



HAL
open science

Greffage chimique et électrochimique de nanoparticules d'or : vers des capteurs plus sensibles

Ali Houmed Adabo

► **To cite this version:**

Ali Houmed Adabo. Greffage chimique et électrochimique de nanoparticules d'or : vers des capteurs plus sensibles. Chimie thérapeutique. Université de Franche-Comté, 2014. Français. NNT : 2014BESA2065 . tel-01345735

HAL Id: tel-01345735

<https://theses.hal.science/tel-01345735>

Submitted on 15 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.



Année 2014

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'université de Franche-Comté

Spécialité : Chimie

Laboratoire UTINAM

Ecole doctorale Carnot-Pasteur

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2014

Par Monsieur Ali HOUMED-ADABO

Greffage chimique et électrochimique de nanoparticules d'or : Vers des capteurs plus sensibles.

Directeur de thèse : Mr. Stéphane ROUX, Pr. Université de Franche-Comté

Mme Rana BAZZI, MCF, Université de Franche-Comté (Co-encadrante)

Après avis de : Mr. Fabrice GOUBARD, Pr. Université de Cergy-Pontoise Rapporteur

Mr. Fabien MIOMANDRE, MCF, ENS Cachan (Paris) Rapporteur

Devant la commission d'examen formé :

Professeur Fabrice GOUBARD, Université de Cergy-Pontoise Rapporteur

Docteur Fabien MIOMANDRE, MCF, ENS Cachan (Paris) Rapporteur

Professeur Emmanuel BENICHO, Université Claude Bernard Lyon 1 Examineur

Docteur Wilfrid BOIREAU, Université de Franche-Comté Examineur

Professeur Stéphane ROUX, Université de Franche-Comté Membre

« Ah ! Ce n'est pas dans la science qu'est le bonheur, mais dans l'acquisition de la science ! Savoir pour toujours, c'est l'éternelle béatitude ; mais tout savoir, ce serait une damnation de démon. »

Edgar Allan Poe (1845).

REMERCIEMENTS.

Ce travail de thèse pluridisciplinaire a été réalisé au laboratoire UTINAM et plus exactement au sein de l'équipe NCM (Nanoparticules, Contaminants et Membrane) à l'université de Franche-Comté. Je tiens donc à remercier en premier lieu Sylvain PICAUD (directeur du laboratoire d'UTINAM) et Patrick FIEVET (directeur de l'équipe NCM), pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans d'excellentes conditions.

Je suis ensuite très reconnaissant à Fabrice GOUBARD et Fabien MIOMANDRE d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je tiens également à remercier Emmanuel BENICHOU et Wilfrid BOIREAU d'avoir assuré les rôles d'examineur de mon jury.

Je souhaite ensuite exprimer toute ma gratitude à Stéphane ROUX, mon directeur de thèse, et à Rana BAZZI qui ont tous les deux encadré ce travail pendant mes trois années de recherche. Merci du fond du cœur à Stéphane ROUX pour ta disponibilité et ton enthousiasme, pour nos discussions scientifiques et non scientifiques toujours enrichissantes, pour son aide lors des manipulations et de la rédaction, pour ses conseils judicieux. J'ai beaucoup appris à ses côtés, notamment au niveau de sa rigueur scientifique et de sa précision dans le travail. J'espère sincèrement que dans le futur nous serons amenés à travailler de nouveau ensemble.

Je voudrais aussi remercier tous ceux qui ont directement participé à ce travail par leur écoute, leur disponibilité et leurs conseils avisés. Wilfrid BOIREAU et Rabah ZAGGARI de nous avoir fourni des surfaces d'or terrasses et faire des caractérisations AFM sur les surfaces à FEMTO-ST. Pascal PERRIAT pour la caractérisation TEM. Virginie MOUTARLIER pour les caractérisations Pm-IRRAS et SDL. Nicolas ROUGE et Roland SALUT pour les caractérisations MEB à TEMIS et enfin Christophe MARQUETTE pour la caractérisation fluorescente. Et enfin je tiens particulièrement à remercier aussi Mlle Rokiya HOUSSEIN, stagiaire en master 2, qui m'a aidé en travaillant sur une partie de ce projet de thèse.

Concernant mes compagnons d'arme, Je tiens à remercier tout d'abord Akim TIZIT de m'avoir permis de partager son bureau avec lui, je le remercie aussi pour ses conseils, sa bonne humeur et sa sympathie. Un grand merci aussi à mon binôme de trois ans Gautier LAURENT pour tous les moments agréables passés ensemble en sein du laboratoire comme en dehors et dans toutes les conférences/colloques que nous avons effectué ensemble. Et enfin je remercie Mlle Gloria JIMENEZ SANCHEZ qui partage notre bureau pour sa gentillesse et son amabilité.

