone amorphe.³¹ Au final le rendement est médiocre, de l'ordre de 25%.

Il a donc rapidement été nécessaire de développer de nouvelles techniques pour essayer d'avoir de meilleurs rendements et moins d'impuretés. L'ablation laser permet, par exemple, d'accéder à des nanotubes de haute qualité. Par contre, les rendements avec cette technique sont moins bons que ceux obtenus avec l'arc électrique. La technique par dépôt chimique en phase vapeur catalytique (CCVD) peut conduire à de plus grandes quantités de nanotubes.³² La décomposition à haute température (supérieure à 700°C) de liquide ou gaz hydrocarbonés (de l'acétylène par exemple) sur des particules catalytiques mène à des nanotubes. L'enjeu majeur est de contrôler précisément la position du catalyseur. La direction de croissance peut être également contrôlée en déposant le catalyseur dans un pore du substrat dont les bords fixeront la direction des nanotubes.³³

Ces différentes techniques, ainsi que la dismutation du monoxyde de carbone sous haute pression (HiPCO), vont être détaillées ici afin d'en présenter les avantages et les inconvénients. Selon le type de nanotubes désirés (SWCNT ou MWCNT) ou l'utilisation visée, certaines techniques peuvent être préférables à d'autres.

a) *Méthode de l'arc électrique*

Cette technique était tout d'abord utilisée pour la synthèse de fullerènes en grande quantité³⁴, jusqu'à ce qu'Iijima découvre qu'elle pouvait aussi être utilisée pour produire des MWCNT.³

C'est une technique de synthèse à haute température. Elle consiste à créer un plasma chaud (environ 4000 K au centre) entre deux électrodes en graphite situées dans un cylindre sous pression d'hélium (500 Torr environ).³¹ L'anode va être progressivement sublimée, les espèces carbonées vont se recombinaisonner et les produits formés se déposer sur les parois de la cathode. Plusieurs paramètres sont importants pour contrôler la qualité et la quantité des nanotubes formés (température dans l'enceinte, espacement, tension et densité de courant entre les électrodes par exemple).

Pour obtenir des SWCNT, il est nécessaire de rajouter un catalyseur métallique au sein de l'anode, qui va se sublimer avec le graphite au moment de la création du plasma pour

³¹ Ajayan P.M., Ebbesen T.W. *Rep. Prog. Phys.* **1997**, 60, (p. 1034-1035) 1025-1062.

³² Jourdain V., Bichara C. *Carbon* **2013**, 58, 2-39.

³³ Li W.Z., Xie S.S., Qian L.X., Chang B.H., Zou B.S., Zhou W.Y., Zhao R.A., Wang G. *Science* **1996**, 274, 1701-1703.

³⁴ Krätschmer W., Lamb L.D., Fostiropoulos K., Huffman D.R. *Nature* **1990**, 347, 354-358.

permettre aux nanotubes de croître (Figure IV-9).^{12,35} Les principaux métaux utilisés sont le Ni, le Co et le Pt.

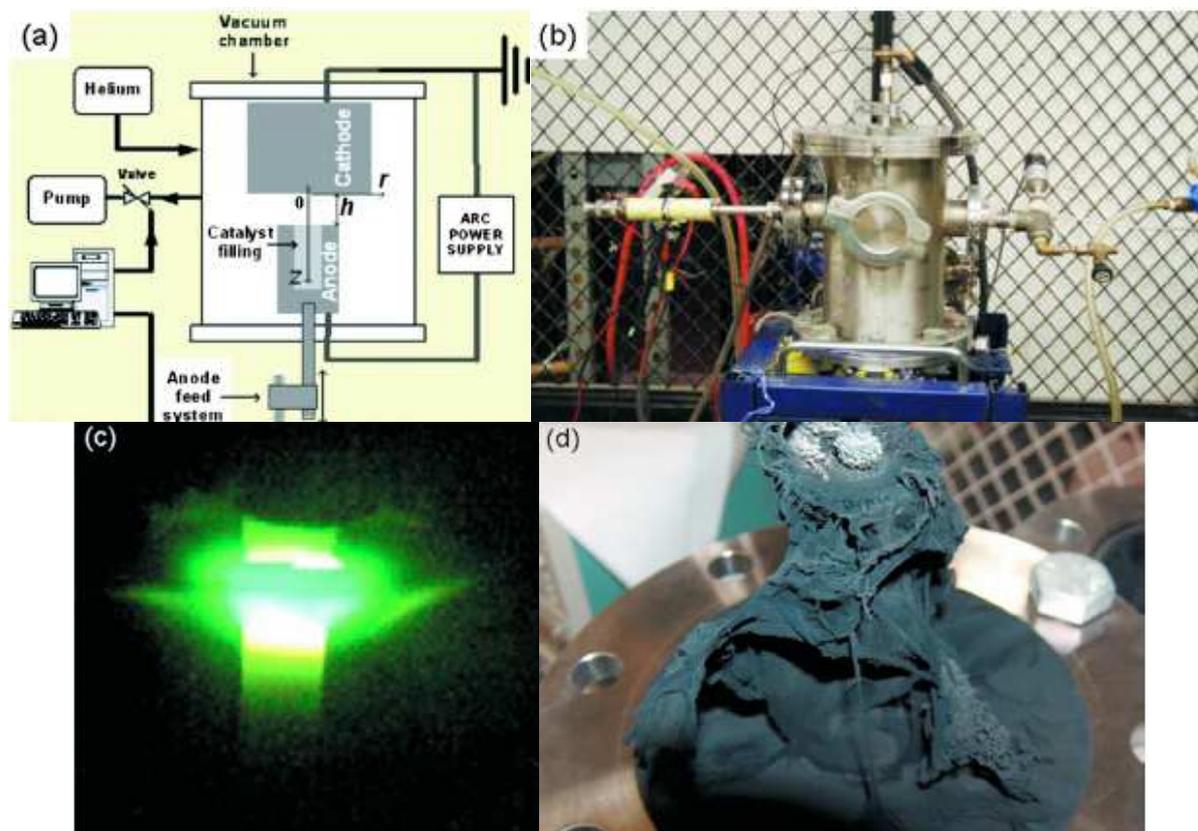


Figure IV-9. a) Schéma d'un dispositif de synthèse de nanotubes par arc électrique ; b) photographie d'une installation expérimentale ; c) photographie d'un arc électrique ; d) photographie d'un réseau de nanotubes obtenu.³⁵

En 1997, un nouveau catalyseur à base d'un mélange de nickel et d'yttrium (Ni/Y) permet d'obtenir de meilleurs rendements (70 à 90 %) et donc d'ouvrir la voie à la production de masse de SWCNT.³⁶ De plus, cette technique donne les nanotubes avec les meilleures propriétés (défauts plus petits, flexibilité et solidité plus importante). Mais elle n'est pas toujours privilégiée, en raison de difficultés de réglage et de contrôle.

C'est pourquoi de nombreuses recherches ont été menées pour contrôler de manière plus précise l'aspect des nanotubes obtenus. Par exemple, l'application d'un champ magnétique non-uniforme (jusqu'à 2 kG) permet de produire de nombreux SWCNT de faible diamètre (environ 1 nm).³⁷ Avec le champ magnétique, il est aussi possible de jouer sur la chiralité des nanotubes obtenus. L'utilisation d'un champ magnétique laisse donc entrevoir la

³⁵ Keidar M, Shashurin A., Volotskova O., Raitsev Y., Beilis I.I. *Phys. Plasmas* **2010**, *17*, 057101, 1-9.

³⁶ Journet C., Maser W.K., Bernier P., Loiseau A., Lamy de la Chapelle M., Lefrant S., Deniard P., Lee R., Fischer J.E. *Nature* **1997**, *388*, 756-758.

³⁷ Volotskova O., Fagan J.A., Huh J.Y., Phelan Jr F.R., Shashurin A., Keidar M. *ACS Nano* **2010**, *4*, 5187-5192.

possibilité de régler de façon plus précise le plasma et donc de pouvoir obtenir de nombreux types de nanotubes avec des propriétés différentes.

b) Méthode par ablation laser

La synthèse par ablation laser est basée sur l'évaporation de graphite placé dans un four à 1200°C, par irradiation à l'aide d'un laser (Figure IV-10). Comme dans le cadre de la synthèse par arc électrique, il est nécessaire d'ajouter un catalyseur. En présence d'un mélange de Co et de Ni environ 50% du carbone vaporisé est transformé en SWCNT.³⁸

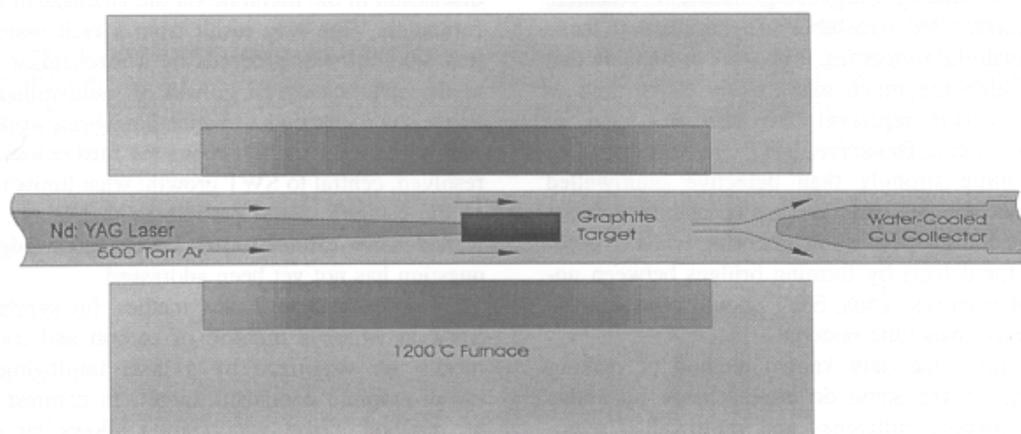


Figure IV-10. Schéma d'un appareil de synthèse de nanotubes par ablation laser.³⁸

L'utilisation d'un laser CO_2 continu émettant à 10,6 μm conduit, sous pression d'argon (400 Torr), à des SWCNT, d'un diamètre moyen de 1,4 nm et regroupés par faisceau d'une vingtaine de SWCNT, à température ambiante (Figure IV-11).³⁹

³⁸ Guo T., Nikolaev P., Thess A., Colbert D.T., Smalley R.E. *Chem. Phys. Lett.* **1995**, 243, 49-54.

³⁹ Maser W.K., Muñoz E., Benito A.M., Martínez M.T., de la Fuente G.F., Maniette Y., Anglaret E., Sauvajol J-L. *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 292, 587-593.

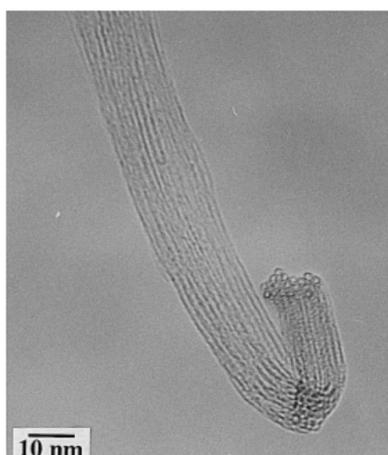


Figure IV-11. Image TEM d'un faisceau de SWCNT obtenu par ablation laser.³⁹

Bien que ce procédé soit principalement utilisé pour la synthèse de SWCNT, il est aussi possible d'obtenir des MWCNT avec la vaporisation de graphite contenant du carbure de bore (B_4C) à température ambiante sous atmosphère d'argon⁴⁰ ou de néon ou d'hélium (MWCNT plus fins obtenus avec un moins bon rendement).⁴¹

c) Méthode par décomposition catalytique du monoxyde de carbone : HiPCO

Les deux méthodes précédentes produisent des nanotubes de bonne qualité, mais les quantités obtenues sont trop faibles en vue d'une production industrielle (de l'ordre du mg au g). Pour certaines applications, il peut être intéressant de disposer de quantités beaucoup plus importantes de nanotubes. Cependant, ces techniques ne sont pas facilement adaptables pour une synthèse à grande échelle.

Dans le but de produire des nanotubes en grande quantité, une nouvelle technique a été développée. Elle présente l'avantage de pouvoir fonctionner de manière continue et est inspirée de la synthèse de nanotubes par décomposition du monoxyde de carbone (CO), à haute température, en présence d'un catalyseur métallique.⁴² Comme elle est réalisée sous haute pression de CO, le terme HiPCO (*High Pressure dismutation of CO*) est employé. A haute température et en présence d'un catalyseur à base de fer, il est possible d'obtenir, avec

⁴⁰ Kokai F., Nozaki I., Okada T., Koshio A., Kuzumaki T. *Carbon* **2011**, 49, 1173-1181.

⁴¹ Kokai F., Nozaki I., Koshio A. *Diam. Relat. Mater.* **2012**, 24, 25-28.

⁴² Dai H., Rinzler A.G., Nikolaev P., Thess A., Colbert D.T., Smalley R.E. *Chem. Phys. Lett.* **1996**, 260, 471-475.

un rendement élevé, de fins SWCNT.⁴³ Contrairement à ce qui peut être parfois observé avec les autres techniques, ces nanotubes ne présentent pas de surcouche de carbone amorphe. Leur diamètre diminue lorsque la pression de CO augmente. Un changement de catalyseur permet de travailler à pression de CO et température plus faible (Figure IV-12).⁴⁴

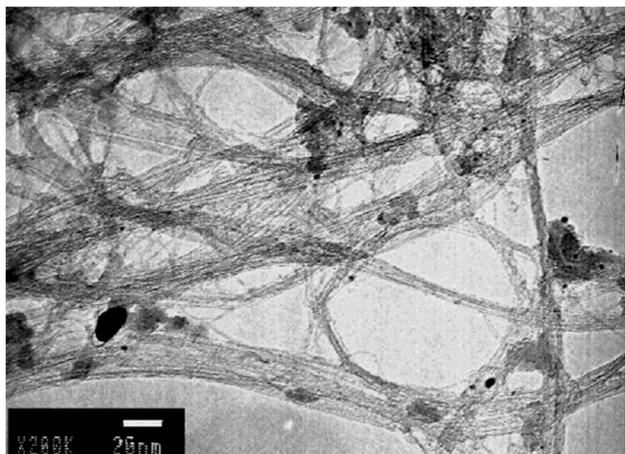


Figure IV-12. Image TEM des nanotubes obtenus par HiPCO à 850°C avec un mélange de Co et Mo comme catalyseur (ratio molaire 1:3) et un temps de réaction de 2 h.⁴⁴

d) *Méthode par dépôt chimique en phase vapeur catalytique*

En raison de son haut degré de contrôle et de sa facile extensibilité, la production de nanotubes par CCVD est, à l'heure actuelle, la méthode la plus étudiée et utilisée. Elle consiste en une conversion catalytique d'un précurseur carboné en nanotubes sur des particules ou un film de catalyseur (Figure IV-13).⁴⁵ Le plus souvent les catalyseurs sont à base de fer, cobalt ou nickel. Parfois, d'autres métaux peuvent être utilisés comme le palladium, le manganèse ou le titane... Il a été montré que des mélanges binaires de catalyseurs étaient souvent plus actifs qu'un catalyseur seul.⁴⁶ Les sources carbonées les plus fréquemment employées sont l'éthylène, l'acétylène, le méthane, le monoxyde de carbone ou l'éthanol.

⁴³ Nikolaev P., Bronikowski M.J., Bradley R.K., Rohmund F., Colbert D.T., Smith K.A., Smalley R.E. *Chem. Phys. Lett.* **1999**, 313, 91-97.

⁴⁴ Alvarez W.E., Pompeo F., Herrera J.E., Balzano L., Resasco D.E. *Chem. Mater.* **2002**, 14, 1853-1858.

⁴⁵ Endo M., Takeuchi K., Igarashi S., Kobori K., Shiraishi M., Kroto H.W. *J. Phys. Chem. Solids* **1993**, 54, 1841-1848.

⁴⁶ Chiang W.H., Sankaran R.M. *Nat. Mat.* **2009**, 8, 882-886.

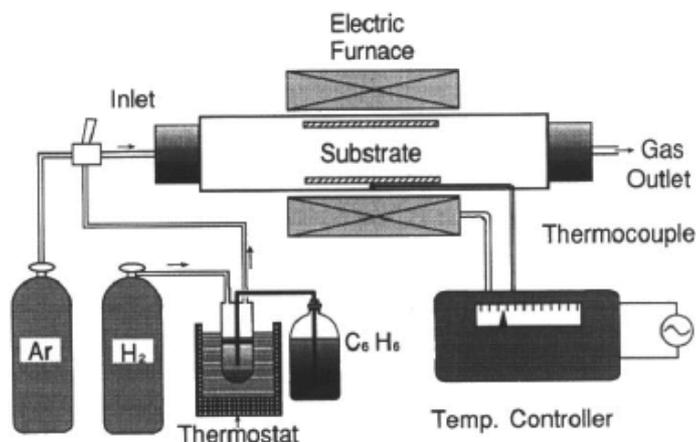


Figure IV-13. Schéma de l'appareillage utilisé pour produire des nanotubes par CCVD.⁴⁵

Lors de ce procédé de fabrication, les propriétés structurales des CNT produits (diamètre, chiralité, proportion de défauts, longueur et rendement en CNT par nanoparticules...) dépendent grandement des conditions expérimentales (nature, taille et densité du catalyseur, précurseurs carbonés utilisés, température et temps de synthèse...). C'est pourquoi, de très nombreuses études ont été menées pour connaître plus précisément l'influence de ces conditions expérimentales sur les propriétés des nanotubes.

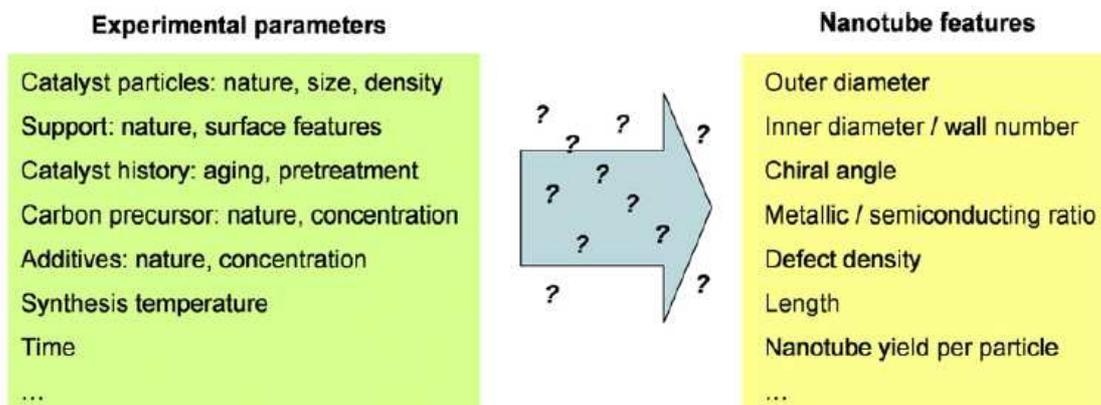


Figure IV-14. Paramètres expérimentaux et propriétés structurales des CNT pouvant varier lors de la synthèse par CCVD.³²

i. Influence de la taille et de la nature des particules de catalyseur

Une corrélation entre la taille des nanoparticules de catalyseur utilisées et le diamètre des nanotubes obtenus, est souvent observée. Plus celles-ci sont grandes, plus les CNT vont

avoir un diamètre important.⁴⁷ En effet, les particules vont prendre une forme de poire qui va dicter le diamètre du nanotube (Figure IV-15).⁴⁸ La même corrélation est observée entre le nombre de feuillets des MWCNT et la taille des nanoparticules. Plus ces dernières vont être larges plus ceux-ci auront de feuillets.⁴⁷

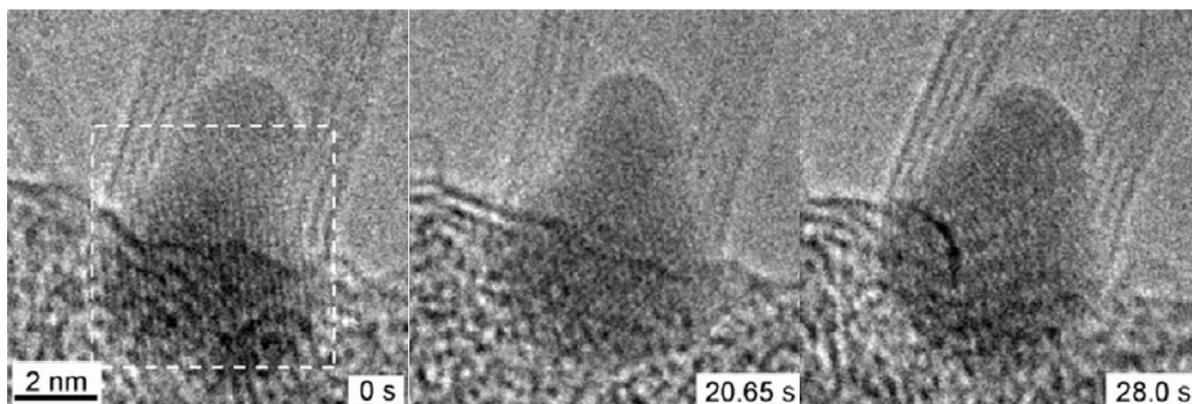


Figure IV-15. Images MET in situ montrant le contrôle du diamètre d'un MWCNT par la taille de la nanoparticule de catalyseur.⁴⁸

La taille des nanoparticules semble aussi avoir une influence sur la chiralité des nanotubes. En effet, il a été remarqué une plus grande proportion de nanotubes de type chaise lorsque le diamètre est faible (inférieur à 3 nm).⁴⁹ La nature du catalyseur, aussi, joue un rôle sur la proportion de nanotubes semi-conducteurs obtenus. En effet, par exemple, une variation du ratio semi-conducteur/métallique, est observée lors de la synthèse de nanotubes à l'aide de différentes proportions d'un catalyseur à base de nickel et de fer.⁵⁰

ii. Influence du précurseur carboné utilisé

Contrairement à l'influence du catalyseur utilisé, il n'y a pas de consensus clair sur l'influence du précurseur carboné utilisé et de ses conditions d'utilisations sur le diamètre des nanotubes. En effet, suivant les études, des nanotubes de faibles diamètres vont être obtenus à faible débit en précurseur carboné⁵¹ ou avec un débit élevé.⁵²

⁴⁷ Schäffel F., Rümmeli M.H., Kramberger C., Queitsch U., Mohn E., Kaltoven R., Pichler T., Büchner B., Rellinghaus B., Schultz L. *Phys. Status Solidi A* **2008**, 205, 1382-1385.

⁴⁸ Yoshida H., Shimizu T., Uchiyama T., Kohno H., Homma Y., Takeda S. *Nano Lett.* **2009**, 9, 3810-3815.

⁴⁹ Hirahara K., Kociak M., Bandow S., Nakahira T., Itoh K., Saito Y., Iijima S. *Phys. Rev. B* **2006**, 73, 195420, 1-11.

⁵⁰ Chiang W-H., Sakr M., Gao X.P.A., Sankaran R.M. *ACS Nano* **2009**, 3, 4023-4032.

⁵¹ Lu C., Liu J. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 20254-20257.

⁵² Wang B., Wei L., Yao L., Li L-J., Yang Y., Chen Y. *J. Phys. Chem. C* **2007**, 111, 14612-14616.

Le précurseur carboné utilisé peut aussi faire varier la chiralité des nanotubes obtenus. Par exemple, le monoxyde de carbone va permettre d'obtenir de façon préférentielle des SWCNT d'une certaine chiralité.⁵²

D'une manière générale, les nanotubes obtenus comportent plus de défauts lorsque la pression de précurseur carboné insérée dans l'enceinte est plus importante.⁵³

Le plus souvent, seulement environ 10% des particules de catalyseurs mènent à des CNT, les autres étant inactives. Cependant, il a été observé que l'ajout d'un certain pourcentage de composés contenant de l'oxygène (CO₂, acétone...) ou de vapeur d'eau, dans le précurseur carboné, augmente sensiblement la proportion de nanoparticules menant à des CNT (jusqu'à plus de 80%).⁵⁴

iii. Influence de la température de synthèse

Même si dans le cas des SWCNT, leur diamètre augmente avec la température de synthèse⁵⁵, aucun accord général n'est observé en ce qui concerne le diamètre et le nombre de feuillets obtenus dans le cas de MWCNT. Ce manque de consensus sur l'influence de la température de synthèse peut être expliqué par la grande diversité de systèmes catalytiques et de conditions expérimentales utilisées.

Contrairement au précurseur carboné et au catalyseur utilisé, la température ne semble pas avoir d'influence sur la chiralité des nanotubes. En effet, une augmentation de la température de synthèse va avoir pour effet une augmentation du diamètre des nanotubes, comme vu précédemment, mais sans changement de leur chiralité (pour les SWCNT).⁵⁶

D'autre part, l'augmentation de la température de synthèse va permettre d'obtenir des nanotubes avec moins de défauts. Cependant, il semble y avoir une température au-dessus de laquelle le nombre de défauts va augmenter.⁵³ Cela peut être expliqué par le dépôt de carbone pyrolytique activé à haute température.

Afin de garder une vitesse de croissance suffisante pour les nanotubes, il ne faut pas utiliser une température trop faible.⁵⁷ En effet, à basse température les particules de catalyseur risquent d'être inactivées, par encapsulation dans une couche carbonée désordonnée.

⁵³ Picher M., Navas H., Arenal R., Quesnel E., Anglaret E., Jourdain V. *Carbon* **2012**, *50*, 2407-2416.

⁵⁴ Futuba D.N., Hata K., Namai T., Yamaka T., Mizuno K., Hayamizu Y., Yumura M., Iijima S. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 8035-8038.

⁵⁵ Li N., Wang X., Ren F., Haller G.F., Pfefferle L.D. *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 10070-10078.

⁵⁶ Lolli G., Zhang L., Balzano L., Sakulchaicharoen N., Tan Y., Resasco D.E. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2108-2115.

⁵⁷ Marchand M., Journet C., Guillot D., Benoit J.M., Yakobson B.I., Purcell S.T. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 2961-2966.

Les différents exemples présentés au cours de cette partie montrent combien la synthèse de CNT par CCVD est un procédé compliqué. En effet, de nombreux paramètres peuvent varier et ceux-ci ont une grande influence sur la qualité et les propriétés des CNT obtenus. De plus, la grande diversité de systèmes expérimentaux utilisés ne facilite pas la compréhension du mécanisme de croissance. Il pourrait être utile de déterminer des systèmes modèles. En tout cas, bien que cette technique soit la plus utilisée et la plus étudiée, beaucoup de travail s'avère nécessaire pour la comprendre et la maîtriser parfaitement.

4. Les nanotubes de carbone comme sondes pour l'AFM

Dès 1996, il a été montré l'intérêt des nanotubes comme sondes idéales pour l'AFM, de par leurs tailles nanométriques, leurs géométries cylindriques et leurs propriétés mécaniques. Cependant nous verrons aussi que leur utilisation en tant que pointes AFM ne s'est pas développé aussi rapidement que prévue, cela principalement pour deux raisons. En effet, une fois fixé sur la pointe, les propriétés mécaniques des nanotubes se sont révélées plus complexes qu'attendues. De plus, il a longtemps été difficile de contrôler précisément la fixation du nanotube sur la pointe.

a) Avantages des nanotubes de carbone en tant que pointes AFM

Certaines des propriétés des nanotubes de carbone, telles que leur haut rapport d'aspect, ont rapidement donné un très grand intérêt à leur utilisation en tant que sondes pour l'AFM. En effet, leur diamètre de l'ordre du nanomètre doit permettre d'avoir une meilleure résolution latérale et de pouvoir imager de manière plus précise des surfaces comportant des mouvements de terrain assez abrupts. D'autres propriétés confirment cet intérêt. C'est, par exemple, le cas de leur habilité à résister élastiquement à de fortes forces, leur forte résistance à l'usure et leur capacité à être fonctionnalisés chimiquement.

i. Leurs tailles nanométriques et leurs hauts rapports d'aspect

En raison du fin diamètre de leurs apex (pouvant descendre jusqu'à 1 nm pour les plus fins) et de leurs hauts rapports d'aspect, les nanotubes de carbone ont rapidement présenté un intérêt pour l'imagerie de nombreux types de surfaces et en particulier celles avec des bords

abrupts dont l'imagerie était difficile avec une pointe AFM classique.⁵⁸ La Figure IV-16 met bien en évidence la meilleure résolution obtenue avec un MWCNT lors de l'imagerie d'une surface présentant des bords abrupts. En effet, en raison de son fin diamètre celui-ci va mieux suivre la surface et passer dans les trous qu'une pointe AFM classique.

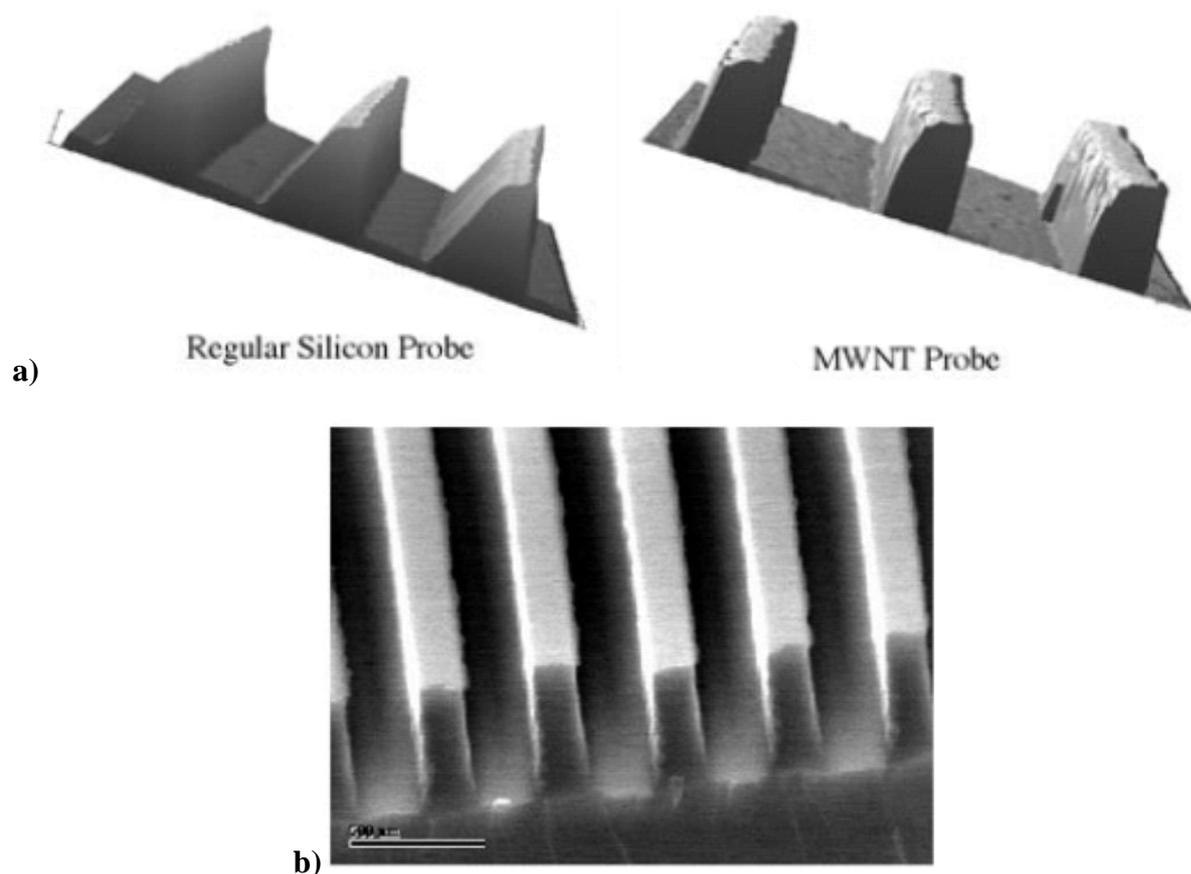


Figure IV-16. a) Reconstruction en 3D d'une image AFM d'une surface alternant des lignes et des creux avec une pointe AFM classique (à gauche) et une pointe AFM munie d'un MWCNT (à droite) ; b) Image MEB de la même surface.⁵⁸

Par contre, les SWCNT ayant une grande flexibilité, il ne faut pas qu'ils dépassent 100 nm de long pour obtenir des images avec une bonne résolution. Il peut donc être parfois nécessaire de les raccourcir. Leurs propriétés électriques peuvent être utilisées dans ce but. En effet, l'application d'un faible courant entre une pointe munie d'un nanotube et une surface de platine permet de raccourcir le nanotube.⁵⁹ L'effet Joule créé va provoquer une oxydation du nanotube et un raccourcissement de celui-ci. L'utilisation de SWCNT raccourcis permet

⁵⁸ Nguyen C.V., Chao K-J., Stevens R.M.D., Delzeit L., Cassell A., Han J., Meyyappan M. *Nanotechnology* **2001**, *12*, 363-367.

⁵⁹ Austin A.J., Nguyen C.V., Ngo Q. *J. Appl. Phys.* **2006**, *99*, 114304, 1-9.

d'imager avec une très bonne résolution des protéines A adsorbées sur un nanotube (Figure IV-17) (il est possible de distinguer deux protéines distantes de seulement 5 nm).⁶⁰

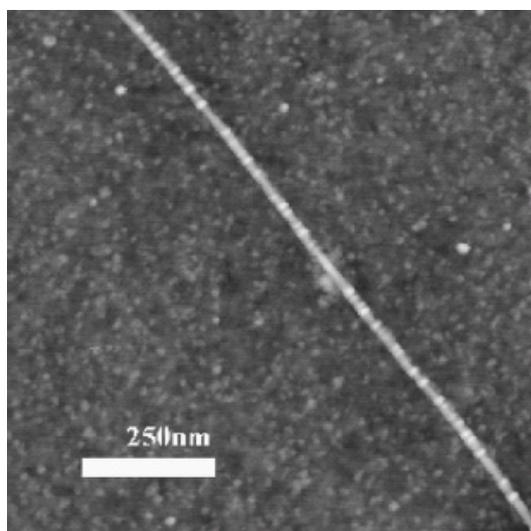


Figure IV-17. Image AFM en mode tapping de protéines A adsorbées sur un nanotube avec une pointe AFM munie d'un SWCNT.⁶⁰

ii. Grande résistance mécanique

Une autre propriété intéressante des nanotubes, en vue de leur utilisation comme pointe AFM, est leur grande résistance mécanique. En effet, ceux-ci peuvent subir d'importantes déformations mécaniques sans que cela les endommage.⁵ Cette grande résistance à la déformation, leur donne un grand avantage par rapport aux pointes AFM, en silicium, classiques. En effet, même après de longs temps d'utilisation en continu, une pointe AFM munie d'un nanotube permet toujours d'obtenir des images de même qualité ce qui n'est pas le cas pour les pointes classiques qui ont tendance à s'abîmer.⁵⁸

⁶⁰ Yenilmez E., Wang Q., Chen R.J., Wang D., Dai H. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 80, 2225-2227.

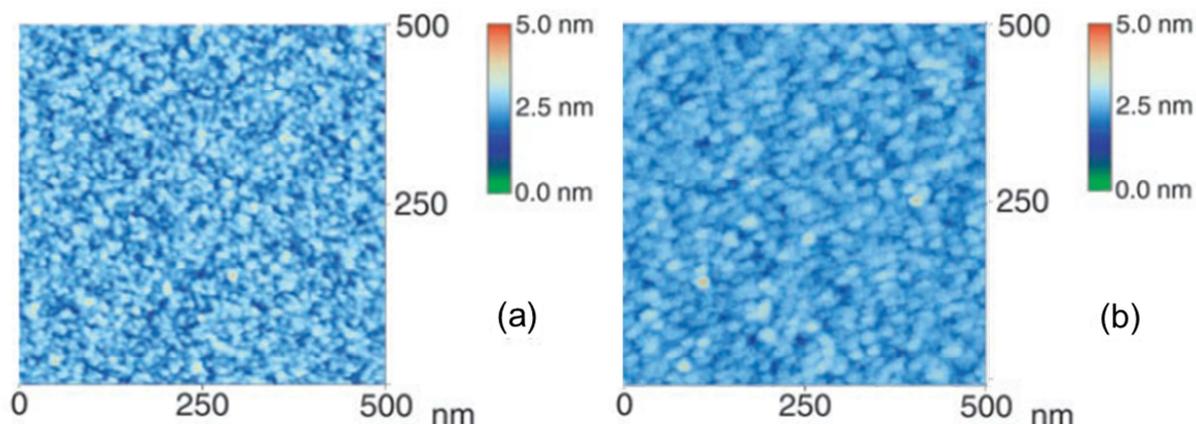


Figure IV-18. Images AFM d'une surface après 15 h d'imagerie en continu avec une pointe avec un MWCNT (a) et après 12 h d'imagerie en continu avec une pointe classique en silicium (b).⁵⁸

iii. Faible réactivité chimique

Lors de l'imagerie de surface avec des pointes AFM, en silicium, classiques, il arrive souvent que les pointes soient contaminées par des éléments venant de la surface (Figure IV-19).⁶¹ L'augmentation du rayon de courbure de la pointe qui en résulte a pour effet de diminuer la résolution de l'image obtenue. Il peut être utile de développer des techniques permettant de vérifier l'état de la pointe et de la nettoyer.

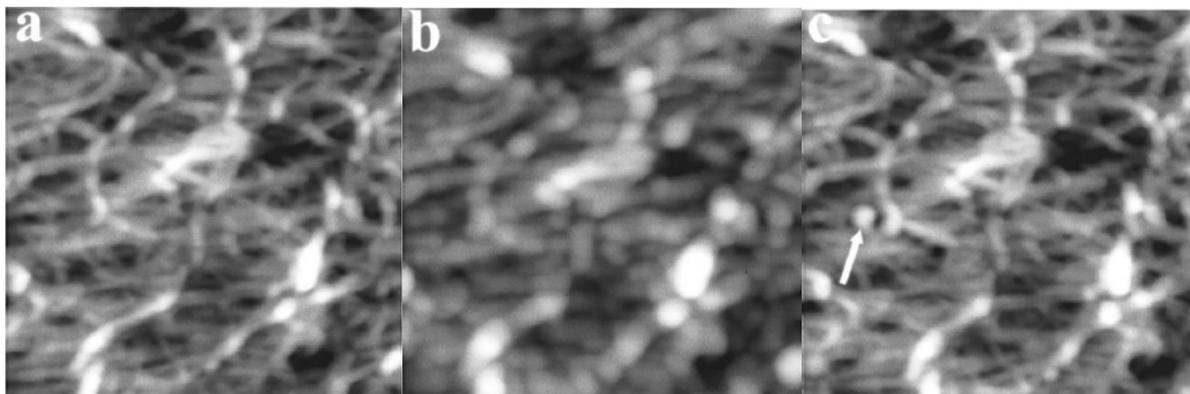


Figure IV-19. Images AFM d'une surface de polypropylène à orientation bi-axilale avec une pointe AFM propre (a) ; contaminée (b) ; et nettoyée (c) (la flèche représente le contaminant déposé sur la surface lors du nettoyage).⁶¹

Cependant, en raison de leur faible réactivité vis-à-vis des échantillons chimiques ou biologiques, les pointes AFM munies d'un nanotube présentent un grand avantage par rapport

⁶¹ Nie H-Y., Walzak M.J., McIntyre N.S. *Rev. Sci. Instrum.* **2002**, 73, 3831-3836.

aux pointes AFM classiques. En effet, il est possible d'imager de nombreux échantillons de compositions différentes avec une même pointe sans avoir d'effet de contamination.²⁴

b) Désavantages des nanotubes de carbone en tant que pointes AFM

Malgré les nombreux avantages évoqués précédemment et le grand intérêt qu'ils ont présenté dès le début, les nanotubes de carbone n'ont pas connu le développement espéré en tant que pointes AFM. En effet, une fois fixés sur la pointe, les nanotubes ont des propriétés mécaniques complexes pouvant être perturbées par une mauvaise fixation du nanotube sur la pointe (mauvaise orientation⁶²). Cela peut avoir pour effet de créer des instabilités mécaniques qui vont diminuer la qualité de l'image obtenue avec l'apparition d'artefacts (Figure IV-20).^{63,64}

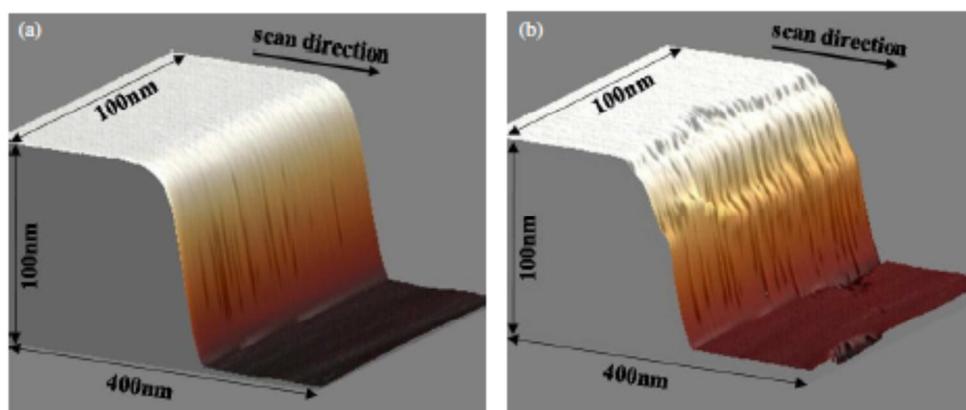


Figure IV-20. Reconstruction en 3D d'une image AFM d'une surface avec un ratio amplitude de consigne/amplitude libre de 91% (à gauche avec absence d'artefacts) et 73% (à droite avec présence de « divots artefacts »).⁶⁴

Cependant, le problème posé par les propriétés mécaniques des nanotubes fixés sur une pointe AFM est en passe d'être résolu. En effet, celles-ci peuvent être décrites par un modèle à deux composantes : d'une part une contribution due à l'élasticité et d'autre part une contribution à cause de l'adhésion due à l'échantillon.⁶⁵ Une comparaison entre ce modèle et les données enregistrées expérimentalement permet de vérifier qu'il est bien adapté pour les interactions entre la pointe munies d'un nanotube et la surface de l'échantillon (Figure IV-21).