Je voudrais remercier tous mes collègues de laboratoire qui ont fait de cette thèse trois années vraiment agréables et plutôt « familiale » du fait de notre petite équipe ; En particulier à Sébastien DEON et Nathalie BERTOLI, ainsi que mes amis doctorants Mohamed-awal, Mahmoud, Anthony, Moumin et Nasser.

J'adresse une pensée particulière et mes chaleureux remerciements à mes deux mères (Neima AHMED-BOURALEH et Hawa DJAMA) et à mon père (Houmed ADABO-KAKO) ainsi qu'à toute la famille ADABO-KAKO à qui je dois beaucoup, pour leur confiance et leur soutien constant durant mes études universitaires. Un grand merci plus particulièrement à mon père qui m'a donné la chance de poursuivre mes études universitaires en France et de m'avoir encouragé tout au long de ces études. Qu'il trouve dans la réalisation de ce travail de thèse, l'aboutissement de son effort ainsi que l'expression de ma profonde gratitude.

Un remerciement très spécial à ma fiancée Ilwad HASSAN DJAMA, pour la patience et le soutien dont elle a fait preuve pendant toute la durée de cette thèse et sans avoir l'ombre d'un doute de ma réussite dans ce travail de thèse.

Je remercie aussi mes compagnons de route universitaire qui sont aussi mes meilleurs amis Pierrick CLEMENT et Patrick TIYUSHIME pour leurs soutiens, leurs encouragements et leurs bonnes ambiances durant les vacances passés auprès de leurs familles respectives. Et enfin une pensée à mes meilleurs amis d'enfance de Djibouti tel que Gamal SHAMY, Kounah DINI, Youssouf MOUSSA, Billy IDRIS-MED, Mazen ADEL, Latif ABDALLAH etc... de m'avoir encouragé et soutenu.

RESUME

En raison des bénéfices apportés, la précocité du diagnostic est un objectif essentiel qui guide la plupart des travaux de recherche consacrés au développement de biocapteurs. Elle permet en effet de réagir efficacement et rapidement face à un risque d'épidémie pour mieux la circonscrire. Sur le plan individuel, elle conduit, en agissant plus tôt, à améliorer l'effet thérapeutique des traitements et le confort du patient. La précocité du diagnostic repose dans la plupart des situations sur la capacité à détecter à très faible concentration dans des fluides complexe un agent pathogène ou un biomarqueur caractéristique d'une pathologie à venir. L'amélioration des seuils de détection constitue donc une priorité dans le cadre du développement des biocapteurs. Parmi les différentes pistes explorées, la nanostructuration de la surface sensible du biocapteur apparaît très prometteuse. La rugosité qui en résulte induit une augmentation de la surface sensible permettant d'immobiliser un plus grand nombre de ligand de capture mais également une meilleure orientation de ces ligands qui les rendent plus efficaces dans le processus de reconnaissance de la cible.

Afin de contrôler la structuration de la surface à l'échelle nanométrique, nous avons choisi de greffer par voie chimique et électrochimique des nanoparticules à base d'or. Pour cela nous avons développé deux types de nanoparticules qui se distinguent par leur taille, leur composition et le mode de greffage sur une surface conductrice. Le premier type de nanoparticules synthétisé est constitué de particules de silice (60 nm) décorées par des nanoparticules d'or (2,5 nm) ($\text{SiO}_2\text{-Au}$). La composition chimique de surface de ces nanoparticules a été adaptée pour assurer leur greffage par cycloaddition 1,3-dipolaire (Click Chemistry). La couche organique des nanoparticules d'or a été modifiée de façon à posséder des fonctions alcyne. En présence de cuivre (I), produit chimiquement ou électrochimiquement, nous avons montré que ces nanoparticules hybrides pouvaient être immobilisées à la surface de substrats d'or recouverts au préalable d'une monocouche mixte de thiols dont certains sont terminés par une fonction azoture qui est connue pour former un cycle triazole après réaction avec la fonction alcyne. Le deuxième type de nanoparticules a été conçu de façon à permettre le greffage par réduction électrochimique des cations

diazonium sur différentes surfaces conductrices (carbone vitreux, ITO et or). Cet objectif a été atteint en développant des nanoparticules d'or fonctionnalisées par la mercaptoaniline (Au@MA, 3 nm) qui est un précurseur du cation diazonium. L'intérêt du greffage des nanoparticules par réduction des cations diazonium repose sur le fait que cette technique ne nécessite aucune modification préalable de la surface du substrat à recouvrir contrairement au greffage par cycloaddition 1,3-dipolaire. Par un test de chimiluminescence du luminol, nous avons montré que les surfaces recouvertes par les nanoparticules d'or étaient nettement plus sensibles que les surfaces dépourvues de nanoparticules. Il ressort de ce travail de thèse que le greffage de nanoparticules à la fonctionnalisation adaptée sur des surfaces conductrices constitue une voie prometteuse pour améliorer la sensibilité des biocapteurs.

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

CHAPITRE 1 : Etude bibliographique

1°/ Diagnostic précoce du cancer	3
2°/ Nanosciences et nanotechnologies.....	4
2.1°/ Définition	4
2.2°/ Les approches « top-down » et « bottom-up »	5
2.3°/ Quelques domaines d'application des nanotechnologies.....	5
2.4°/ L'intérêt unique de l'or dans les nanotechnologies	6
3°/ Les nanoparticules d'or	7
3.1°/ Généralités	7
3.2°/ Propriétés optiques modulables des nanoparticules d'or.....	8
3.3°/ Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules d'or	9
3.3.1°/ Méthodes par réduction chimique	11
3.3.1.1°/ Méthodes de Turkevich-Frens : réduction d'un sel d'or en milieu aqueux.....	11
3.3.1.2°/ Méthodes de Brust : réduction d'un sel d'or en milieu organique	12
3.3.2°/ Méthodes physiques	14
4°/ Modification des surfaces par différentes méthodes de greffage	15
4.1°/ Greffage et électrogreffage via la Click Chemistry	17
4.1.1°/ Cycloaddition de Huisgen.....	19
4.1.1.1°/ Système catalytique avec ligand	21
4.1.1.2°/ Principaux systèmes catalytiques sans ligand	21
4.1.1.2.1°/ Réduction in situ des sels de cuivre(II)	21
4.1.1.2.2°/ Oxydation du cuivre métallique	22
4.1.1.2.3°/ Utilisation directe de sels de cuivre(I)	23
4.1.2°/ Fonctionnalisation des nanoparticules par Click Chemistry	24
4.1.3°/ Modification de surface par Click Chemistry	24
4.2°/ Les sels de diazonium : des agents de fonctionnalisation de surface	

prometteurs.....	27
4.2.1°/ Généralités sur les sels de diazonium	27
4.2.2°/ Modification chimique de la surface par réduction de sels de diazonium...	30
4.2.3°/ Modification électrochimique de la surface par réduction de sels de diazonium	31
4.2.4°/ Production "in situ" de sels de diazonium	33
4.2.5°/ Structure de la couche organique.....	34
4.2.6°/ Greffage direct et indirect des nanoparticules par la réduction des sels de diazonium.....	35
5°/ But de travail	39
Références	41

CHAPITRE 2 : Synthèse, fonctionnalisation, greffage par Click et caractérisation des particules silice/or sur des substrats d'or

1°/ Introduction	47
1.1°/ Généralités sur l'élaboration des nanoparticules d'or Au@DTDTPA	48
1.2°/ Généralité sur la synthèse de particules de silice SiO ₂	49
1.3°/ Généralité sur le greffage via la Click-Chemistry	50
2°/ Partie expérimentale	51
2.1°/ Synthèse et fonctionnalisation des Au@DTDTPA via la propargylamine.....	51
2.1.1°/ Synthèse de nanoparticules d'or Au@DTDTPA	51
2.1.2°/ Fonctionnalisation des nanoparticules Au@DTDTPA par des alcynes via la propargylamine	52
2.2°/ Différentes Méthodes de caractérisations de la solution colloïdales Au@DTDTPA et Au@DTDTPA-Alcyne	52
2.2.1°/ Microscopie Electronique en Transmission (TEM)	52
2.2.2°/ Spectrophotométrie d'absorption UV-visible et étude de la stabilité colloïdale en fonction du pH	53

2.2.3°/ Mesure du potentiel zêta et Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	53
2.3°/ Synthèse, fonctionnalisation et caractérisation des particules fluorescentes de silice de 50 nm par des azotures	54
2.4°/ Fonctionnalisation des particules de silice $\text{SiO}_2\text{-N}_3$ par des nanoparticules d'or Au@DTDTPA-alcyne par cycloaddition 1,3-dipolaire.....	55
2.5°/ Préparation et fonctionnalisation de la surface d'or par des fonctions azotures .	55
2.6°/ Greffage chimique des $\text{SiO}_2\text{-Au@Alcyne}$ sur de surface d'or azoturée.....	56
2.7°/ Greffage électrocatalysé des $\text{SiO}_2\text{-Au@Alcyne}$ sur de surface d'or azoturée	56
2.8°/ Différentes méthodes de caractérisation de la surface d'or modifiée.....	57
2.8.1°/ Infrarouge Pm-IRRAS.....	57
2.8.2°/ Par imagerie MEB.....	57
2.8.3°/ Par imagerie fluorescence.....	57
2.8.4°/ par SDL	58
3°/ Résultats et discussion	58
4°/ Conclusion	78
Références	79

CHAPITRE 3 : Synthèse et greffage électrochimique de Au@MA. Vers des biocapteurs plus sensibles ?