⁶² Snow M.C., Campbell P.M., Novak J.P. *Appl. Phys. Lett.* **2002**, 80, 2002-2004.

⁶³ Akita S., Nishijima H., Nakayama Y. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **2000**, 33, 2673-2677.

⁶⁴ Strus M.C., Raman A., Han C-S., Nguyen C.V. *Nanotechnology* **2005**, 16, 2482-2492.

⁶⁵ Dietzel D., Marsaudon S., Aimé J-P., Nguyen C.V., Couturier G. *Phys Rev. B* **2005**, 72, 035445, 1-16.

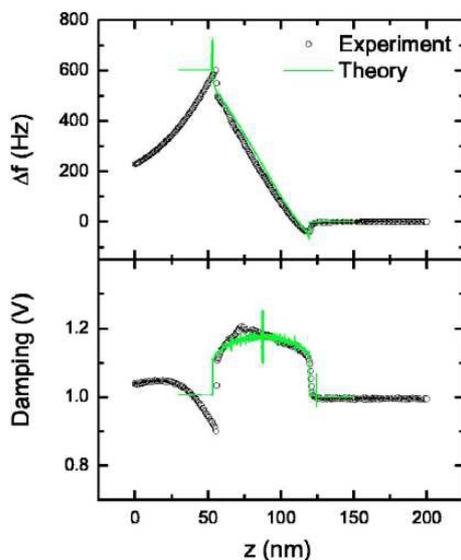


Figure IV-21. Comparaison entre les données enregistrées expérimentalement pour une courbe d'approche et un modèle théorique.⁶⁵

c) Techniques utilisées au Laboratoire (CBMN) pour fixer les nanotubes sur les pointes AFM

Afin de contrôler la fixation du nanotube sur la pointe AFM, deux procédés différents sont utilisés au Laboratoire (CBMN) suivant qu'il s'agisse de SWCNT ou de MWCNT.

La croissance des SWCNT sur des pointes AFM, est réalisée par CCVD assisté par filament chaud (HFCVD).⁶⁶ Pour cela, des SWCNT vont croître, sur l'apex de pointes AFM disposées sur un support chauffé à une température entre 750 et 850°C, par décomposition de méthane réalisée à l'aide d'un filament de tungstène placé 1 cm au-dessus des pointes et chauffé entre 1900 et 2100°C. Après la synthèse, les pointes seront observées au MEB pour contrôler l'orientation des SWCNT.

Les MWCNT, quant à eux, sont aussi synthétisés par CCVD. Un procédé développé au sein du centre Ames de la NASA est utilisé.⁶⁷ Une solution de catalyseur à base de Fer III est déposée sur un fil de platine/iridium qui va être placé dans un four à 750°C sous courant d'éthylène. Une fois la croissance des MWCNT sur le fil effectuée, ces derniers vont être soudés sur des pointes AFM sous microscope optique. La soudure sera réalisée par la fusion, à l'aide d'un courant électrique, d'une fine couche de nickel préalablement déposée sur les pointes AFM. Les pointes seront elles aussi contrôlées par MEB.

⁶⁶ Marty L., Iaia A., Faucher M., Bouchiat V., Naud C., Chamont M., Fournier T., Bonnot A-M. *Thin Solid Films* **2006**, 501, 299-302.

⁶⁷ Stevens R., Nguyen C., Cassell A.M., Delzeit L., Meyyappan M., Han J. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 3453-3455.

B. Biofonctionnalisation des pointes AFM avec ou sans nanotubes

1. Biofonctionnalisation d'une pointe AFM

Pour certaines applications, telles que la mesure d'interactions entre deux biomolécules, il peut être utile de fixer des biomolécules sur des pointes AFM. Dans un premier temps, celles-ci ont été déposées de manière non-covalente, par simple adsorption. En effet, cette technique est la plus simple à mettre en œuvre. Les protéines peuvent être immobilisées directement sur des pointes⁶⁸ ou bien par interactions électrostatiques sur une pointe recouverte de poly-L-lysine en utilisant les charges positives de celle-ci.⁶⁹

L'immobilisation non-covalente sur des pointes AFM présente cependant de nombreux inconvénients. En effet, il est, par exemple, difficile de contrôler, de manière précise, le nombre de biomolécules immobilisées sur chaque pointe et donc d'obtenir des pointes de manière reproductible. De plus, elles ne sont pas très stables dans le temps (risque de désorption de l'objet biologique). Cela impose donc de les renouveler fréquemment.

Afin de palier ces divers désavantages, l'immobilisation de biomolécules de manière covalente sur des pointes AFM recouvertes d'une fine couche d'or a été imaginée. Une fonctionnalisation de la pointe au moyen d'un espaceur terminé par un thiol ou un disulfure (par exemple du dithio-bis(succinimidylundécanoate) (DSU)) a été envisagée.⁷⁰ Cela permet de fixer seulement quelques protéines sur la pointe. Cependant, en raison de la couche d'or qui augmente le rayon de courbure de celle-ci, il est peu vraisemblable qu'il n'y ait qu'une seule protéine sur la pointe (Figure IV-22).

⁶⁸ Moy V.T., Florin E-L., Gaub H.E. *Colloid Surface A* **1994**, 93, 343-348.

⁶⁹ Oberleithner H., Schneider S.W., Henderson R.M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, 94, 14144-14149.

⁷⁰ Dammer U., Hegner M., Anselmetti D., Wagner P., Dreier M., Huber W., Günterodt H-J. *Biophys. J.* **1996**, 70, 2437-2441.

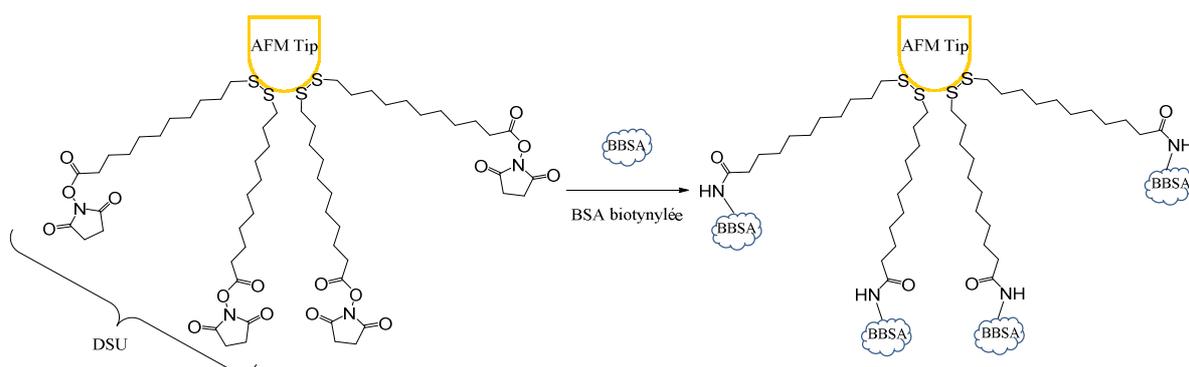


Figure IV-22. Utilisation du DSU pour la fonctionnalisation d'une pointe AFM recouverte d'or avec de la BSA biotinylée.

De plus, la couche d'or rajoutée sur la pointe est la principale cause de dérive de la pointe lors de la mesure de forces.⁷¹ Cela a pour conséquence une baisse de la précision et de la stabilité des mesures effectuées.

En raison des inconvénients énoncés précédemment pour les pointes AFM recouvertes d'une couche d'or, des biomolécules ont été immobilisées de manière covalente sur des pointes AFM en silicium ou en nitrure de silicium.⁷² Dans ce cas, une fonctionnalisation préalable est nécessaire et réalisée au moyen de chaînes terminées par une fonction amine, selon diverses voies possibles. Une étude a comparé les trois principales, à savoir l'estérification des silanols avec l'éthanolamine, la silanisation en phase gazeuse avec l'APTES ou le traitement avec l'aminophényltriméthoxysilane en solution dans le toluène.⁷³ Il n'y a que peu de différences entre ces trois techniques de silanisation. Elles pourront être utilisées, au choix, suivant les besoins et les préférences.

Cependant, en plus d'être un des moyens les plus utilisés pour fonctionnaliser les pointes AFM, la fonction amine est aussi une des plus présentes sur les biomolécules et donc les plus souvent utilisées pour les immobiliser. Cela nécessite donc l'utilisation d'un espaceur terminé par des fonctions réactives vis-à-vis des amines, aux deux extrémités, avec un risque de repliement sur lui-même. Pour pallier ce problème, un espaceur terminé par un ester activé NHS et un aldéhyde protégé par un acétal a été développé (Figure IV-23).⁷⁴ En effet, la déprotection sélective de l'acétal, au dernier moment, a permis d'éviter la réaction de

⁷¹ Sullan R.M.A., Churnside A.B., Nguyen D.M., Bull M.S., Perkins T.T. *Methods* **2013**, *60*, 131-141.

⁷² Hinterdorfer P., Baumgartner W., Gruber H.J., Schilcher K., Schindler H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 3477-3481.

⁷³ Ebner A., Hinterdorfer P., Gruber H.J. *Ultramicroscopy* **2007**, *107*, 922-927.

⁷⁴ Wildling L., Unterauer B., Zhu R., Rupprecht A., Haselgrübler T., Rankl C., Ebner A., Vater D., Pollheimer P., Pohl E.E., Hinterdorfer P., Gruber H.J. *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 1239-1248.

l'aldéhyde sur une fonction amine de la pointe et favoriser celle avec la biomolécule à immobiliser.

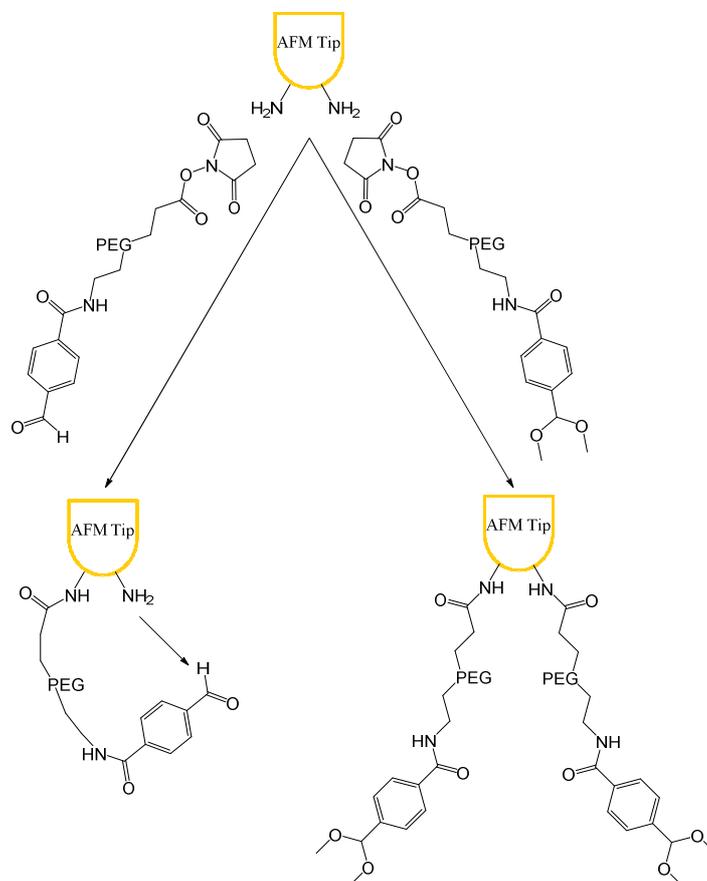


Figure IV-23. Utilisation d'un espaceur terminé à une extrémité par une fonction ester-NHS et à l'autre par une fonction aldéhyde protégée ou non.

Par contre, la fonctionnalisation des pointes avec des biomolécules est souvent réalisée en phase aqueuse. Or, avec l'APTES, il est difficile d'obtenir des monocouches uniformes lorsque la réaction a lieu en milieu liquide. De plus, le NHS (utilisé pour former les esters activés qui réagiront sur les fonctions amines) est sensible à l'humidité et risque l'hydrolyse. Pour améliorer les rendements, il peut être utile de procéder différemment. Un nouveau espaceur, terminé par une fonction silatrane à une extrémité (pour la fixation sur la pointe) et une cyclooctyne à l'autre (pour l'immobilisation des biomolécules par une réaction de « click chemistry » sans catalyseur métallique) a été développé (Figure IV-24).⁷⁵

⁷⁵ Senapati S., Manna S., Lindsay S., Zhang P. *Langmuir* **2013**, 29, 14622-14630.

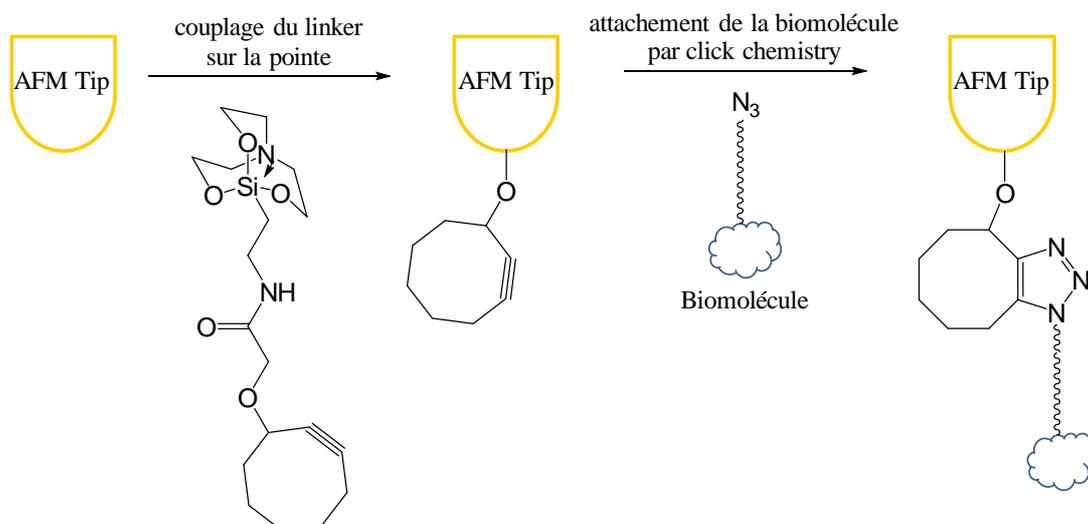


Figure IV-24. Immobilisation d'une biomolécule sur une pointe par "click chemistry".

Une autre possibilité consiste à exploiter les fonctions thiols des protéines.⁷² De plus l'immobilisation des biomolécules sur une pointe peut être contrôlée par un marqueur fluorescent.⁷⁶ La fluorescence est environ trois fois plus importante pour les pointes fonctionnalisées.

Au lieu d'un simple espaceur, un dendrimère dont les branches sont terminées par un aldéhyde peut aussi être envisagé.⁷⁷ Celui-ci sera fixé sur une pointe AFM fonctionnalisée par l'éthanolamine et permettra l'immobilisation de biomolécules (Figure IV-25). Il a été montré que, grâce à sa taille et son orientation, ce dendrimère permet, lors d'une expérience de mesure d'interactions entre biomolécules, d'en avoir une seule en contact avec la surface.

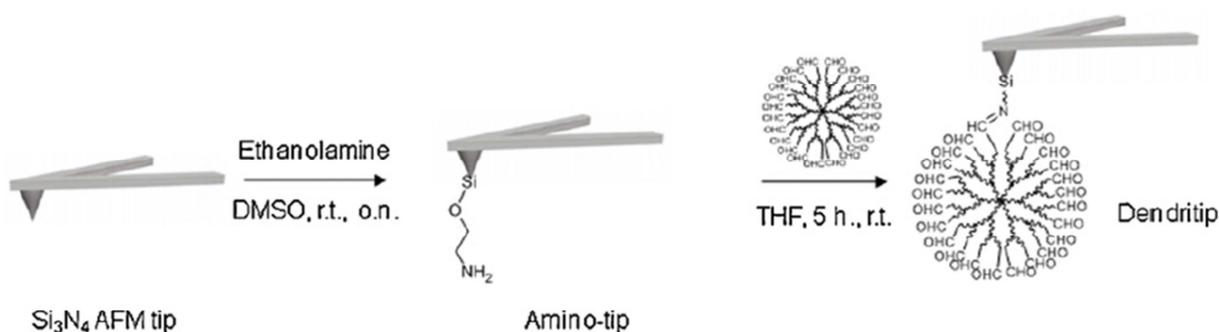


Figure IV-25. Utilisation d'un dendrimère pour fonctionnaliser une pointe AFM.⁷⁷

⁷⁶ Pietak A.M., Sayer M. *Biomaterials* **2006**, 27, 3-14.

⁷⁷ Jauvert E., Dague E., Séverac M., Ressler L., Caminade A-M., Majoral J-P., Trévisol E. *Sens. Actuat. B-Chem.* **2012**, 168, 436-441.

Les pointes AFM fonctionnalisées avec des biomolécules ne sont pas uniquement utilisées pour faire des mesures d'interactions entre biomolécules. En effet, une pointe AFM sur laquelle une protéase est immobilisée permet, par exemple, de réaliser la lithographie sélective de certaines zones d'une surface sur laquelle sont immobilisés des peptides.⁷⁸

2. Biofonctionnalisation d'une pointe AFM munie d'un nanotube

Pour développer de nouveaux biocapteurs ou pour certaines autres applications, telles que la mesure d'interactions entre deux biomolécules, il peut être utile d'immobiliser celles-ci sur des nanotubes fixés ou non sur des pointes AFM. La technique la plus simple pour cela est leur adsorption directement sur les nanotubes de carbone.⁷⁹ Lors de l'adsorption de peptides sur des CNT, dans la zone de liaisons entre le peptide et ce dernier, il y a une prédominance d'histidine et de tryptophane.⁸⁰ En effet, les cycles aromatiques présents dans les chaînes latérales des acides aminés favorisent la création d'interactions π - π . Ces interactions peuvent être impliquées lors de l'immobilisation non-covalente de biomolécules. Une petite molécule terminée par un cycle aromatique peut, par exemple, jouer le rôle d'un espaceur (Figure IV-26).⁸¹

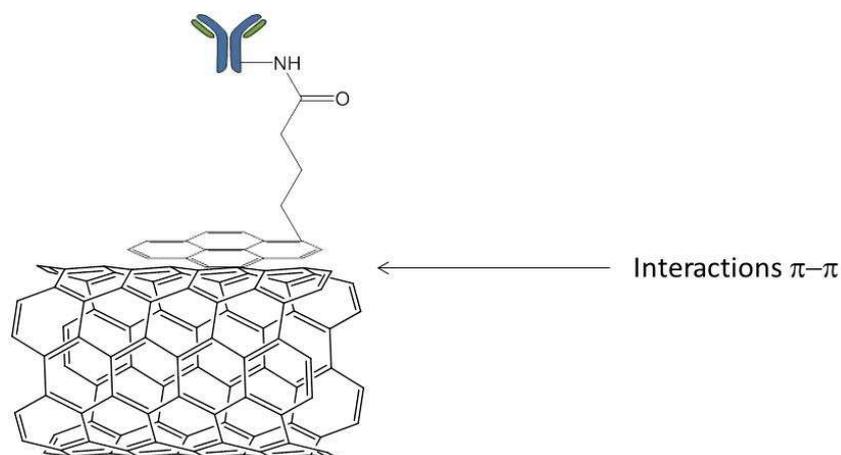


Figure IV-26. Immobilisation d'un anticorps anti-PSA à l'aide de l'ester de succinimidyle de l'acide pyrènebutanoïque.

⁷⁸ Takeda S., Nakamura C., Miyamoto C., Nakamura N., Kageshima M., Tokumoto H., Miyake J. *Nano Lett.* **2003**, 3, 1471-1474.

⁷⁹ Yang R., Tang Z., Yan J., Kang H., Kim Y., Zhu Z., Tan W. *Anal. Chem.* **2008**, 80, 7408-7413.

⁸⁰ Wang S., Humphreys E.S., Chung S-Y., Delduco D.F., Lustig S.R., Wang H., Parker K.N., Rizzo N.W., Subramoney S., Chiang Y-M., Jagota A. *Nat. Mater.* **2003**, 2, 196-200.

⁸¹ Li C., Curreli M., Lin H., Lei B., Ishikawa F.N., Datar R., Cote R.J., Thompson M.E., Zhou C. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 12484-12485.

Cependant il a été établi que cette méthode n'était pas forcément idéale.⁸² En effet, l'analyse de la structure et de l'activité de certaines protéines après leur immobilisation sur des SWCNT a prouvé que certaines subissaient de fortes modifications de leurs structures et avaient donc une perte presque totale de leurs activités.

Pour éviter cette déformation et cette perte d'activité, l'immobilisation covalente de biomolécules sur des CNT peut donc aussi être envisagée. Cependant, ce n'est pas possible de fonctionnaliser directement des CNT. En général, il faut procéder en trois étapes. Tout d'abord, une oxydation des nanotubes, par une solution mélangeant l'acide sulfurique et l'acide nitrique, est réalisée pour créer des fonctions acide carboxylique qui seront ensuite activées, le plus souvent à l'aide du couple EDC/NHS. Pour finir, la biomolécule est immobilisée par la création d'une liaison amide entre une de ses fonctions amine et les acides carboxyliques des nanotubes (Figure IV-27).⁸³ Avec cette technique, 90% des protéines immobilisées gardent leurs activités.⁸⁴

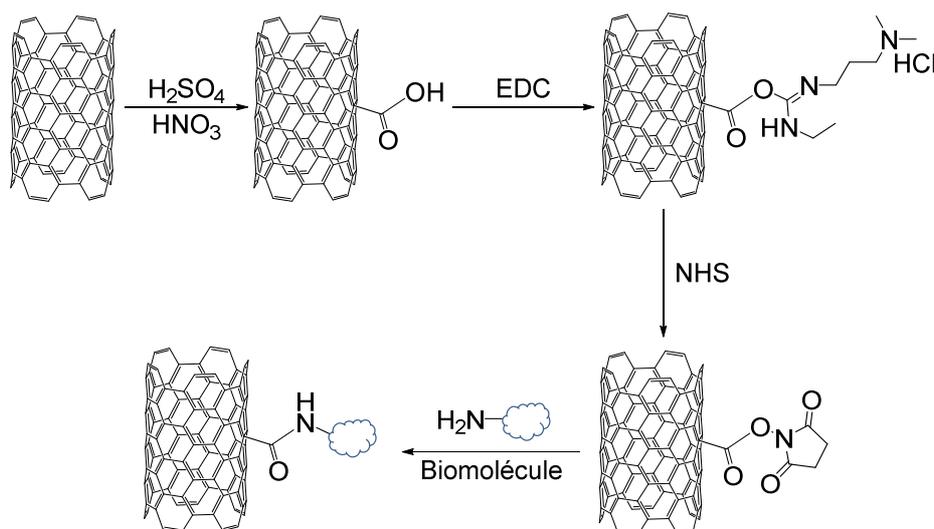


Figure IV-27. Schéma de l'immobilisation en trois étapes d'une biomolécule sur un nanotube de carbone.

Toutefois, l'oxydation des CNT avec des acides est quand même une approche assez radicale. De plus, il a été prouvé par infrarouge qu'en plus des fonctions acide carboxylique, des fonctions hydroxyle, carbonyle ou sulfate étaient aussi obtenues.⁸³ Afin d'éviter cela une variante de la méthode de gazéification-dissolution décrite par Chiang *et al.* peut permettre d'oxyder les nanotubes (exposition sous air à la vapeur d'eau à 200°C pendant 1 h 30).⁸⁵

⁸² Karajanagi S.S., Vertegel A.A., Kane R.S., Dordick J.S. *Langmuir* **2004**, *20*, 11594-11599.

⁸³ Jiang K., Schadler L.S., Siegel R.W., Zhang X., Zhang H., Terrones M. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 37-39.

⁸⁴ Huang W., Taylor S., Fu K., Lin Y., Zhang D., Hanks T.W., Rao A.M., Sun Y-P. *Nano Lett.* **2002**, *2*, 311-314.

⁸⁵ Chiang I.W., Brinson B.E., Huang A.Y., Willis P.A., Bronikowski M.J., Margrave J.L., Smalley R.E., Hauge R.H. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8297-8301.

Après immobilisation avec cette technique, il a été mis en évidence, à l'aide de l'anticorps conjugué marqué par fluorescence, que les biomolécules (protéine Knob) maintiennent leurs activités.⁸⁶

La création d'une liaison amide n'est pas la seule technique pour fixer des biomolécules sur des nanotubes. En effet, les réactions de chimie « click », telles que la [3 + 2] cycloaddition de Huisgen, peuvent s'avérer très utiles. Après insertion de groupements azide sur des nanotubes carboxylés, la réaction d'un anticorps modifié avec une fonction alcyne peut être réalisée (Figure IV-28).⁸⁷ Celui-ci garde toute son activité suite à cette immobilisation.

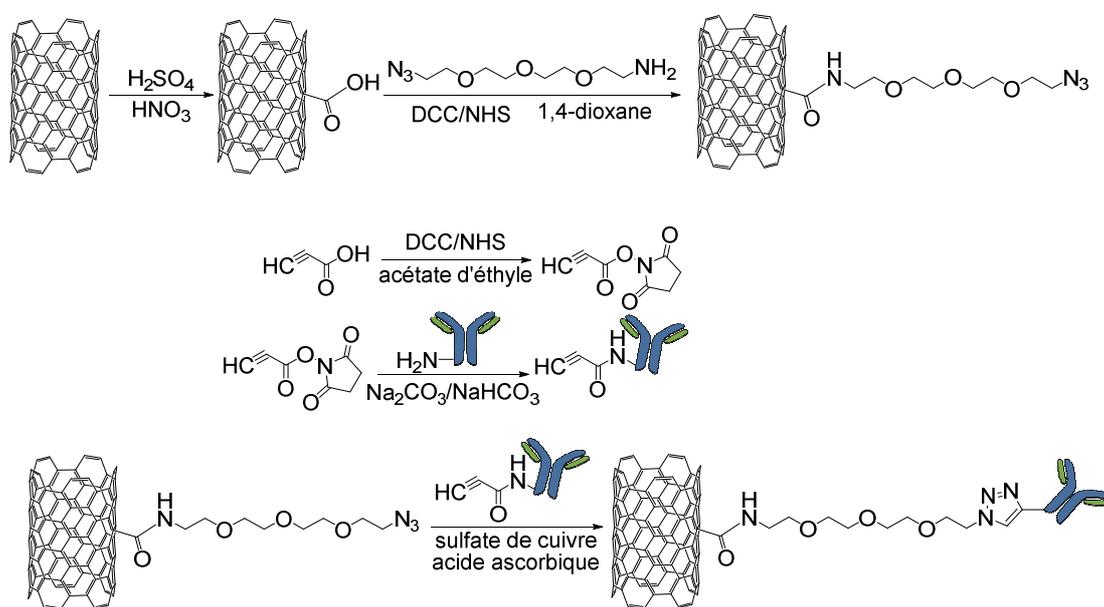


Figure IV-28. Schéma réactionnel de l'immobilisation d'anticorps par cycloaddition de Huisgen sur un nanotube de carbone.

La fonctionnalisation des nanotubes de carbone peut s'appliquer à d'autres domaines tels que la distribution de médicaments anti-cancer. Pour cela, un nanotube est fonctionnalisé avec des biotines à son extrémité et des molécules d'agents anti-cancer sur les côtés.⁸⁸ La surexpression de récepteurs à biotine sur les cellules cancéreuses permet l'internalisation du nanotube de manière plus importante que dans les cellules saines et la libération de l'agent anti-cancer à l'intérieur de la cellule (Figure IV-29).

⁸⁶ Zhang, Y-B., Kanungo M., Ho A.J., Freimuth P., van der Lelie D., Chen M., Khamis S.M., Datta S.S., Johnson A.T.C., Misewich J.A., Wong S.S. *Nano Lett.* **2007**, 7, 3086-3091.

⁸⁷ Qi H., Ling C., Huang R., Qiu X., Shanguan L., Gao Q., Zhang C. *Electrochim. Acta* **2012**, 63, 76-82.

⁸⁸ Chen J., Chen S., Zhao X., Kuznetsova L.V., Wong S.S., Ojima I. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 16778-16785.

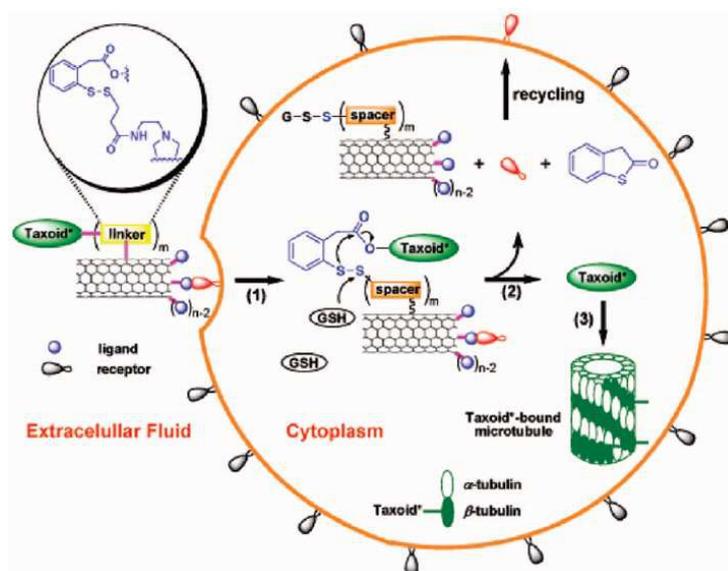


Figure IV-29. Schéma de principe de l'utilisation d'un nanotube comme agent de distribution de médicaments anti-cancer

C. Résumé

Au cours de cette étude bibliographique, nous avons présenté les différents types de nanotubes de carbone existants (SWCNT et MWCNT), ainsi que leurs principales propriétés (électroniques, thermiques et mécaniques). Un accent a été mis sur les propriétés mécaniques des nanotubes, présentant le plus d'intérêt dans le cadre de notre projet.

Nous avons aussi décrit les différentes techniques existantes pour synthétiser des nanotubes (arc électrique, ablation laser, HiPCO et dépôt chimique en phase vapeur catalytique). Cette dernière a été plus détaillée car c'est de loin la plus utilisée à l'heure actuelle en raison de son haut degré de contrôle et de sa facile extensibilité. Les principaux facteurs pouvant faire varier l'aspect et les propriétés des nanotubes obtenus, tels que la température de synthèse, le catalyseur et le précurseur carboné utilisé, ont été examinés.

Ensuite, l'intérêt des nanotubes de carbones comme sondes AFM a été présenté. Leur haut rapport d'aspect et leurs propriétés mécaniques en font des candidats de choix pour une utilisation comme pointes AFM. Cependant, en raison de la difficulté à contrôler la fixation du nanotube sur la pointe et de la complexité des propriétés mécaniques acquises, ils n'ont pas connu le développement attendu. Malgré tout, ces inconvénients sont en passe d'être réglés.

Pour finir nous avons décrit les principales techniques mises en jeu pour immobiliser des biomolécules sur une pointe AFM ou sur un nanotube. Pour des raisons de contrôle du

nombre de biomolécules fixées et de maintien de leur activité, l'accroche covalente est souvent privilégiée par rapport à l'immobilisation non covalente.

Au vu de tous les éléments décrits ici, nous avons choisi pour la suite de notre étude, d'utiliser des MWCNT, synthétisés au Laboratoire (CBMN) par dépôt chimique en phase vapeur catalytique.

Ceux-ci seront ensuite fixés, par soudure sous microscopie optique, sur des pointes AFM de façon à obtenir des sondes AFM. Celles-ci permettent de caractériser des SAMs ou bien elles seront fonctionnalisées avec une biomolécule dans le but de réaliser des expériences de DFS.

V. Chapitre V :

Fixation de nanotubes multiparois sur une pointe AFM et biofonctionnalisation

Depuis la mise en évidence, en 1996, par Dai et *al.* de la possibilité d'utiliser des nanotubes de carbone (CNT) comme pointes pour la microscopie en champ proche¹, de nombreuses techniques ont été développées pour la fixation de ceux-ci sur des pointes. Originellement le CNT était collé sur une pointe AFM en silicium à l'aide d'un adhésif, mais de nombreuses avancées ont été faites pour développer une technique qui soit plus reproductible. Au cours de cette immobilisation, il est important de contrôler plusieurs paramètres comme le positionnement et l'orientation du CNT à l'apex de la pointe ainsi que la solidité de l'accroche entre celui-ci et la pointe pour avoir une bonne transmission des propriétés mécaniques.

Les techniques de fabrication peuvent être classées en deux catégories. La première consiste à faire croître le CNT directement sur la pointe. Cette méthode directe permet d'envisager un procédé industrialisable, mais il est difficile de contrôler tous les éléments du cahier des charges. Avec la deuxième catégorie, le nanotube est implanté manuellement sur la pointe, après une croissance sur un autre support. Ce procédé est donc moins facilement industrialisable, car il impose une manipulation individuelle, mais il permet d'intervenir directement sur la longueur, l'orientation du CNT ainsi que la solidité de son accroche sur la pointe lorsqu'il est soudé sur celle-ci. Dans cette catégorie, deux techniques s'opposent. La première développée par Hafner et *al.* dite « pick-up »², consiste à approcher une pointe AFM au-dessus d'une surface plane recouverte de CNT qui ont poussés perpendiculairement à celle-ci. La pointe va en attraper un qui se collera sur une de ses faces grâce aux forces de van der Waals. La seconde technique consiste à souder le nanotube sur la pointe à l'aide d'un courant électrique sous un microscope optique.³ Cette pratique permet d'obtenir des sondes nanotubes avec une solidité de fixation inégalée sur les pointes, ainsi que de mieux contrôler leur orientation après une période d'apprentissage. Dans le reste de cette étude, uniquement ce procédé sera utilisé.

Les MWCNT seront principalement utilisés au cours de ce chapitre. En effet :

- d'une part, leur synthèse par CCVD est plus facile et mieux maîtrisée au Laboratoire (CBMN) que celle des SWCNT,
- d'autre part, leur fixation sur une pointe AFM (*via* la fusion d'un fin film de nickel) est plus solide.

¹ Dai H., Hafner J.H., Rinzler A.G., Colbert D.T., Smalley R.E. *Nature* **1996**, 384, 147-150.

² Hafner J.H., Cheung C.L., Oosterkamp T.H., Lieber C.M. *J. Phys. Chem B* **2001**, 105, 743-746.

³ Stevens R., Nguyen C., Cassel A., Delzeit L., Meyyappan M., Han J. *Appl. Phys. Lett.* **2000**, 77, 3453-3455.

A. Synthèse des MWCNT

Pour disposer des MWCNT, nous utilisons un protocole développé par Stevens et *al.*³ au centre de recherche Ames de la NASA. Celui-ci consiste à faire croître de longs MWCNT sur un fil de platine/iridium.

L'utilisation d'un catalyseur liquide, à base de fer III, permet de mieux disperser les nanotubes sur le fil. En effet, en plus du fer III, un surfactant (Pluronic P123) est ajouté à la solution de catalyseur afin de mieux répartir les particules de fer. Un composé silicié ($\text{Si}(\text{OEt})_4$) est aussi ajouté pour augmenter la viscosité de la solution. Cette dernière est un paramètre important. En effet, il ne faut pas qu'elle soit trop faible sinon la solution ne va pas mouiller le fil de façon homogène. Si elle est trop importante, la couche de catalyseur sur le fil risque d'être trop épaisse. La viscosité augmentant avec le séchage de la solution et la croissance des MWCNT se faisant uniquement sur les parties du fil recouvertes de catalyseur, il est donc essentiel de bien répartir la solution sur toute la longueur du fil.

Les fils métalliques sont ensuite déposés dans un tube de quartz lui-même placé dans un four tubulaire (Figure V-1).

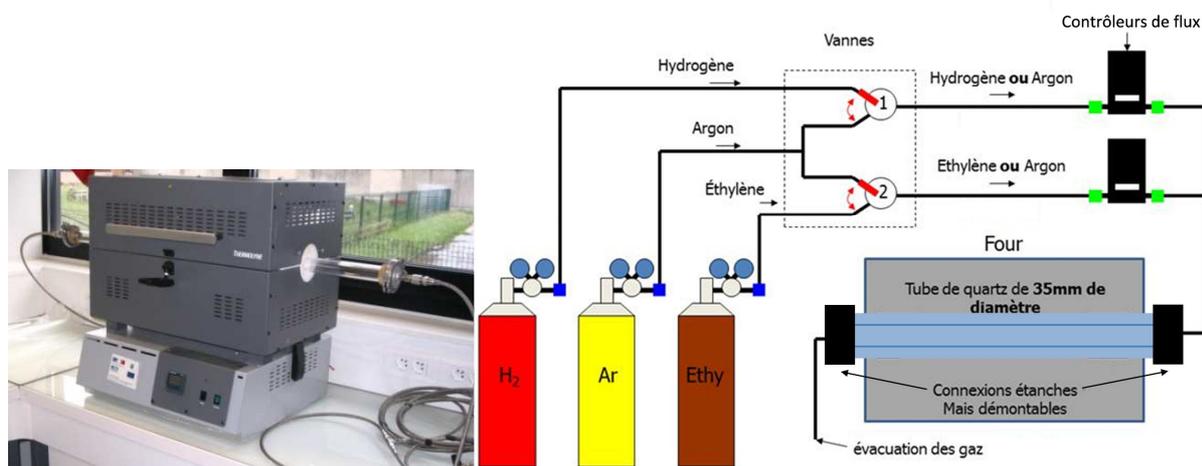


Figure V-1. Four tubulaire utilisé pour la synthèse des MWCNT et schéma du raccordement aux gaz.

Trois gaz différents (argon, hydrogène et éthylène) ayant chacun un rôle bien précis, sont injectés dans le four, une fois celui-ci porté à 750°C. Deux voies sont utilisées pour l'ajout des trois gaz. La sélection du gaz est réalisée grâce à deux vannes. Leur débit est contrôlé à l'aide de deux contrôleurs de flux sur lesquels le débit est réglé à 500 sccm (standard cubic centimeter per minute). Le four est tout d'abord mis sous courant d'argon de

façon à le purger de tout autre gaz. Ensuite, un flux d'argon et d'hydrogène est inséré dans le tube afin de nettoyer toutes les impuretés qui pourraient être présentes. Puis vient l'étape de croissance proprement dite, pendant laquelle le tube est placé sous un flux d'hydrogène et d'éthylène. Le précurseur carboné est l'éthylène, sa décomposition sur les particules de catalyseur permettra la formation des MWCNT. Cette phase dure 10 minutes, même si aucun rapport direct entre le temps d'exposition au gaz carboné et la longueur des MWCNT n'a été mis en évidence.

Les fils de Pt/Ir recouverts de nanotubes obtenus après la croissance sont appelés cartouches de nanotubes (Figure V-2).

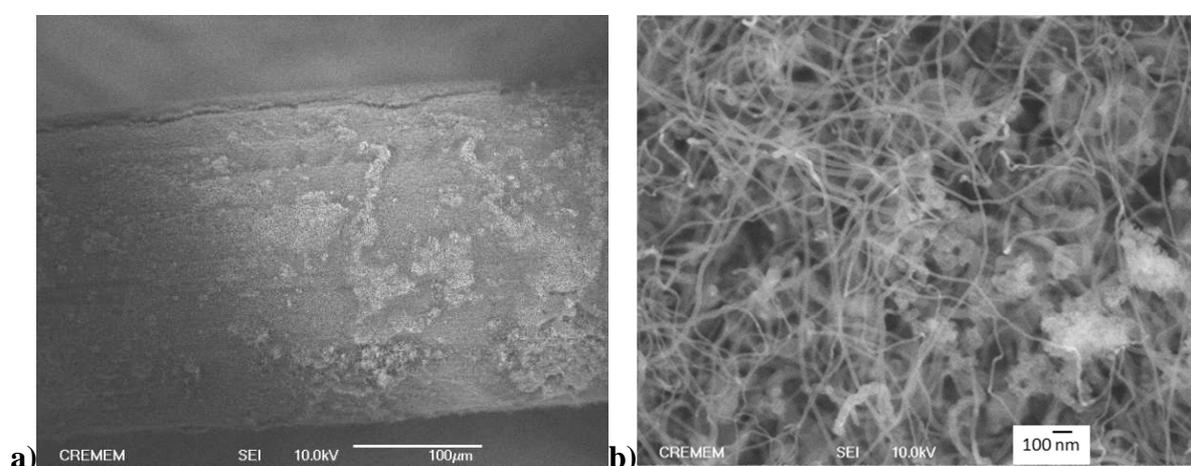


Figure V-2. Image MEB d'une cartouche de MWCNT (a), zoom sur une partie de celle-ci (b).

La croissance des MWCNT se faisant de façon aléatoire sur le fil de Pt/Ir, la formation d'un tapis de nanotubes est observée. Seulement une faible proportion des MWCNT formés sont exploitables pour la fixation sur une pointe. En effet, seuls les plus gros nanotubes orientés presque perpendiculairement à la cartouche peuvent être soudés.

Pour conclure, il a été montré que la croissance de MWCNT était possible sur un fil de Pt/Ir. Parmi les nanotubes désordonnés obtenus, ceux ayant la bonne orientation pourront être soudés sur des pointes AFM.