1°/ Introduction	81
2°/ Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'or fonctionnalisées	83
2.1°/ Quelle stratégie pour des nanoparticules d'or Au@MA.....	83
2.2°/ Partie expérimentale	84
2.2.1°/ Synthèse des nanoparticules d'or fonctionnalisées Au@MA.....	84
2.2.2°/ Les différentes étapes de purification de Au@MA (lavage par décantation et dialyse)	85
2.2.2.1°/ Lavage par décantation des Au@MA.....	85
2.2.2.2°/ Purification par dialyse des Au@MA.....	85
2.2.3°/ Caractérisation des nanoparticules d'or Au@MA	86

2.2.3.1°/ Microscopie Electronique en Transmission (TEM).....	86
2.2.3.2°/ Spectrophotométrie d'absorption UV-visible et étude de la stabilité colloïdale au cours du temps et du pH	86
2.2.3.3°/ Mesure du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique par DLS	87
2.2.3.4°/ Dosage par ICP-OES de l'or (Au) et du soufre (S)	87
2.3°/ Résultats et discussion	87
3°/ Greffage électrochimique et caractérisation des Au@MA.....	97
3.1°/ Quelle stratégie pour le greffage électrochimique des nanoparticules d'or Au@MA?	97
3.2°/ Partie expérimentale	97
3.2.1°/ Différents substrats conducteurs utilisés	97
3.2.1.1°/ La surface de carbone vitreux	97
3.2.1.2°/ La surface d'or	98
3.2.1.3°/ La surface d'oxyde d'indium et d'étain (Indium Tin Oxide (ITO))	98
3.2.2°/ Préparation des substrats conducteurs	98
3.2.2.1°/ Substrat de carbone vitreux (GC)	98
3.2.2.2°/ Substrat d'ITO	99
3.2.2.3°/ Substrat d'or	100
3.2.3°/ Électrogreffage des nanoparticules Au@MA sur les substrats conducteurs	101
3.2.4°/ Différentes méthodes de caractérisation des surfaces	101
3.2.4.1°/ Par la voltamétrie cyclique (cas des substrats GC et ITO)	101
3.2.4.2°/ Par imagerie AFM (cas des substrats ITO et or)	102
3.2.4.3°/ Par analyse élémentaire ICP (cas du substrat d'ITO)	102
3.3°/ Résultats et discussion	102
4°/ Conclusion	114
Références	115
Conclusion générale.....	116

Glossaire

Abréviation Signification

Au	Or
MA	Mercaptoaniline
SAM	Monocouches auto-assemblées
CuAAC	Cu(I)-catalysed Azide-Alkyne 1,3 dipolar Cycloaddation
TBTA	tris-(benzyltriazolyméthyle)amine
Asc-Na	Ascorbate de sodium
AFM	Atomic Force Microscopy
IR	Spectroscopie infra-rouge
GC	Carbone vitreux
ITO	Oxyde d'indium et d'étain
Pt	Platine
Pm-IRRAS	Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption par modulation de polarisation
MEB	Microscope Electronique à Balayage
SDL	Spectroscopie de Décharge Luminescente
TEM	Microscopie Electronique en Transmission
TEOS	Tétraéthoxysilane
TOAB	Bromure de tétraoctylammonium
VC	Voltamétrie cyclique
ISN	Intensité de la Surface Nanostructurée

APTES	(3-Aminopropyl)triéthoxysilane
ECS	Electrode de référence au calomel saturée
Da	Dalton
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DTDTPA	Dérivé dithiolé du DTPA
DTPA	Acide diéthylentriamine pentaacétique
EDC	N-[3-(diméthylamino)propyl]-N'-éthylcarbodiimide
ICP-OES	Spectrométrie d'émission atomique par torche à plasma
nm	Nanomètre
pH	Potentiel Hydrogène
UV	Ultraviolet
NHS	N-hydroxysuccinimide

INTRODUCTION GENERALE

L'abaissement des seuils d'exposition à certains contaminants, la prévention d'épidémie et le diagnostic précoce de maladies nécessitant de lourds traitements (cancer) constituent des enjeux majeurs de santé publique qui nécessitent des outils de détection toujours plus performants. Il a été récemment démontré que la nanostructuration de surface constituait une stratégie prometteuse pour rendre les surfaces de biocapteur beaucoup plus sensibles à leur environnement. Le gain en sensibilité semble résulter de l'augmentation de surface et d'une meilleure orientation des ligands de capture. Parmi les différentes voies physiques et chimiques pour contrôler la topographie de la surface, l'immobilisation durable de nanoparticules sur une surface plane apparaît comme une méthode prometteuse. En raison de l'excellent contrôle des réactions interfaciales que procurent les techniques électrochimiques, le greffage électrochimique de nanoparticules d'or apparaît parfaitement adapté pour améliorer la sensibilité de la détection. Cette stratégie nécessite la synthèse de nanoparticules fonctionnalisées par des groupements électroactifs ou par des fonctions réactives permettant l'accrochage sur des surfaces modifiées par voie chimique (électro)catalysée.