B. Soudure des MWCNT sur une pointe AFM et oxydation

1. Dépôt du film de nickel sur les pointes AFM

Afin de pouvoir réaliser la soudure du nanotube, une étape de métallisation préalable, de la pointe silicium, est indispensable. Pour cela, la pulvérisation d'une fine couche d'environ 12 nm de nickel est réalisée par Lionel Teule-Gay au Centre de Ressources en Couches Minces à l'ICMCB, dans une chambre Ultra Haut Vide équipée d'une cathode magnétron portant une cible de nickel.

Ce film de nickel permet la soudure du nanotube sur l'apex de la pointe. En effet, il va y avoir une fusion partielle de celui-ci due à l'effet joule provoqué par le courant appliqué. Le nanotube sera donc solidement attaché à la pointe, une fois le nickel refroidit.

2. Soudure du nanotube sous microscopie optique

La fixation du nanotube sur la pointe est réalisée par microsoudure, sous le contrôle d'un microscope optique. Cela permet de mieux maîtriser la soudure et d'obtenir des résultats plus reproductibles. La cartouche et la pointe AFM sont immobilisées sur la platine du microscope à l'aide de translateurs micrométriques tridimensionnels équipés de pinces crocodiles conductrices (Figure V-3). Le tout est aussi connecté à un générateur permettant d'appliquer une tension allant de 0 à 80 V.

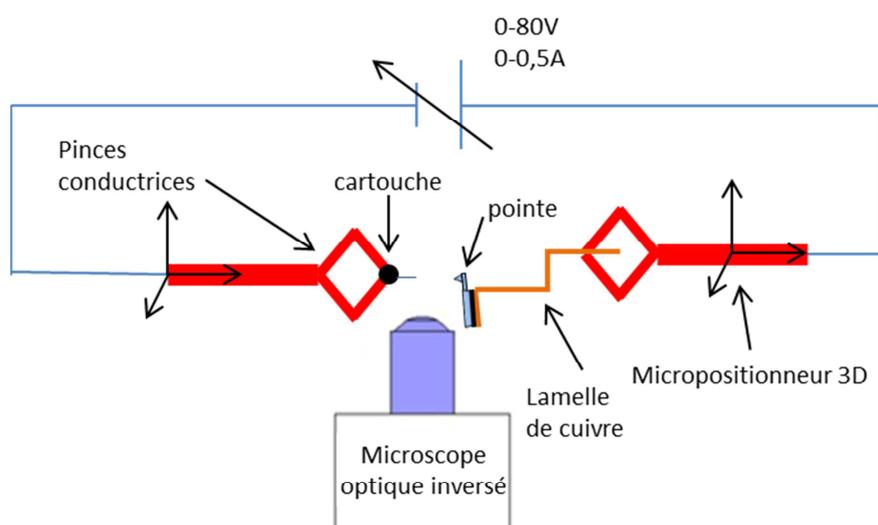


Figure V-3. Schéma du dispositif utilisé pour la soudure des MWCNT sur une pointe AFM.

Le contrôle précis de plusieurs points est important pour obtenir des pointes avec un nanotube soudé et orienté correctement sur l'apex. Tout d'abord, l'orientation de la pointe AFM et donc de la lamelle de cuivre permettant sa fixation est aussi importante. Celle-ci a été optimisée et doit être pratiquement à la verticale pour souder un nanotube avec la bonne direction (Figure V-4 a)).

Ensuite, un soin particulier doit être apporté à la sélection du MWCNT. Celui-ci doit être suffisamment long pour permettre un contact sur une grande longueur avec la pointe et être dirigé le plus perpendiculairement possible à la cartouche (Figure V-4 b)). Après, les différents objectifs disponibles (x5, x20, x50) permettent un positionnement plus précis de la pointe par rapport au nanotube (Figure V-4 c)). Pour finir, le nanotube est positionné correctement sur la pointe en venant le coller contre une des faces de celle-ci (Figure V-4 d)).

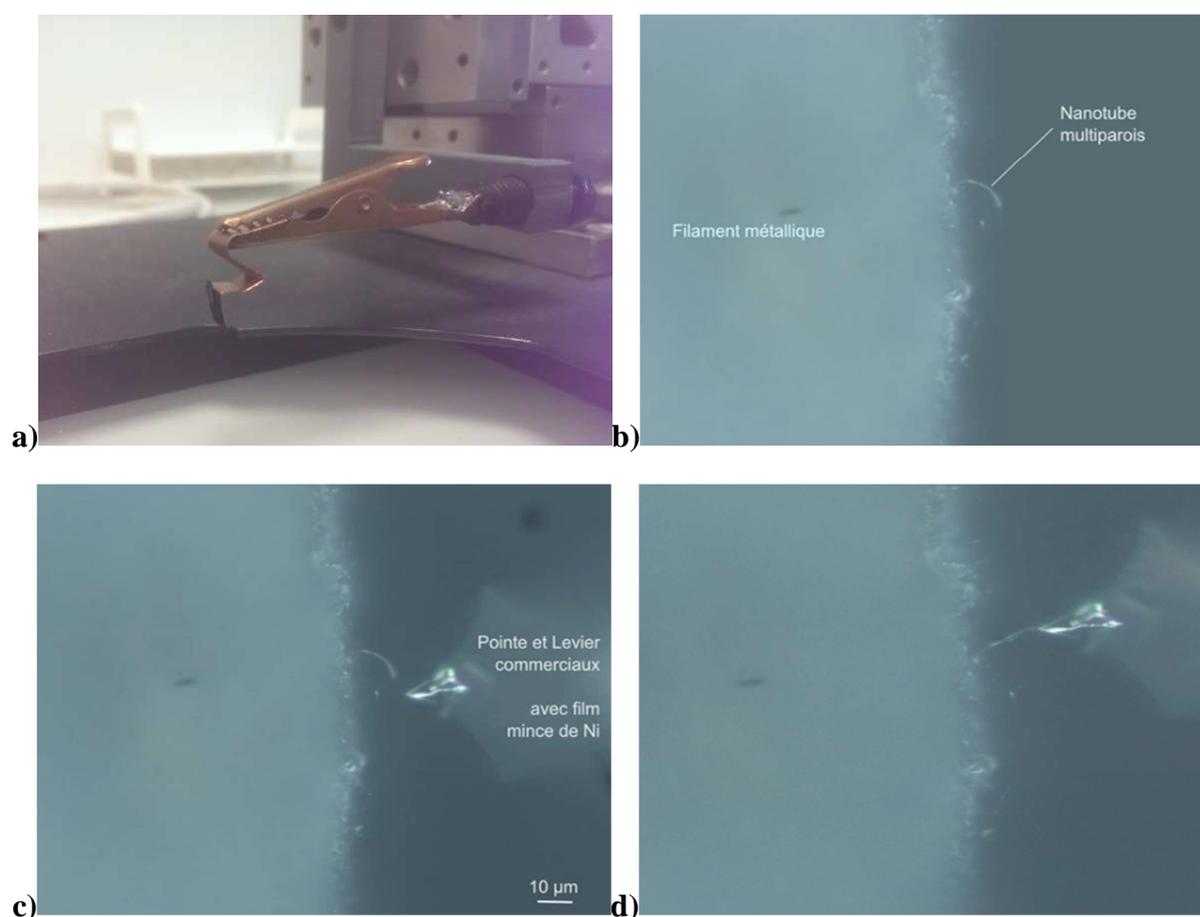


Figure V-4. Images des différentes étapes du positionnement du nanotube sur une des faces de la pointe (lamelle de cuivre utilisée pour fixer la pointe (a) ; choix d'un MWCNT bien orienté et suffisamment long (b) ; approche du MWCNT et de la pointe (c) ; positionnement correct du MWCNT contre la pointe (d)). Les images (b), (c) et (d) ont été réalisées avec le grossissement x50 du microscope optique.

La tension est ensuite progressivement augmentée dans le circuit. Cela va chauffer la pointe, faire fondre localement la fine couche de nickel et permettre la soudure du MWCNT avec la pointe. La tension est augmentée jusqu'à rupture du MWCNT (Figure V-5). Celle-ci va avoir lieu à l'endroit le plus chaud du MWCNT : en son milieu ou à un endroit du MWCNT présentant un défaut. La localisation du point de rupture et donc la longueur du nanotube soudé sur la pointe ne peut pas toujours être contrôlée de manière précise.



Figure V-5. Image de la rupture du nanotube au moment de la soudure.

3. Contrôle de la fixation au MEB

La résolution du microscope optique n'est pas suffisante pour évaluer la taille et l'orientation précise du MWCNT ainsi que la qualité de la soudure sur la pointe. Toutes les pointes soudées sont donc imagées au MEB au CREMEM (Centre de Ressource En Microscopie Electronique et Microanalyse) pour une caractérisation plus précise.

Pour pouvoir les observer au MEB, les pointes AFM sont fixées sur un support adapté recouvert de scotch conducteur (Figure V-6). De manière à faciliter l'examen, les pointes doivent être fixées le plus près possible du sommet du support.

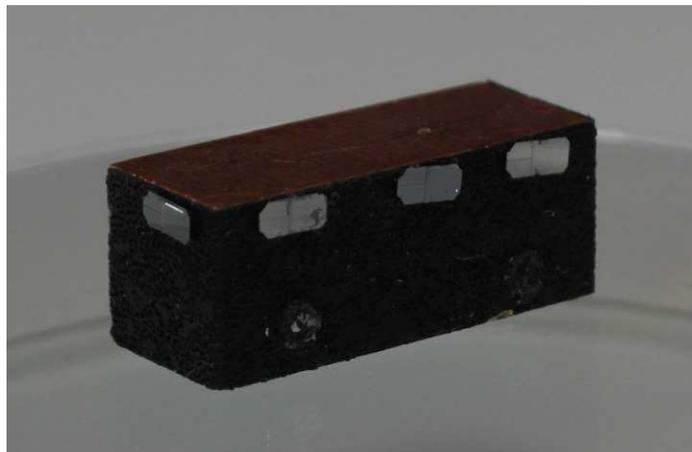


Figure V-6. Support utilisé pour l'observation des pointes AFM au MEB.

En plus du risque inhérent à toute manipulation d'abimer la pointe, le passage du MWCNT au MEB risque de modifier l'état de celui-ci. Cependant, ce passage est obligatoire, car c'est la seule technique dont nous disposons actuellement pour avoir une caractérisation précise du résultat de la soudure.

La Figure V-7 montre l'évolution de la soudure des pointes entre le début (a) et b)) et la fin de cette Thèse (c) et d)), une fois tous les paramètres de la soudure optimisés.

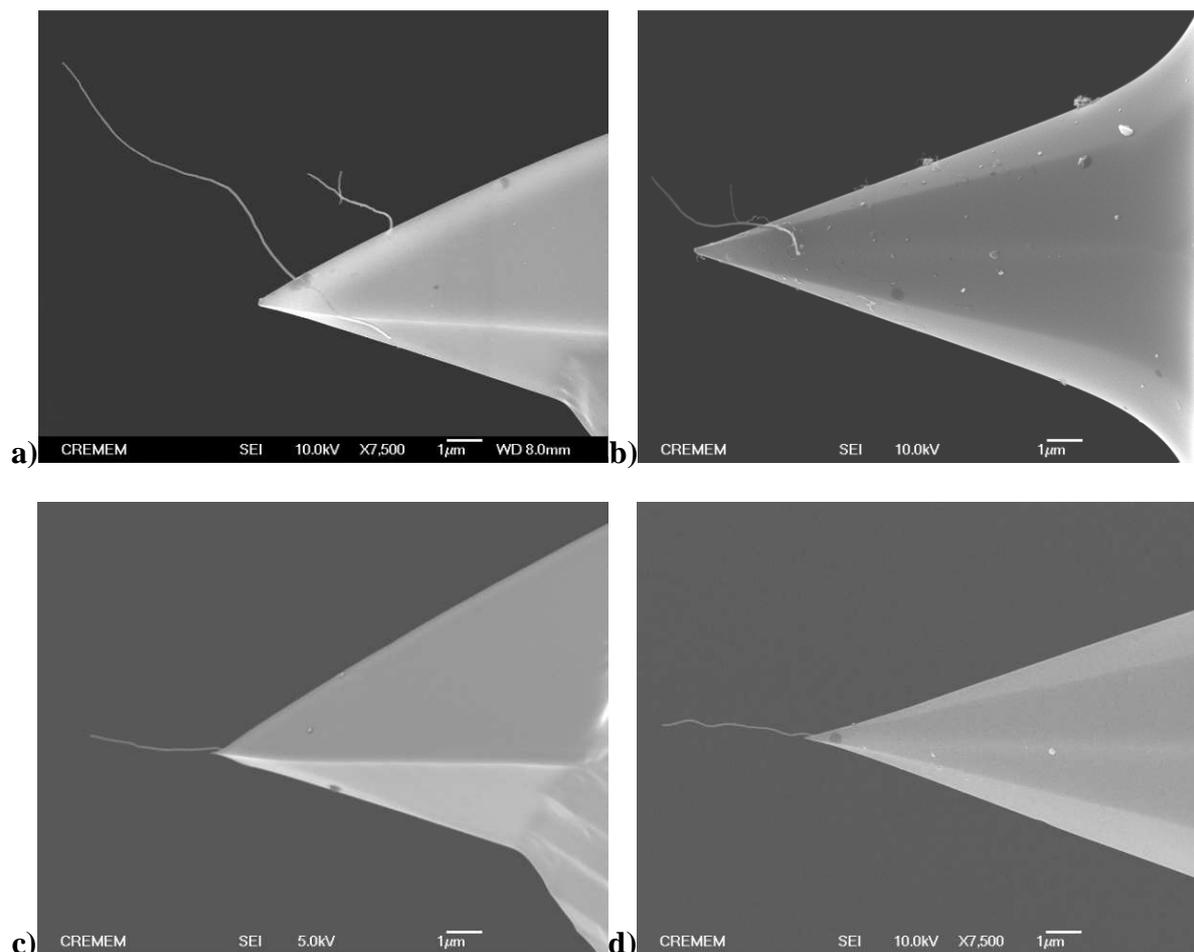


Figure V-7. Images MEB montrant l'évolution de la soudure des MWCNT sur des pointes AFM entre le début de cette Thèse (a) et b)) et la fin (c) et d)).

Ces images MEB montrent bien l'importance que peut avoir l'optimisation de tous ces paramètres (orientation de la pointe AFM, choix et orientation des MWCNT par rapport à la pointe) sur le résultat obtenu. En effet, afin de limiter les pertes, que ce soit en terme de pointes AFM ou de MWCNT, il est important de travailler dans les meilleures conditions pour obtenir des soudures les plus reproductibles possibles.

Ces images permettent aussi une évaluation de la longueur du MWCNT ainsi que de son diamètre. La qualité de la soudure du nanotube peut aussi être observée suivant le côté de la pointe observé.

C. Caractérisation de SAMs-urée avec des MWCNT fixés sur des pointes AFM

Les pointes AFM munies d'un nanotube présentent un grand intérêt en vue d'une utilisation en tant que sondes AFM pour caractériser des surfaces. En effet, celles-ci offrent plusieurs avantages par rapport aux pointes AFM en silicium utilisées en général. Par exemple, en raison de la robustesse du nanotube de carbone et de la solidité de l'attache de celui-ci sur la pointe grâce à la soudure, les pointes à nanotube sont beaucoup plus résistantes mécaniquement que celles en silicium qui ont tendance à se détériorer rapidement.⁴ De plus, les pointes en silicium ont souvent tendance à être contaminées par la surface⁵, ce qui n'est pas le cas des pointes à nanotube en raison de la plus faible réactivité chimique de ces derniers. Tout cela leur procure donc une bien meilleure stabilité. Leur grand rapport d'aspect peut permettre la caractérisation de surfaces rugueuses. De plus, il est possible de tirer parti du très grand rapport surface/volume des nanotubes pour détecter différents matériaux par les différences de glissement des CNT sur ces surfaces.

Ces variations modifient les conditions aux limites du CNT, ce qui change sa raideur.⁶ Pouvoir caractériser différentes surfaces à l'aide de pointes AFM à nanotube présente notamment un grand intérêt dans le domaine des biocapteurs et des MEMS (MicroSystèmes ElectroMécaniques). Cela permettrait, par exemple, de mesurer la rugosité avec des sondes CNT stables et de cartographier la fonctionnalisation chimique ou l'activité biologique avec une meilleure résolution. A terme, les procédés de fabrication pourront ainsi être contrôlés et améliorés. Une longue durée de vie des sondes à CNT pourrait également devenir un atout considérable dans le domaine émergent de la nanométrie.

Cependant, ce domaine reste encore très peu exploré. Cela est sans doute dû aux difficultés précédentes de contrôle de fabrication des sondes à CNT et de compréhension de leurs propriétés mécaniques. Aujourd'hui un grand volume de travail est nécessaire pour identifier les possibilités et limites de la caractérisation de surface avec les sondes à nanotube. Nous présentons ici uniquement quelques expériences préliminaires.

Dans le but de tenter de caractériser et différencier les SAMs-urée formées précédemment (SAM-urée-CH₃ 100%, SAM-urée-NO₂ 30%, SAM-urée-NO₂ 100%), des séries de courbes approche-retrait (CAR) ont été effectuées, en différents points des SAMs-urée. Pour cela, un AFM Dimension FastScan (Bruker) est utilisé en mode FM (mode

⁴ Nguyen C.V., Chao K-J., Stevens R.M.D., Delzeit L., Cassell A., Han J., Meyyappan M. *Nanotechnology* **2001**, *12*, 363-367.

⁵ Nie H-Y., Walzak M.J., McIntyre N.S. *Rev. Sci. Instrum.* **2002**, *73*, 3831-3836.

⁶ Dietzel D., Marsaudon S., Aimé J-P., Nguyen C.V., Couturier G. *Phys Rev. B* **2005**, *72*, 035445, 1-16.

modulation de fréquence) avec différentes pointes. Pour travailler en mode FM l'ajout d'une électronique extérieure est nécessaire (PLL Nanonis OC4.5-Station).

Dans un premier temps, la réponse mécanique d'un MWCNT soudé, sans ajout d'oxygène, sur un levier de raideur intermédiaire (PPP-FMR de Nanosensors, fréquence de résonance du levier : $f_0 = 69,509$ kHz, facteur de qualité : $Q = 142$, raideur du levier : $k_{\text{levier}} = 2,4$ N/m) sera étudiée sur les différentes SAMs-urée.

Par la suite, une autre expérience sera menée pour voir si une différence est observée dans la réponse mécanique des MWCNT suivant le traitement subi par leur extrémité lors de la soudure (présence ou non d'un flux d'oxygène (pour le procédé d'oxydation voir p. 185)). Pour cela, deux sondes à MWCNT sur des leviers de raideur plus importante sont utilisées (PPP-NCL de Nanosensors : $f_0 = 152,390$ kHz, $Q = 451$, $k_{\text{levier}} = 50$ N.m⁻¹ pour celle sans flux d'oxygène et $f_0 = 156,537$ kHz, $Q = 445$, $k_{\text{levier}} = 50$ N.m⁻¹ pour celle avec flux d'oxygène). La raideur plus importante permettra d'augmenter la réponse en fréquence.

1. Réponse mécanique d'un MWCNT sur une SAM

Dans le mode FM, initialement appelé Non-contact Résonant (NC AFM), le système pointe-levier est inséré dans une boucle d'auto-oscillation qui maintient l'oscillateur à la résonance en fixant le déphasage à -90° . Un asservissement (Contrôle Automatique de Gain) permet de maintenir l'amplitude d'oscillation constante. On enregistre le décalage de la fréquence et le signal dit « Damping » qui est la tension de sortie du contrôle automatique de gain.^{7,8}

L'utilisation du mode FM permet de séparer les interactions conservatives et dissipatives. En effet, le signal de « Damping » dépend uniquement de l'énergie dissipée par l'oscillateur en interaction avec la surface. Le décalage de la fréquence de résonance du levier dépend, quant à lui, uniquement des forces d'interactions conservatives : des forces attractives diminueront la fréquence, alors que des forces répulsives provoqueront une augmentation de la fréquence de résonance du levier. Ce mode permet de déchiffrer rapidement le type d'interaction du nanotube, à l'inverse du mode AM dit « tapping » dans lequel une variation d'amplitude (ou de phase) peut provenir d'un décalage de la fréquence ou d'une variation du facteur de qualité.

⁷ Nony L., *Thèse Université Bordeaux I*, 2000.

⁸ Dubourg F., *Thèse Université Bordeaux I*, 2002.

Un exemple de l'évolution des deux signaux enregistrés lors des courbes d'approche-retrait en mode dynamique FM est présenté sur la Figure V-8 : décalage de la fréquence de résonance du levier et évolution du signal de « Damping » en fonction du déplacement du piézo.

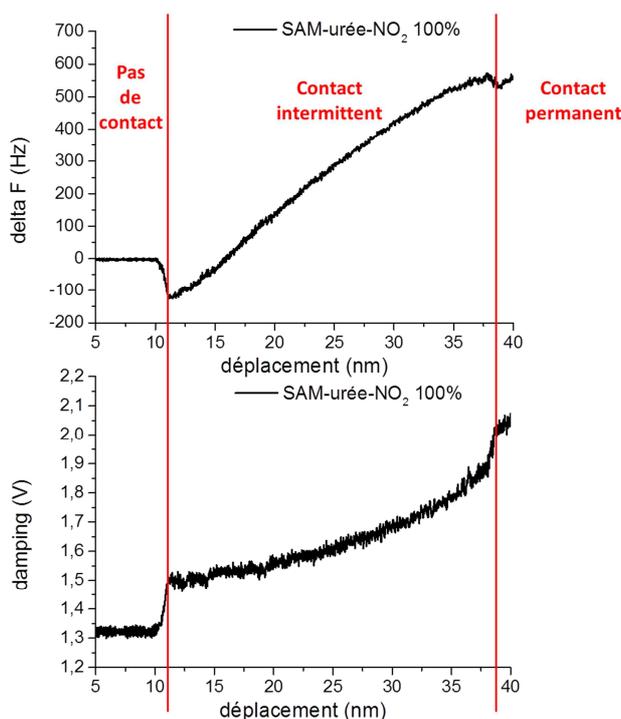


Figure V-8. Exemple de courbe d'approche-retrait obtenue, avec un MWCNT soudé sur une pointe de raideur intermédiaire (FMR : $k = 2 \text{ N.m}^{-1}$ (valeur nominale)), sur la SAM-urée-NO₂ 100% avec une amplitude de 10 nm. Le début de l'interaction a été translaté vers une distance d correspondant à l'amplitude de 10nm.

L'interprétation de ce type de courbes est basée sur des modèles mécaniques développés dans l'Equipe depuis 2005.^{6,9,10} Ces modèles prennent en compte des forces de volume : forces élastiques d'un tube selon la mécanique classique et des forces de surfaces : forces attractives.

⁹ Bernard C., Marsaudon S., Boisgard R., Aimé J-P. *Nanotechnology* **2008**, *19*, 035709, 1-10.

¹⁰ Buchoux J., Bellon L., Marsaudon S., Aimé J-P. *Eur. Phys. J. B* **2011**, *84*, 69-77.

Ces courbes peuvent être divisées en trois parties :

a/ Dans la première, il n'y a pas de contact entre le MWCNT et la surface. Le levier oscille à sa fréquence propre, le décalage de fréquence est nul. Le signal continu d'excitation appelé « Damping » est proportionnel à l'énergie qu'il faut fournir au levier pour le faire osciller, sa valeur dépend du facteur de qualité du levier ($Q = 140$) et de l'électronique associée (amplitude d'oscillation $A = 10$ nm). Dans le cas présenté en Figure V-8, elle est de :

$$E_0 = \frac{\pi k_{lev} A^2}{Q} = 4,5 \text{ aJ}$$

Quand la distance nanotube-surface est proche de l'amplitude d'oscillation, une force attractive dépendant de la géométrie et de la taille de l'extrémité du nanotube va s'exercer sur le MWCNT. Elle provoque une diminution de la fréquence de résonance.

b/ Dès que le nanotube commence à toucher la surface (lorsque la distance pointe-surface est égale à l'amplitude d'oscillation), la force subie par le CNT comprend une composante répulsive, le sens de variation de la fréquence s'inverse, elle augmente. Au même moment, de l'énergie supplémentaire est dissipée chaque fois que le nanotube se détache de la surface : ce domaine est appelé contact intermittent. La pente d'augmentation de la fréquence est proportionnelle au rapport de la raideur du nanotube sur celle du levier.^{6,9}

L'énergie dissipée est donnée par :

$$E_{tot} = E_0 + E_{int} = E_0 \left(1 + \frac{E_{int}}{E_0} \right)$$

où E_{int} est l'énergie additionnelle dissipée lors de l'interaction du nanotube avec la surface.

Le signal de « Damping » étant proportionnel à l'énergie dissipée ; on a :

$$E_{tot} = kDamp_{tot} \text{ et } E_0 = kDamp_0$$

où $Damp_{tot}$ représente le « Damping » total.

Il est donc possible d'écrire le rapport suivant :

$$\frac{E_{tot}}{E_0} = \frac{Damp_{tot}}{Damp_0}$$

Comme $Damp_{tot} = Damp_{int} + Damp_0$, où $Damp_{int}$ est le signal additionnel du « Damping » lors de l'interaction du nanotube avec la surface et $Damp_0$ le signal du « Damping » sans interactions, il est aussi possible de l'écrire sous la forme :

$$\left(1 + \frac{E_{int}}{E_0}\right) = \left(1 + \frac{Damp_{int}}{Damp_0}\right)$$

$$\text{Soit : } E_{tot} = E_0 \left(1 + \frac{E_{int}}{E_0}\right) = E_0 \left(1 + \frac{Damp_{int}}{Damp_0}\right).$$

Nous cherchons à identifier l'énergie dissipée lorsque le nanotube interagit avec la surface :

$$E_{int} = E_{tot} - E_0 = E_0 \left(\frac{E_{tot}}{E_0} - 1\right) = E_0 \left(\frac{Damp_{tot}}{Damp_0} - 1\right)$$

Dans notre cas, la première variation rapide du signal de « Damping » est de 0,18 mV, ce qui est notablement faible par rapport au « Damping » d'oscillation du levier (1,32 V) :

$$E_{int} = E_{tot} - E_0 = E_0 \left(\frac{E_{tot}}{E_0} - 1\right) = E_0 \left(\frac{Damp_{tot}}{Damp_0} - 1\right) = 4,5 \cdot \left(\frac{1,50}{1,32} - 1\right) = 0,61 \text{ aJ}.$$

Cette dissipation, relativement faible par rapport au levier sans interaction, est une caractéristique de la réponse de nanotube.

Au fur et à mesure que le nanotube s'approche de la surface, la composante répulsive de la force augmente car elle agit pendant une fraction de cycle de plus en plus grande. Plus l'échantillon se rapproche de la surface, plus les forces répulsives vont conduire à une augmentation de la fréquence de résonance du levier et du signal de « Damping ».

c/ En dernière partie, le nanotube se retrouve en contact permanent avec la surface. Ceci va se matérialiser avec un saut de la fréquence de résonance du levier et du signal de « Damping ».

Pour pouvoir comparer les résultats obtenus sur différentes surfaces ou avec différents nanotubes, nous présenterons par la suite les courbes de signal de « Damping » dues à l'interaction normée : $\left(\frac{Damp_{tot}}{Damp_0} - 1\right)$ (Figure V-9).

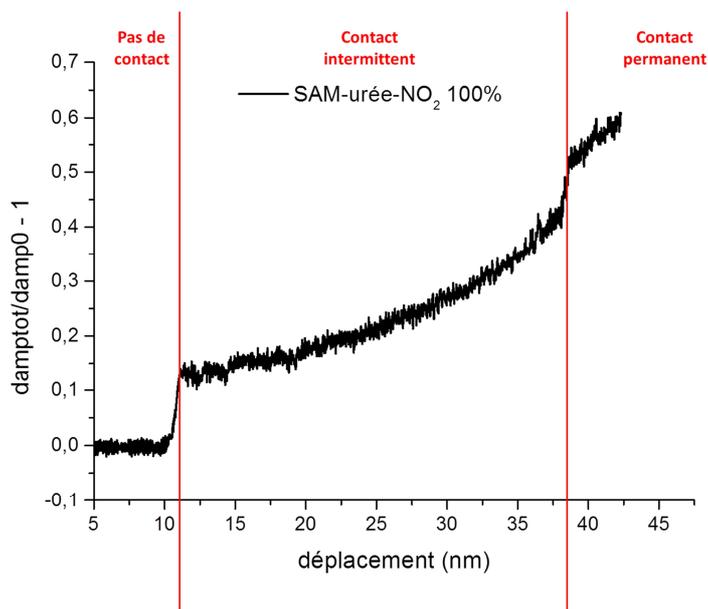


Figure V-9. Courbe du signal de « Damping » normé pour une courbe d'approche-retrait obtenue, avec un MWCNT soudé sur une pointe de raideur intermédiaire (FMR : $k = 2 \text{ N.m}^{-1}$ (valeur nominale)), sur la SAM-urée-NO₂ 100% avec une amplitude de 10 nm.

2. Réponse mécanique d'un MWCNT sur les SAMs-urée, cas d'un levier de raideur intermédiaire

a) *Reproductibilité des CAR en différents points des SAMs-urée*

Pour permettre une comparaison entre les différentes SAMs-urée, il est nécessaire de vérifier, au préalable, la reproductibilité des signaux enregistrés (décalage de la fréquence de résonance du levier et signal de « Damping ») lors de CAR en différents points de la surface.

Dans un premier temps, un MWCNT soudé sans ajout d'oxygène sur un levier de raideur intermédiaire (PPP-FMR de Nanosensors, fréquence de résonance du levier : $f_0 = 69,509 \text{ kHz}$, facteur de qualité : $Q = 142$, raideur du levier : $k_{\text{levier}} = 2,4 \text{ N/m}$) (Figure V-10), est utilisée pour effectuer 20 CAR tous les 5 nm sur une ligne de la SAM-urée-NO₂ 100% et vérifier la reproductibilité de décalage de la fréquence de résonance observé (Figure V-11).

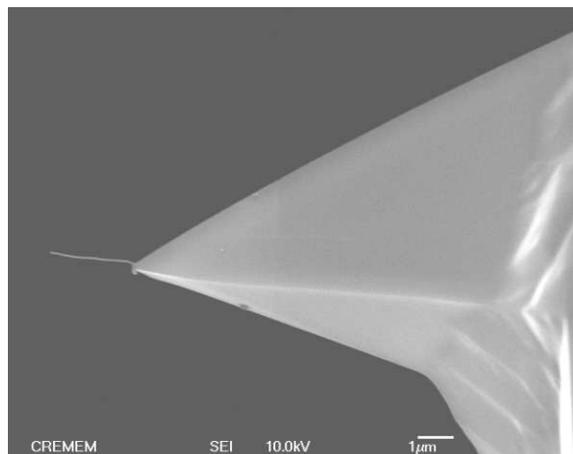


Figure V-10. Image MEB du MWCNT utilisé pour les Figure V-11, Figure V-12, Figure V-13, soudé sur un levier de raideur intermédiaire.

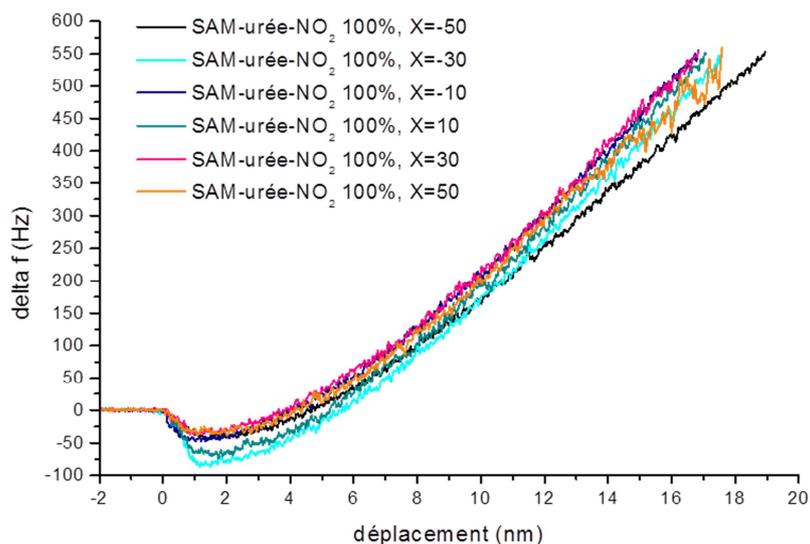


Figure V-11. Décalages de la fréquence de résonance enregistrés, en différents points de la SAM-urée-NO₂ 100%, avec une amplitude de 30 nm (par souci de clarté, uniquement 6 courbes représentatives des 20 courbes sont représentées).

Ces CAR montrent qu'il y a peu de variations du décalage de la fréquence de résonance du levier enregistré, en différents points de la surface. La même vérification est effectuée sur la SAM-urée-NO₂ 30% et la SAM-urée-CH₃ 100% (Figure V-12).

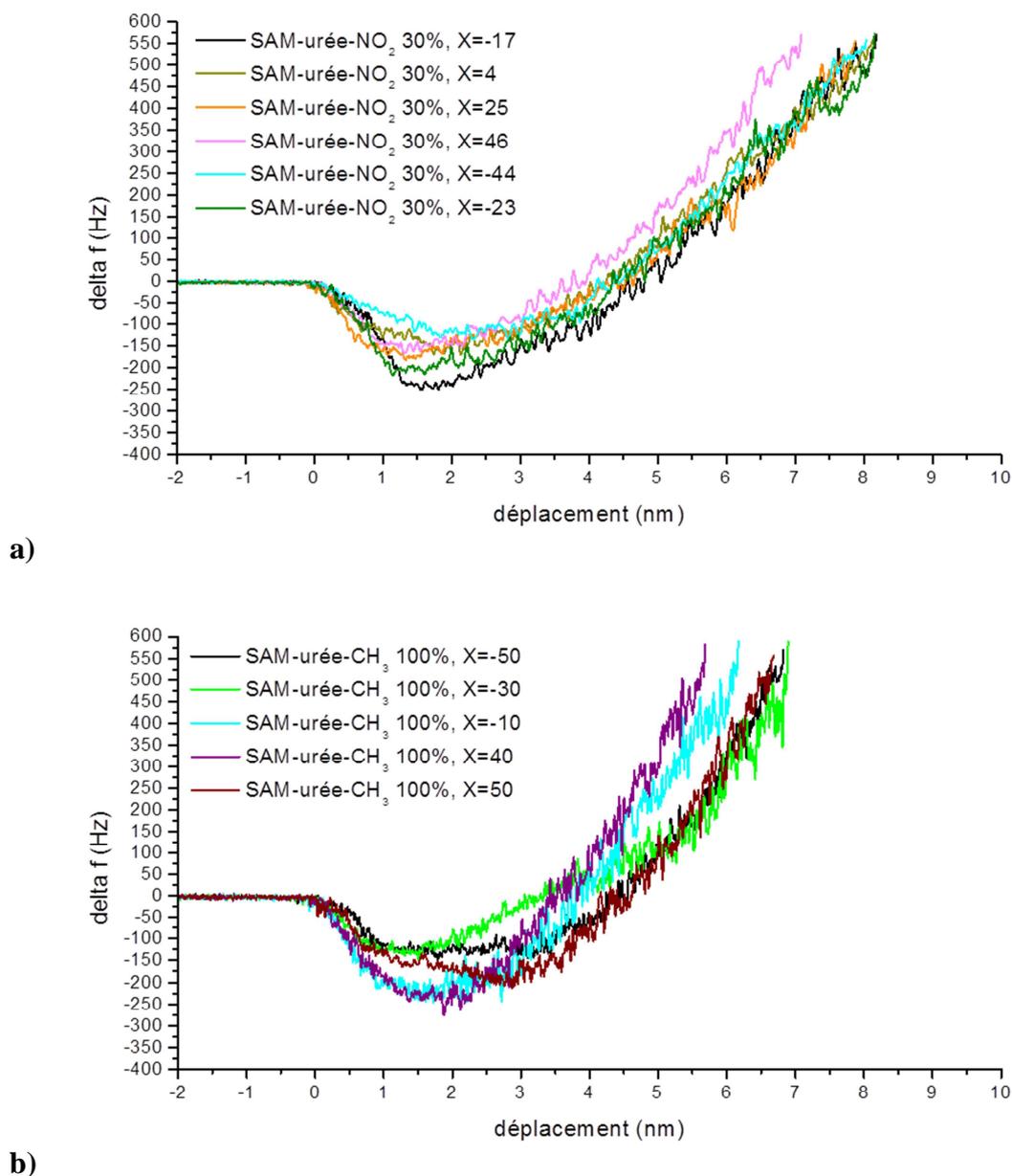


Figure V-12. Décalages de la fréquence de résonance enregistrés, en différents points de la SAM-urée-NO₂ 30% (a) et la SAM-urée-CH₃ 100% (b), avec une amplitude de 30 nm (comme précédemment seulement quelques courbes sont représentées).

Ces CAR permettent de constater qu'il en est de même pour la SAM-urée-NO₂ 30% et la SAM-urée-CH₃ 100%. Il est donc possible d'envisager une comparaison de la réponse obtenue sur les différentes SAMs-urée pour voir si une différenciation est possible.

b) Comparaison des réponses obtenues sur les différentes SAMs

La Figure V-13 compare la réponse mécanique du MWCNT précédent sur les trois types de SAMs-urée. En plus de la variation de la fréquence de résonance, la Figure V-13 représente aussi le saut de l'énergie dissipée lors de l'interaction du MWCNT avec la surface (ΔE_{int}).

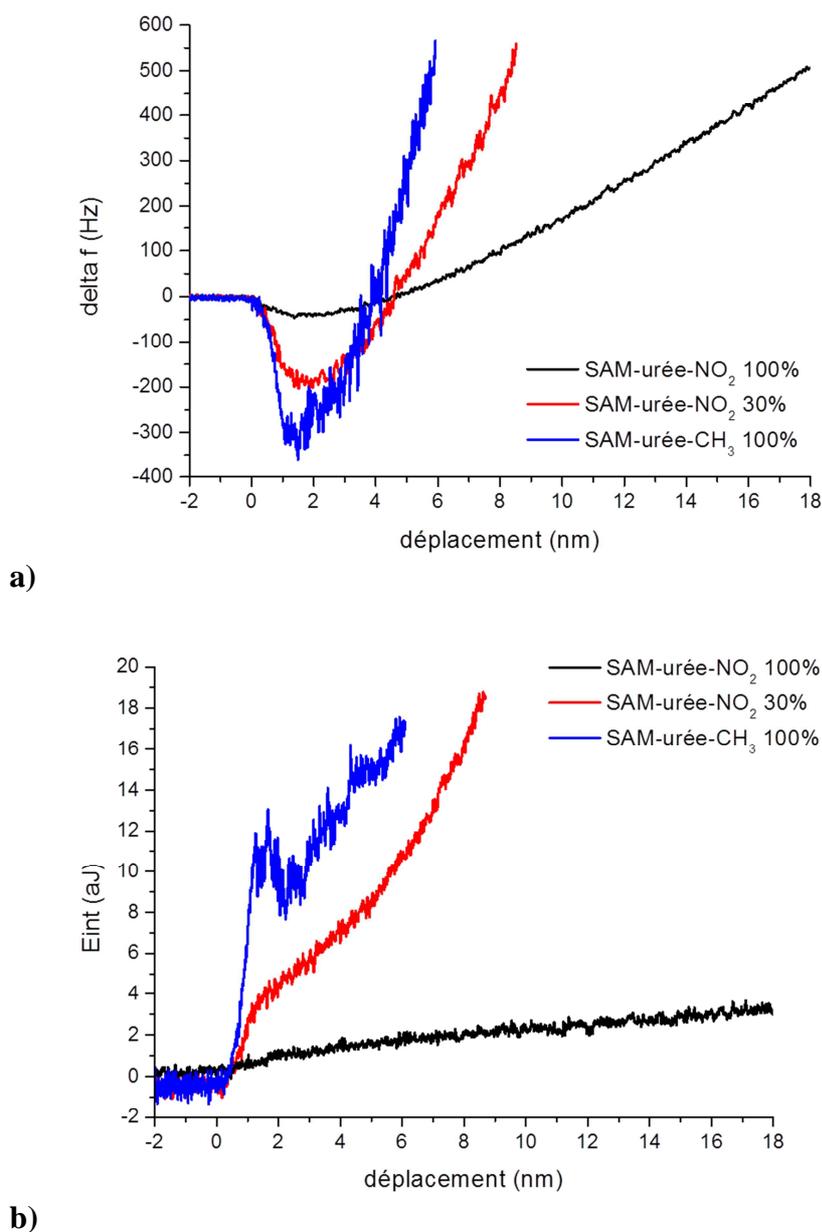


Figure V-13. Décalages de la fréquence de résonance du levier (a) et de l'énergie dissipée ($E_0 = 47,8$ aJ) (b) enregistrés pour l'approche sur les trois types de SAMs avec une amplitude de 30 nm.

Les valeurs observées pour le minimum de la fréquence de résonance (ΔF_{\min}), le saut de l'énergie dissipée lors de l'interaction (ΔE_{int}) ainsi que les valeurs des pentes ($\alpha_{\Delta F}$ et $\alpha_{E_{\text{int}}}$) sont résumées dans le Tableau V-1. Il peut facilement être noté que celles-ci augmentent lorsque la proportion du composé **4** (agent de couplage terminé CH_3) augmente. Le minimum de fréquence plus important observé pour la SAM-urée- CH_3 met en évidence la présence de plus grandes forces attractives entre celle-ci et le nanotube lors de l'approche. Le nanotube va donc plus coller sur la surface. Ceci est cohérent avec l'augmentation de la dissipation (reliée à l'énergie nécessaire pour décoller le MWCNT de la surface) et aussi avec celle plus rapide de la fréquence car le MWCNT glisse moins sur la surface.