En s'appuyant sur les propriétés singulières des nanoparticules d'or (résonance de plasmon, effet catalytique) et sur celles résultant de leur assemblage contrôlé, des capteurs plus sensibles et plus spécifiques pourront être développés. Afin d'atteindre ces objectifs, le travail réalisé au cours de cette thèse a consisté :

- à synthétiser des nanostructures à base d'or.
- à maîtriser l'assemblage de nanoparticules dont la fonctionnalisation aura été adaptée pour obtenir des structures tri et bidimensionnelles sur un substrat solide.
- à évaluer leur potentiel pour la biodétection.

L'immobilisation de nanostructures à base d'or à la surface d'un substrat conducteur nécessite une fonctionnalisation adaptée. Comme la réduction électrochimique des sels de diazonium s'est révélée extrêmement performante pour fonctionnaliser des surfaces, des particules d'or seront synthétisées de manière à être recouvertes par des précurseurs de sels de diazonium. La seconde méthode que nous explorerons pour immobiliser les nanoobjets à

base d'or repose sur la cycloaddition 1,3-dipolaire entre des fonctions alcyne portées par les nanoparticules d'or et azoture immobilisées à la surface du substrat plan.

A partir de l'exemple du diagnostic du cancer qui s'il était plus précoce permettrait d'augmenter les chances de guérison et un meilleur confort des patients, ce chapitre tente de montrer l'intérêt de développer des biocapteurs ultrasensibles. Parmi les stratégies possibles, le greffage des nanoparticules constitue une voie prometteuse pour améliorer la sensibilité des surfaces intégrées dans les biocapteurs. La synthèse de nanoparticules, leur fonction et les différentes possibilités de les greffer (réduction de cation diazonium, cycloaddition 1,3-dipolaire) sur des surfaces seront abordées dans le chapitre 1.

Les chapitres 2 et 3 sont consacrés à la synthèse et au greffage des nanostructures à base d'or. Le chapitre 2 rassemble les résultats obtenus dans le cas de particules de silice fluorescentes décorées de nanoparticules d'or. La fonction de ces dernières a été imaginée afin d'assurer à la fois leur greffage sur les particules de silice et l'immobilisation de l'édifice final sur des substrats plans d'or par des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire. Comme la réduction de cation diazonium est un procédé efficace pour recouvrir une surface par un film organique, un des objectifs de cette thèse consistait à exploiter ce mode de greffage pour immobiliser des nanoparticules. C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressées à la synthèse de nanoparticules d'or recouvertes de précurseurs de cation diazonium à leur greffage sur des substrats conducteurs et aux conséquences sur la biodétection. Les résultats concernant cette partie font l'objet du chapitre 3.

A la fin de ce mémoire se trouve l'ensemble des conclusions et perspectives qui découlent de ce travail de thèse.

Chapitre 1 : Etude bibliographique

1°/ Diagnostic précoce du cancer

L'abaissement des seuils d'exposition à certains contaminants, la prévention d'épidémie et le diagnostic précoce de pathologies sévères (comme le cancer) constituent à l'heure actuelle des enjeux majeurs de santé publique qui nécessitent des outils de détection toujours plus performants. Parmi toutes les stratégies qui peuvent être développées pour la détection précoce d'un cancer, la recherche de biomarqueurs dans le sang, c'est-à-dire de protéines plus fréquemment produites chez des patients cancéreux que chez des patients sains, est l'objet de nombreuses études de biologie et de médecine car ces biomarqueurs sont présents avant l'apparition des symptômes de la maladie mais à l'état de traces. Certains cancers (poumon, intestin et foie) présentent en effet des difficultés de diagnostic, en raison de symptômes communs avec de petits maux quotidiens. Dans la plupart des cas, la maladie n'est détectée qu'à un stade avancé qui limite les chances de guérison. Les diagnostics précoces constituent donc un enjeu sociétal de taille, à la fois pour éviter des traitements lourds et difficiles à supporter, mais aussi pour améliorer le pronostic vital. Pour effectuer un diagnostic plus précoce, il est nécessaire de détecter les précurseurs moléculaires de ces maladies (biomarqueurs). Une telle démarche repose sur la conception et le développement de biocapteurs ultrasensibles car cette détection est rendue difficile par la faible quantité de ces molécules et par la complexité du milieu dans lequel elles circulent. Un biocapteur est un outil analytique composé d'un élément biologique appelé biorécepteur lié à un transducteur. Le biorécepteur reconnaît spécifiquement une molécule du milieu analysé et l'information biochimique qui en résulte est convertie par le transducteur en un signal analytiquement utile.