Type de surface	ΔF_{\min} (Hz)	$\alpha_{\Delta F}$ (Hz.nm ⁻¹)	ΔE_{int} (aJ)	$\alpha_{E_{\text{int}}}$ (aJ.nm ⁻¹)
SAM-urée-NO ₂ 100%	-47	41	1,05	0,13
SAM-urée-NO ₂ 30%	-202	136	2,82	2,00
SAM-urée-CH ₃ 100%	-335	291	10,09	2,11

Tableau V-1. Récapitulatif des minima de fréquence de résonance du levier, sauts de l'énergie dissipée lors de l'interaction et pentes observés sur les trois SAMs-urée, avec une pointe de raideur intermédiaire.

*Pour conclure, les interactions entre un nanotube fixé sur un levier de raideur intermédiaire (type FMR, $k = 2,4 \text{ N/m}$) et les SAMs-urée sont plus importantes lorsque la proportion de composé **4** (agent de couplage terminé CH_3) augmente. En effet, une augmentation du minimum du décalage de la fréquence de résonance du levier montre une augmentation des forces attractives entre le nanotube et la surface. L'augmentation plus rapide de la fréquence en contact intermittent indique que le nanotube glisse moins sur la surface, ce qui lui confère une raideur plus forte. L'énergie nécessaire pour décoller augmente aussi. Nos modèles ne prévoient pas d'augmentation de la dissipation en régime de contact intermittent, mais on l'observe couramment. Il pourrait provenir de l'augmentation de la longueur de frottement lorsque le CNT s'approche des SAMs. Là encore, lorsque la proportion du composé **4** augmente, la dissipation en contact intermittent augmente plus fortement, ce qui est cohérent avec un collage plus fort.*

D'autres expériences seraient nécessaires pour valider la différence observée. Une modélisation de l'interaction (avec des méthodes ab initio par exemple) pourrait aussi aider à mieux la comprendre.

3. Evolution de la réponse mécanique d'un MWCNT selon le traitement subi par l'extrémité lors de la soudure

Nous avons montré précédemment qu'il était possible d'observer une réponse mécanique différente, suivant le type de SAMs-urée observée, lors de l'utilisation d'un MWCNT soudé sur un levier de raideur intermédiaire. Par la suite, nous avons voulu voir si une différence est aussi observée dans la réponse mécanique d'un MWCNT, suivant le traitement que subissait l'extrémité de celui-ci lors de la soudure (avec ou sans flux d'oxygène). Pour cela, nous avons choisi d'utiliser des leviers avec une fréquence de résonance et un facteur de qualité (rapport Q entre la fréquence de résonance f_0 et la bande passante Δf) plus élevés (type NCL avec une fréquence de résonance de l'ordre de 150 kHz). En effet, ceux-ci permettent d'avoir une meilleure sensibilité lors des mesures.

Des CAR ont donc été réalisées successivement sur les trois types de SAMs-urée (SAM-urée- CH_3 100%, SAM-urée- NO_2 30%, SAM-urée- NO_2 100%) avec deux MWCNT soudés sur des leviers NCL (PPP-NCL de Nanosensors : $f_0 = 152,390$ kHz, $Q = 451$, $k_{\text{levier}} = 50 \text{ N.m}^{-1}$ pour celle sans flux d'oxygène et $f_0 = 156,537$ kHz, $Q = 445$, $k_{\text{levier}} = 50 \text{ N.m}^{-1}$ pour celle avec flux d'oxygène) (Figure V-14). Cela a été effectué dans le but de voir si une différence était observée selon le traitement subi par l'extrémité du nanotube pendant la soudure (un a été soudé sous flux d'oxygène et l'autre non).

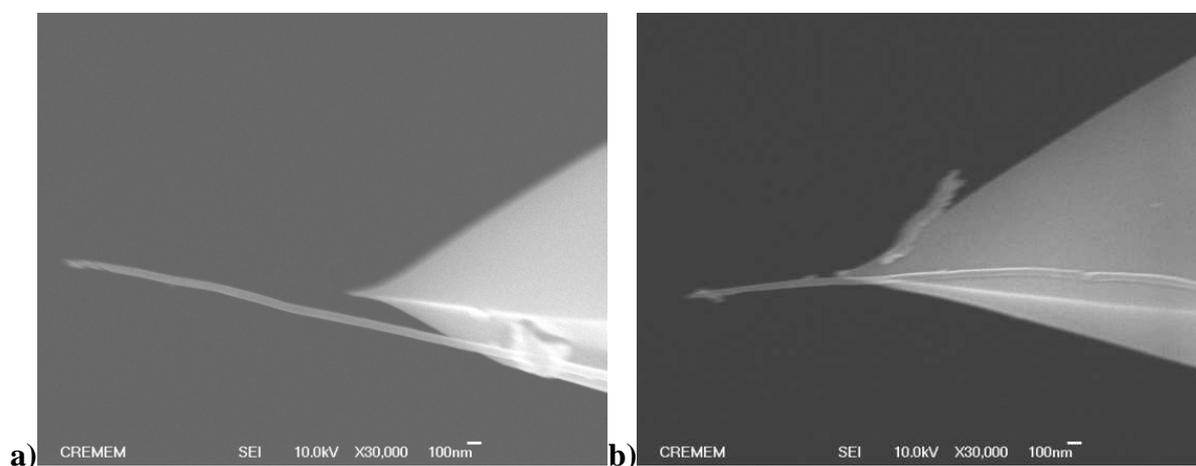


Figure V-14. Images MEB du MWCNT soudé sur un levier NCL sans flux d' O_2 (a) et de celui soudé avec flux d' O_2 (b).

Comme précédemment ces CAR ont été effectuées en mode FM avec une amplitude de 30 nm sur un AFM Dimension FastScan avec l'aide d'une électronique extérieure (PLL Nanonis OC4.5-Station).

Pour ce qui est du décalage de la fréquence de résonance du levier, les courbes observées, avec le MWCNT soudé sans oxygène (Figure V-15), montrent une variabilité un peu plus importante que celle observée précédemment, dans le cas du MWCNT soudé sur une pointe de raideur intermédiaire. Celle-ci peut être expliquée par l'enregistrement des courbes sur de plus longs déplacements pour lesquels l'interaction CNT/surface est plus forte.

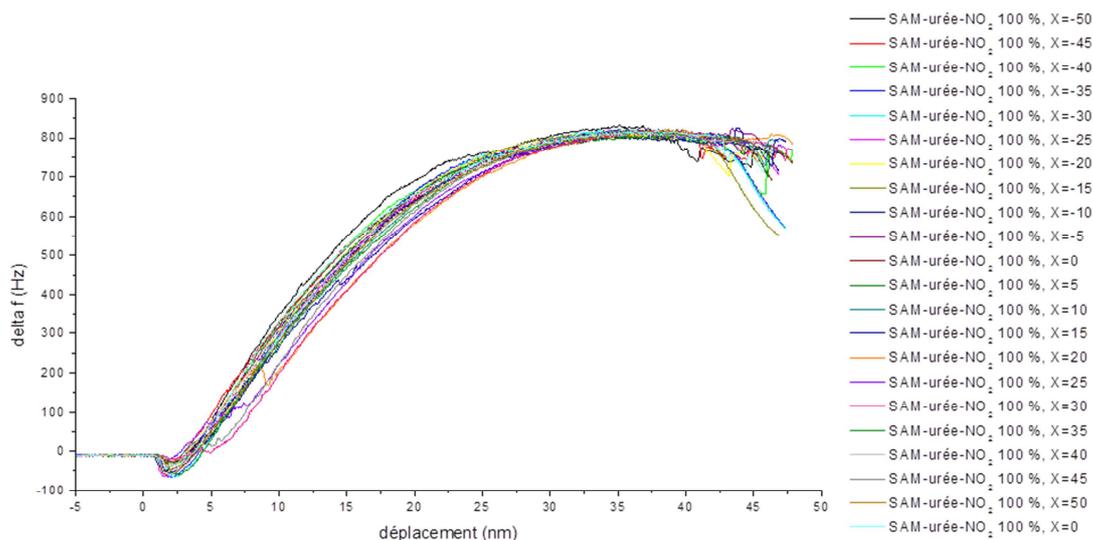


Figure V-15. Décalages de la fréquence de résonance du levier observés, en différents points de la SAM-urée-NO₂ 100%, avec un MWCNT soudé sur un levier NCL sans flux d'O₂, avec une amplitude de 30 nm.

Par contre, dans le cas du MWCNT soudé avec flux d'oxygène (Figure V-16), une plus grande variabilité des courbes obtenues pour le décalage de la fréquence de résonance du levier est observée. De plus, celle-ci ne peut pas être expliquée pour la même raison que précédemment. En effet, ici l'interaction ne va pas jusqu'au régime de contact permanent.

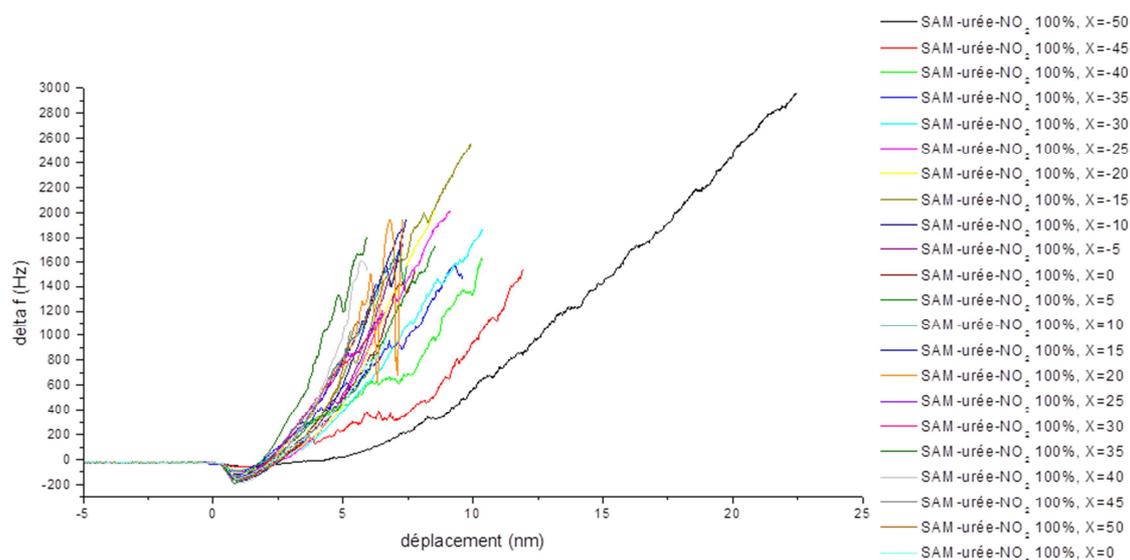
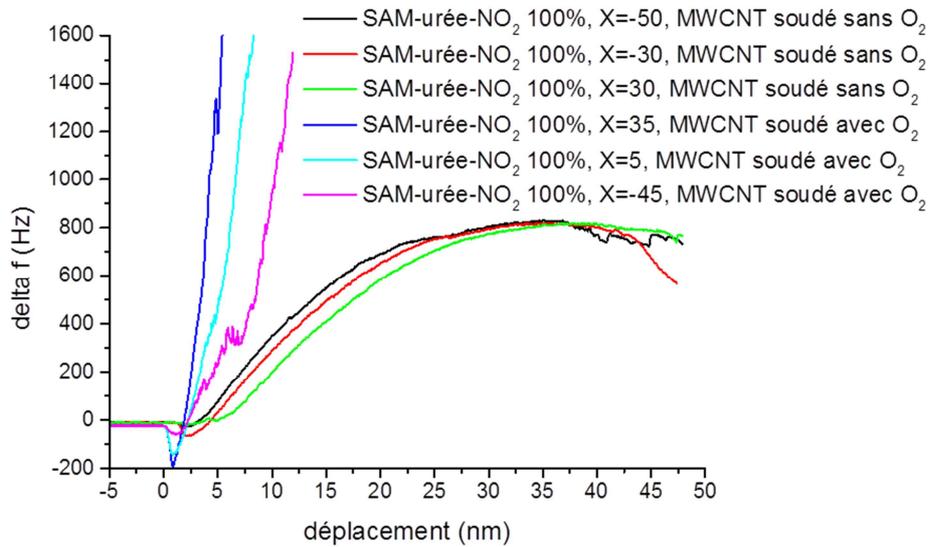
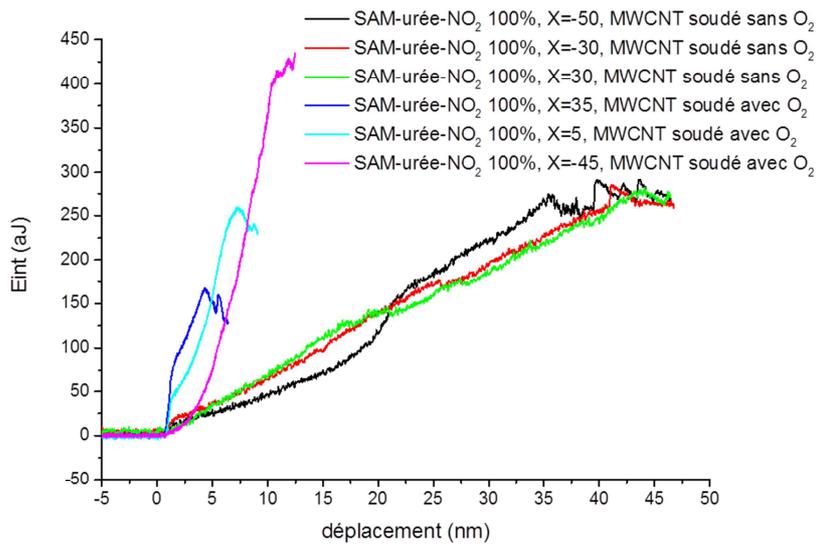


Figure V-16. Décalages de la fréquence de résonance du levier observés, en différents points de la SAM-urée-NO₂ 100%, avec un MWCNT soudé sur un levier NCL avec flux d'O₂, avec une amplitude de 30 nm.

Pour tenter de comparer les réponses des deux sondes malgré la plus faible reproductibilité des CAR pour celle soudée sous flux d'oxygène, nous avons sélectionné trois courbes pour chaque MWCNT (des courbes extrêmes du faisceau et une courbe du centre du faisceau). Ces courbes permettent d'observer un minimum pour la fréquence de résonance du levier (ΔF_{\min}) et un saut d'énergie dissipée lors de l'interaction plus important, lorsque la pointe utilisée est terminée par des fonctions acide carboxylique (voir p. 186 pour la mise en évidence de la présence de ces fonctions) (Figure V-17). Les valeurs obtenues sont résumées dans le Tableau V-2.



a)



b)

Figure V-17. Décalages de la fréquence de résonance du levier (a) et évolution de l'énergie dissipée lors de l'interaction ($E_0= 313,5$ aJ pour le MWCNT soudé sans O_2 et $E_0= 317,7$ aJ pour l'autre) (b) enregistrés pour l'approche avec les deux MWCNT, sur la SAM-urée- NO_2 100%, avec une amplitude de 30 nm.

Courbes	ΔF_{\min} (Hz)	$\alpha_{\Delta F}$ (Hz.nm ⁻¹)	ΔE_{Int} (aJ)	$\alpha_{E_{\text{Int}}}$ (aJ.nm ⁻¹)
N° 1 avec MWCNT sans O ₂	-32	52	14,4	4,7
N° 2 avec MWCNT sans O ₂	-68	49	18,5	6,0
N° 3 avec MWCNT sans O ₂	-24	37	12,5	7,5
Moyenne	-41,3	46	15,0	6,0
N° 1 avec MWCNT avec O ₂	-192	502	77,5	30,2
N° 2 avec MWCNT avec O ₂	-143	284	44,2	41,9
N° 3 avec MWCNT avec O ₂	-64	144	5,4	47,0
Moyenne	-133	310	42,3	39,7

Tableau V-2. Récapitulatif des minima de fréquence de résonance du levier, saut de l'énergie dissipée lors de l'interaction et pentes observés avec les deux MWCNT, sur la la SAM-urée-NO₂ 100%, avec une amplitude de 30 nm.

Une forte différence de la pente ($\alpha_{\Delta F}$) est notée pour la variation de la fréquence de résonance du levier de la Figure V-17. Cependant, cette différence n'est pas forcément liée à celle d'interactions entre la pointe et la surface. En effet, la pente ($\alpha_{\Delta F}$) est proportionnelle au rapport $\frac{k_{CNT}}{k_{levier}}$.⁹ Les raideurs des deux leviers sont identiques, mais les longueurs des deux MWCNT sont différentes. Or la raideur du nanotube glissant librement sur une surface est donnée par l'équation d'Euler⁶ :

$$k_{CNT} = E\pi \frac{r_{CNT}^4}{L_{CNT}^3}$$

où r_{CNT} est le rayon du nanotube, L_{CNT} sa longueur et E son module d'Young. Celle-ci dépend donc fortement de la longueur du nanotube utilisée.

Si la pente dépend uniquement de la géométrie du nanotube et non des interactions entre celui-ci et la surface et que le diamètre des CNT est considéré identique (Figure V-14), le rapport suivant entre les deux pointes doit être vérifié :

$$\frac{k_{CNT1}}{k_{CNT2}} = \left(\frac{L_{CNT2}}{L_{CNT1}}\right)^3$$

D'après la Figure V-17, les pentes moyennes du décalage de la fréquence de résonance du levier (sur les trois courbes présentées) sont respectivement $\alpha_{\Delta F1} = 310$ Hz/nm (pour celui soudé avec O₂) et $\alpha_{\Delta F2} = 46$ Hz/nm (pour celui soudé sans O₂). Le rapport $\frac{\alpha_{\Delta F1}}{\alpha_{\Delta F2}}$ est donc de 6,74. Ce rapport est proportionnel au rapport des raideurs des nanotubes.

Par ailleurs, d'après les images MEB (Figure V-14), les longueurs des deux nanotubes (la partie dépassant de la pointe) sont respectivement $L_{CNT1} = 1,05$ μm et $L_{CNT2} = 1,98$ μm . Le rapport $\left(\frac{L_{CNT2}}{L_{CNT1}}\right)^3$ est donc de 6,71. Il peut être remarqué que les rapports sont pratiquement identiques. La différence de pente observée semble être reliée à la différence de longueur des deux MWCNT.

Concernant la différence de forces attractives entre les deux nanotubes (minimum de fréquence), elle pourrait provenir d'une différence de taille de l'extrémité des MWCNT. La Figure V-18 présente des images MEB des extrémités des deux MWCNT. Celui soudé sous oxygène semble plus fin à l'extrémité (sur une centaine de nm), ce qui diminuerait la force attractive au lieu de l'augmenter. L'augmentation observée ne semble pas due à une différence de géométrie mais pourrait bien provenir de la présence de fonctions acides à l'extrémité du MWCNT soudé sous oxygène.

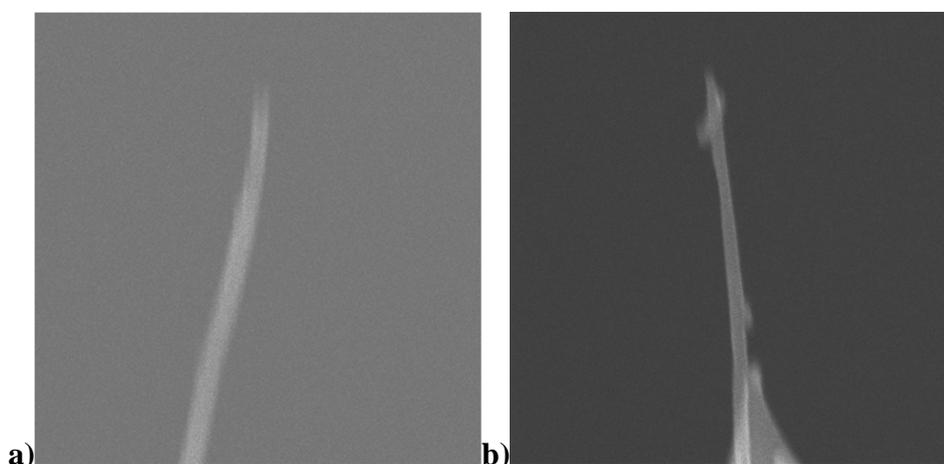


Figure V-18. Images MEB de l'extrémité du MWCNT soudé sans O₂ (a)) et du MWCNT soudé avec O₂ (b)).

Des résultats similaires ont été observés sur la SAM-urée-NO₂ 30% ainsi que sur la SAM-urée-CH₃ 100%.

Pour conclure, une moins grande reproductibilité est observée pour les CAR réalisées avec un MWCNT soudé sur une pointe NCL avec un flux d'oxygène. De plus, les forces attractives observées entre cette pointe et les différentes SAMs-urée sont plus importantes que lors de l'utilisation d'un MWCNT soudé sur une pointe NCL sans flux d'oxygène. Cela pourrait être lié à la présence de fonctions acide à l'extrémité du nanotube. Par contre, la forte différence de pente observée, sur les CAR entre les deux pointes, est principalement liée à la différence de longueur entre les deux nanotubes utilisés.

4. Images de SAMs avec des pointes AFM à MWCNT

a) Images de la SAM-urée-CH₃ 100% : comparaison pointe silicium et pointe à MWCNT et comparaison mode « tapping » et mode FM

Bien qu'elle soit toujours recherchée, la comparaison d'images AFM, obtenues avec différentes pointes, est souvent délicate, surtout lors de la comparaison d'une pointe à nanotube et d'une pointe AFM silicium. Par exemple, la force attractive nettement supérieure d'une pointe Si par rapport à une pointe à nanotube modifie fortement la balance entre les forces attractives et répulsives : de mêmes conditions apparentes peuvent aboutir à une image en mode attractif dominant pour une pointe Si et répulsif pour un CNT.

En première approche, nous comparons des images de la même surface (SAM-urée-CH₃ 100%) réalisées en mode « tapping » (ou mode AM : modulation d'amplitude) et en mode FM, avec une pointe AFM en silicium (PPP-NCL de Nanosensors : $f_0 = 160,079$ kHz, $Q = 465$, $k_{\text{levier}} = 50$ N.m⁻¹) et une pointe à nanotube (PPP-FMR de Nanosensors : $f_0 = 68,011$ kHz, $Q = 140$, $k_{\text{levier}} = 2$ N.m⁻¹).

La Figure V-19 présente des images de hauteur et de phase de la SAM-urée-CH₃ 100% obtenues avec une pointe AFM en silicium et avec une pointe AFM à MWCNT.

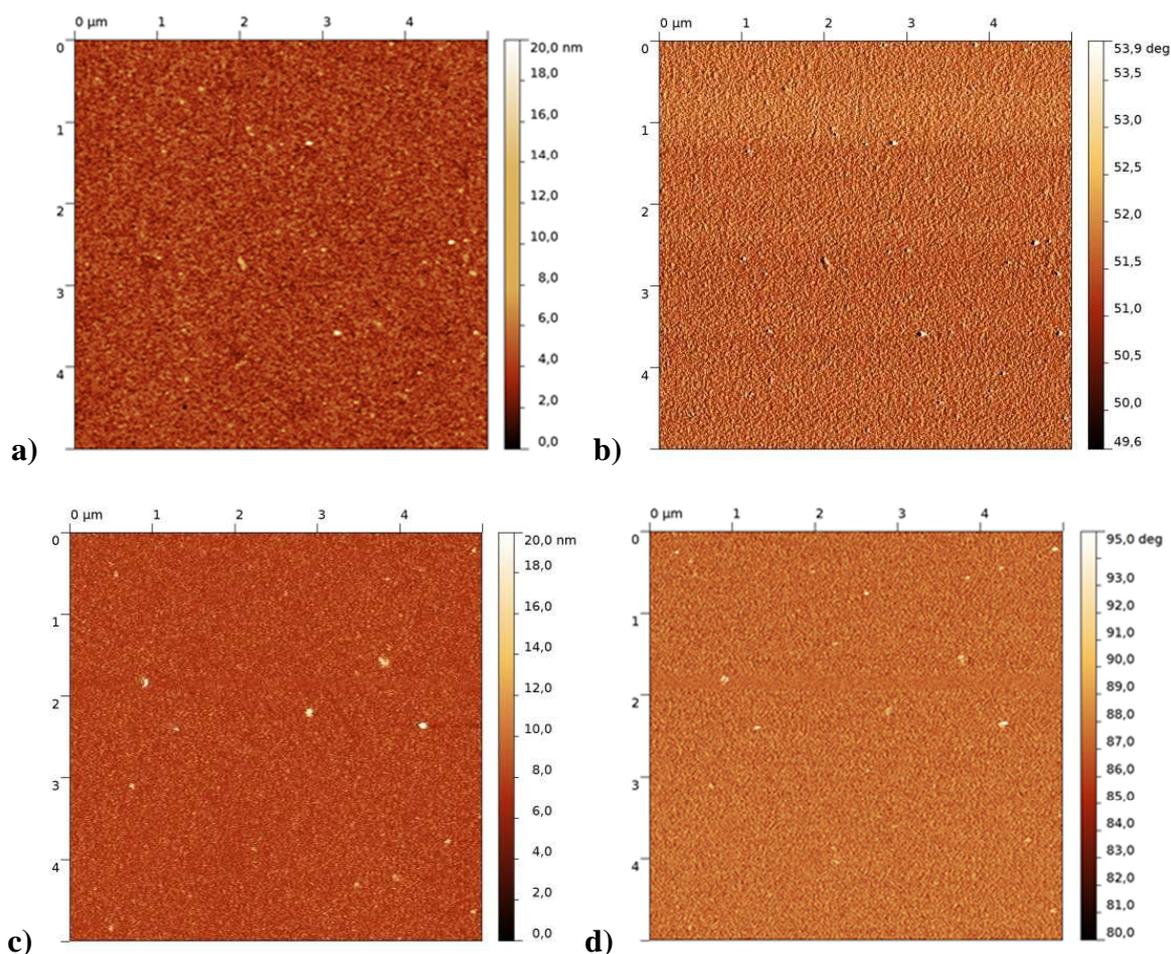


Figure V-19. Images réalisées en mode « tapping » avec une pointe silicium (hauteur : (a) et phase : (b)) et une pointe à nanotube (hauteur : (c) et phase : (d)). La consigne d'amplitude est de 26 nm pour la pointe silicium et 22 nm pour le MWCNT. La résolution est identique pour toutes les images (1024 x 1024).

Avec les deux pointes, une surface homogène avec quelques petits agrégats est observée (Figure V-19). Le Rms trouvé avec la pointe à nanotube (1,54 nm) est légèrement plus important que celui obtenu avec la pointe silicium (0,98 nm).

Pour compléter la comparaison, la Figure V-20 ci-dessous présente une image obtenue avant l'image AM avec la même pointe à MWCNT en mode FM. Rappelons qu'en mode FM, l'amplitude d'oscillation ainsi que le retard de phase sont maintenus constants, l'asservissement se fait sur le décalage de fréquence (image de hauteur) et l'on enregistre simultanément le signal de sortie du contrôle automatique de gain (Damping ou dissipation). L'état du nanotube n'était probablement pas le même, à cause d'une panne du logiciel qui pilote l'AFM. A chaque panne, la réponse du nanotube a été modifiée. Cela revient à imagier avec un MWCNT de longueur différente mais fixé sur le même levier.

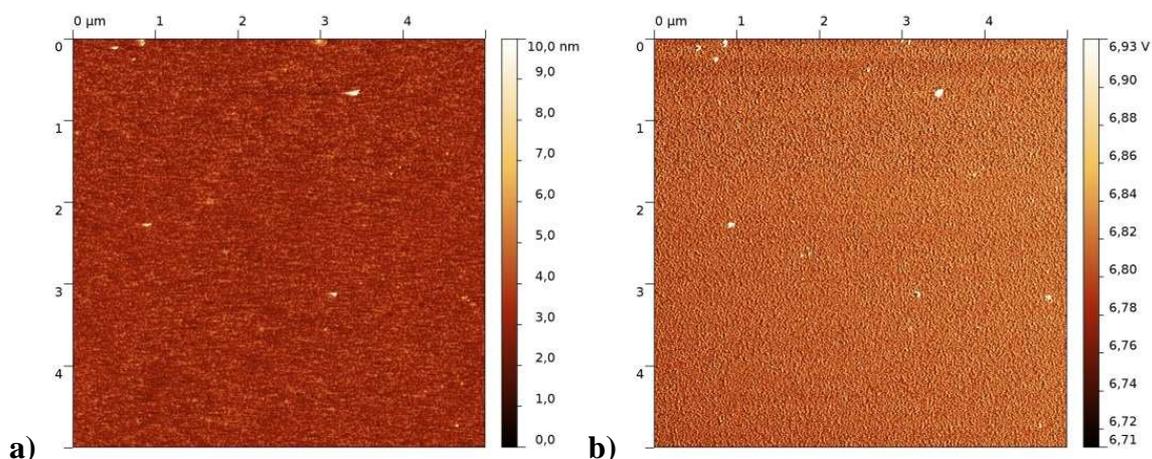


Figure V-20. Images réalisées en mode FM avec une pointe à nanotube (hauteur : (a) et dissipation : (b)). L'amplitude est de 40 nm, la consigne de fréquence est de 20 Hz.

La rugosité (Rms) de cette image est de 0,70 nm, cela correspond à la meilleure valeur obtenue pour la SAM-urée-CH₃ 100%, tous modes d'imagerie et pointes confondus.

L'histogramme de hauteur des trois images précédentes est reporté sur la Figure V-21.

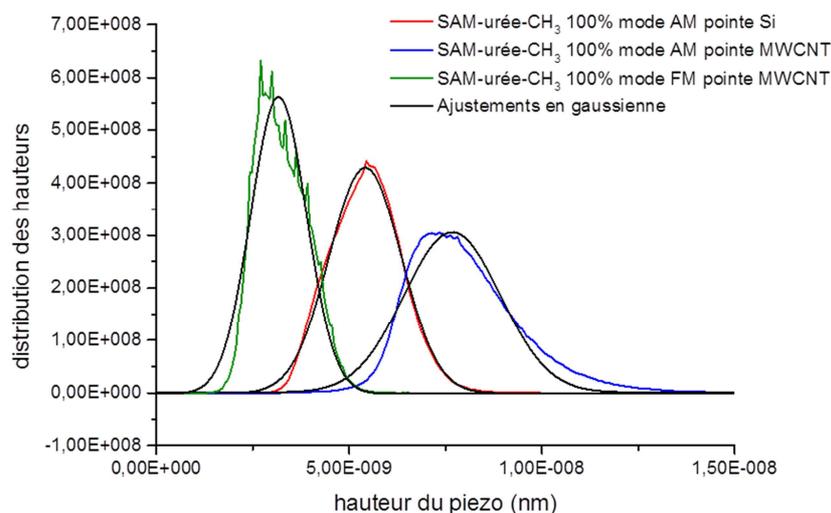


Figure V-21. Comparatif des distributions de hauteurs des images de la SAM-urée-CH₃ 100% en mode "tapping" et FM. Les courbes ont été décalées arbitrairement latéralement pour une meilleure lisibilité.

Les écarts-types des ajustements en gaussiennes de ces courbes confirment les rugosités obtenues : de gauche à droite, 1,02 nm pour celle en mode FM avec un MWCNT, 1,33 nm pour celle avec la pointe normale et 1,77 nm pour celle en mode AM avec un MWCNT.

En conclusion, ces résultats partiels (amplitudes, états du nanotube et leviers différents) confirment qu'il est possible d'obtenir des images de qualité comparable avec des MWCNT. L'utilisation de sondes à SWCNT devrait permettre d'améliorer la finesse de l'information.

b) *Particularité de l'imagerie de SAMs avec un nanotube*

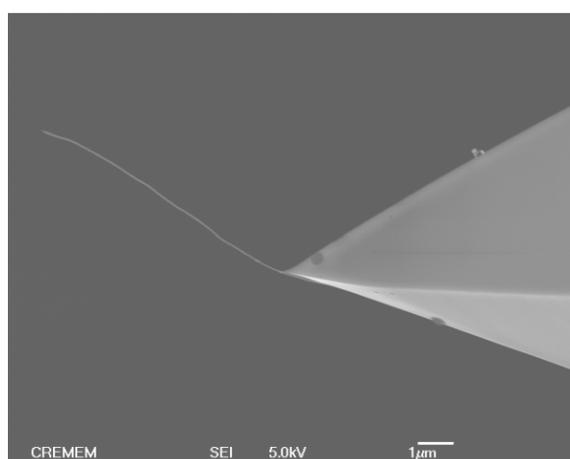


Figure V-22. Image MEB du nanotube

Des résultats surprenants obtenus avec un nanotube long (7,85 μm), comme celui de la Figure V-22, sont représentés dans la Figure V-23 ci-dessous. Sans aucune modification des paramètres, les images, en mode FM, présentent plusieurs sauts de hauteur associés à des variations du signal de Damping (dissipation). Au début, la fréquence de consigne de 2 Hz correspond à une valeur de Damping de 8,6 V. Après 0,8 μm de balayage, la hauteur baisse de 20 nm et la dissipation augmente à 9,0 V sur environ 0,2 μm . Puis, sur quelques lignes, la hauteur augmente de 10 nm avec un retour à la dissipation initiale vers 8,6 V. Finalement, la plus grande partie de l'image a une hauteur basse avec une forte dissipation. Ces changements sont détaillés dans les sections verticales de la Figure V-24 (dans la direction de balayage lent). Localement, des petites variations de hauteur de l'ordre de 5 nm sont reliées à des variations de dissipation de l'ordre de 0,2 V soit environ 3 aJ.

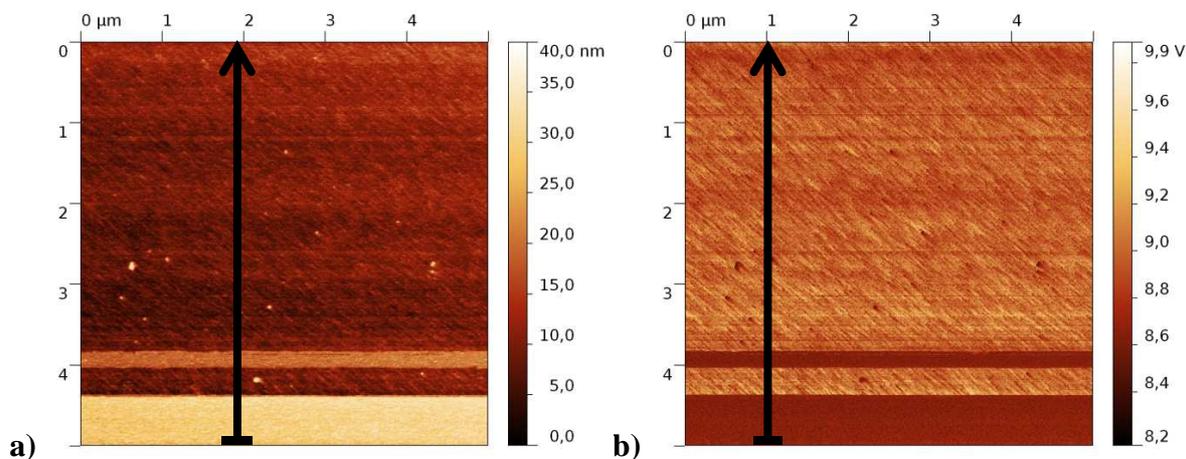


Figure V-23. Images AFM de la SAM-urée-CH₃ 100% obtenues en mode FM avec un long nanotube : images de hauteur (a) et de dissipation (b). Consigne 2 Hz, amplitude 54 nm, image enregistrée du bas vers le haut.

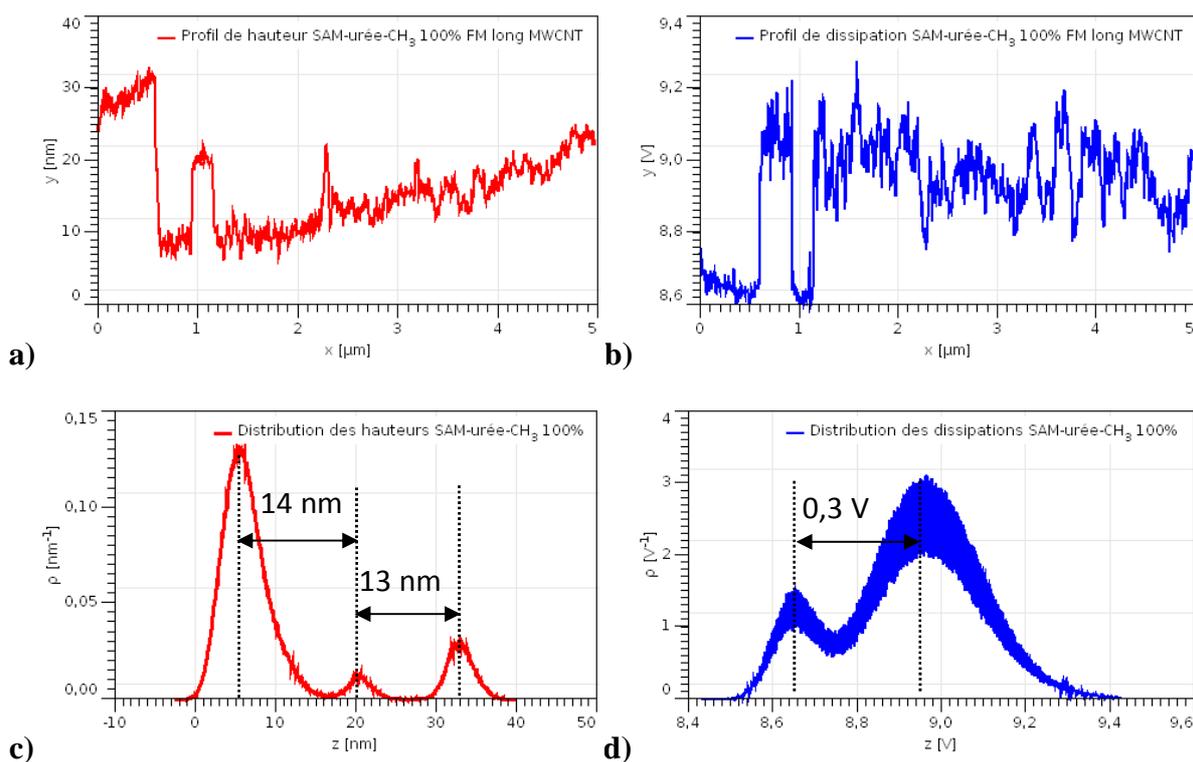


Figure V-24. Sections verticales effectuées sur 20 pixels le long des traits noirs (hauteur : a) et dissipation : b) et distributions correspondantes (en densité normée ρ (c) et d)).

Lorsque la moyenne est faite sur l'image complète, la distribution de hauteur met en évidence trois populations à 13-14 nm de différence. La distribution des valeurs de Damping

est séparée en deux populations en énergie dissipée : 8,65 V (Energie d'interaction de $E_{int} \approx 5$ aJ) et 8,96 V ($E_{int} \approx 10$ aJ).

Des changements de hauteur entre 5 nm et 30 nm au maximum peuvent paraître surprenants a priori pour une SAM de 2,5 nm de hauteur théorique. L'augmentation du signal de Damping révèle une dissipation plus forte, donc une interaction plus forte de la sonde nanotube avec la SAM, ce qui peut être relié à un glissement du MWCNT sur la surface.

Cette hypothèse est confirmée par le changement de structuration des deux images : lorsque la dissipation est faible, la surface est homogène, alors que pour les plus fortes valeurs de dissipation, le contraste révèle une anisotropie dans la direction diagonale (Figure V-25).

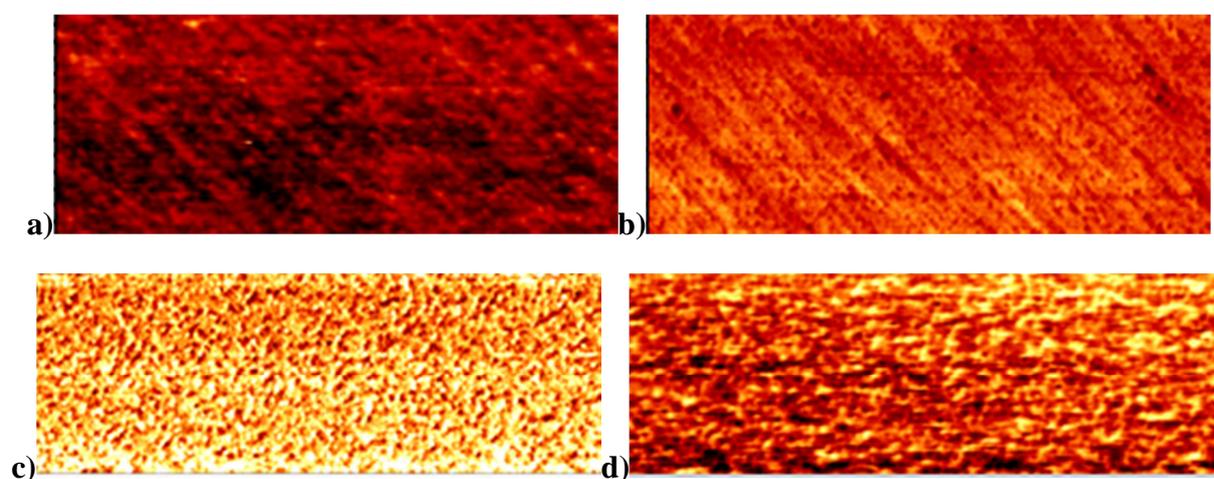


Figure V-25. Comparaison des structures des domaines de haute (a) et b)) et de faible dissipation (c) et d)) en hauteur (a) et c)) et Damping (b) et d)). Les zones sont des agrandissements des images de $0,6 \mu\text{m} \times 1,5 \mu\text{m}$, le contraste a été amplifié indépendamment pour chaque zone.

L'absence d'anisotropie du début de balayage avec la dissipation faible correspondrait à une interaction de la surface avec l'apex du MWCNT, alors que la zone majoritaire reflèterait le glissement du nanotube sur la SAM. La longueur de glissement du MWCNT serait à l'origine du décalage des hauteurs, ce qui amène la longueur de glissement à de 5 nm pour les plus petits jusqu'à 30 nm pour les plus longs. Ils pourraient être corrélés à la grande longueur du MWCNT qui le rend particulièrement flexible. (Malheureusement, la panne du logiciel ne nous a pas permis d'enregistrer les CAR correspondantes.)

Les différentes fréquences spatiales de la grande partie anisotrope de l'image de hauteur (insert) sont révélées par la Transformée de Fourier (TF) à deux dimensions présentée dans la Figure V-26.

Pour comprendre l'origine du réseau de tâches obtenu, deux exemples d'images artificielles associées à leur TF sont adossés : les lignes créent des paires de tâches perpendiculaires à celles-ci, des discontinuités dans ces lignes élargissent les tâches. Il est également possible de raisonner comme pour des clichés de diffraction de monocristaux 2D, l'image correspondra alors au réseau direct. Rappelons que, dans l'espace réciproque, des inverses de longueurs ou « fréquences spatiales » sont manipulés.

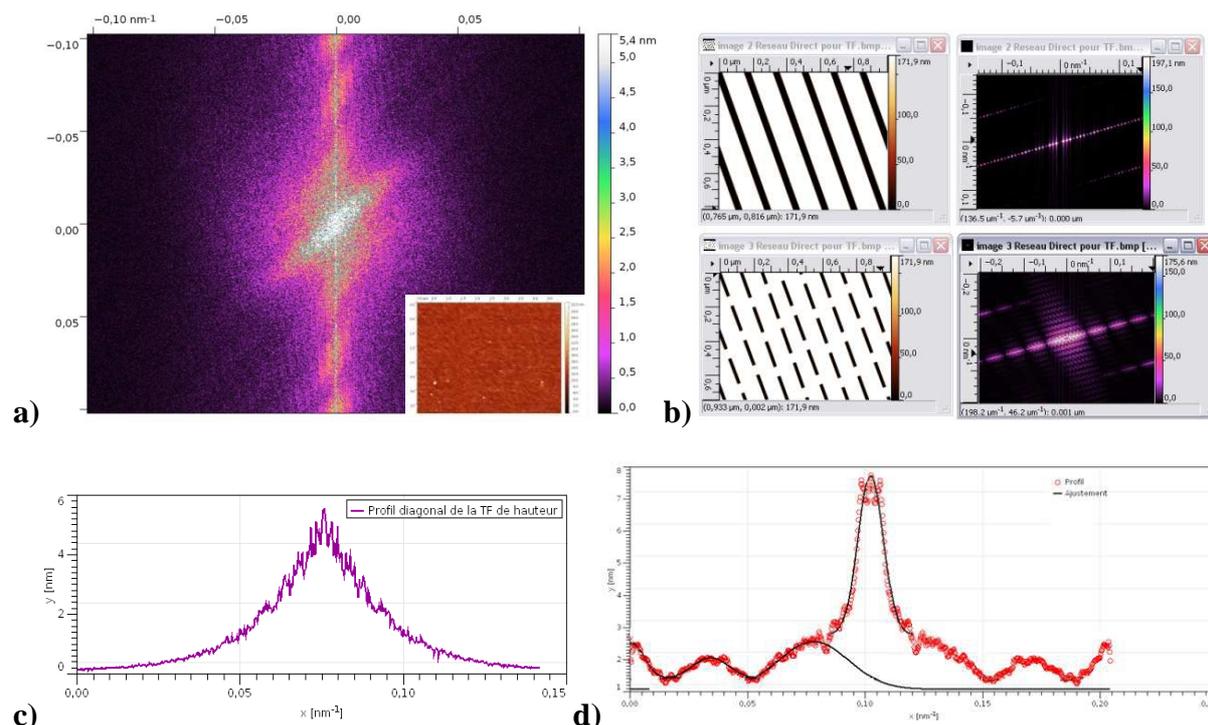


Figure V-26. Transformée de Fourier de la partie anisotrope de l'image de hauteur (insert) (a), exemples de réseaux directs et de leurs transformées (b), sections de la diagonale centrale (c) et de la verticale, filtrée de la TF (d).

Sur la diagonale, les tâches sont très rapprochées correspondant à de grandes distances (480 nm pour la tâche la plus proche du centre, puis 240 nm, 140 nm, etc..). La position de ces tâches ainsi que leur ordre de grandeur pourraient être reliés à l'empreinte de glisse du MWCNT laissée sur la SAM. La largeur du nanotube évaluée en MEB est de 45 nm.

La section verticale filtrée révèle des tâches larges qui ont été ajustées avec des gaussiennes aux positions de :

- $102.10^6 \mu\text{m}^{-1}$ pour la tâche centrale
- $78.10^6 \mu\text{m}^{-1}$ pour la 1^{ère} tâche, à $24.10^6 \mu\text{m}^{-1}$ du centre, soit à 41 nm
- $34.10^6 \mu\text{m}^{-1}$ pour la 2^{ème} tâche, à $68.10^6 \mu\text{m}^{-1}$ du centre, soit à 15 nm

On retrouve des distances proches de la longueur supposée de glissement égale aux sauts de hauteur.

Ces changements de conditions d'imagerie avec CNT sur SAM, avec glissements aléatoires semblent-ils, ont été répétés sur une autre image partielle obtenue avec ce MWCNT, comme représenté dans la Figure V-27. Des diminutions de hauteur associées à une augmentation de dissipation sont aussi retrouvées, avec une transition de contraste isotrope vers un contraste anisotrope. Les plus petits changements de hauteur locaux semblent deux fois inférieurs à ceux précédemment obtenus, la distribution des hauteurs sur toute l'image fait ressortir trois populations distantes les unes des autres d'environ 9 nm, deux niveaux d'énergie sont retrouvés.

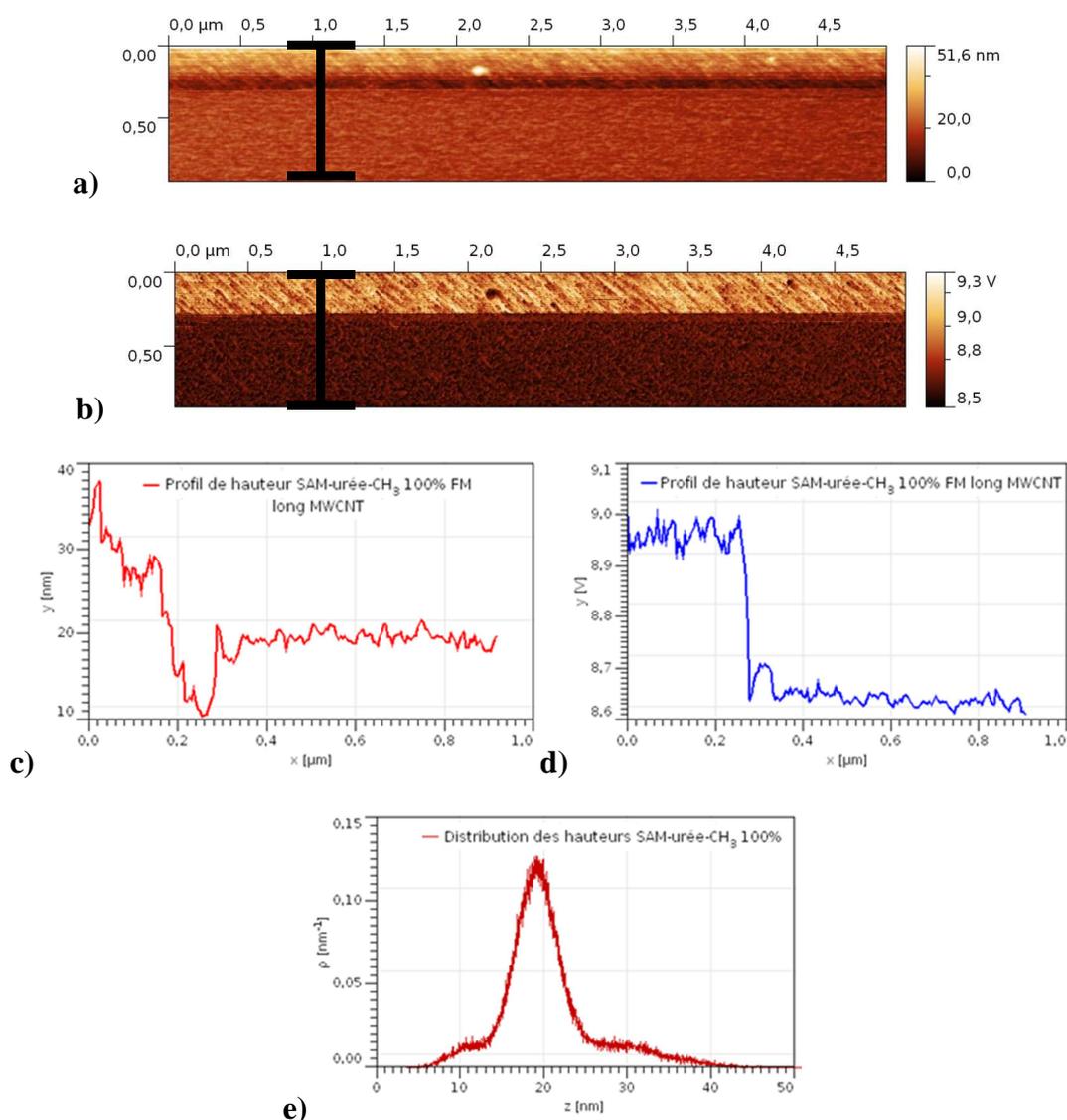


Figure V-27. Images AFM de hauteur (a) et de dissipation (b) de la SAM-urée-CH₃ 100% avec un long MWCNT et sections verticales moyennées sur 128 pixels (c) et (d)) et histogramme de hauteurs (e).

Pour conclure, nous avons développé les premières bases d'analyse de glisse aléatoire des MWCNT sur les SAMs. Ces résultats originaux sont bien entendus partiels et hypothétiques. Il est à noter toutefois que des images similaires ont été enregistrées dans le cadre du doctorat (en cours) de Ludovic Robin, en collaboration entre l'équipe du CBMN et le LETI du CEA à Grenoble. Des analyses sont en cours pour valider ou non cette analyse.

c) Robustesse des pointes à nanotube

Les pannes du logiciel ont permis de montrer la robustesse des pointes à nanotube comparées aux pointes Si. Trois pannes ont modifié le nanotube présenté dans la Figure V-22. Un agrandissement de l'attache sur la pointe est montré dans la Figure V-28 a). Nous avons pu mettre en évidence le résultat de la dernière panne sur la SAM-urée-CH₃ 100% (Figure V-29). Les images de hauteur et de dissipation révèlent le motif dû à une percée du CNT à travers la SAM. La largeur de la trace du CNT varie de 20 à 130 nm.

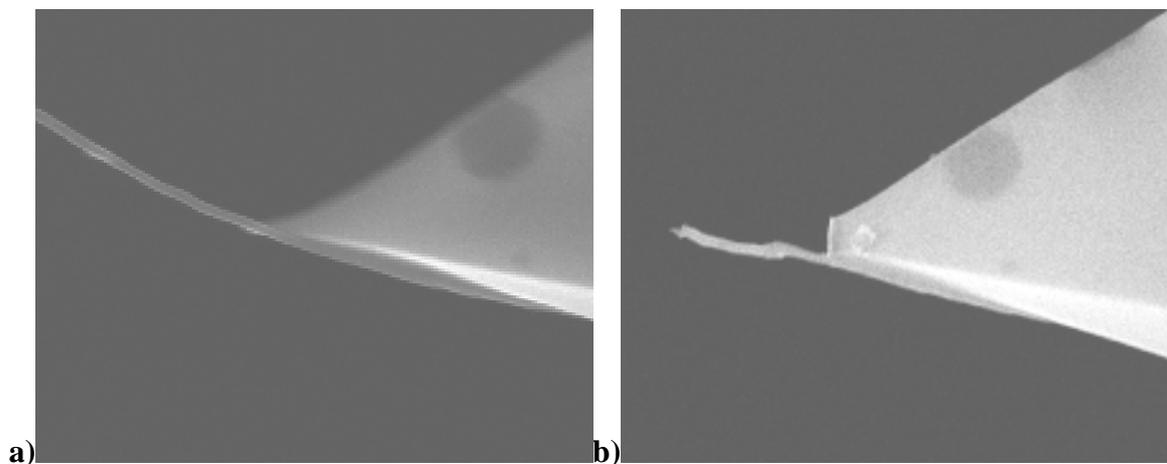


Figure V-28. Images MEB avant et après raccourcissement du nanotube lors de l'imagerie de surfaces.

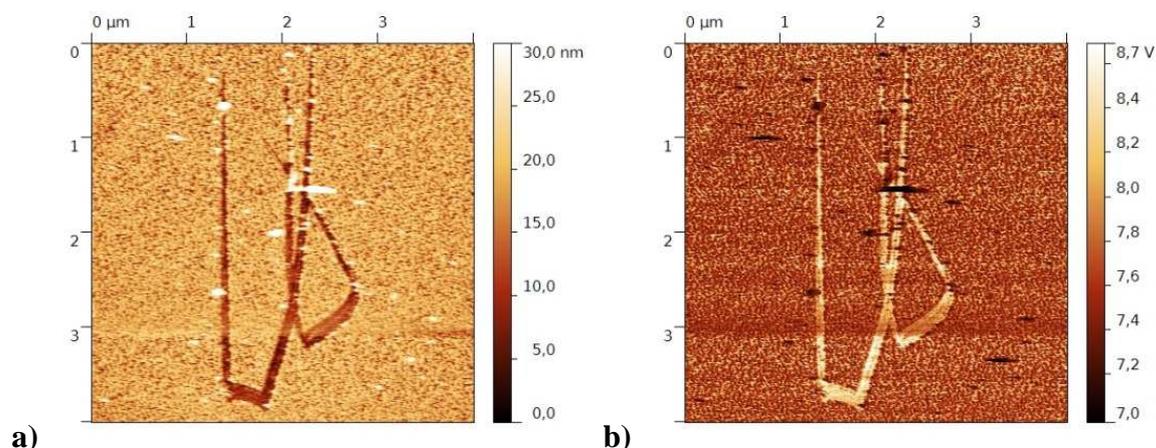


Figure V-29. Images AFM de hauteur (a) et de dissipation (b) dans une zone de la SAM-urée-CH₃ modifiée par le MWCNT.

La Figure V-28 b) montre le résultat de ces pannes sur le MWCNT qui a été raccourci de 7,85 μm à 0,6 μm . Par contre, l'apex de la pointe en silicium a été détérioré mais le MWCNT lui est toujours présent. Ceci indique que la pointe a été en contact avec le silicium du wafer. Au moment de ce contact, le nanotube a donc dû être replié. Il a donc pu supporter de grandes déformations contrairement à la pointe en silicium. Ceci est possible tant que la partie en silicium comportant la soudure n'est pas endommagée.

Nous avons donc mis en évidence, une plus grande robustesse mécanique des pointes à nanotube comparée à celle des pointes en silicium. Pour l'utilisateur, un contact violent avec la surface, peut entraîner un raccourcissement du MWCNT sans perte de celui-ci. Il est toujours possible de l'utiliser comme sonde. Au contraire, l'aplatissement d'une pointe en silicium impose un changement de système pointe-levier.

D. Biofonctionnalisation de l'extrémité du nanotube

Pour pouvoir réaliser des expériences de DFS, il est nécessaire d'immobiliser, au préalable, une biomolécule à l'extrémité du MWCNT soudé sur la pointe AFM. Pour cela, dans un premier temps, nous avons fait l'hypothèse de la présence de fonctions acide carboxylique à l'extrémité du MWCNT. Celles-ci permettent l'immobilisation de façon covalente d'une biomolécule, par la création d'une liaison amide, après une activation préalable par NHS/EDC (Figure V-30).

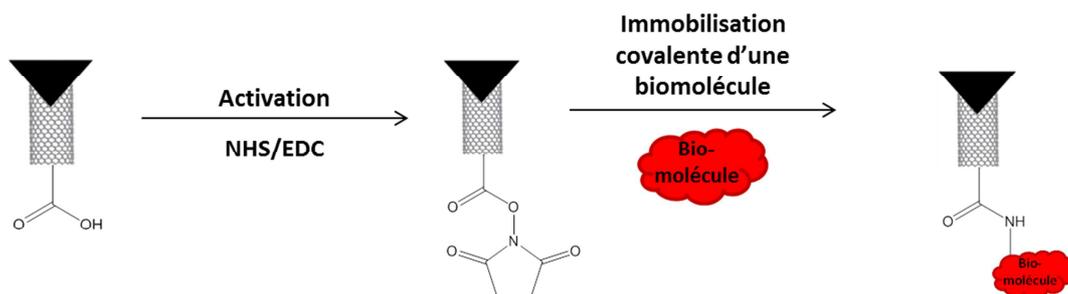


Figure V-30. Schéma des différentes étapes de la biofonctionnalisation de l'extrémité d'un MWCNT.

1. Expérience préliminaire

Actuellement la DFS est la seule technique de caractérisation permettant de mettre en évidence la fixation d'une biomolécule à l'extrémité d'un nanotube, par la mesure d'interactions spécifiques. Afin de pouvoir mettre en évidence la fonctionnalisation de l'extrémité du nanotube, par une autre technique indépendante, nous avons choisi d'immobiliser les NP-pA à l'extrémité d'un MWCNT, par la création d'une liaison amide, après activation préalable des fonctions acide carboxylique (Figure V-31). En effet, les électrons rétrodiffusés du mode BSEI du MEB, sont plus nombreux sur l'or que sur le carbone, en raison du numéro atomique plus élevé de l'or, ce qui rend les NP-pA bien visibles.

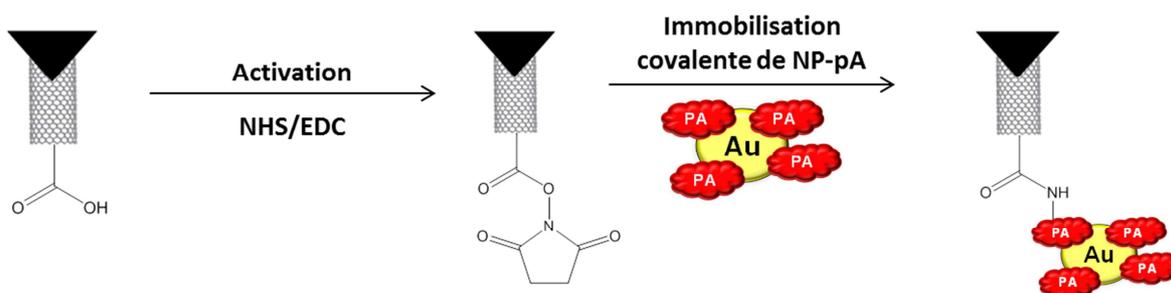


Figure V-31. Schéma des différentes étapes de la biofonctionnalisation de l'extrémité d'un MWCNT.

a) Activation des acides carboxyliques terminaux

Un procédé de fonctionnalisation spécifique de l'extrémité du nanotube a été développé au sein des Laboratoires (CBMN et ISM) dans ce but (dépôt de brevet en cours). L'activation des fonctions acide carboxylique est réalisée avec une solution aqueuse de NHS/EDC dans un tampon MES à 0,3M.

Une fois l'étape d'activation effectuée, pour éviter une hydrolyse de l'ester activé, les pointes AFM sont directement fonctionnalisées avec les NP-pA.

b) Immobilisation covalente des NP-pA sur l'extrémité du nanotube

Des NP-pA sont, ensuite, immobilisées sur le nanotube avec le même procédé que celui utilisé précédemment pour l'activation.

Une fois la manipulation effectuée, la pointe est donc caractérisée au MEB afin de voir si des NP-pA ont été immobilisées. Les images MEB (Figure V-32) confirme la présence du MWCNT qui a résisté à la manipulation. Cependant aucune NP-pA n'est observée sur le nanotube en mode BSEI. Il n'y a donc pas de fonctionnalisation de l'extrémité du MWCNT avec les NP-pA.

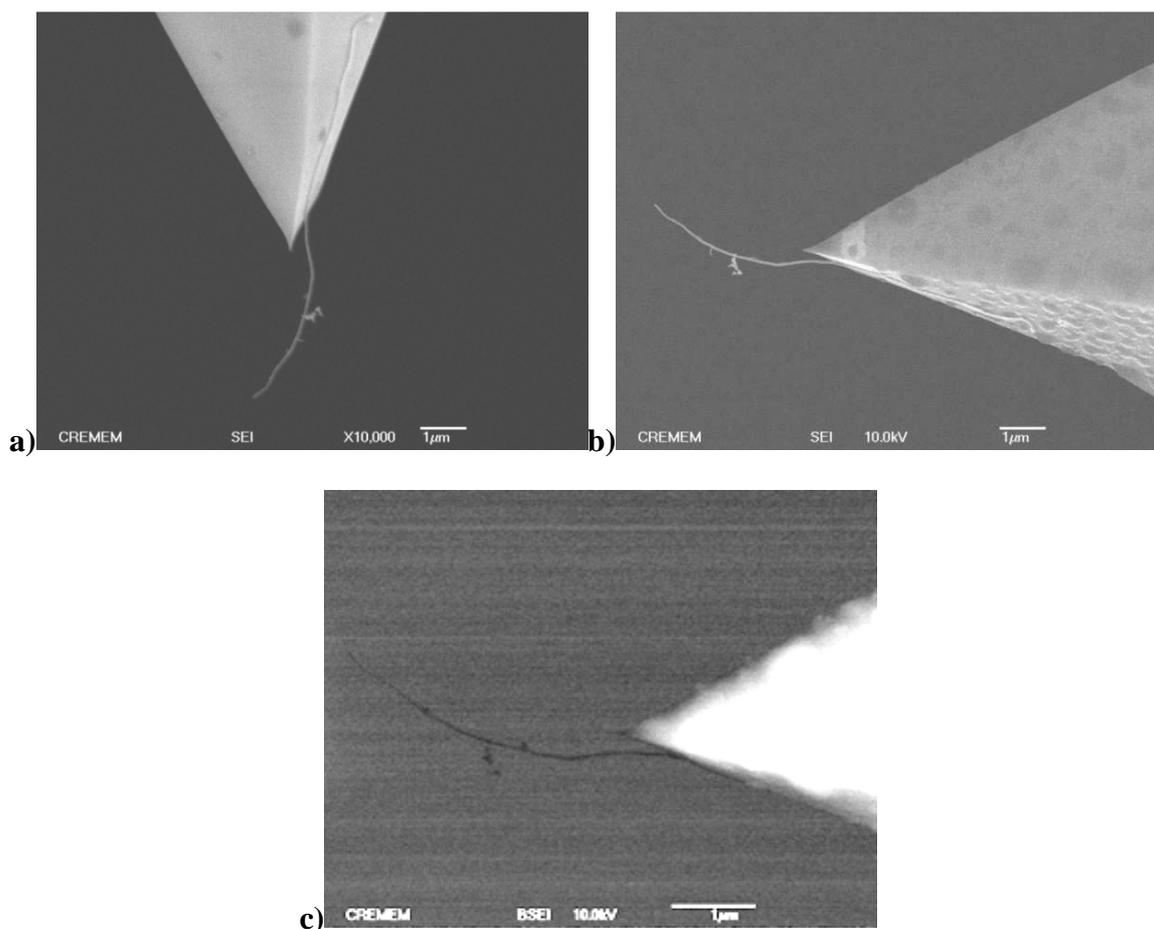


Figure V-32. Images MEB d'un MWCNT soudé sur une pointe AFM pour vérifier l'immobilisation de NP-pA (a) pointe avant manipulation, b) pointe après manipulation, c) pointe après manipulation en mode BSEI).

Une expérience similaire a été réalisée avec un SWCNT. L'absence de NP-pA a aussi été observée.

L'hypothèse que nous avons faite au départ, à savoir la présence de fonctions acide carboxylique à l'extrémité du MWCNT, n'est donc pas vérifiée. Il est donc nécessaire de réaliser une oxydation du nanotube afin de créer des fonctions COOH à l'extrémité de celui-ci. Toutefois, cette expérience met en évidence l'absence d'adhésion non-spécifique des NP-pA sur le nanotube.

2. Oxydation de l'extrémité du MWCNT

Pour créer des fonctions acide carboxylique à l'extrémité du nanotube, l'oxydation du MWCNT à l'aide d'une solution d'acide sulfurique et nitrique (H_2SO_4/HNO_3)¹¹ n'est pas envisageable. En effet, le trempage des leviers et pointes AFM munies d'un nanotube dans cette solution n'est pas possible. Les pointes et leviers risqueraient d'être attaqués par l'acide et donc d'être détériorés. De plus, pour fonctionnaliser uniquement l'extrémité du nanotube, une oxydation sélective de celle-ci est préférable. C'est pourquoi, une oxydation du MWCNT grâce à un apport local d'oxygène, dirigé au plus près de la pointe, au moment de sa rupture lors de la soudure a été envisagée (Figure V-33). Ce flux d'oxygène localisé permet l'oxydation de l'extrémité du nanotube au moment de sa rupture. Il est toutefois aussi possible de créer des fonctions acide carboxylique à d'autres endroits du nanotube où des défauts seraient présents.

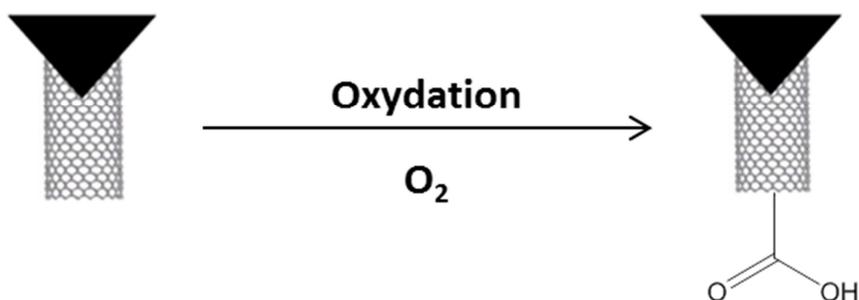


Figure V-33. Schéma de l'étape d'oxydation du nanotube.

Le procédé utilisé pour la croissance des SWCNT au Laboratoire (CBMN) consiste à les faire croître directement sur la pointe. Il n'y a donc pas d'étape de soudure. Il n'est donc pas possible de réaliser l'oxydation de l'extrémité du SWCNT de la même manière que pour les MWCNT. Comme cela aurait nécessité le développement d'une autre méthode

¹¹ Jiang K., Schadler L.S., Siegel R.W., Zhang X., Zhang H., Terrones M. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 37-39.

d'oxydation plus difficile à mettre en œuvre, seuls les MWCNT seront utilisés pour le reste des expériences de fonctionnalisation.

3. Validation de la création de fonctions acide carboxylique et de la fonctionnalisation de l'apex du MWCNT

Afin de vérifier la réussite des étapes d'oxydation de l'extrémité du MWCNT lors de la soudure et de fixation des NP-pA à l'extrémité du MWCNT, les mêmes étapes d'activation et d'immobilisation covalente que précédemment sont réalisées.

Les pointes AFM sont ensuite caractérisées au MEB pour mettre en évidence la présence de NP-pA.

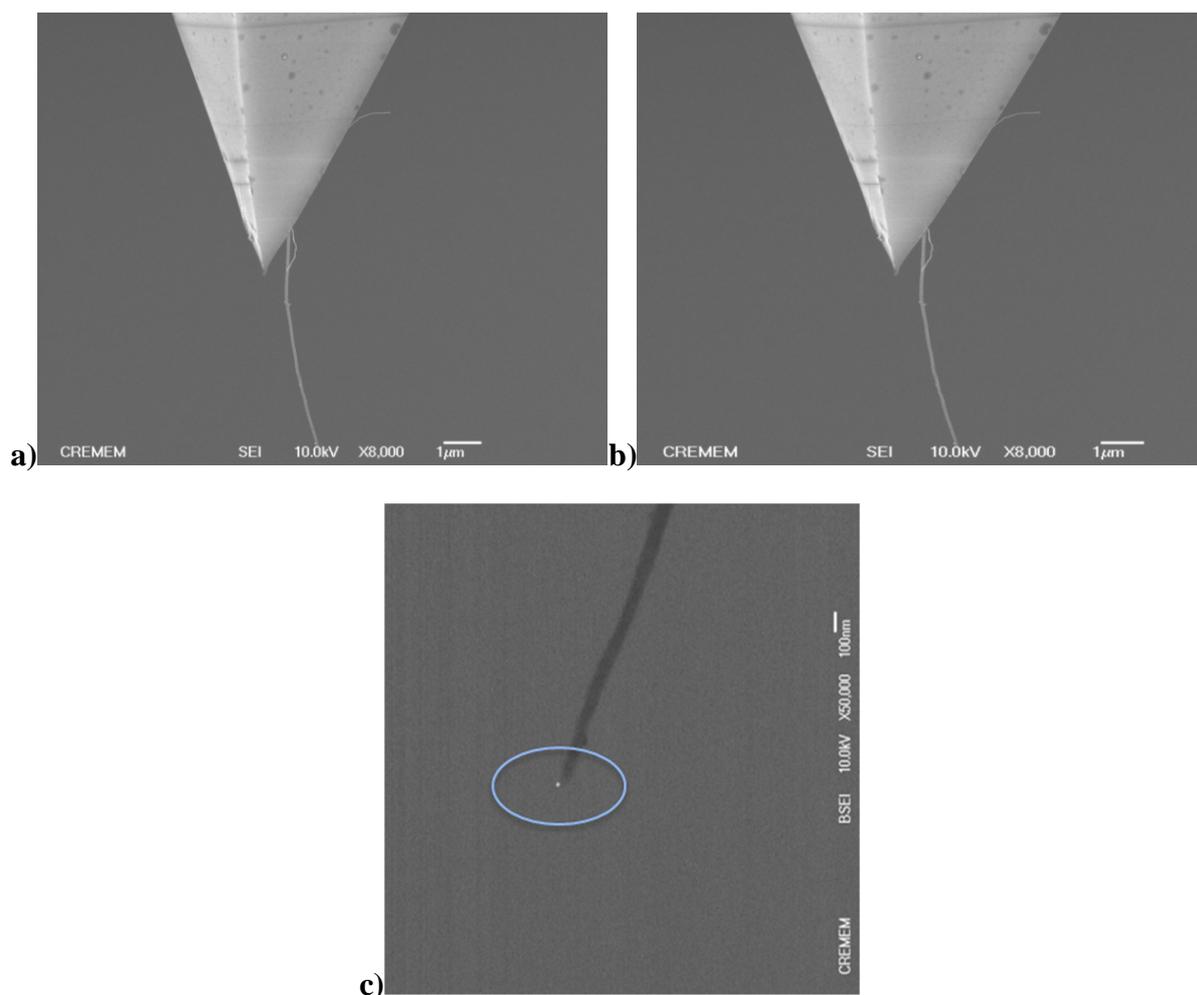


Figure V-34. Images MEB d'une pointe AFM munie d'un MWCNT fonctionnalisé avec une NP-pA (a) pointe avant immobilisation, b) pointe après immobilisation, c) zoom sur l'extrémité du MWCNT en mode BSEI.

Sur les images MEB (Figure V-34), l'observation après immobilisation (b)) montre que le nanotube ne présente aucune différence notable par rapport à son aspect avant immobilisation (a)). De plus, sur un zoom effectué en mode BSEI sur l'extrémité du nanotube (c)), une fonctionnalisation sélective de l'extrémité du nanotube avec une NP-pA est observée. Ces résultats ont été reproduits sur plusieurs pointes.

Pour conclure, l'efficacité de la soudure avec flux d'oxygène, pour créer des fonctions acide carboxylique, a été mise en évidence. De plus, il a aussi été démontré la possibilité d'une immobilisation covalente d'une NP-pA, après une étape d'activation préalable avec NHS/EDC, à l'extrémité du MWCNT. Aucune adhésion non spécifique des NP-pA sur le MWCNT n'a été établie lors de l'absence de fonctions acide carboxylique à l'extrémité du nanotube.

4. Biotinylation de l'extrémité du nanotube

Dans le but de faire des expériences de DFS sur le couple biotine/streptavidine, l'extrémité d'un MWCNT est fonctionnalisée avec une biotine par l'intermédiaire d'un espaceur PEG terminé par une fonction NH_2 (Figure V-35). Comme précédemment, une étape d'activation préalable des fonctions acide carboxylique par une solution de NHS/EDC est nécessaire.

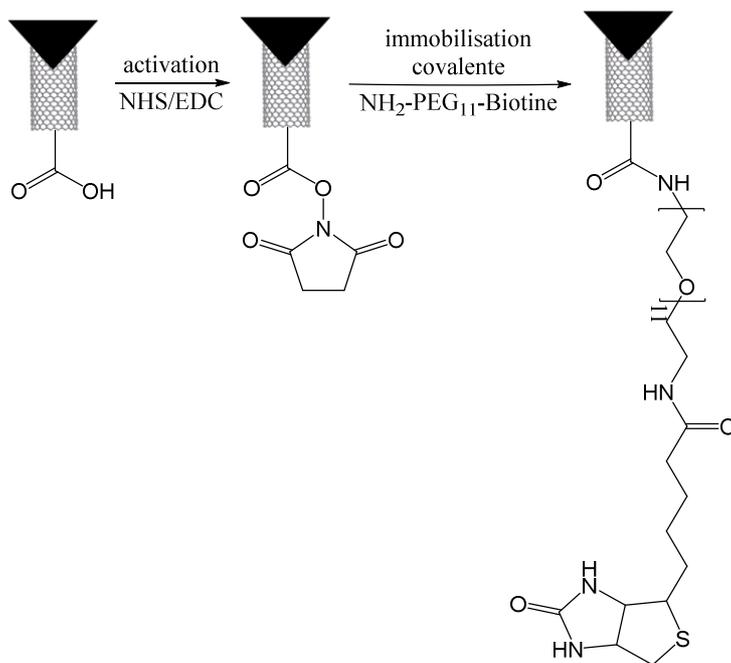


Figure V-35. Schéma de l'immobilisation de la biotine à l'extrémité d'un MWCNT.

Celle-ci est réalisée à l'aide du même procédé que celui utilisé précédemment (cf. p. 183). Les pointes AFM sont ensuite directement fonctionnalisées avec l'espaceur NH₂-PEG₁₁-Biotine afin d'éviter une hydrolyse de l'ester activé.

L'immobilisation d'une biotine à l'extrémité du MWCNT est réalisé à l'aide d'un espaceur NH₂-PEG₁₁-Biotine (fournisseur : Thermo Scientific Pierce). Celui-ci est mis en solution dans du tampon MES à 0,1 M ajusté à pH 5,5 avec une solution de NaOH (0,5 M). La concentration en espaceur dans cette solution est de $C_{\text{espaceur}} = 2 \mu\text{g/mL}$. L'immobilisation de la biotine est réalisée selon le même procédé que précédemment.

Pour les expériences de DFS, cette fonctionnalisation sera aussi effectuée sur des nanotubes soudés sur des pointes AFM à constantes de raideur plus faibles que les FMR ou NCL utilisées précédemment ($k < 0,1 \text{ N/m}$ contre $0,5 \leq k \leq 9,5 \text{ N/m}$ pour les FMR et $21 \leq k \leq 98 \text{ N/m}$ pour les NCL). En effet, plus la constante de raideur est faible, meilleure sera la sensibilité pour les expériences de DFS.

La fonctionnalisation du nanotube avec la biotine sera démontrée ultérieurement par la mesure d'interactions spécifiques lors des expériences de DFS.

E. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord montré qu'il était possible de faire croître des MWCNT par CCVD sur un fil de Pt/Ir à l'aide d'un catalyseur à base d'ions Fe(III) et d'éthylène comme source de carbone. En effet, l'observation du fil au MEB après la croissance permet d'observer un tapis de MWCNT recouvrant le fil.

Ensuite, nous avons établi la possibilité de souder ces MWCNT sur des pointes AFM par la fusion locale d'un fin film de nickel recouvrant les pointes. L'apport d'un flux d'oxygène proche de la pointe au moment de la soudure permet l'oxydation de l'extrémité du nanotube et la création des fonctions acide carboxylique.

Ces pointes AFM munies d'un nanotube ont été utilisées pour caractériser les différentes SAMs-urée (SAM-urée-CH₃ 100%, SAM-urée-NO₂ 30%, SAM-urée-NO₂ 100%). Il a été mis en évidence qu'avec une même pointe des interactions plus importantes étaient observées entre la pointe et la SAM lorsque la proportion du composé **4** (agent de couplage terminé CH₃) était plus importante. Il a aussi été révélé que des forces attractives plus importantes étaient observées entre la pointe et la SAM lorsque la pointe AFM utilisée était munie d'un nanotube terminé par des fonctions acide carboxylique.

La possibilité de réaliser des images de qualité comparable avec un MWCNT et avec une pointe AFM a été montrée. De plus, les premières bases de l'étude du glissement aléatoire des MWCNT sur les SAMs ont été développées. Ces deux derniers résultats sont issus d'études préliminaires et nécessitent d'être confirmés par d'autres analyses. Pour finir, la plus grande robustesse mécanique des pointes à nanotubes a été mise en évidence.

A l'aide d'un procédé original de fonctionnalisation spécifique de l'extrémité du nanotube, développé aux Laboratoires (CBMN et ISM), des NP-pA, ont été immobilisées de façon covalente sur des MWCNT soudés sur une pointe AFM, après activation préalable des fonctions acide carboxylique, afin de prouver que l'étape d'oxydation avait créé des fonctions acide carboxylique et qu'il était possible de fonctionnaliser de manière sélective l'apex des MWCNT.

Pour finir, le même procédé a été utilisé pour fonctionnaliser des MWCNT soudés sur des pointes AFM, avec une biotine à l'aide d'un espaceur PEG terminé par une fonction NH_2 . Comme le but est d'effectuer des expériences de DFS sur le couple biotine/streptavidine et de mesurer des interactions uniques, cette fonctionnalisation a été réalisée sur des pointes AFM à faibles constantes de raideur ($k < 0,1 \text{ N/m}$). En effet, plus faible est la constante de raideur, meilleure sera la sensibilité en DFS.

VI. Chapitre VI :

Mesure d'interactions ligand-récepteur par Spectroscopie Dynamique de Force (DFS)

Afin d'améliorer la clarté de ce chapitre, quelques rappels bibliographiques sur la Spectroscopie Dynamique de Force sont, tout d'abord, effectués.

A. Rappel bibliographiques sur la Spectroscopie Dynamique de Force (DFS)

La DFS est un des outils les plus prometteurs et les plus puissants pour l'obtention d'informations sur les processus de reconnaissance biologiques à l'échelle de la molécule unique.¹ En effet, elle permet de caractériser le paysage énergétique d'une rupture entre deux biomolécules (brins d'ADN², protéine-ions^{3,4}, protéine-protéine⁵), à l'aide d'un appareil d'AFM, avec une sensibilité de l'ordre du piconewton, dans des conditions quasi-physiologiques et sans aucun marquage (Figure VI-1).

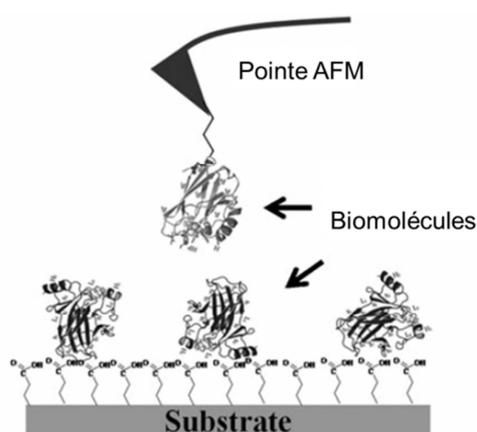


Figure VI-1. Schéma d'une expérience de DFS entre deux biomolécules.¹

¹ Bizzarri A.R., Cannistraro S. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 734-749.

² Jung Y.J., Hong B.J., Zhang W., Tendler S.J.B., Williams P.M., Allen S., Park J.W. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 9349-9355.

³ Odorico M., Teulon J-M., Bessou T., Vidaud C., Bellanger L., Chen S-w. W., Quéméneur E., Parrot P., Pellequer J-L. *Biophys. J.* **2007**, 93, 645-654.

⁴ Teulon J-M., Parot P., Odorico M., Pellequer J-L. *Biophys. J.* **2008**, 95, L63-L65.

⁵ Sulchek T.A., Friddle R., Noy R.W. *Biophys. J.* **2006**, 90, 4686-4691.

1. Paramètres importants

Bien que la DFS présente un fort potentiel pour l'étude des interactions de complexes biologiques, à l'échelle de la molécule unique, certaines études révèlent parfois des résultats ambigus et controversés suivant les conditions expérimentales et les logiciels de modélisations utilisés.^{6,7} Cela a montré à quel point, il était important d'apporter un grand soin aux procédures expérimentales et d'analyses pour éliminer tous les inconvénients et artefacts qui pourraient remettre en cause le succès des mesures par DFS. Le contrôle de certains paramètres est donc très important afin d'obtenir des résultats fiables.

a) *Contrôle de l'immobilisation des biomolécules*

L'immobilisation des biomolécules sur un substrat est une étape critique dans tout type de bio-détecteur comme l'a montré une étude récente sur l'interaction avidine-biotine.⁸ Il est également connu que l'adsorption de protéines sur un support minéral peut provoquer une dénaturation partielle ou totale de celles-ci, comme observé avec la protéine A.⁹ De plus, l'orientation des objets biologiques déposés reste un problème majeur. Par exemple, dans le cas d'un immunotest, une réponse bien plus importante est observée si la protéine est modifiée de manière à avoir une orientation contrôlée.¹⁰ Des résultats similaires sont observés lors de la fixation d'anticorps sur un substrat plan.^{11,12}

Pour contrôler l'immobilisation des biomolécules sur la pointe, des espaceurs sont utilisés. Le plus souvent, il s'agit de poly(éthylène glycol) hétérobifonctionnels.¹³ Ceux-ci présentent plusieurs avantages. Par exemple, en augmentant la distance entre la pointe et la biomolécule, ils diminuent la distorsion et la dénaturation de cette dernière dues aux interactions avec la surface.¹⁴ En augmentant leur mobilité et en leur donnant plus de liberté d'orientation, ils favorisent aussi la reconnaissance entre les deux biomolécules.