Afin d'améliorer la sensibilité des biocapteurs, le groupe de Kelley a étudié le rôle de nanostructuration de la surface sensible [1]. Leur travail a mis en évidence que la morphologie de surface peut exercer une influence importante au niveau des interactions biomoléculaires entre la cible circulante et le ligand de capture immobilisé. L'augmentation de la rugosité de la surface résultant de la nanostructuration permet non seulement d'accroître la surface de contact qui conduit à l'immobilisation d'un plus grand nombre de

ligands de capture mais également d'améliorer l'orientation de ces ligands de capture pour mieux interagir avec les biomolécules (Figure 1.1). Cette stratégie de fonctionnalisation de surface devrait déboucher sur la mise au point de biocapteurs de haute performance pour les applications médicales comme le diagnostic précoce du cancer. Afin d'augmenter la rugosité (et donc d'améliorer la sensibilité de la surface du biocapteur), la stratégie mise en œuvre au cours de ce travail de thèse a consisté à greffer les nanoparticules d'or sur des surfaces conductrices. Afin de mieux appréhender les enjeux et les limitations d'une telle stratégie, le paragraphe suivant sera consacré aux domaines des nanosciences et nanotechnologies avant d'enchaîner sur une revue dédiée aux nanoparticules d'or à partir desquelles nous espérons concevoir une surface nanostructurée.

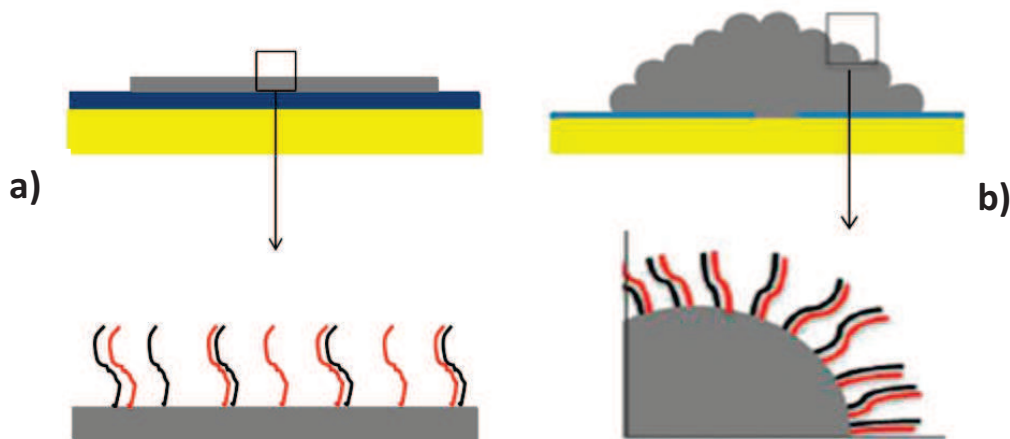


Figure 1.1 : a) surface lisse non nanostructurée ; b) surface rugueuse nanostructurée.

2°/ Nanosciences et nanotechnologies

2.1°/Définition

Utilisée pour la première fois en 1974 par Noria Tanigushi, Le terme «nanotechnologie » est devenu un mot très courant dans la littérature scientifique. Sachant que le préfixe « nano » désigne nanomètre soit le millième de micromètre (ou 10^{-9} m), les nanosciences et les nanotechnologies peuvent être définies comme étant les sciences et les technologies des objets à l'échelle nanométrique. Une nanoparticule se définit comme un objet dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm. Mais la principale caractérisation des

nanoparticules est l'apparition de nouvelles propriétés qui n'existent pas dans les matériaux massifs parents. Basée sur les propriétés intrinsèques d'objets de taille nanométrique, les nanosciences et nanotechnologies permettent de les utiliser et/ou de les assembler de façon à obtenir des propriétés spécifiques.

2.2°/ les approches « top-down » et « bottom-up »

Les nano-objets sont principalement accessibles par deux voies différentes :

- la première approche, dite « top-down » (allant du plus grand vers le plus petit (voie descendante)), permet de concevoir des objets de dimension nanométrique par fragmentation.
- La seconde approche, dite « bottom-up » (allant du plus petit vers le plus grand (voie ascendante)), permet en s'appuyant sur les propriétés intrinsèques d'auto-assemblage ou d'assemblage direct de molécules ou atomes de concevoir des nanostructures. Cette approche semble être la stratégie la plus prometteuse pour exploiter le potentiel des nanosciences et nanotechnologies.