⁶ Dudko O.K., Filippov A.E., Klafter J., Urbakh M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 11378-11381.

⁷ Rico F., Moy V.T. *J. Mol. Recognit.* **2007**, *20*, 495-501.

⁸ Teulon J-M., Delcuze Y., Odorico M., Chen S-w. W., Parot P., Pellequer J-L. *J. Mol. Recognit.* **2011**, *24*, 490-502.

⁹ Coen M.C., Lehmann R., Gröning P., Biemann M., Galli C., Schalpbach L. *J. Colloid Interf. Sci.* **2001**, *233*, 180-189.

¹⁰ Feng B., Luo Y., Ge F., Wang L., Huang L., Dai Y. *Surf. Interface Anal.* **2011**, *43*, 1304-1310.

¹¹ Farris L.R., McDonald M.J. *Anal. Bioanal. Chem* **2011**, *401*, 2821-2829.

¹² Johnson J.C., Nettikadan S.R., Vengasandra S.G., Henderson E. *J. Biochem. Bioph. Meth.* **2004**, *59*, 167-180.

¹³ Haselgrübler T., Amerstorfer A., Schindler H., Gruber H.J. *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 242-248.

¹⁴ Bonanni B., Bizzaeei R., Cannistraro S. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 14574-14580.

Le nombre de sites de fixation sur la biomolécule a aussi une grande importance. En effet, pour un couple antigène-anticorps, la probabilité d'observer une interaction est plus importante si l'antigène porte plusieurs épitopes.¹⁵ Par contre, avec des systèmes ne portant qu'un seul épitope, les interactions uniques anticorps-antigène observées seront plus fortes et plus facilement visibles.

De manière à favoriser les interactions uniques, il est aussi préférable d'avoir un faible taux d'immobilisation de biomolécules sur le substrat. Pour cela, des SAMs mixtes sont souvent utilisées. Celles-ci sont composées d'une molécule présentant une extrémité inerte aux biomolécules (un chaînon PEG terminé OMe par exemple) et l'autre molécule possède une extrémité spécifique de la biomolécule à fixer.⁵ Une autre technique peut être la saturation d'une partie des molécules déposées (soit sur la pointe, soit sur le substrat) en ajoutant le ligand correspondant dans le tampon dans lequel sont réalisées les mesures d'interactions.⁷

b) Elimination des événements non-spécifiques

Lors d'une expérience de DFS, il est important au moment de l'analyse des courbes de forces obtenues d'éliminer au maximum les ruptures liées à des interactions non-spécifiques pour ne pas inclure de faux positifs.

¹⁵ Allen S., Davies J., Davies M.C., Dawkes A.C., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 173-178.

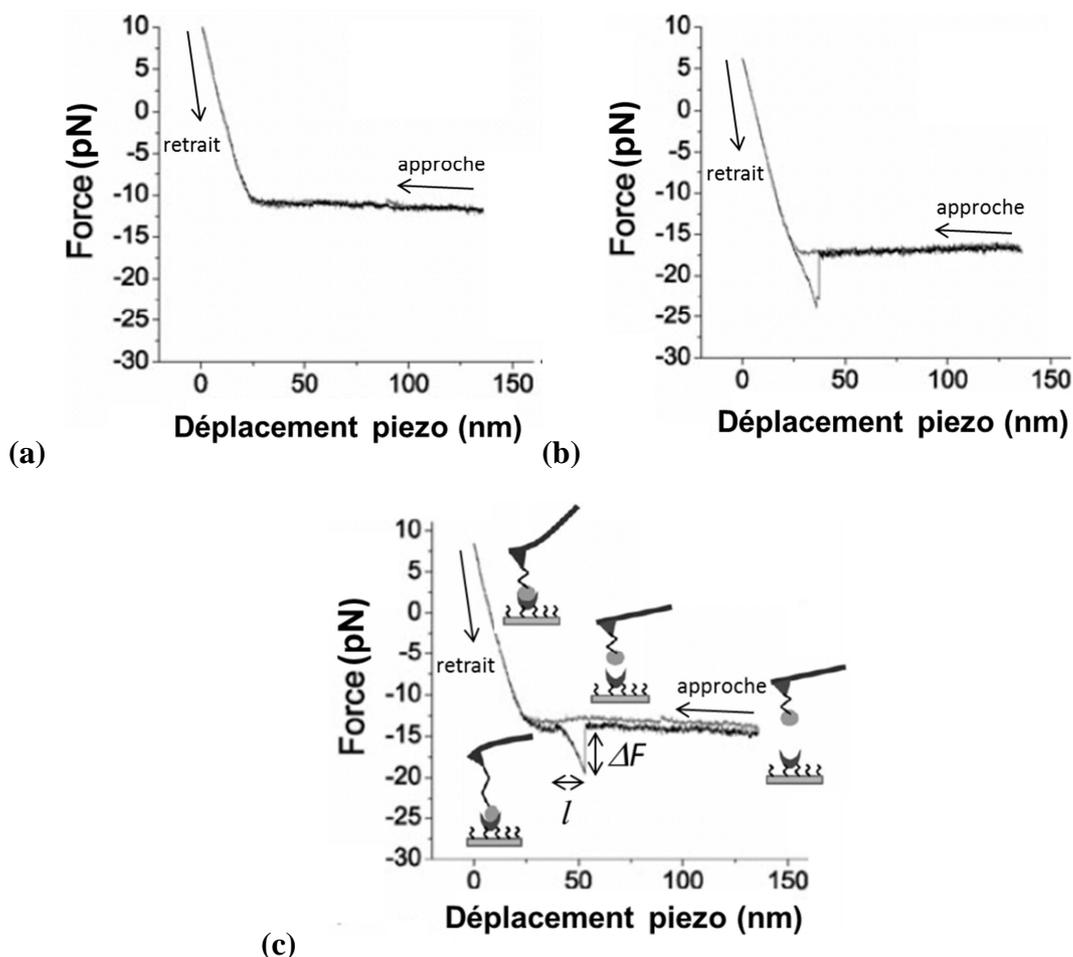


Figure VI-2. Différents types de courbes de forces pouvant être obtenus lors d'une expérience de DFS.¹

Comme observé sur la Figure VI-2, deux types d'évènements non désirés peuvent être observés :

- la biomolécule immobilisée sur la pointe ne rencontre rien à cause d'une mauvaise orientation de celle immobilisée sur le substrat **(a)**, aucune interaction n'est donc observée,
- des contacts ont lieu entre la pointe et le substrat **(b)**, une interaction apparait mais aucune variation de la pente n'est présente lors du retrait de la pointe.

Ces courbes sont différentes de celles correspondant aux interactions spécifiques **(c)**. Sur celles-ci, un changement de la pente de la courbe enregistrée lors du retrait de la pointe est constaté, dû à la brusque rupture des interactions entre les deux biomolécules. Il peut aussi être noté :

- la longueur l correspond à la longueur de rupture de l'interaction (environ la longueur de l'espaceur complètement étendu)¹⁶,
- la hauteur correspond à la variation de force ΔF nécessaire à la rupture de l'interaction.

c) *Modèle utilisé pour l'analyse des courbes de forces*

En général le modèle de Bell-Evans est utilisé pour analyser les courbes obtenues. Celui-ci indique que la dissociation de deux réactants peut être décrite par la théorie de l'état de transition^{17,18}, et permet, en utilisant une rampe de force linéaire ($F(t) = rt$) où r représente la vitesse de charge constante, de déduire la force F^* la plus probable capable de provoquer une rupture grâce à l'équation suivante :

$$F^* = \frac{k_B T}{\gamma} \ln \frac{r_e \gamma}{k_{off} k_B T}$$

où k_B est la constante de Boltzman, T la température, γ la largeur de la barrière de transition énergétique, k_{off} la constante cinétique de dissociation, et r_e la vitesse de charge effective.³

Bien que ce modèle se soit montré parfaitement adapté pour l'étude de nombreux systèmes, dans certains cas il donne des résultats contradictoires et nécessite donc quelques adaptations.⁶ Jarzynski a par exemple développé un nouveau modèle qui permet une évaluation directe de la différence d'énergie libre.¹⁹ Celui-ci est décrit par l'identité de Jarzynski suivante :

$$e^{\frac{-\Delta G}{k_B T}} = \int \rho(W_\lambda) e^{\frac{W_\lambda}{k_B T}} dW_\lambda$$

où $W_\lambda = \int \mathbf{F} d\boldsymbol{\lambda}$ est le travail mécanique effectué le long du chemin λ et $\rho(W_\lambda)$ la distribution de travail. Ce modèle a récemment été utilisé pour l'étude des interactions entre deux protéines synaptiques syntaxine 1A et synaptobrevine 2.²⁰

¹⁶ Baumgartner W., Hinterdorfer P., Ness W., Raab A., Vestweber D., Schindler H., Drenckhahn D. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, 97, 4005-4010.

¹⁷ Bell G.I. *Science* **1978**, 200, 618-627.

¹⁸ Evans E., Ritchie K. *Biophys. J.* **1997**, 72, 1541-1555.

¹⁹ Jarzynski C. *Phys. Rev. Lett.* **1997**, 78, 2690-2693.

²⁰ Liu W., Montana V., Parpura V., Mohideen U. *Biophys. J.* **2008**, 95, 419-425.

2. Application au système modèle biotine-avidine

Le complexe biotine-avidine est un des plus utilisés comme modèle pour l'étude d'interactions entre deux biomolécules. En effet ce complexe, en plus d'être une des plus importantes interactions non-covalentes connues ($K_D = 10^{-15} \text{ mol.L}^{-1}$), est extrêmement stable sur une large plage de température (jusqu'à plus de 110°C^{21}) et de pH (de 2 à $13,7^{22}$). Cependant malgré, un grand nombre d'études par beaucoup d'équipes différentes, avec des montages expérimentaux différents, il y a un manque de consensus sur la caractérisation du paysage énergétique de la rupture de ce complexe. Teulon et *al.* ont tenté de re-caractériser celui-ci en prenant en compte la présence de plusieurs interactions en parallèle.⁸ En effet, l'avidine comportant quatre sites de fixation, suivant les conditions expérimentales utilisées plusieurs biotines peuvent interagir avec une même avidine.

En utilisant le modèle de Bell-Evans, ils ont montré que les résultats de certaines équipes correspondaient plus aux résultats obtenus avec des interactions simples dans leur étude (courbe bleue, Figure VI-3), alors que d'autres correspondent à des interactions doubles (courbe verte, Figure VI-3), des interactions triples (courbe orange, Figure VI-3) ou quadruples (courbe rouge, Figure VI-3).

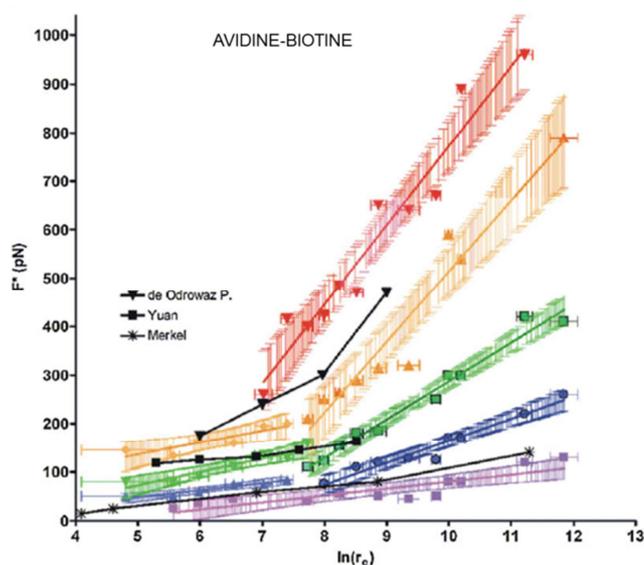


Figure VI-3. Graphique représentant les forces de rupture en fonction du logarithme de la vitesse de charge effective.⁸

²¹ González M., Argaraña C.E., Fidelio G.D. *Biomol. Eng.* **1999**, *16*, 67-72.

²² Donovan J.W., Ross K.D. *Biochemistry* **1973**, *12*, 512-517.

Ces différences peuvent être expliquées par les conditions expérimentales utilisées. En particulier, les procédés d'immobilisation comme par exemple, la fixation de l'avidine sur le substrat, via des espaceurs PEG-biotine bloqué au moins trois des quatre sites de fixation²³ ((a), Figure VI-4), favorisant la présence d'une seule interaction. Par contre, le procédé utilisé par Teulon et *al.*⁸ où l'avidine est immobilisée sur le substrat par la création d'une liaison amide entre l'acide 11-mercaptopundécanoïque et les fonctions NH₂ de l'avidine ((b), Figure VI-4) permet d'avoir toutes les interactions possibles de la simple à la quadruple. L'immobilisation de l'avidine sur la pointe AFM (via l'utilisation de l'APTES et du glutaraldéhyde) et de la biotine sur le substrat (avec la même méthode) ((c), Figure VI-4), permet aussi d'avoir tous les types d'interactions possibles.²⁴

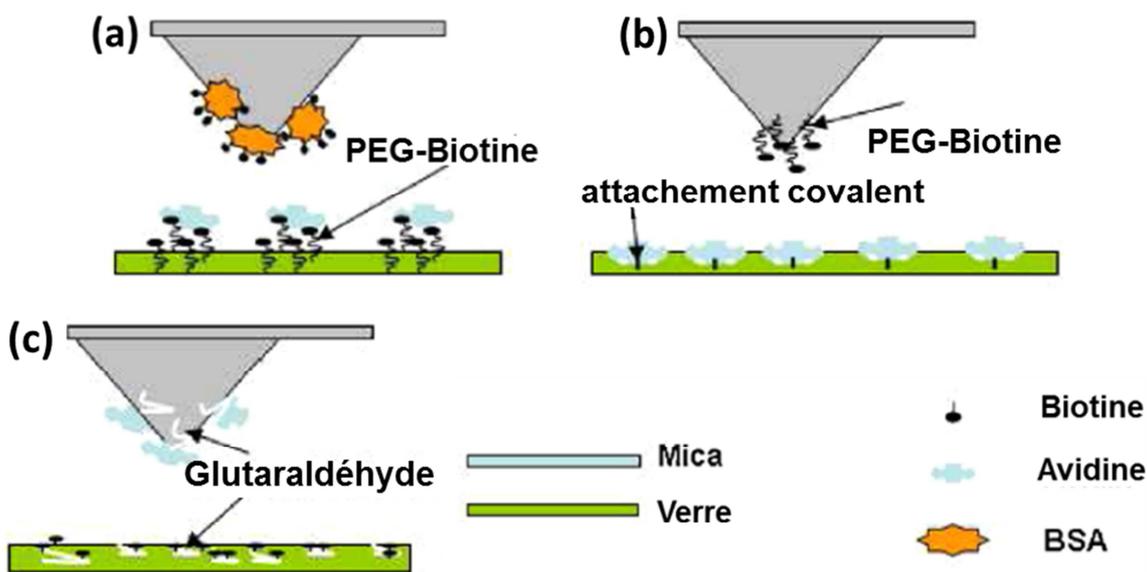


Figure VI-4. Schéma des différents procédés d'immobilisation utilisés pour la mesure des interactions avidine-biotine.⁸

B. Mesure des interactions Biotine-Avidine

Dans ce chapitre, des expériences de DFS sont effectuées, à l'aide d'un AFM Dimension 3100 (Bruker AXS), avec les pointes AFM, munies d'un MWCNT fonctionnalisé précédemment avec la biotine (Figure VI-5). Celles-ci sont réalisées avec un double objectif. Dans un premier temps, il s'agit de mettre en évidence la présence de biotine à l'extrémité du

²³ Moy V.T., Florin E.L., Gaub H.E. *Science* **1994**, 266, 257–259.

²⁴ de Odrowaz Piramowicz M., Czuba P., Targosz M., Burda K., Szymonski M *Acta Biochim. Pol.* **2006**, 53, 93-100.

nanotube. Le second objectif, quant à lui, est de mesurer des interactions entre la biotine fixée sur le nanotube et de l'avidine immobilisée sur une surface de verre.

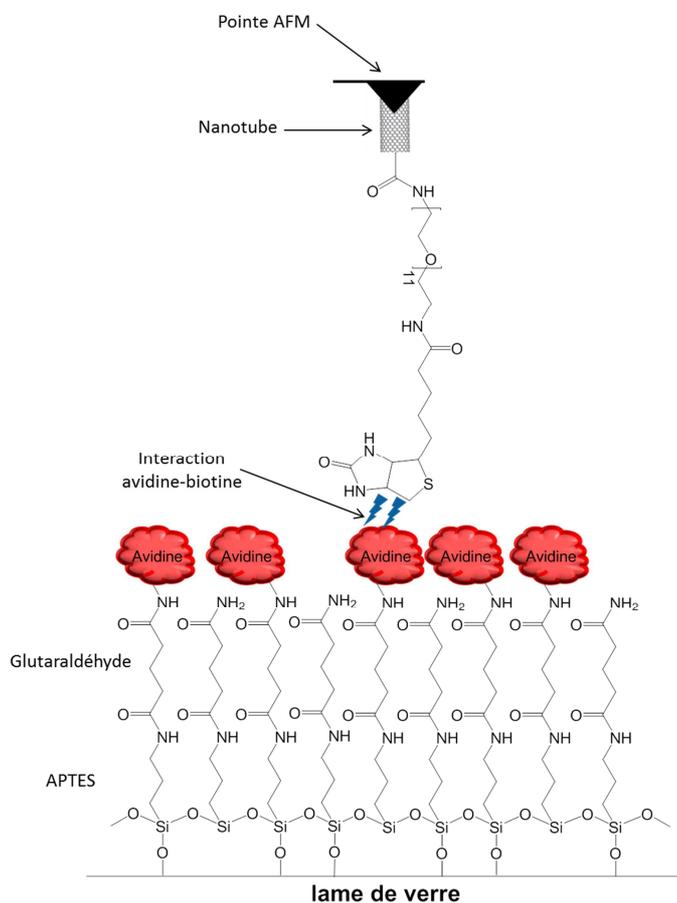


Figure VI-5. Schéma de principe de l'expérience de DFS pour mesurer l'interaction avidine-biotine.

1. Types de pointes utilisées

Des pointes AFM de différentes raideurs (rigides (NCL), semi-rigides (FMR) et souples (CSC17)) ont été testées lors des expériences de DFS, dans le but de vérifier la biofonctionnalisation du nanotube de carbone fixé sur celles-ci. Le résumé de leurs caractéristiques (fréquence de résonance du levier f_0 , facteur de qualité Q (rapport entre la fréquence de résonance f_0 et la bande passante Δf (largeur de la courbe de résonance)) et raideur du levier k) est donné dans le Tableau VI-1.

Type de pointe	f_0 (Hz)	Q	k (nN/nm)
NCL	155683	520	11,19 ^a
FMR	62752	136	0,505 ^a
CSC17-1	11831	65	0,18 ^b
CSC17-2	13167	63	0,18 ^b

Tableau VI-1. Liste des pointes AFM munies d'un MWCNT fonctionnalisé avec de la biotine (a : valeur expérimentale déterminée à l'air ; b : valeur nominale fournisseur).

La mesure de la constante de raideur du levier k des pointes AFM munies d'un nanotube, en milieu liquide, est très difficile. En effet, le spectre du bruit thermique est en général de mauvaise qualité et ne permet pas de déterminer celle-ci. Pour le moment, aucune étude n'a été entreprise pour comprendre ce phénomène. Les valeurs données dans le Tableau VI-1, déterminées à l'air ou données par le fournisseur, sont utilisées pour l'analyse des mesures de force.

2. Mise en évidence de la présence de la biotine

Avant de vérifier la présence de biotine à l'extrémité du nanotube, il est nécessaire de vérifier la présence et l'accessibilité des avidines immobilisées sur la surface de verre. Cela est fait à l'aide d'une pointe AFM recouverte d'or (NPG de Veeco, $k = 0,06-0,32$ N/m) fonctionnalisée avec de la biotine (Figure VI-6 a)).⁸

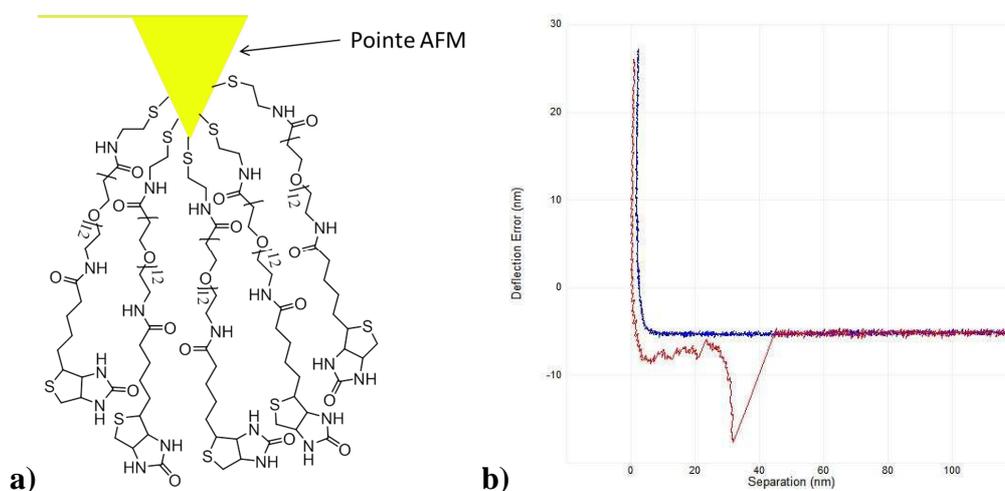


Figure VI-6. Schéma de la pointe utilisée pour vérifier la présence d'avidines sur le substrat (a) et exemple de courbes d'approche-retrait obtenues en milieu liquide (b).

Sur les courbes d'approche-retrait effectuées (Figure VI-6 **b**)), un évènement de rupture est observé. Celui-ci est caractérisé par un saut de la déflexion du levier lors du retrait de la pointe (courbe rouge) dû à la rupture de l'interaction avidine-biotine. Cela montre donc la présence d'avidines immobilisées sur la surface de verre et accessibles pour une biotine.

Des courbes d'approche-retrait sont donc, ensuite, réalisées entre les pointes AFM munies d'un MWCNT fonctionnalisé avec la biotine et le même substrat recouvert d'avidine, en milieu liquide (tampon PBS), pour vérifier la présence de biotine à l'extrémité du nanotube.

Pour les trois premières pointes du Tableau VI-1 (NCL, FMR et CSC17-1) aucune interaction n'est constatée lors des courbes d'approche-retrait (aucun saut de déflexion observé) (Figure VI-7). Cette absence d'interactions peut être expliquée par l'absence de biotine à l'extrémité du nanotube.

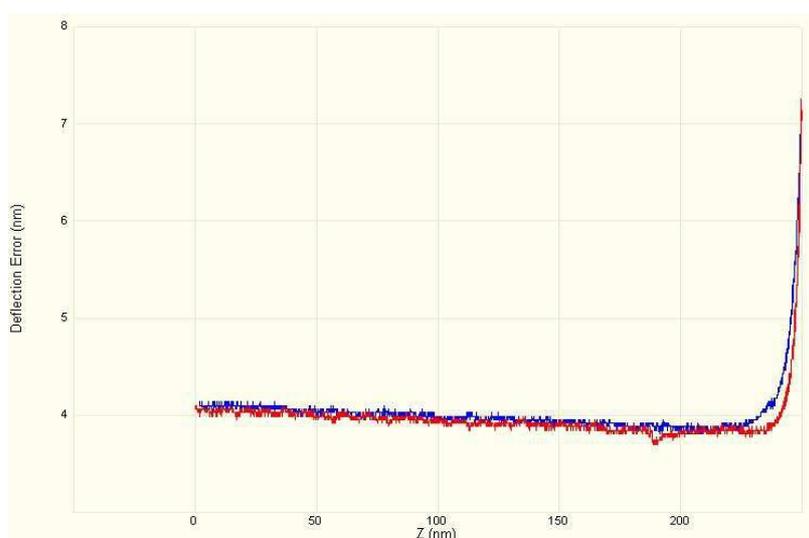


Figure VI-7. Exemple de courbes d'approche-retrait enregistrées en l'absence d'interactions avidine-biotine.

Par contre, pour la dernière pointe (CSC17-2), des évènements de rupture significatifs sont observés lors des courbes d'approche-retrait (Figure VI-8 **a**)), montrant la présence de biotine à l'extrémité du nanotube. La superposition d'une série de CAR, obtenues en différents points de la surface et avec la même vitesse de retrait de la pointe, est représentée en Figure VI-8 **b**)) (sur celles-ci c'est la force qui est représentée étant reliée à la déflexion x du levier par la relation $F = kx$). Elles ont été normalisées et l'origine (point (0,0)) indique le point de contact entre la biotine et une avidine immobilisée sur la surface. La longueur l de la séparation indique la distance parcourue lors du retrait jusqu'à la rupture finale.

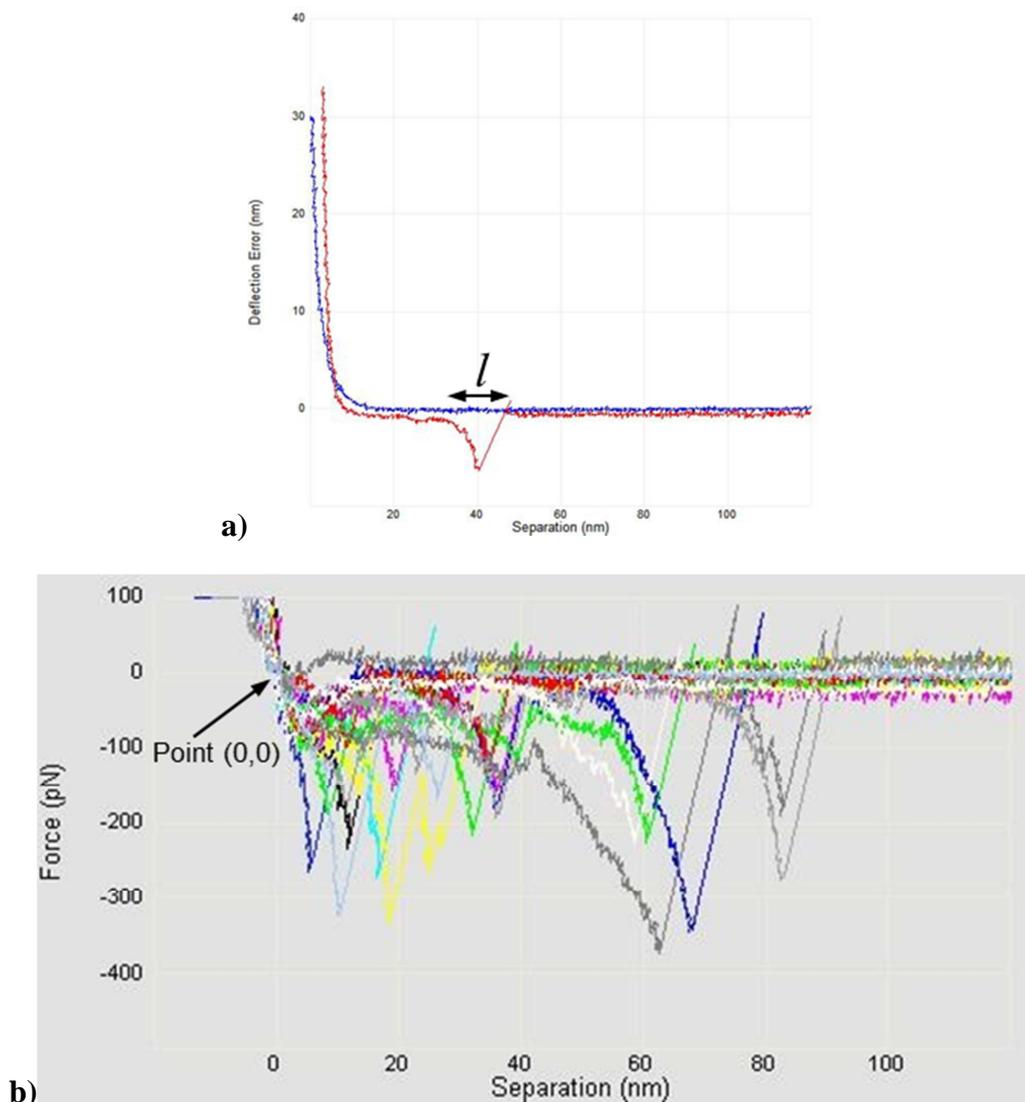


Figure VI-8. Exemple de courbe d'approche-retrait obtenue pour la mesure d'une interaction entre une pointe AFM munie d'un MWCNT fonctionnalisé avec de la biotine et un substrat modifié par de l'avidine (a) et superposition des courbes obtenues en différents points de la surface à même vitesse de retrait (b).

Une hétérogénéité des courbes est remarquée. Celle-ci met en évidence une interaction plus complexe qu'attendue, notamment dans la distribution des distances de séparation. En raison de la taille de l'espaceur utilisé pour fixer la biotine sur le nanotube (environ 5 nm) et de celle de l'avidine et des molécules servant à la fixer sur la lame de verre (environ 5 nm) (Figure VI-5), un pic de distribution des distances de séparation devrait être attendu vers une dizaine de nanomètres. Cependant, sur certaines courbes, une distance plus importante est constatée. Plusieurs facteurs peuvent l'expliquer. En effet, il est, par exemple, possible de considérer un certain étirement des espaceurs ou de l'avidine. Une flexibilité du nanotube peut aussi provoquer cette variation dans les distances de ruptures moyennes.

3. Mesure d'interactions du couple avidine-biotine

De manière à avoir plusieurs points pour pouvoir tracer l'évolution de F^* en fonction de $\ln(r_e)$, des mesures d'interactions sont faites, avec notre pointe AFM à nanotube fonctionnalisé biotine, à différentes vitesses de charge. Les forces les plus probables de rupture sont déterminées grâce à l'élaboration d'histogrammes de distribution à chaque vitesse (Figure VI-9). Un fit Gaussien appliqué sur chacune des distributions permet de déduire, à son maximum, les valeurs de rupture les plus probables (F^*).

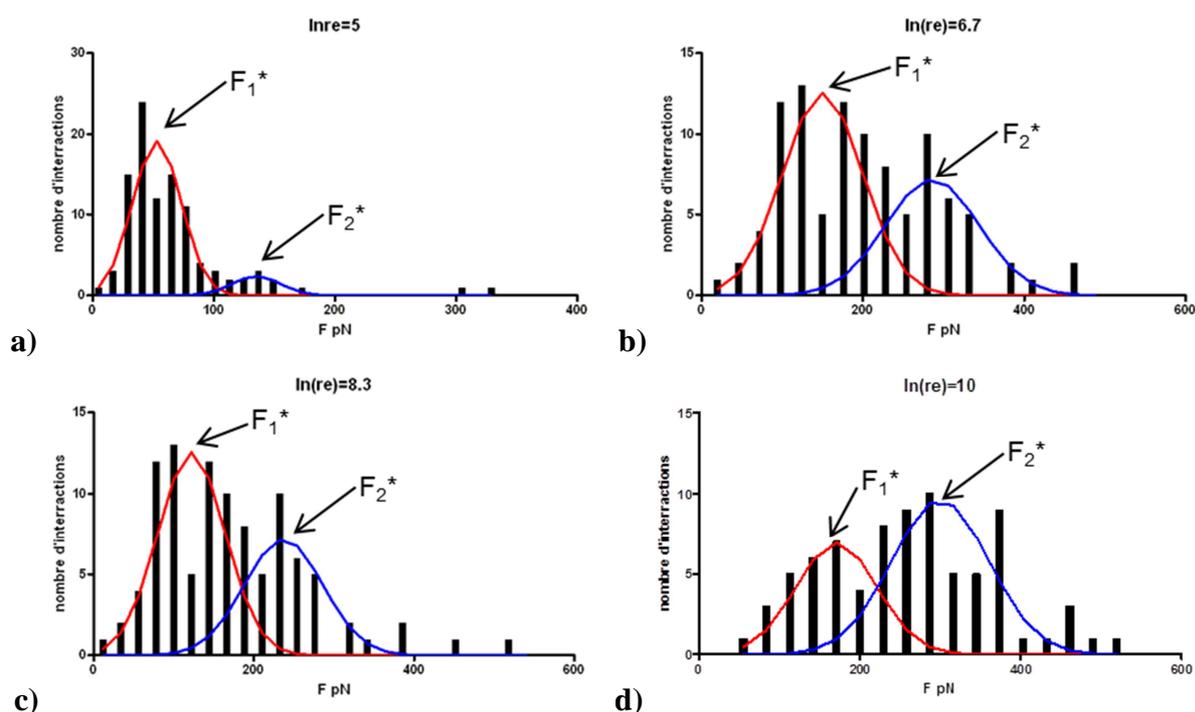


Figure VI-9. Exemples de distribution d'évènements de ruptures entre une biotine immobilisée sur le MWCNT fixé sur la pointe AFM et l'avidine immobilisée sur une lame de verre.

Sur les histogrammes de distribution (Figure VI-9), la présence de deux populations est notée (une première représentée en rouge et l'autre représentée en bleu). Cela laisse envisager deux types d'interactions différentes. Le nombre d'interactions pour chaque population varie selon la vitesse de charge. Par exemple, à faible vitesse ($\ln(r_e) = 5$), il n'y a pratiquement aucune interaction pour la population bleue. Certaines interactions sont donc plus fréquemment observées à certaines vitesses de charge.

La représentation de nos résultats selon le modèle de Bell-Evans : $F^* = f(\ln(r_e))$, permet d'obtenir deux droites interpolées quasiment parallèles (Figure VI-10). Celles-ci indiquent la présence de deux évènements de rupture simultanés suggérant la présence de deux biotines sur le nanotube de carbone.

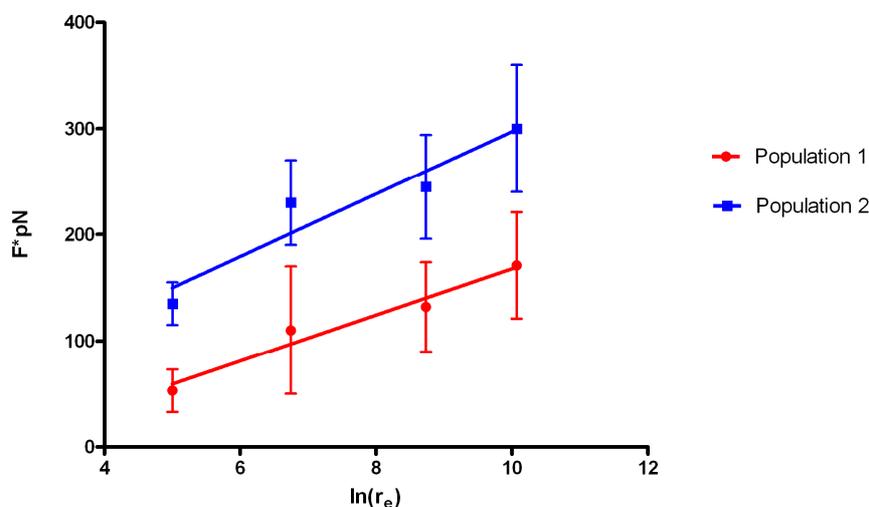


Figure VI-10. Droites de régression obtenues, par le modèle de Bell-Evans, sur les évènements de rupture entre la biotine immobilisée à l'extrémité du nanotube de carbone et l'avidine fixée sur une surface de verre ($r^2 = 0,96$ pour la courbe rouge et $r^2 = 0,91$ pour la courbe bleue).

D'autre part, le modèle de Bell-Evans permet aussi de déterminer la largeur de la barrière de transition avant la rupture γ et la constante cinétique de dissociation k_{off} . Des études précédentes⁸ semblent montrer l'existence de deux barrières de transition pour la rupture de l'interaction avidine-biotine (une interne et une externe). L'externe, la dernière franchie et donc plus élevée en hauteur, est la plus facilement observable. Cependant, en DFS, il est aussi possible de mesurer la barrière interne, à haute vitesse de charge. En effet, cette technique a pour effet de réduire la taille de la barrière externe. La rupture s'effectue donc après passage de la barrière interne. Toutefois, sur la Figure VI-10, une seule pente est notée pour les droites obtenues. Une seule barrière, l'externe, est donc caractérisée. Les valeurs de la barrière de transition avant rupture γ sont donc respectivement de 1,8 Å et 1,4 Å pour les droites rouge et bleue. La constante cinétique de dissociation extrapolée k_{off} est, quant à elle, respectivement de 0,4 s⁻¹ et 0,03 s⁻¹ pour les droites rouge et bleue. Ces valeurs sont complètement en accord, avec celles précédemment publiées lors d'une étude de DFS où la biotine était immobilisée sur une pointe AFM normale recouverte d'or (Figure VI-6).⁸ L'utilisation de vitesses de charge trop faibles, ou la flexibilité du MWCNT nous empêchant d'aller plus vite, peuvent expliquer la non-observation de la barrière interne, même à hautes vitesses de charge.

Les valeurs obtenues, avec la pointe à nanotube, ont été comparées à celles déjà publiées pour la biotine immobilisée sur des pointes AFM normales recouvertes d'or (Figure VI-11).⁸ La droite en noir représente la mesure d'interactions non spécifiques. Les autres, quant à elles, correspondent à des événements de rupture simples, doubles, triples et quadruples (de bas en haut). La superposition de nos valeurs obtenues avec la pointe à

nanotube avec les valeurs obtenues avec une pointe normale, montre qu'avec une grande vitesse de charge ($\ln(r_c) > 8$), il existe un très bon accord entre les résultats. Les valeurs se superposent clairement aux droites correspondant à des événements de rupture simples et doubles. En revanche, à des vitesses de charge plus réduites, il y a une légère déviation. Celle-ci peut être expliquée par le faible nombre de courbes d'approche-retrait obtenues par rapport aux résultats précédemment publiés sur les pointes AFM normales recouvertes d'or. En effet, disposer d'un grand nombre de courbes permet d'avoir un histogramme de distribution et donc un fit Gaussien plus précis pour conduire à des valeurs de forces F^* plus précises.

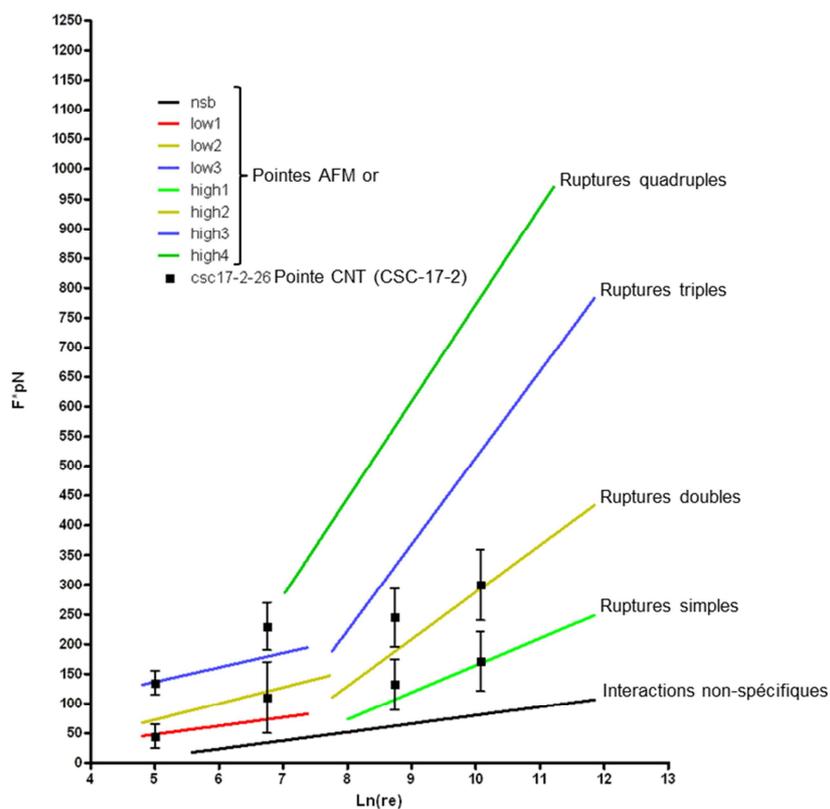


Figure VI-11. Comparatif des valeurs de forces F^* obtenues avec la pointe à nanotube et celles obtenues avec les pointes AFM normales recouvertes d'or.

C. Conclusion

Lors de cette étude, dans un premier temps, il a été démontré qu'il était possible de réaliser des expériences de Spectroscopie Dynamique de Force avec une pointe à nanotube, même si quelques difficultés (détermination difficile de la constante de raideur en milieu liquide, hétérogénéité des mesures), probablement liées à la flexibilité des nanotubes, ont été rencontrées. Dans un deuxième temps, l'immobilisation de la biotine à l'extrémité du nanotube a été mise en évidence. En effet, des interactions ont été mesurées avec des avidines immobilisées sur une surface de verre.

La comparaison de nos résultats obtenus avec une pointe à nanotube avec ceux précédemment publiés pour l'immobilisation de la biotine sur des pointes AFM normales recouvertes d'or a montré que les interactions que nous observions correspondaient à des événements de rupture simples et doubles. Cela suggère la présence de deux biotines à l'extrémité du nanotube.

Dans le but de favoriser la mesure d'évènements de rupture simples, plusieurs pistes pourraient être envisagées. Une diminution de la concentration de la solution utilisée pour l'immobilisation de la biotine à l'extrémité du nanotube pourrait, par exemple, être considérée. En effet, cela permettrait de diminuer le risque d'immobiliser plusieurs biotines sur le nanotube.

Conclusion Générale

Conclusion générale

Ce travail de recherche avait pour objectifs :

- l'immobilisation de biomolécules, sans dégrader leurs propriétés biologiques, sur des SAMs fonctionnalisées ; ceci nécessitant le développement de nouveaux agents de couplage pour la modification de surfaces,
- l'élaboration de pointes AFM modifiées avec des nanotubes de carbone fonctionnalisés,
- la mesure d'interactions ligands/protéines par Spectroscopie Dynamique de Force à l'échelle de la molécule unique.

Afin de lier de façon covalente, sans dénaturation, des entités biologiques sur une surface à base de silicium, nous avons synthétisé des agents de couplage siliciés fonctionnels comportant un groupement urée permettant l'auto-assemblage par liaisons hydrogène. Ainsi, des Self-Assembled Monolayers, SAMs-urée-COOH 100%, ont été préparées à l'ISM, après déprotection sous UV, par clivage d'un ester photolabile. Dans le but de faire varier la distribution des fonctionnalités de surface, des SAMs mixtes (30 %, 10 %) ont été aussi obtenues. Toutes les étapes de modification chimique de surface ont été suivies par PM-IRRAS. La Microscopie Atomique de Force (AFM) a montré une bonne homogénéité des couches ainsi qu'une très faible rugosité (Rms d'environ 0,3 et 0,5 nm). Dans le but de limiter l'adhésion non spécifique, des SAMs composées d'un organosilane comportant un chaînon PEG, ont aussi été préparées. Toutefois, lors de l'immobilisation covalente de NP-pA, celles-ci se concentrent en îlots. L'utilisation de nanoparticules NP-PEG-NH₂ sur les SAMs-urée (100% et mixtes) a permis d'établir une diminution du nombre de sites de fixation dans les SAMs mixtes. De plus, nous avons observé une structure en « îlots », constitués de la chaîne réactive.

Enfin, nous avons mis en évidence l'intérêt des SAMs urée COOH 100% comme substrat de choix pour l'immobilisation d'objets biologiques. Une étude par AFM a montré que le virus de la mosaïque du tabac (TMV) pouvait être lié de façon covalente, sans déformation, sur ces SAMs contrairement au virus physisorbé sur mica.

Nous avons fixé, au CBMN, des nanotubes de carbone multi-parois (MWCNTs) sur des pointes AFM. Les MWCNTs sont synthétisés par CCVD sur un fil métallique puis soudés individuellement sur la pointe, par fusion locale d'un film fin de nickel, sous microscopie optique.

La biofonctionnalisation des CNTs, consiste à générer des fonctions acide à l'extrémité du nanotube, par simple oxydation sous courant d'oxygène, au moment de la soudure.

Conclusion générale

Les pointes/CNTs ainsi modifiées, sont biofonctionnalisées uniquement à leur extrémité selon un protocole original mis au point par le CBMN et l'ISM. Cette étape nécessite l'activation des fonctions COOH présentes à l'extrémité du nanotube, puis la réaction de l'ester activé avec les fonctions NH₂ d'une biomolécule. Ce procédé a été validé par l'immobilisation covalente, sélective, de nanoparticules/protéine A (NP-pA), sur l'extrémité du CNT, puis appliqué à l'immobilisation de la biotine.

Les premières analyses de la réponse mécanique des sondes à nanotube sur les SAMs ont montré plus de stabilité des réponses lorsque l'extrémité du nanotube n'est pas oxydé. La sensibilité des sondes à MWCNT aux différents groupements fonctionnels nécessite des études plus amples, notamment concernant la possibilité de distinguer des domaines dans les SAMs mixtes. Nous avons mis en évidence un comportement original de glissement d'un nanotube sur les SAMs, sur des longueurs de quelques 5 à 30 nm. Lorsqu'il n'y a pas de glissement, les images obtenues avec un MWCNT sont comparables à celles enregistrées avec des pointes, avec la robustesse des nanotubes en plus.

Les interactions ligand/récepteur, type avidine/biotine, ont été étudiées par spectroscopie dynamique de force (DFS). Une comparaison de ces résultats avec d'autres publiés précédemment sur des pointes AFM recouvertes d'or semble suggérer la présence de deux biotines à l'extrémité du MWCNT.

Plusieurs pistes pourraient être envisagées pour poursuivre ce travail. L'utilisation de SAMs mixtes pour immobiliser l'avidine pour les expériences de DFS. En effet, une plus grande distance entre deux biomolécules favoriserait l'observation d'interactions uniques lorsqu'une seule biotine est immobilisée sur le MWCNT.

Pour fonctionnaliser le nanotube avec une seule biotine, plusieurs voies peuvent être envisagées. Par exemple, une diminution de la concentration de la solution de biotine utilisée peut être considérée. L'utilisation de MWCNT plus fins (soudure sous MEB au lieu de sous microscopie optique) ou de SWCNT pourrait aussi être examinée. Des linkers de différentes natures et longueurs pourraient aussi être testés.

Enfin, l'étude, par DFS, des interactions d'autres modèles de biomolécules pourraient être envisagées.

Partie expérimentale

1) Solvants et réactifs

Les différents produits commerciaux utilisés ont été achetés, pour la plupart, chez Sigma-Aldrich, Alfa Aesar et Fischer Acros. Ceux-ci ont été utilisés sans purification préalable. Le dichlorométhane anhydre nécessaire pour certaines réactions a été séché sur un agent déshydratant (CaH_2) et distillé sous atmosphère d'azote. Toutes les manipulations sous atmosphère inerte ont été réalisées sous argon à l'aide d'une rampe à vide.

2) Appareillages

❖ Résonance magnétique nucléaire :

Les différents spectres RMN (^1H , ^{13}C , ^{29}Si) ont été enregistrés sur les appareils suivants :

- Spectromètre Bruker DPX 200 FT (^1H : 200, ^{13}C : 50 MHz)
- Spectromètre Avance 300 FT (^1H : 300, ^{13}C : 75, ^{29}Si : 59 MHz)
- Spectromètre Bruker DPX 400 FT (^1H : 400, ^{13}C : 100 MHz)

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et sont calibrés sur les signaux des solvants deutérés.

❖ Spectroscopie infrarouge :

Les spectres FT-IR ont été enregistrés sur un spectromètre PerkinElmer Spectrum 100 soit avec des pastilles KBr, soit sur cristal ATR. Les nombre d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

Les spectres infrarouge en mode PM-IRRAS ont été enregistrés sur un spectromètre NEXUS 670 (Thermo Optek) ayant une résolution de 4 cm^{-1} . Tous les spectres sont enregistrés sous une atmosphère d'air sec après 30 min d'incubation dans la chambre. Une moyenne est réalisée sur plusieurs blocs de 1500 scans (30 minutes d'acquisition).

Le faisceau infrarouge est dirigé vers un banc annexe à l'aide d'un miroir après sa sortie de l'interféromètre. Ensuite il est focalisé sur l'échantillon par une lentille en séléniure de zinc (ZnSe) de grande focale 190 mm. Puis il passe par un polariseur en fluorure de baryum (BaF₂) et à travers un modulateur photo-élastique (PEM) en ZnSe. Pour finir, il est réfléchi par l'échantillon avec un angle d'incidence de 75° et focalisé par une deuxième lentille en séléniure de zinc (ZnSe) de courte focale 40 mm sur un détecteur suffisamment rapide de type MCT (tellure de mercure-cadmium).

❖ Spectroscopie de masse :

Les spectres de masse ont été effectués par le CESAMO (Centre d'Etude Structurale et d'Analyse des Molécules Organiques, Bordeaux) sur un spectromètre de masse QStar Elite équipé d'une source d'ionisation ESI.

❖ Analyse élémentaire :

Les analyses élémentaires des différents produits ont été réalisées par le Service Central d'Analyse du CNRS à Villeurbanne.

❖ Microscopie à force atomique :

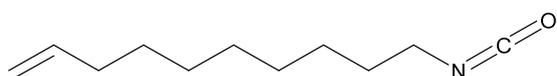
Les analyses AFM sur les wafers de silicium ont été réalisées sur trois appareils : un Agilent 5500 à l'ISM et un MFP 3D™ Stand Alone AFM (Asylum Research) et un Dimension FastScan (Bruker) au CBMN.

❖ Microscopie électronique à balayage :

Les images MEB ont été enregistrées sur un microscope JSM 6700F (JEOL) fonctionnant à 10 kV du CREMEM (Centre de Ressources en Microscopie Electronique et Microanalyse). Les échantillons ont été collés avec un scotch adapté sur un support et un contact a été effectué au moyen de laque d'argent.

3) Synthèse des composés organiques

a. Synthèse de l'isocyanatodéc-1-ène (2)



Formule : $C_{11}H_{19}NO$ (MM : 181,27 g/mol)

Rendement : 92%

Aspect : liquide très visqueux blanc

A une solution d'azoture de sodium (1,73 g, 26,6 mmol) dans du toluène anhydre (20 mL) refroidie à 0°C, est lentement ajouté le chlorure de 10-undécénoyle (2,69 g, 13,3 mmol) (1) sous agitation et sous atmosphère inerte. Après 3 heures d'agitation à 25°C, 1 équivalent supplémentaire d'azoture de sodium est ajouté. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à 25°C toute la nuit. La solution est ensuite canulée dans un ballon tricol contenant 200 mL de toluène anhydre à 75°C. Le milieu est laissé sous agitation à cette température pendant 20 heures. Après refroidissement à température ambiante la solution est filtrée sur Celite®. Puis le solvant est évaporé sous pression réduite. On obtient le produit avec un rendement de 92% (2,22g, 12,2 mmol).

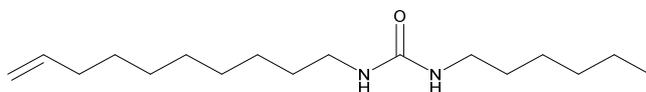
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 5,87- 5,72 (m, 1H, $CH_2=CH-$) ; 5,03 – 4,88 (m, 2H, $CH_2=CH-$) ; 3,27 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H, $-CH_2-NCO$) ; 2,04 (quint, 2H, $CH_2=CH-CH_2-$) ; 1,67 – 1,54 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-NCO-$) ; 1,45 – 1,23 (m, 10H, $(-CH_2-)_5$).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 139,24 ($CH_2=CH-$) ; 114,33 ($CH_2=CH-$) ; 43,13 ($-CH_2-NCO$) ; 33,89 ($CH_2=CH-CH_2-$) ; 31,44-26,65 (6 $-CH_2-$).

IRTF (cm^{-1}) : 2274 (ν_{NCO}) ; 2856 ($\nu_s CH_2$) ; 2928 ($\nu_{as} CH_2$).

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 72.88 ; H 10.56 ; O 8.83 ; N 7.73 ; trouvée. C 72.69 ; H 10.63 ; O 8.84 ; N 7.73.

b. Synthèse du 6-[(déc-9-ényl)uréido]hexane (3)



Formule : $C_{17}H_{34}N_2O$ (MM : 282,46 g/mol)

Rendement : 75%

Aspect : poudre blanchâtre

Partie expérimentale

A une solution d'hexylamine (0,28 g, 2,8 mmol) dans le dichlorométhane anhydre (45 mL) sous atmosphère inerte est ajouté le composé **(2)** (0,5 g, 2,8 mmol). Après 16 heures d'agitation à température ambiante le solvant est évaporé. Le solide récupéré est ensuite abondamment lavé sur verre fritté avec du pentane. Le produit attendu est alors obtenu avec un rendement de 75% (0,60g, 2,1 mmol).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5,87 - 5,72 (m, 1H, $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-$) ; 5,02 - 4,88 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-$) ; 4,7 (t, $J = 4,7$ Hz, 2H, 2 $-\text{NH}-$) ; 3,17 - 3,08 (m, 4H, 2 $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{NH}-\text{CO}-$) ; 2,07 - 1,97 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$) ; 1,46 (quint, 4H, 2 $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$) ; 1,27 (s, 16H, 8 $-\text{CH}_2-$) ; 0,87 (t, 3H, $-\text{CH}_3$).

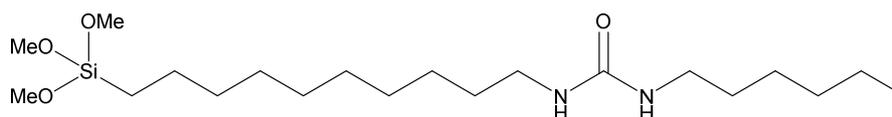
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 158,71 ($\underline{\text{C}}\text{O}_{\text{urée}}$) ; 139,28 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-$) ; 114,28 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-$) ; 40,70 (2 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$) ; 33,91 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$) ; 31,71- 22,72 (10 $-\text{CH}_2-$) ; 14,16 ($-\text{CH}_3$).

IRTF (cm^{-1}) : 1579 (δ_{NH} , ν_{CN}) ; 1645 ($\nu_{\text{C}=\text{C}}$) ; 1620 ($\nu_{\text{CO}_{\text{urée}}}$) ; 2856 ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$) ; 2928 ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$) ; 3338 (ν_{NH}).

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 72,29 ; H 12,13 ; O 5,66 ; N 9,92 ; trouvée. C 72,09 ; H 12,46 ; O 5,96 ; N 9,70.

SMHR-TOF $[\text{M}+\text{Na}]^+$: calculée 305,2563 ; trouvée 305,2569.

c. Synthèse du composé **(4)**



Formule : $\text{C}_{20}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$ (404,66 g/mol)

Rendement : quantitatif

Comme les composés silylés ne sont pas très stables dans le temps et qu'une hydrolyse de la fonction silane peut avoir lieu, les réactions d'hydrosilylation sont réalisées au dernier moment avant l'étape de silanisation.

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide, puis placé sous argon, on verse une solution du composé **(3)** (14 mg, 0,05 mmol) dans le toluène anhydre (0,5 mL). On ajoute ensuite le triméthoxysilane préalablement distillé (32 μL , 0,25 mmol) et le catalyseur de

Partie expérimentale

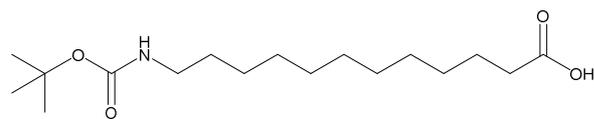
Karstedt (28 μ L, 1,25 μ mol [Pt]). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures à 65°C puis refroidi à température ambiante. Le solvant et l'excès de triméthoxysilane sont évaporés à la rampe à vide. Le composé (**4**) est obtenu avec un rendement quantitatif (cf. RMN ^1H).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5,31 (s, 2H, 2 -NH-) ; 3,51 (s, 9H, -Si-(OCH₃)₃) ; 3,13 - 3,01 (m, 4H, 2 -CH₂-NH-CO-) ; 1,50 - 1,33 (m, 4H, 2 -CH₂-CH₂-NH-) ; 1,21 (s, 20H, 10 -CH₂-) ; 0,82 (t, 3H, -CH₃) ; 0,64 - 0,54 (m, 2H, -CH₂-Si-).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 159,20 (CO_{urée}) ; 50,46 (-Si-(OCH₃)₃) ; 40,44 (2 -CH₂-NH-) ; 33,17 - 26,73 (11 -CH₂-) ; 22,65 (-CH₂-CH₂-Si-) ; 14,04 (-CH₃) ; 9,18 (-CH₂-Si-).

RMN ^{29}Si (59 MHz, CDCl_3 , δ ppm): -41,31.

d. Synthèse de l'acide 12-(tertbutoxycarbonylamino)dodécanoïque (**6**)



Formule : $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{NO}_4$ (MM : 315,45g/mol)

Rendement : 86%

Aspect : solide blanc

L'acide aminododécanoïque (**5**) (2 g, 9,3 mmol) est dissous dans un mélange de tert-butanol et d'eau (3/1, 20 mL). Le pH est ajusté à 13-14 avec une solution de NaOH (1 N). Le di-tert-butyl dicarbonate (2,84 g, 13 mmol) est ajouté lentement à 0°C. Après 16 heures d'agitation à 25°C, une solution de HCl à 10% est ajoutée lentement à 0°C jusqu'à pH 2. La phase aqueuse est ensuite extraite 3 fois à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont ensuite réunies, séchées sur MgSO_4 et concentrées sous pression réduite. Le produit brut est obtenu avec un rendement de 86% (2,52g ; 8 mmol)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 4,57 (s, 1H, -NH-) ; 3,06 (m, 2H, -CH₂-NH-) ; 2,31 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-CO-) ; 1,62 (quint, 2H, -CH₂-CH₂-CO-) ; 1,42 (s, 9H, -C-(CH₃)₃) ; 1,25 (s, 16H, (-CH₂)₈).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 179,02 (CO_{acide}) ; 156,03 (CO_{Boc}) ; 78,92 (-C_{Boc}-) ; 40,53 (-CH₂-NH-) ; 34,03 (-CH₂-CO-) ; 29,92-28,33 (7 -CH₂-) ; 28,22 (3 CH₃) ; 26,61 (-CH₂-CH₂-NH-) ; 24,64 (-CH₂-CH₂-CO-).

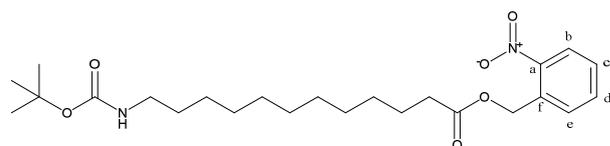
IRTF (cm^{-1}) : 1518 (δ_{NH}) ; 1686 ($\nu_{\text{CO Boc}}$) ; 1700 ($\nu_{\text{CO dimère acide}}$) ; 1716 ($\nu_{\text{CO acide}}$) ; 2851 ($\nu_{\text{s CH}_2}$) ; 2873 ($\nu_{\text{s CH}_3}$) ; 2917 ($\nu_{\text{as CH}_2}$) ; 2977 ($\nu_{\text{as CH}_3}$) ; 3368 (ν_{NH}).

Partie expérimentale

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 64,73 ; H 10,54 ; O 20,29 ; N 4,44 ; trouvée, C 64,45 ; H 10,56 ; O 21,16 ; N 4,45.

SMHR-ESI $[M+Na]^+$: calculée 338,2301 ; trouvée 338,2317.

e. Synthèse du 12-(tert-butoxycarbonylamino)dodécanoate de 2-nitrobenzyle (**7**)



Formule : $C_{24}H_{38}N_2O_6$ (MM : 450,57 g/mol)

Rendement : 80%

Aspect : huile jaune

A une solution d'acide 12-(tert-butoxycarbonylamino)dodécanoïque (**6**) (2,33 g, 7,38 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (20 mL) sous atmosphère inerte, sont ajoutés la 4-diméthylaminopyridine (DMAP) (0,9 g, 7,38 mmol), l'alcool 2-nitrobenzyle (0,9 g, 5,9 mmol) et le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1,52 g, 7,38 mmol). Au bout de 20h d'agitation à 25°C, la dicyclohexylurée (DCU) formée est filtrée. La solution est ensuite lavée avec de l'eau et la phase aqueuse est extraite avec du CH_2Cl_2 . Toutes les phases organiques sont réunies, séchées sur $MgSO_4$ anhydre et concentrées sous pression réduite. Pour finir, le produit brut est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (CH_2Cl_2 /Acétone : 98/2). Le composé (**7**) est obtenu avec un rendement de 80% (2,12 g, 4,71 mmol).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 8,07 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H_b) ; 7,67 - 7,43 (m, 3H, H_c , H_e , H_d) ; 5,49 (s, 2H, $-CH_2-Ar$) ; 4,53 (s, 1H, $-NH-$) ; 3,08 (m, 2H, $-CH_2-NH-$) ; 2,39 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, $-CH_2-CO-$) ; 1,64 (quint, 2H, $-CH_2-CH_2-CO-$) ; 1,42 (s, 9H, $-C-(CH_3)_3$) ; 1,24 (s, 16H, $(-CH_2)_8$).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 173,20 (CO_{ester}) ; 156,10 (CO_{Boc}) ; 147,78 (C_a) ; 133,73 (C_d) ; 132,39 (C_f) ; 129,19 ; 128,83 (C_c , C_e) ; 125,11 (C_b) ; 78,9 ($-C_{Boc}-$) ; 62,83 ($-CH_2-Ar$) ; 40,74 ($-CH_2-NH-$) ; 34,25 ($-CH_2-CO-$) ; 30,17 - 29,19 (7 $-CH_2-$) ; 28,22 ($-CH_3$) ; 26,88 ($-CH_2-CH_2-NH$) ; 24,98 ($-CH_2-CH_2-CO-$).

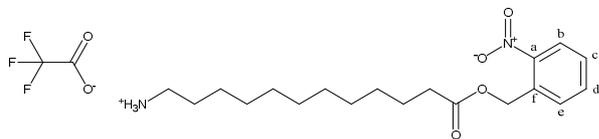
IRTF (cm^{-1}) : 1337 ($\nu_s NO_2$) ; 1521 (δ_{NH} , ν_{CN}) ; 1530 ($\nu_{as} NO_2$) ; 1688 ($\nu_{CO Boc}$) ; 1748 ($\nu_{CO ester}$) ; 2852 ($\nu_s CH_2$) ; 2878 ($\nu_s CH_3$) ; 2919 ($\nu_{as} CH_2$) ; 2975 ($\nu_{as} CH_3$) ; 3372 (ν_{NH}).

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 63,98 ; H 8,50 ; O 21,31 ; N 6,22 ; trouvée. C 64,25 ; H 8,56 ; O 19,87 ; N 6,21.

SMHR-ESI $[M+Na]^+$: calculée 473,2622 ; trouvée 473,2627.

Partie expérimentale

f. Synthèse du trifluoroacétate de 12-ammonium de dodécanoate de 2-nitrobenzyle (8)



Formule : $C_{21}H_{31}N_2O_6F_3$ (MM : 464,48 g/mol)

Rendement : 80%

Aspect : poudre blanchâtre

A une solution de 12-(tert-butoxycarbonylamino)dodécanoate de 2-nitrobenzyle (7) (1,14 g, 2,54 mmol) dans le dichlorométhane (60 mL) est ajouté de l'acide trifluoroacétique (2,26 mL, 30,48 mmol). Au bout de 4h d'agitation à 25°C, le solvant est évaporé. L'excès d'acide trifluoroacétique est éliminé par distillation azeotropique avec le toluène (30 mL). Le produit est ensuite séché sous pression réduite pour éliminer le toluène résiduel. Le composé (8) est obtenu avec un rendement de 97% (1,14g, 2,45 mmol).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 8,05 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H_b) ; 7,89 (s, 3H, NH_3^+) ; 7,58 - 7,33 (m, 3H, H_e, H_c, H_d) ; 5,46 (s, 2H, $-CH_2-Ar$) ; 2,88 (s, 2H, $-CH_2-NH_3^+$) ; 2,37 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, $-CH_2-CO-$) ; 1,61 (quint, 4H, $-CH_2-CH_2-NH_3^+$; $-CH_2-CH_2-CO-$) ; 1,24 (s, 14H, ($-CH_2-$)₇).

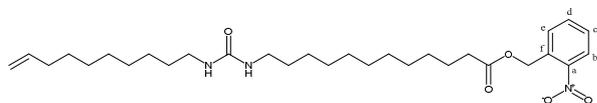
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 173,26 (CO_{ester}) ; 147,5 (C_a) ; 133,78 (C_d) ; 132,26 (C_f) ; 129,07 ; 128,79 (C_c, C_e) ; 125,03 (C_b) ; 62,78 ($-CH_2-Ar$) ; 39,94 ($-CH_2-NH_3^+$) ; 34,15 ($-CH_2-CO-$) ; 29,40 - 28,98 (6 $-CH_2$) ; 27,46 ($-CH_2-CH_2-NH_3^+$), 26,33 (1 $-CH_2$) ; 24,88 ($-CH_2-CH_2-CO-$).

IRTF (cm^{-1}) : 1338 ($\nu_s NO_2$) ; 1529 ($\nu_{as} NO_2$) ; 1673 ($\nu_{as} CO_2^-$) ; 1744 ($\nu_{CO ester}$) ; 2853 ($\nu_s CH_2$) ; 2922 ($\nu_{as} CH_2$).

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 54,30 ; H 6,73 ; N 6,03 ; trouvée. C 53,29 ; H 6,72 ; N 5,88.

SMHR-ESI [M-TFA] : calculée 351,2278 ; trouvée 351,2286.

g. Synthèse du 12-[(déc-9-ènyl)uréido]dodécanoate de 2-nitrobenzyle (**9**)



Formule : $C_{30}H_{49}N_3O_5$ (MM : 531,73 g/mol)

Rendement : 92%

Aspect : poudre jaune

A une solution de sel de trifluoroacetate d'ammonium (**8**) (0.34 g, 0.73 mmol) dans du dichlorométhane anhydre (15 mL) sous atmosphère inerte, sont ajoutés la triéthylamine anhydre (0.12 mL, 0.80 mmol) et le composé (**2**) (0.17 g, 0.95 mmol). Le mélange réactionnel est agité pendant 16 heures à température ambiante. Le solvant est ensuite évaporé et le solide obtenu lavé abondamment avec du pentane. Il est ensuite dissous dans du dichlorométhane et lavé à l'eau puis séché sur $MgSO_4$ anhydre. Après filtration et concentration sous pression réduite le produit est obtenu avec un rendement de 92% (0.36g, 0.67 mmol).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 8,09 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H_b) ; 7,68 - 7,44 (m, 3H, H_c , H_d , H_e) ; 5,87 - 5,71 (m, 1H, $CH_2=CH-$) ; 5,50 (s, 2H, $-CH_2-Ar$) ; 5,03 - 4,88 (m, 2H, $CH_2=CH-$) ; 4,38 (t, $J = 5,4$ Hz, 2H, 2 $-NH-$) ; 3,17 - 3,08 (m, 4H, 2 $-CH_2-NH-CO-$) ; 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, $-CH_2-CO-$) ; 2,02 (m, 2H, $CH_2=CH-CH_2-$) ; 1,65 (quint, 2H, $-CH_2-CH_2-CO-$) ; 1,46 (quint, 4H, 2 $-CH_2-CH_2-NH-$) ; 1,27 (s, 24H, 12 $-CH_2-$).

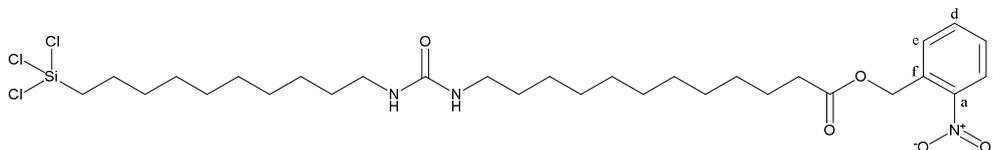
RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 173,32 (CO_{ester}) ; 158,44 ($CO_{urée}$) ; 147,76 (C_a) ; 139,29 ($CH_2=CH-$) ; 133,80 (C_d) ; 132,40 (C_f) ; 129,22 ; 128,89 (C_c , C_e) ; 125,18 (C_b) ; 114,29 ($CH_2=CH-$) ; 62,91 ($-CH_2-Ar$) ; 40,77 (2 $-CH_2-NH-$) ; 34,29 ($-CH_2-CO-$) ; 33,91 ($CH_2=CH-CH_2-$) ; 30,37 - 27,02 (14 $-CH_2-$) ; 25,00 ($-CH_2-CH_2-CO-$).

IRTF (cm^{-1}) : 1332 ($\nu_s NO_2$) ; 1531 ($\nu_{as} NO_2$) ; 1570 (δ_{NH} , ν_{CN}) ; 1615 ($\nu_{CO_{urée}}$) ; 1645 ($\nu_{C=C}$) ; 1734 ($\nu_{CO_{ester}}$) ; 2850 ($\nu_s CH_2$) ; 2922 ($\nu_{as} CH_2$) ; 3335 (ν_{NH}).

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 67,76 ; H 9,29 ; O 15,04 ; N 7,90 ; trouvée. C 65,81 ; H 9,20 ; O 15,39 ; N 7,46.

SMHR-ESI $[M+Na]^+$: calculée 554,3564 ; trouvée 554,3562.

h. Synthèse du composé (**10a**)



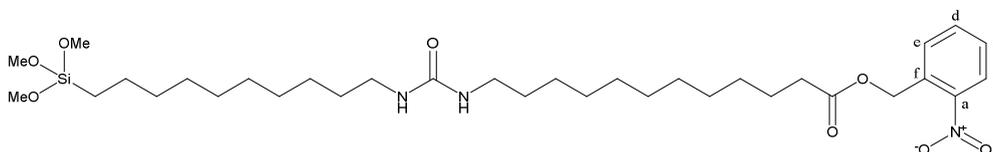
Formule : C₃₀H₅₀Cl₃N₃O₅Si (667,18 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide, puis placé sous argon, on verse une solution du composé (**9**) (26 mg, 0,05 mmol) dans le toluène anhydre (0,5 mL). On ajoute ensuite le trichlorosilane préalablement distillé (80 μ L, 0,8 mmol) et le catalyseur de Karstedt (112 μ L, 5 μ mol [Pt]). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures à 40°C et puis refroidi à température ambiante. Le solvant et l'excès de trichlorosilane sont évaporés à la rampe à vide. Le composé (**10a**) est obtenu avec un rendement quantitatif (cf. RMN ¹H).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8,08 (d, J = 8,2 Hz, 1H, H_b) ; 7,67 - 7,44 (m, 3H, H_c, H_d, H_e) ; 5,50 (s, 2H, -CH₂-Ar) ; 4,41 (s, 2H, 2 -NH-) ; 3,56 (s, 9H, -Si-(OCH₃)₃) ; 3,16 - 3,08 (m, 4H, 2 -CH₂-NH-CO-) ; 2,40 (t, J = 7,5 Hz, 2H, -CH₂-CO-) ; 1,64 (m, 2H, -CH₂-CH₂-CO-) ; 1,52 - 1,41 (m, 4H, 2 -CH₂-CH₂-NH-) ; 1,25 (s, 28H, 14 -CH₂-) ; 0,60 - 0,49 (m, 2H, -CH₂-Si-).

i. Synthèse du composé (**10b**)



Formule : C₃₃H₅₉N₃O₈Si (653,92 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide, puis placé sous argon, on verse une solution du composé (**9**) (26 mg, 0,05 mmol) dans le toluène anhydre (0,5 mL). On ajoute

Partie expérimentale

ensuite le triméthoxysilane préalablement distillé (32 μL , 0,25 mmol) et le catalyseur de Karstedt (28 μL , 1,25 μmol [Pt]). Le milieu réactionnel est agité pendant 3 heures à 65°C et puis refroidi à température ambiante. Le solvant et l'excès de triméthoxysilane sont évaporés à la rampe à vide. Le composé (**10b**) est obtenu avec un rendement quantitatif (cf. RMN ^1H).

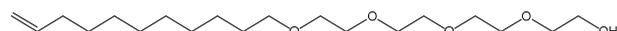
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8,08 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H_b) ; 7,67 - 7,44 (m, 3H, H_c , H_d , H_e) ; 5,50 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Ar}$) ; 4,41 (s, 2H, 2 $-\text{NH}-$) ; 3,56 (s, 9H, $-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$) ; 3,16 - 3,08 (m, 4H, 2 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-$) ; 2,40 (t, $J = 7,5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CO}-$) ; 1,64 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$) ; 1,52 - 1,41 (m, 4H, 2 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$) ; 1,25 (s, 28H, 14 $-\text{CH}_2-$) ; 0,67 - 0,59 (m, 2H, $-\text{CH}_2-\text{Si}-$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 173,10 (CO_{ester}) ; 158,52 ($\text{CO}_{\text{urée}}$) ; 147,51 (C_a) ; 133,62 (C_d) ; 132,23 (C_f) ; 129,03, 128,72 (C_c , C_e) ; 125,04 (C_b) ; 62,71 ($-\text{CH}_2-\text{Ar}$) ; 50,45 ($-\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$) ; 40,51 (2 $-\text{CH}_2-\text{NH}-$) ; 34,12 ($-\text{CH}_2-\text{CO}-$) ; 30,31 - 26,92 (15 $-\text{CH}_2-$) ; 24,83 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-$) ; 22,53 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Si}-$) ; 9,12 ($-\text{CH}_2-\text{Si}-$).

RMN ^{29}Si (59 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : -41,1.

FTIR (cm^{-1}) : 1084-1194 ($\nu_{\text{Si-O}}$) ; 1334 ($\nu_{\text{s NO}_2}$) ; 1532 ($\nu_{\text{as NO}_2}$) ; 1576 (δ_{NH} , ν_{CN}) ; 1617 ($\nu_{\text{CO urée}}$) ; 1736 ($\nu_{\text{CO ester}}$) ; 2850 ($\nu_{\text{s CH}_2}$) ; 2925 ($\nu_{\text{as CH}_2}$).

j. Synthèse du 3,6,9,12-tétraoxatricos-22-èn-1-ol (**12**)



Formule : $\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_5$ (MM : 346,5 g/mol)

Rendement : 70%

Aspect : huile jaune

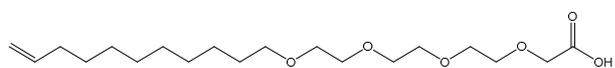
Dans un ballon bicol de 250 mL rempli avec 100 mL de THF anhydre, on ajoute à 0°C sous argon l'hydrure de sodium (6 g, 250 mmol), le tétraéthylène glycol (**11**) (58,5 g, 390 mmol) est additionné lentement. On laisse sous agitation pendant 20 minutes, et le 11-bromoundécène (10 mL, 43,3 mmol) est versé goutte à goutte. Après retour à température ambiante, puis une nuit à 65°C, on ajoute 2 mL d'eau pour éliminer le NaH restant. On évapore ensuite le THF. On redissout le produit dans du pentane et on extrait à l'eau pour éliminer le tétraéthylène glycol en excès. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (AcOEt/pentane 1/2 puis AcOEt). Le produit est obtenu avec un rendement de 70% (10,60 g, 30 mmol).

Partie expérimentale

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5,85 - 5,62 (m, 1H, $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-$) ; 4,99 - 4,79 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-$) ; 3,69 - 3,46 (m, 16H, $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$) ; 3,38 (t, $J = 6,7$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$) ; 2,90 (s, 1H, $-\text{OH}$) ; 2,06 - 1,88 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$) ; 1,61 - 1,41 (m, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$) ; 1,21 (s, 12H, 6 $-\text{CH}_2-$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 139,14 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-$) ; 114,08 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-$) ; 72,51 ($-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$) ; 71,47 - 69,09 (3 $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$ + $(\text{CH}_2)_8-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}$) ; 63,53 ($-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{OH}$) ; 33,74 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$) ; 29,88 - 28,96 (6 $-\text{CH}_2-$) ; 26,02 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$).

k. Synthèse de l'acide 3,6,9,12-tétraoxatricos-22-èn-1-oïque (13)



Formule : $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_6$ (MM : 346,5 g/mol)

Rendement : 79%

Aspect : huile jaune

A une solution de CrO_3 (3,35 g, 33,5 mmol) dans l'acide sulfurique à 1,5 M (53 mL, 80 mmol), maintenue entre 5 et 10°C (mélange cyclohexane/azote liquide pour refroidir), est ajouté le composé (12) (3,08 g, 8,90 mmol), dilué dans 100 mL d'acétone, en 3h30. Le milieu réactionnel est ensuite laissé sous agitation pendant 2h à 25°C. De l'éther (150 mL) est ajouté et le milieu réactionnel est lavé 3 fois avec de l'eau (150 mL). La phase organique est concentrée sous pression réduite et reprise dans l'éther (100 mL). La phase étherée est ensuite extraite 2 fois avec une solution de soude à 1M. La phase aqueuse est acidifiée jusqu'à pH 2 avec une solution d'acide sulfurique à 6M et extraite à nouveau 3 fois avec de l'éther. La phase organique est séchée sur MgSO_4 anhydre et concentrée sous pression réduite. Le produit est obtenu avec un rendement de 79% (2,52 g, 7,015 mmol).

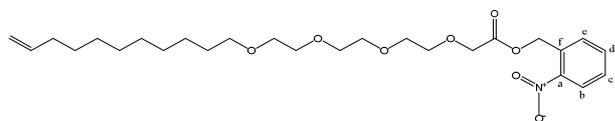
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,66 (s, 1H, $-\text{OH}$) ; 5,81 - 5,64 (m, 1H, $\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-$) ; 4,97 - 4,78 (m, 2H, $\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-$) ; 4,07 (s, 2H, $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CO}_2\text{H}$) ; 3,75 - 3,47 (m, 12H, $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$) ; 3,38 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$) ; 2,04 - 1,89 (m, 2H, $\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$) ; 1,59 - 1,42 (m, 2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$) ; 1,20 (s, 12H, 6 $-\text{CH}_2-$).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 172,60 ($-\text{CO}_2\text{H}$) ; 139,05 ($\text{CH}_2=\underline{\text{C}}\text{H}-$) ; 114,04 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2=\text{CH}-$) ; 71,48 - 69,93 (3 $-\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}-$ + $(\text{CH}_2)_8-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}$) ; 68,64 ($-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CO}_2\text{H}$) ; 33,70 ($\text{CH}_2=\text{CH}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$) ; 29,38 - 28,92 (6 $-\text{CH}_2-$) ; 25,93 ($\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}_2$).

IRTF (cm^{-1}) : 1109 (ν_{COC}) ; 1736 ($\nu_{\text{CO acide}}$) ; 2855 ($\nu_{\text{s}} \text{CH}_2$) ; 2926 ($\nu_{\text{as}} \text{CH}_2$).

SMHR-FD [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$: calculée 383,2410 ; trouvée 389,2418.

1. Synthèse du 3,6,9,12-tétraoxatricos-22-èn-1-oate de 2-nitrobenzyle (**14**)



Formule : $C_{26}H_{41}NO_8$ (MM : 495,61 g/mol)

Rendement : 57%

Aspect : huile jaune

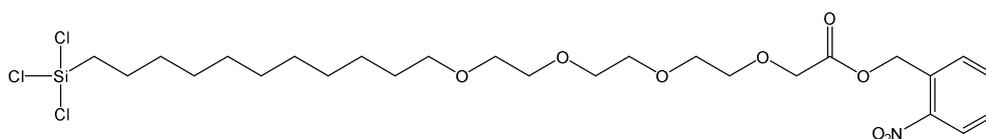
A une solution de composé (**13**) (3,379 g, 9,37 mmol) dans 30 mL de dichlorométhane anhydre, on ajoute du DCC (1,933 g, 9,37 mmol), de la DMAP (1,145 g, 9,37 mmol) et de l'alcool nitrobenzylique (1,149 g, 7,50 mmol). On laisse la solution sous agitation à 25°C pendant 20h. On filtre ensuite la solution sur fritté pour enlever la dicyclohexylurée (DCU) formée. On lave à l'eau distillée et la phase aqueuse est extraite au dichlorométhane. Les phases organiques sont séchées sur $MgSO_4$ anhydre puis concentrées sous pression réduite. Le produit est purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (AcOEt/pentane 5/5). Le produit est obtenu avec un rendement de 57% (2,10 g, 4,24 mmol).

RMN 1H (400 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 8,05 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H_b) ; 7,64 - 7,45 (m, 3H, H_c , H_d , H_e) ; 5,80 - 5,68 (m, 1H, $CH_2=CH-$) ; 5,53 (s, 2H, $-CH_2-Ar$) ; 4,96 - 4,83 (m, 2H, $CH_2=CH-$) ; 4,22 (s, 2H, $-O-CH_2-CO_2R$) ; 3,73 - 3,48 (m, 12H, $-O-CH_2-CH_2-O-$) ; 3,38 (t, $J = 6,8$ Hz, 2H, $-CH_2-CH_2-O-$) ; 2,01 - 1,93 (m, 2H, $CH_2=CH-CH_2-$) ; 1,56 - 1,46 (m, 2H, $-CH_2-CH_2-O-$) ; 1,21 (s, 12H, 6 $-CH_2-$).

RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 169,88 (CO_{ester}) ; 147,48 (C_a) ; 139,11 ($CH_2=CH-$) ; 133,80 (C_d) ; 131,61 (C_f) ; 129,15 ; 128,94 (C_c , C_e) ; 125,05 (C_b) ; 114,07 ($CH_2=CH-$) ; 71,45 - 70,00 (3 $-O-CH_2-CH_2-O + (CH_2)_8-CH_2-O$) ; 68,50 ($-CH_2-CO_2R$) ; 63,06 ($-CH_2-Ar$) ; 33,74 ($CH_2=CH-CH_2-$) ; 29,57 - 28,86 (6 $-CH_2-$) ; 26,02 ($CH_2-CH_2-CH=CH_2$).