En effet, les avantages de la voie ascendante résident dans un meilleur contrôle de la composition, de la forme et de la taille du système et dans la possibilité d'obtenir des objets d'un degré élevé de complexité [2].

2.3°/ Quelques domaines d'application des nanotechnologies

Le développement des nanotechnologies commence déjà à transformer notre quotidien. La possibilité de réduire la taille des objets tout en augmentant leurs performances nous promet des produits plus petits, plus légers, moins chers, plus puissants (ordinateurs) ou plus efficaces (soins médicaux). Plus de 300 produits contenant des nanoparticules sont déjà commercialisés. Bien que les domaines d'application des nanotechnologies soient nombreux nous ne mentionnerons que ceux en lien avec la biologie et la médecine:

- Domaine biomédical : au cours de ces dernières années, le monde a assisté à la naissance du nano-diagnostic et des nanomédicaments. Il est possible d'envisager la synthèse de matériaux nanométriques et biocompatibles hautement performants

pour le diagnostic et/ou la thérapie car ils pourraient après injection cibler spécifiquement les tissus malades. L'ingénierie tissulaire, destinée à remplacer des tissus ou organes, exploite également le potentiel des nanotechnologies.

- **Domaine des biotechnologies :** sachant que certaines molécules indispensables à la vie (comme les protéines, acides nucléiques, lipides, etc.) sont des matériaux qui présentent des propriétés uniques, déterminées par leur taille, leur forme et leur arrangement à l'échelle nanométrique, l'intégration contrôlée à l'échelle nanométrique de ces composants biologiques dans des matériaux synthétiques devrait conduire à l'amélioration de la sélectivité qui est, par exemple, à la base du ciblage de tumeurs cancéreuses ou de la détection par des biocapteurs.

2.4°/ L'intérêt unique de l'or dans les nanotechnologies

L'or, provenant du mot latin Aurum, est le deuxième métal (après le cuivre) connu par l'humanité. Du point de vue chimique, l'or métallique est considéré comme peu réactif (métal noble). Ces états d'oxydation stables sont +I et +III [3]. Reconnu comme matériau noble, l'or métallique possède à l'échelle nanométrique, des propriétés uniques et inattendues qui en font un candidat prometteur pour de nombreuses applications. Les applications potentielles des nanoparticules d'or sont très nombreuses en électronique, dans le domaine de la santé, de la catalyse et de la décoration. Considéré comme étant un « matériau clé », les nanoparticules d'or ont fait et continuent à faire l'objet de nombreux travaux visant à exploiter les propriétés intrinsèques de l'or (effet radiosensibilisant pour améliorer la radiothérapie [4,5]) et les propriétés optiques modulables résultant de la réduction de la taille (imagerie photoacoustique [6], thérapie photothermique [6], détection colorimétrique de l'ADN [7], détection par effet SERS [8], détection « plasmonique » [6]...).

3°/ Les nanoparticules d'or

3.1°/ Généralités

Les suspensions à base de nanoparticules d'or sont connues depuis l'antiquité. L'or « soluble » est apparu au 5^e ou 4^e siècle avant J.C. en Egypte et en Chine. L'or colloïdal était alors utilisé à la fois dans des buts curatifs et artistiques. Sa couleur, variant du rouge au bleu, était utilisée pour colorer des vitraux et des céramiques. Un exemple surprenant de cette utilisation est la coupe de Lycurgue composée essentiellement d'alliage or-argent et datant du 5^e ou 4^e siècle avant J.C. (Figure 1.2). Cette coupe romaine, exposée au British Museum de Londres est caractérisée par sa couleur changeant en fonction de la manière dont elle est éclairée. Lorsqu'elle est éclairée en lumière transmise, elle est verte. Par contre, éclairée de l'intérieur, elle apparaît rouge rubis. En 1818, Jeremias Benjamin Richter suggéra même que la couleur des solutions colloïdales dépendait de la taille des particules en suspension [9]. C'est en 1857 que Faraday met au point la première synthèse contrôlée de colloïdes d'or [10]. Il a ainsi prouvé qu'il existe un lien entre la couleur de la solution et la taille des nanoparticules. En réduisant une solution aqueuse de tétrachloroaurate d'hydrogène (HAuCl_4) par du phosphore solubilisé dans du disulfure de carbone, il est parvenu à obtenir des particules d'or dont la taille pouvait être contrôlée par les conditions expérimentales. Il a également observé que la couleur de films minces de particules variait en fonction de la compression mécanique subie. Il constate ainsi que de nombreux paramètres peuvent influencer sur les propriétés optiques des nanoparticules d'or. Depuis, les propriétés exceptionnelles des solutions colloïdales métalliques n'ont cessé d'attirer l'attention de la communauté scientifique.