SMHR-TOF $[M+Na]^+$: calculée 518,2724 ; trouvée 518,2730.

m. Synthèse du composé (**15a**)



Formule : $C_{26}H_{42}Cl_3NO_8Si$ (631,06 g/mol)

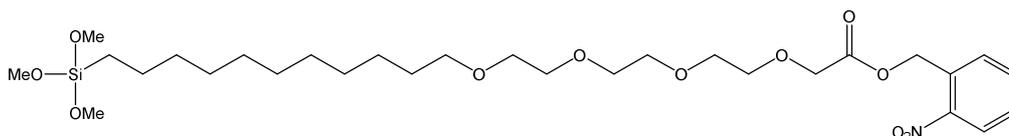
Rendement : quantitatif

Partie expérimentale

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide, puis placé sous argon, on verse une solution du composé (**14**) (25 mg, 0,05 mmol) dans le toluène anhydre (0,5 mL). On ajoute ensuite le trichlorosilane préalablement distillé (81 μ L, 0,8 mmol) et le catalyseur de Karstedt (112 μ L, 5 μ mol [Pt]). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures à 40°C puis refroidi à température ambiante. Le solvant et l'excès de trichlorosilane sont évaporés à la rampe à vide. Le composé (**15a**) est obtenu avec un rendement quantitatif (cf. RMN ^1H).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8,11 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H_b) ; 7,71 - 7,45 (m, 3H, H_c , H_d , H_e) ; 5,59 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Ar}$) ; 4,28 (s, 2H ; $-\text{O-CH}_2\text{-CO}_2\text{R}$) ; 3,83 - 3,53 (m, 12H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$) ; 3,43 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$) ; 1,66 - 1,24 (m, 18H, 9 $-\text{CH}_2$) ; 0,78 - 0,63 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Si-}$).

n. Synthèse du composé (**15b**)



Formule : $\text{C}_{29}\text{H}_{51}\text{NO}_{11}\text{Si}$ (617,81 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide, puis placé sous argon, on verse une solution du composé (**14**) (25 mg, 0,05 mmol) dans le toluène anhydre (0,5 mL). On ajoute ensuite le trichlorosilane préalablement distillé (32 μ L, 0,25 mmol) et le catalyseur de Karstedt (28 μ L, 1,25 μ mol [Pt]). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures à 40°C puis refroidi à température ambiante. Le solvant et l'excès de trichlorosilane sont évaporés à la rampe à vide. Le composé (**15b**) est obtenu avec un rendement quantitatif (cf. RMN ^1H).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8,09 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H, H_b) ; 7,73 - 7,42 (m, 3H, H_c , H_d , H_e) ; 5,56 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Ar}$) ; 4,24 (s, 2H ; $-\text{O-CH}_2\text{-CO}_2\text{R}$) ; 3,84 - 3,50 (m, 12H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$) ; 3,43 (t, $J = 6,5$ Hz, 2H, $-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$) ; 1,66 - 1,15 (m, 18H, 9 $-\text{CH}_2$) ; 0,71 - 0,50 (m, 2H, $-\text{CH}_2\text{-Si-}$).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 169,97 (CO_{ester}) ; 147,63 (C_a) ; 133,85 (C_d) ; 131,70 (C_f) ; 129,27 ; 129,02 (C_c , C_e) ; 125,15 (C_b) ; 71,57 - 70,00 (3 $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ + $(\text{CH}_2)_8\text{-CH}_2\text{-}$

O) ; 68,61 (-CH₂-CO₂R) ; 63,17 (-CH₂-Ar) ; 50,61 (-Si-(OCH₃)₃) ; 29,64 - 26,13 (8 -CH₂-) ; 22,71 (-CH₂-CH₂-Si-) ; 9,18 (-CH₂-Si-).

4) Greffages des agents de couplage et modification des surfaces de silice

a. Matériel et substrats

Un réacteur à double enveloppe de 500 mL est utilisé pour réaliser les réactions de silanisation à température contrôlée et sous atmosphère inerte. Celui-ci est nettoyé au préalable à la potasse alcoolique, puis rincé à l'eau, à l'acétone et séché dans une étuve à 80°C pendant au moins une nuit.

Les substrats utilisés pour la PM-IRRAS sont des lames d'or recouvertes d'une couche de SiO₂ fournies par Optics Balzers AG (référence 200785). Leur facteur de réflexion est supérieur à 98% dans la zone spectrale 1,2 - 12 μm. L'épaisseur de la couche de SiO₂, mesurée par ellipsométrie est de 215 ± 7 Å. Ce sont des lames de 5 cm x 5 cm découpés manuellement en quatre (2,5 cm x 2,5 cm) à l'aide d'un coupe - verre.

Les wafers de silicium utilisés sont des wafers Silicon-CZ-undoped (épaisseur 500 μm, une seule face polie) fournis par BT Electronics. Ce sont des wafers prédécoupés de 1 cm x 1 cm.

b. Préparation des substrats

Les substrats sont tout d'abord intensivement rincés à l'eau MilliQ (18 MΩ.cm). Ensuite ils sont déposés sur un support en téflon puis placés dans un bécher remplis de chloroforme mis dans un bain à ultrasons (Fisherbrand FB 11205 ; 37 kHz) pendant 15 minutes. Les substrats sont ensuite séchés avec un jet d'azote sous la hotte à flux laminaire avant d'être exposés aux UV/O₃ (PSDP-UVT Pro, Novascan, λ = 185-254 nm) pendant 30 min. Pour finir les substrats sont directement introduits dans le réacteur double enveloppe et mis sous vide pendant 1h30 à 18°C.



Figure 1 : photo du réacteur double paroi utilisé pour les greffages des SAMs

c. Greffage des agents de couplage

❖ Formation de la SAM-urée-NO₂ 100% et SAM-urée-CH₃ 100% :

Le composé **(4)** ou **(10b)** ($5 \cdot 10^{-5}$ mol) fraîchement préparé est solubilisé dans le schlenk d'hydrosilylation sous atmosphère d'argon, dans 5 mL de toluène anhydre. On ajoute ensuite ces 5 mL dans un schlenk **(A)** contenant 45 mL de toluène anhydre. Dans un schlenk **(B)**, une solution d'acide trichloroacétique (TCA) (0,8 mg ; $5 \cdot 10^{-6}$ mol) est préparé dans 50 mL de toluène anhydre. Sous atmosphère d'argon, 100 mL de toluène anhydre sont introduits dans le réacteur double enveloppe (wafers placés au préalable à l'intérieur), puis successivement le contenu du schlenk **(A)** et celui du schlenk **(B)**. On a donc un volume total de 200 mL ce qui fait une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M dans le réacteur.

Après 12h sous atmosphère d'argon à 18°C dans le réacteur double enveloppe, les substrats sont sortis de la solution, rincés dans le toluène et nettoyés aux ultrasons successivement dans le toluène (5 min), le chloroforme (5 min) et l'eau milliQ (10 min), puis séchés sous jet d'azote et placés sous vide dans un dessiccateur en attendant la caractérisation par PM-IRRAS et AFM.

❖ Formation de la SAM-urée-NO₂ 30% et SAM-urée- NO₂ 10% :

Le composé **(10b)** ($1,5 \cdot 10^{-5}$ mol ou $0,5 \cdot 10^{-5}$ mol) et le composé **(4)** ($3,5 \cdot 10^{-5}$ mol ou $4,5 \cdot 10^{-5}$ mol) fraîchement préparé est solubilisé dans le schlenk d'hydrosilylation sous

atmosphère d'argon, dans 5 mL de toluène anhydre. On ajoute ensuite ces 5 mL (contenant 30% ou 10% de **(10b)** et 70% ou 90% de **(4)**) dans un schlenk **(A)** contenant 45 mL de toluène anhydre. Dans un schlenk **(B)**, une solution d'acide trichloroacétique (TCA) (0,8 mg ; 5.10^{-6} mol) est préparé dans 50 mL de toluène anhydre. Sous atmosphère d'argon, 100 mL de toluène anhydre sont introduits dans le réacteur double enveloppe (wafers placés au préalable à l'intérieur), puis successivement le contenu du schlenk **(A)** et celui du schlenk **(B)**. On a donc un volume total de 200 mL ce qui fait une concentration de $2,5.10^{-4}$ M dans le réacteur.

Après 12h sous atmosphère d'argon à 18°C dans le réacteur double enveloppe, les substrats sont sortis de la solution, rincés dans le toluène et nettoyés aux ultrasons successivement dans le toluène (5 min), le chloroforme (5 min) et l'eau milliQ (10 min), puis séchés sous jet d'azote et placés sous vide dans un dessiccateur en attendant la caractérisation par PM-IRRAS et AFM.

❖ Formation de la SAM PEG-NO₂ 100% :

Le composé **(15a)** (5.10^{-5} mol) fraîchement préparé est solubilisé dans le schlenk d'hydrosilylation sous atmosphère d'argon, dans 5 mL de toluène anhydre. On ajoute ensuite ces 5 mL dans un schlenk **(A)** contenant 95 mL de toluène anhydre. Sous atmosphère d'argon, 100 mL de toluène anhydre sont introduits dans le réacteur double enveloppe, puis le schlenk **(A)**. On a donc un volume total de 200 mL ce qui fait une concentration de $2,5.10^{-4}$ M dans le réacteur.

Après 20h sous atmosphère d'argon à 18°C dans le réacteur double enveloppe, les substrats sont sortis de la solution, et nettoyés aux ultrasons successivement dans le toluène (5 min), le chloroforme (5 min) et l'eau milliQ (10 min), puis séchés sous jet d'azote et placés sous vide dans un dessiccateur en attendant la caractérisation par PM-IRRAS et AFM.

d. Modifications chimiques sur la fonction terminale des SAMs

❖ Photoclivage de l'ester 4 - nitrobenzylique :

Pour les 5 types de SAMs précédents, les substrats sont irradiés pendant 30 minutes, à température ambiante, sous une lampe au mercure haute pression à 365 nm. L'irradiation se fait à travers une plaque de Pyrex pour retenir toutes les longueurs d'ondes inférieures à 300 nm. Les substrats sont placés à une distance de 3 cm de la plaque Pyrex et la lampe juste au-dessus de celle-ci. Les substrats irradiés sont ensuite nettoyés aux ultrasons dans le

chloroforme pendant 5 min, puis séchés sous jet d'azote et placés sous vide dans un dessiccateur en attendant la caractérisation par PM-IRRAS.

❖ **Activation des acides carboxyliques :**

Les substrats déprotégés sont plongés dans une solution d'EDC (Chlorhydrate de N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide, 1 g soit 25 mg/mL), de NHS (N-hydroxy-succinimide, 500 mg soit 50 mg/mL) et de MES (hydrate d'acide 2-(N-morpholino)-éthanesulfonique, 1,2 g) dans l'eau (20 mL), pendant 3 heures à température ambiante. Les substrats sont ensuite abondamment rincés à l'eau milliQ puis nettoyés aux ultrasons dans le chloroforme pendant 5 min, puis séchés sous jet d'azote et placés sous vide dans un dessiccateur en attendant la caractérisation par PM-IRRAS.

❖ **Immobilisation de nanoparticules d'or recouvertes de protéine A :**

Des nanoparticules d'or recouvertes de protéine A ($\varnothing = 20$ nm, concentration en protéine : 3.2 $\mu\text{g/mL}$) en solution dans un buffer TRIS (pH = 8.2) sont achetées chez British BioCell International (BBI). On prélève 0,25 ml de cette solution que l'on dilue dans 10 mL d'eau. L'ensemble est passé à la centrifugeuse (5500 tours/min) pendant 3 fois 30 min. On élimine le surnageant puis les nanoparticules sont remises en suspension dans du PBS (10 mL), ajusté à pH 8 avec une solution de KOH (0.5 M).

Les substrats activés sont ensuite immergés dans ce mélange pendant 2h dans une étuve à 37°C. Afin d'éliminer les particules physisorbées, ils sont abondamment rincés avec de l'eau milliQ puis nettoyés aux ultrasons dans l'eau milliQ pendant 5 min. Enfin les substrats sont séchés sous jet d'azote et placés sous vide dans un dessiccateur en attendant la caractérisation par PM-IRRAS, AFM et MEB.

❖ **Immobilisation de nanoparticules d'or PEG-NH₂ :**

Une solution de PBS (9 mL), ajustée à pH 8 avec une solution aqueuse de KOH (0,5 M), est ajoutée à 1 mL d'une solution aqueuse de NP-PEG-NH₂ ($3,4 \cdot 10^{11}$ nanoparticules).

Les substrats activés sont ensuite immergés dans cette solution pendant 20 heures, dans une étuve à 37°C. Puis ils sont abondamment rincés avec de l'eau milliQ puis nettoyés

aux ultrasons pendant 10 min. Enfin ils sont séchés sous jet d'azote et placés sous vide dans un dessiccateur, en attendant la caractérisation par PM-IRRAS, AFM et MEB.

❖ Immobilisation du Virus de la Mosaïque du Tabac (TMV) : protocole développé par le LIRM (CEA)

Les substrats déprotégés sont ensuite activés avec une solution aqueuse de NHS/EDC (0,4 mg/mL de NHS et 0,6 mg/mL d'EDC dans l'eau milliQ) pendant 30 min. Les surfaces sont rincées ensuite 10 fois avec une solution de tampon acétate (10 mM, 100 mM NaCl, pH 4,5). Ensuite on dépose délicatement 80 μ L de tampon acétate sur les substrats activés. Ensuite 20 μ L d'une solution de TMV (1,5 mg/mL dans l'EDTA à 1 mM) est insérée dans la goutte de tampon. Les substrats sont ensuite rincés délicatement avec une solution de tampon phosphate (10 mM, 50 mM KCl, pH 7,5) et séchés en utilisant une pompe à vide (Laboport, KNF Neuberger, Trenton, NJ, USA).

Sur les substrats de mica, le virus TMV, dilué dans l'eau milliQ ($C=1,5$ mg/mL) est déposé sur les substrats pendant 10 min. Les surfaces sont ensuite rincées délicatement avec de l'eau milliQ et séchées comme présenté ci-dessus.

5) Croissance et soudure des nanotubes multiparois sur des pointes AFM

a. Types de pointes

Différents types de pointes AFM sont utilisés pour souder les nanotubes. D'une part des pointes pyramidales en silicium sont utilisées :

- des PPP-NCL de Nanosensors : $k=21 - 98$ N/m ; $f=146 - 236$ kHz
- des PPP-FMR de Nanosensors : $k=0,5 - 9,5$ N/m ; $f=45 - 115$ kHz

D'autre part des pointes coniques en silicium sont utilisées :

- des pointes CSC17 de MikroMasch : $k= 0,06 - 0,4$ N/m ; $f= 10 - 17$ kHz
- des pointes CSC38 de MikroMasch :
 - ✓ levier A : $k= 0,01 - 0,36$ N/m ; $f= 8 - 32$ kHz
 - ✓ levier B : $k= 0,003 - 0,13$ N/m ; $f= 5 - 17$ kHz

Partie expérimentale

- ✓ levier C : $k=0,005 - 0,21 \text{ N/m}$; $f=6 - 23 \text{ kHz}$

Pour finir des pointes pyramidales en nitrure de silicium sont utilisées :

- des pointes DNP de Brucker :
 - ✓ levier A : $k=0,175 - 0,7 \text{ N/m}$; $f=50 - 80 \text{ kHz}$
 - ✓ levier B : $k=0,06 - 0,24 \text{ N/m}$; $f=16 - 28 \text{ kHz}$
 - ✓ levier C : $k=0,12 - 0,48 \text{ N/m}$; $f=40 - 75 \text{ kHz}$
 - ✓ levier D : $k=0,03 - 0,12 \text{ N/m}$; $f=12 - 24 \text{ kHz}$
- des pointes SNL de Brucker :
 - ✓ levier A : $k=0,175 - 0,7 \text{ N/m}$; $f=50 - 80 \text{ kHz}$
 - ✓ levier B : $k=0,06 - 0,24 \text{ N/m}$; $f=16 - 28 \text{ kHz}$
 - ✓ levier C : $k=0,12 - 0,48 \text{ N/m}$; $f=40 - 75 \text{ kHz}$
 - ✓ levier D : $k=0,03 - 0,12 \text{ N/m}$; $f=12 - 24 \text{ kHz}$
- des pointes MSNL de Brucker :
 - ✓ levier A : $k=0,025 - 0,14 \text{ N/m}$; $f=15 - 30 \text{ kHz}$
 - ✓ levier B : $k=0,005 - 0,04 \text{ N/m}$; $f=10 - 20 \text{ kHz}$
 - ✓ levier C : $k=0,005 - 0,02 \text{ N/m}$; $f=4 - 10 \text{ kHz}$
 - ✓ levier D : $k=0,01 - 0,06 \text{ N/m}$; $f=10 - 20 \text{ kHz}$
 - ✓ levier E : $k=0,05 - 0,2 \text{ N/m}$; $f=26 - 50 \text{ kHz}$
 - ✓ levier F : $k=0,3 - 1,4 \text{ N/m}$; $f=90 - 160 \text{ kHz}$

b. Croissance de nanotubes multiparois (MWCNT) sur un fil métallique

Les filaments métalliques sur lesquels vont croître les nanotubes doivent être préparés la veille de la croissance. Il est important de nettoyer préalablement tout le matériel utilisé à l'éthanol et de porter des gants pour éviter toutes contaminations des fils.

Partie expérimentale

Trois fils de platine/iridium (composition : 80% de platine et 20% d'iridium, diamètre : 0,38 mm, Goodfellow) de même longueur sont découpés (environ 3cm). Les fils sont ensuite redressés à l'aide de pinces. Une pliure à un bout est effectuée au bout de manière à pouvoir les différencier. Les fils sont ensuite déposés sur une lame de microscope. A l'aide d'une micropipette, 20 à 30 μl de la solution de catalyseur sont ensuite déposés sur les fils de manière à bien les recouvrir (composition du catalyseur (en volume) : 70% de solution de Pluronic P123 (0,3 g/mL dans l'éthanol) ; 25% de solution de Fe(III) acétylacétonate (0,00024 mol/mL dans l'éthanol) ; 5% de solution de tétraéthylorthosilicate (0,022 mol/mL dans l'éthanol)). Pour finir les fils sont laissés à sécher une nuit sous le couvercle d'une boîte de Pétri.

Le lendemain, les 3 fils sont insérés dans un tube en verre préalablement lavé à l'eau et à l'éthanol puis séché pendant 30 min à 900°C dans le four (Thermolyne Types F79320-33 Tube Furnaces, Thermoscientific).

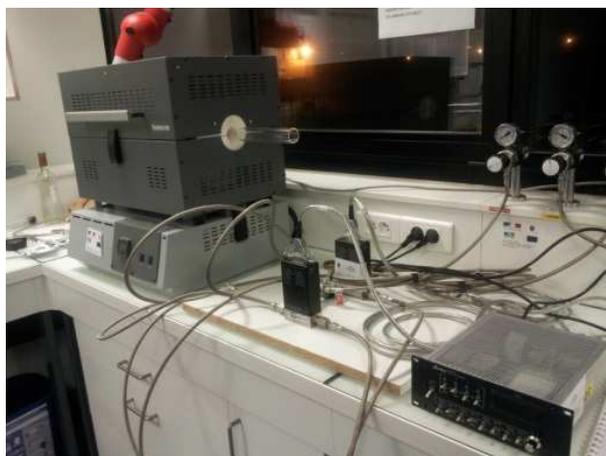


Figure 2 : photo du four utilisé pour la croissance des MWCNT

Le tube avec les fils est ensuite placé dans le four sous flux d'argon pendant 5 minutes à température ambiante. Puis les fils sont chauffés à 750°C pendant 10 minutes sous flux d'argon (temps de chauffe du four compris). Le tube est ensuite laissé pendant 15 minutes sous flux d'argon et d'hydrogène à 750°C, puis 10 minutes sous flux d'hydrogène et d'éthylène toujours à 750°C. Pour finir le tube est laissé 5 minutes sous flux d'argon à 750°C, puis le four est laissé refroidir sous argon. Les fils métalliques sont ensuite sortis du tube et stockés dans une boîte de Pétri propre jusqu'à leur utilisation pour la soudure de nanotubes.

- c. Dépôt d'un film de nickel par pulvérisation cathodique sur les pointes AFM (réalisé par le Centre de Ressources en Couches Minces à l'ICMCB)

Préalablement au dépôt de nickel, les pointes AFM sont fixées sur une lame métallique à l'aide de scotch carbone double face.

Les pointes sont ensuite placées dans une chambre Ultra Haut Vide équipée d'une cathode magnétron portant une cible de nickel. Les pointes sont mises sous un vide de $4,6 \cdot 10^{-7}$ mbar.

Le dépôt d'un film de nickel d'une épaisseur de 12 nm est ensuite réalisé. Pour cela la chambre est mise à une pression de $5 \cdot 10^{-3}$ mbar en insérant un débit d'argon de $52 \text{ cm}^3/\text{min}$ (pour avoir les espèces nécessaires à la création du plasma et à la pulvérisation du nickel). La cible de nickel est placée à une distance de 70 mm des pointes. Une puissance de 56 W est appliquée sur la cathode afin de créer le plasma qui permettra la pulvérisation (cette puissance est appliquée en radiofréquence, de façon à éviter l'accumulation de charge à la surface de la cible). Une tension d'autopolarisation de - 429 V va se créer au niveau de la cathode. La durée du dépôt est de 1 min 16 s (une calibration de l'appareil est réalisée auparavant pour connaître le temps nécessaire pour déposer la hauteur de métal désirée).

Une fois ce dépôt effectué, les pointes sont stockées dans une boîte en attendant d'être utilisées pour la soudure de nanotubes.

- d. Soudure des nanotubes multiparois (MWCNT) sur des pointes AFM

La soudure des nanotubes est effectuée à l'aide d'un microscope optique (Axiovert 200 Mat, Zeiss). Sur la platine de celui-ci sont fixés 2 micropositionneurs tridirectionnels sur lesquels sont fixés des pinces crocodiles.



Figure 3 : photo du montage utilisé pour la soudure des MWCNT

Le filament métallique recouvert de nanotubes est fixé sur la pince crocodile de gauche. En utilisant les différents objectifs du microscope (x10, x20 et x50), la mise au point est effectuée sur un nanotube. Une pointe AFM, préalablement recouverte d'un fin film de nickel, est ensuite fixée sur un support en cuivre à l'aide de scotch carbone double face. Ce support est ensuite fixé sur la pince crocodile de droite. A l'aide des objectifs du microscope la mise au point est effectuée et à l'aide des micropositionneurs, la pointe AFM est ensuite approchée du nanotube et placée dans le même plan. L'ensemble est ensuite placé sous un flux d'oxygène à l'aide d'un fin tube en verre, orientée vers la pointe, de manière à oxyder l'extrémité du nanotube au moment de la soudure et créer des fonctions CO₂H au bout de celui-ci. Le nanotube est ensuite collé contre une des faces de la pointe. Une fois que tout est bien positionné, la tension est augmentée progressivement jusqu'à observer la rupture du nanotube au niveau du fil métallique ainsi que sa soudure sur la pointe. La pointe AFM est ensuite rangée dans une boîte de stockage en attendant d'être imagée au microscope électronique à balayage.

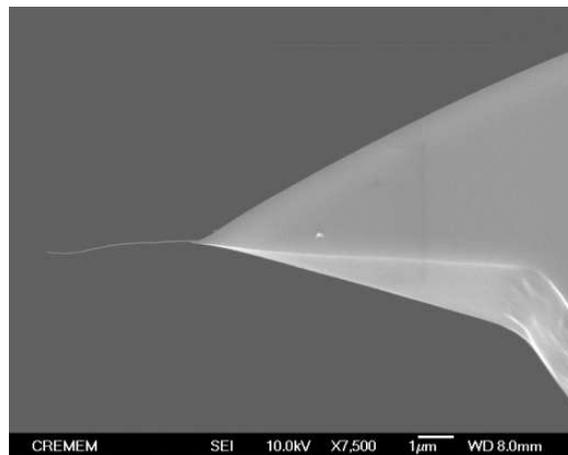


Figure 4 : image MEB d'une pointe AFM avec un MWCNT soudé

6) Mesure de l'interaction avidine-biotine par Spectroscopie Dynamique de Force

a. Immobilisation de l'avidine sur un substrat

L'avidine est fixée sur une lamelle couvre lame de microscope. La lamelle est préalablement nettoyée dans un bain d'acétone pendant 5 mn, séchée sous flux d'azote puis irradiée par une lampe UV-C (180-254 nm) pendant 30 mn pour exposer des groupes hydroxyle en surface.

La lamelle est ensuite plongée dans une solution d'APTES (1 mM dans un mélange 50/50 éthanol et chloroforme) pendant deux heures à température ambiante. L'excès d'APTES est éliminé par trois rinçages à l'éthanol. La lamelle est à nouveau séchée sous flux

d'azote, avant d'être immergée dans une solution de glutaraldéhyde (1% dans l'eau) pendant 30 mn.

Après d'abondants rinçages à l'eau, la surface est plongée dans une solution de 1 μM d'avidine dans un tampon PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) pendant une nuit à 4°C. L'avidine, non fixée par le glutaraldéhyde, est rincée par trois bains de quelques secondes dans le PBS. Les molécules de glutaraldéhyde, non couplées par l'avidine, sont bloquées par une courte incubation de 5 mn en présence d'éthanolamine (1 M, pH 8). Après plusieurs rinçages dans un tampon PBS, la lamelle est stockée à 4°C dans ce tampon.

b. Mesure des courbes approche-retrait en AFM

Les pointes munies d'un nanotube de carbone fonctionnalisé par de la biotine sont montées sur la cellule liquide d'un AFM (Dimension 3100 de Bruker AXS).

Des courbes d'approche retrait sont obtenues par le mode pico-force du programme Nanoscope (v7.30, Bruker AXS). En général, la mesure inclus 3500 points dans chaque courbe. Les variations des vitesses de charges sont obtenues en ajustant la vitesse d'approche et de retrait (entre 25 nm/sec et 1030 nm/sec).

La calibration de la constante de raideur de la pointe fonctionnalisée a été effectuée par la méthode du bruit thermique.

Les courbes d'approche-retrait sont enregistrées dans le format natif de Nanoscope et traitées par le logiciel YieldFinder.¹

¹ Odorico M., Teulon J-M., Bessou T., Vidaud C., Bellanger L., Chen S-w W., Quéméneur E., Parot P., Pellequer J-L. *Biophys. J.* **2007**, 93, 645-654.

Annexe : Microscopie à Force Atomique

La microscopie à force atomique (AFM) fait partie du domaine des techniques à sondes locales (comme la microscopie à effet tunnel (STM)). Celles-ci sont basées sur le principe de l'interaction entre une pointe de taille nanométrique et une surface. Un prix Nobel de physique a récompensé leur découverte en 1986. Contrairement à la STM qui permet d'étudier uniquement des matériaux conducteurs, l'AFM permet l'étude de différents types de surfaces.

Les images de hauteur et de phase des monocouches étudiées dans les chapitres II et III ont été réalisées par microscopie à force atomique (AFM) en mode intermittent (mode tapping).

Les caractérisations des SAMs à l'aide de pointes AFM munies de MWCNT ainsi que les expériences de fonctionnalisation des MWCNT du chapitre V ont été réalisées en mode FM.

Les expériences de DFS du chapitre VI ont aussi été effectuées à l'aide d'un AFM.

A. Principe général de fonctionnement

Le principe de base de l'AFM est de sonder la surface d'un échantillon avec une pointe fine possédant un faible rayon de courbure (de l'ordre de quelques nanomètres). Celle-ci est fixée à l'extrémité d'un levier de 100 à 300 nm de long. Les forces d'interactions entre la pointe et l'échantillon vont provoquer une déflexion du levier due aux forces de van der Waals. Cette dernière est détectée à l'aide d'un système optique constitué d'un faisceau laser et de quatre photodiodes. Les informations collectées par les photodiodes sont ensuite transmises via un système d'asservissement à une céramique piézoélectrique afin d'ajuster la hauteur entre la surface de l'échantillon et la pointe.

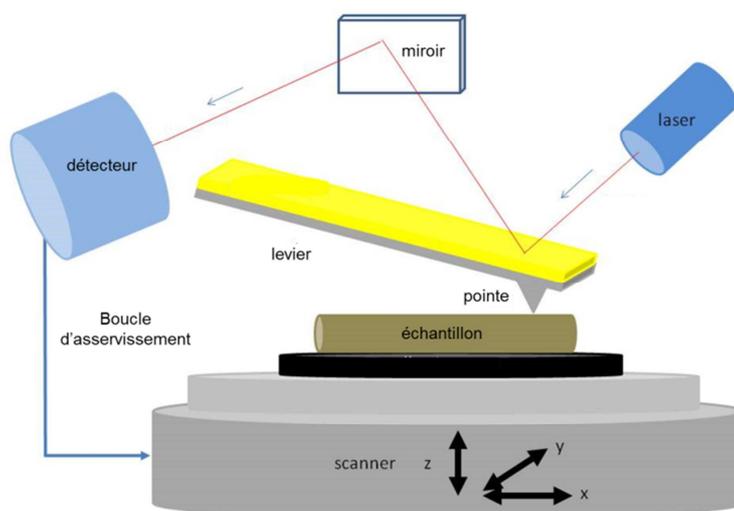


Figure 5. Schéma de fonctionnement d'un microscope à force atomique

Le mode contact intermittent est souvent utilisé pour l'analyse de matériaux mous sans les dégrader. En effet, dans ce mode la pointe n'entre en contact avec la surface que par intermittence et donc le dégrade moins que ne le ferait le mode contact. Dans ce mode, l'amplitude de vibration de la pointe est fixée par une consigne. La topographie est donc construite grâce au mouvement du scanner piézoélectrique suivant l'axe z afin de garder la consigne d'amplitude constante, à l'aide de la boucle d'asservissement. Un déphasage est possible entre le mouvement d'oscillation de la pointe et celui du scanner piézoélectrique. Celui-ci a lieu lors de la rencontre de la pointe avec des régions ayant des propriétés de surfaces différentes. Il permet donc de mettre en évidence les différences de propriétés chimiques ou mécaniques à la surface d'un matériau.

En mode FM (mode qui a été introduit par Albrecht et *al.*²), la phase de l'oscillateur est fixé à $-\pi/2$ et l'amplitude est maintenue constante. Cependant, les mesures étant effectuées en mode dynamique, les interactions entre le nanotube et la surface modifient les propriétés de l'oscillateur et tout particulièrement sa fréquence de résonance et son facteur de qualité. Deux signaux peuvent alors être extraits : le décalage de la fréquence de résonance $\Delta\nu$ ainsi que l'amplitude d'excitation a_{ex} qu'il faut appliquer pour maintenir l'amplitude d'oscillation constante. Ce mode permet donc de séparer les interactions conservatives et dissipatives. En effet, l'amplitude d'excitation dépend uniquement de l'énergie dissipée par l'oscillateur qui est en interaction avec la surface. Le décalage de la fréquence de résonance dépend quant à lui uniquement des forces d'interactions conservatives.

² Albrecht T.R., Grütter P., Horne C., Rugar D. *J. Appl. Phys.* **1991**, 69, 668-673.

B. Matériel utilisé

1. Microscopes

Différents microscopes à force atomique ont été utilisés dans le cadre de cette thèse :

- un AFM 5500 d'*Agilent Technologies* qui a été utilisé pour la caractérisation des SAMs après greffage et l'immobilisation des NP-pA et des NP-PEG,
- un MFP 3D™ Stand Alone AFM d'*Asylum Research* qui a été employé pour la caractérisation des SAMs après greffage et l'immobilisation des NP-pA. Il a aussi servi pour toutes les expériences de fonctionnalisation des MWCNT,
- un Dimension FastScan de *Bruker* a servi pour la caractérisation des SAMs à l'aide de pointes AFM munies d'un MWCNT,
- un MultiMode V de *Veeco* a été utilisé par le laboratoire LIRM du CEA Marcoule pour la caractérisation de l'immobilisation du TMV sur les SAMs.
- un Dimension 3100 de *Bruker* a été employé par le laboratoire LIRM du CEA Marcoule pour les expériences de DFS sur le couple avidine-biotine avec des pointes AFM à nanotubes.

2. Pointes AFM

Pour les différentes expériences d'AFM réalisées au cours de cette thèse, différents types de pointes ont été utilisés :

- des pointes PPP-NCL (PointProbe® Plus Non-Contact /Tapping Mode - Long Cantilever) de *Nanosensors*. Ces pointes ont un levier de 225 μm de long, 38 μm de large et 7 μm d'épaisseur en moyenne. Leur constante de raideur est comprise entre 21 et 98 N/m et la fréquence de résonance entre 146 et 236 kHz. Ces pointes sont utilisées pour la caractérisation des SAMs après greffage et après immobilisation des NP-pA et des NP-PEG ainsi que pour la caractérisation des SAMs une fois munies d'un MWCNT et pour les expériences de fonctionnalisation des MWCNT,

- des pointes PPP-NCH (PointProbe[®] Plus Non-Contact / Tapping Mode - High Resonance Frequency) de *Nanosensors*. Le levier de ces pointes a une longueur de 125 μm , une largeur de 30 μm et une épaisseur de 4 μm en moyenne. Leur constante de raideur est comprise entre 10 et 130 N/m et la fréquence de résonance entre 204 et 497 kHz. Ces pointes sont employées pour la caractérisation des SAMs après immobilisation des NP-pA et des NP-PEG,
- des pointes OTESPA de *Bruker* dont le levier a une longueur de 160 μm , une largeur de 50 μm et une épaisseur de 4,6 μm en moyenne. Leur constante de raideur est comprise entre 12 et 103 N/m et la fréquence de résonance entre 200 et 400 kHz. Elles ont servi pour la caractérisation des SAMs après l'immobilisation du TMV,
- des pointes FMR (PointProbe[®] Plus Force Modulation Mode - Reflex Coating) de *Nanosensors*. Ces pointes dont le levier mesure 225 μm de long, 28 μm de large et 3 μm d'épaisseur en moyenne. Leur constante de raideur est comprise entre 0,5 et 9,5 N/m et la fréquence de résonance entre 45 et 115 kHz. Ces pointes, une fois munies d'un MWCNT ont servies pour la caractérisation des SAMs et pour les expériences de fonctionnalisation des MWCNT,
- des pointes CSC17 de *MikroMasch*. Ces pointes avec un levier de 450 μm de long, 50 μm de large et 2 μm d'épaisseur, ont une fréquence de résonance comprise entre 10 et 17 kHz et une constante de raideur comprise entre 0,06 et 0,4 N/m. Munies d'un MWCNT, elles ont été utilisés pour les expérience de DFS sur le couple avidine-biotine.

C. Conditions d'imagerie pour la caractérisation des SAMs en mode contact intermittent

Les conditions utilisées pour imager les SAMs peuvent être amenées à varier un peu suivant la pointe utilisée et la SAM observée. Mais ces changements sont souvent peu importants et des conditions générales vont ici être présentées.

Pour les pointes utilisées lors de l'imagerie des surfaces (NCL ou NCH), le facteur de qualité mesuré à l'air (loin de la surface pour ne pas avoir d'interactions entre la pointe et la surface) est en général d'environ 500. Celui-ci correspond au rapport Q entre la fréquence de

résonance f_0 et la bande passante Δf (largeur de la courbe de résonance). Plus celui-ci est élevé, meilleure sera la sensibilité du levier.

D'une manière générale, on ne travaille pas à la fréquence de résonance du levier pour imager les surfaces. On se décale à une fréquence légèrement inférieure (une centaine de Hz en général) de manière à ce que la phase libre (sans interactions avec la surface) soit de 45° . De cette manière, on se situe au niveau du point d'inflexion de la lorentzienne de la courbe de résonance. Cela permet d'avoir une plus grande sensibilité lors de la mesure.

L'amplitude de consigne utilisée est généralement légèrement plus faible que l'amplitude libre (amplitude à laquelle, on perd les interactions avec la surface). A titre d'exemple pour une amplitude libre 1,42 V, on utilise une amplitude de consigne de 1,30 V.

La vitesse de balayage est en général comprise entre 0,25 et 0,5 Hz pour les images de $5 \mu\text{m}$ de large effectuées sur l'AFM 5500 d'Agilent. Pour celles effectuées sur le MFP 3D™ Stand Alone AFM d'Asylum, il est possible d'utiliser des vitesses de 1 Hz.

D. Traitements utilisés pour la mise en forme des images AFM

Comme différents appareils ont été utilisés et afin d'avoir une homogénéité de présentation, toutes les images AFM présentées dans cette thèse ont été traitées avec le logiciel Gwyddion v 2.36 (<http://gwyddion.net/>).

Les opérations réalisées pour le traitement ainsi que l'ordre où elles sont réalisées ont une légère influence sur le Rms calculé sur la surface. Pour cette raison, il est donc important que les mêmes opérations soient réalisées dans le même ordre sur toutes les images de manière à pouvoir comparer les Rms obtenus entre eux.

Le Rms est l'écart-type de la distribution de hauteur :

$$Rms = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(Z_i - \bar{Z})^2}{N}}$$

où \bar{Z} est la hauteur moyenne, Z les hauteurs et N le nombre de points.

Pour les images de hauteur, cela consiste, premièrement, à supprimer l'arrière-plan polynomial, en utilisant un polynôme de degré 2 (horizontalement et verticalement). Ensuite, les lignes sont corrigées en faisant correspondre la hauteur médiane. Puis, la valeur minimale

Annexe : Microscopie à force atomique

est fixée à zéro. Pour finir, le maximum de l'échelle de hauteur est fixé à 10 nm pour les SAMs seules et à 20 nm lorsque les NP-pA, les NP-PEG-NH₂ ou le TMV sont immobilisés dessus. Pour ce qui est des images de phase, le seul traitement effectué consiste à adapter la plage de visualisation automatiquement avec suppression des extrémités.

Glossaire

Par souci de clarté une liste des différentes abréviations utilisées, classées par ordre alphabétique, a été réalisée :

2-Np : 11-(2-naphtyl)undécyltrichlorosilane

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

AFM : Microscopie à Force Atomique

AHTMS : (17-aminoheptadécyl)triméthoxysilane

AHTS : 21-aminohénicosyltrichlorosilane

ANR : Agence Nationale pour la Recherche

APhMS : Aminophényltriméthoxysilane

APS : (3-aminopropyl)triméthoxysilane

APTES : 3-aminopropyltriéthoxysilane

ARN : Acide RiboNucléique

Boc : Tert-butoxycarbonyle

Br-HTS : Bromoheptadécyl)trichlorosilane

BSA : Albumine de Sérum Bovin

BSEI : BackScattered Electron Imaging (Mode Electron Rétrodiffusés)

C8TES : Octyltriéthoxysilane

CAR : Courbes Approche-Retrait

CBMN : Institut de Chimie & Biologie des Membranes & des Nano-objets

CCVD : Dépôt Chimique en phase Vapeur Catalytique

CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CNT : Carbon NanoTubes

CREMEM : Centre de Ressource En Microscopie Electronique et Microanalyse

DCC : Dicyclohexylcarbodiimide

Glossaire

DCU : Dicyclohexylurée

DFS : Spectroscopie Dynamique de Force

DMAP : Diméthylaminopyridine

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DSU : Dithio-bis(succinimidylundécanoate)

DSV : Direction des Sciences du Vivant

DTS : Décyltrichlorosilane

EDC : Chlorhydrate de *N*-(3-Diméthylaminopropyl)-*N*'-éthylcarbodiimide

EDTA : Acide EthylèneDiamineTétraacétique

EG : Ethylène glycol

ELISA : Enzyme linked immunoassay

FM : Modulation de Fréquence

FMR : Force Modulation Mode - Reflex Coating

FT-IR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

FTIR-ATR : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier - Réflexion Totale Atténuée

GF : groupement fonctionnel

GPTS : 3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane

HEK : Human Embryonic Kidney

HFCVD : CCVD assistée par filament chaud

HiPCO : Dismutation du monoxyde de carbone sous haute pression

HTS : Hexadécyltrichlorosilane

ICMCB : Institut de Chimie de la Matière Condensée de Bordeaux

IRRAS : Spectroscopie Infrarouge d'Absorption-Réflexion

ISM : Institut des Sciences Moléculaires

LETI : Laboratoire d'Electronique et de Technologie de l'Information

LFM : Microscopie de Force Latérale

LIRM : Laboratoire Interactions et Reconnaissance Moléculaires

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

MEMS : Microsystèmes électromécaniques

MES : 2-(acide *N*-morpholino)éthanesulfonique

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MWCNT : MultiWall Carbon NanoTubes

NASA : National Aeronautics and Space Administration

NCH : Non-Contact / Tapping Mode - High Resonance Frequency

NCL : Non-Contact/Tapping Mode - Long Cantilever

NEXAFS : Near Edge X-ray Absorption Fine Structure (Absorption des rayons X)

NHS : *N*-Hydroxysuccinimide

NP-pA : Nanoparticules d'or recouvertes de protéine A

NP-PEG-NH₂ : Nanoparticules d'or recouvertes de polymères à chaînons PEG terminés amine

ODS : Octadécyltriméthoxysilane

OTMS : Octadécyltriméthoxysilane

OTS : Octadécyltrichlorosilane

P2N : Programme Nanotechnologies et Nanosystèmes

PBS : Tampon Phosphate Salin

PBTCl : Phénylbutyltrichlorosilane

PEG : Polyéthylène glycol

PFPTCl : Pentafluoro-phénylpropyltrichlorosilane

PIERS : Spectroscopie Infrarouge Polarisée par Réflexion Externe

PLL : Phase-Locked Loop (boucle à verrouillage de phase)

PM-IRRAS : Spectroscopie InfraRouge de Réflexion-Absorption par Modulation de Polarisation

Glossaire

PPP : PointProbe[®] Plus

RIA : Radioimmunoassay

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

Rms : Roughness mean square

SAM : Self-Assembled Monolayer (monocouche auto - assemblée)

Sccm : Standard cubic centimeter per minute

STM : Microscopie à Effet Tunnel

SWCNT : SingleWall Carbon NanoTubes

TCA : Acide trichloracétique

TEG : Tétraéthylèneglycol

TFA : Acide trifluoroacétique

TFEE : 1-(trichlorosilyl)-11-[(2,2,2-trifluoroéthoxy)carbonyl]-undécane

THF : Tétrahydrofurane

TMV : Virus de la Mosaique du Tabac

TOF-SIMS : Time Of Flight-Secondary Ion Mass Spectrometry

UMR : Unité Mixte de Recherche

UV : Ultraviolet

XPS : Spectrométrie Photoélectronique X