Figure 1.2 : A gauche, la coupe de Lycurgue présentant le changement de couleur induit par la direction de l'éclairage et, à droite, la solution de Faraday exposée dans son laboratoire.

3.2°/ Propriétés optiques modulables des nanoparticules d'or

Outre leurs propriétés catalytiques inattendues décrites par Haruta en 1987 lorsque leur taille n'excède pas 2 nm, les nanoparticules d'or ont retenu l'attention de la communauté scientifique au cours des trois dernières décennies en raison de leurs propriétés optiques modulables qui reposent sur les phénomènes de résonance de plasmon.

Ces phénomènes de résonance de plasmon résultent de l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction. Ce phénomène de résonance se traduit par l'absorption d'onde électromagnétique dans le domaine du visible pour l'or [11], ce qui explique la coloration particulière de ces nanoparticules. Cependant ce phénomène de résonance de plasmon est observé seulement pour des nanoparticules de taille supérieure à 2 nm [12]. La fréquence de résonance de plasmon dépend de la nature du métal, de la taille et de la forme de la particule, des propriétés diélectriques du substrat ou du milieu environnant et des interactions entre-particules. Il est possible de jouer sur ces différents paramètres pour faire varier la couleur des nanoparticules d'or dans tout le domaine du visible, voire de déplacer la fréquence de résonance de plasmon dans le proche infrarouge (Figure 1.3).

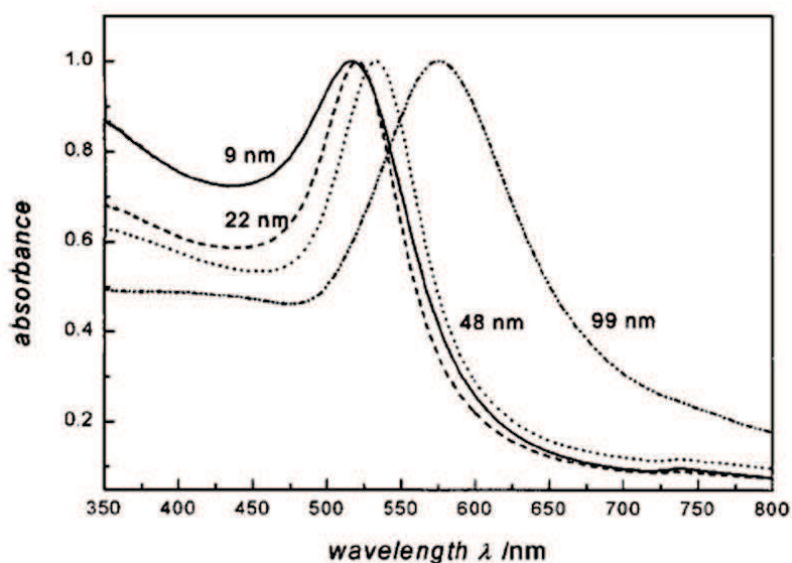


Figure 1.3 : Position de la bande de plasmon en fonction de la taille des nanoparticules d'or.

Cette sensibilité à ces différents paramètres a été exploitée pour concevoir des biocapteurs, en particulier des tests colorimétriques de détection d'ADN (travaux de Mirkin [11–13]).

Mais elle a également été exploitée pour caractériser les nanoparticules car la position de la bande d'absorption « plasmonique » est déplacée vers les grandes longueurs d'onde quand la taille des nanoparticules augmentent ou quand des agrégats de nanoparticules se forment [13–15]. De plus, la largeur à mi-hauteur fournit une indication sur la distribution en taille de la suspension de nanoparticules : plus elle est fine, plus la suspension colloïdale contient des nanoparticules homogènes en taille.

3.3°/ Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules d'or

À partir de la voie ascendante (bottom up), plusieurs protocoles de synthèse chimique et physique de nanoparticules d'or ont été mis au point. Dans la plupart des cas, les nanoparticules d'or sont obtenues par réduction de sels d'or ou de composés organométalliques à base d'or. Les protocoles se distinguent par la source d'électrons, le précurseur à base d'or et la nature des ligands. En revanche, quelle que soit la méthode de synthèse mise en œuvre, la formation des nanoparticules d'or s'effectuent en deux étapes : la nucléation et la croissance. La formation de nanoparticules d'or nécessite la réduction de Au^{3+} (ou Au^+ dans le cas de certains précurseurs) en Au^0 . L'absence de charge de Au^0 favorise

la collision des atomes d'or qui contrairement au cas des cations Au^{3+} ou Au^+ n'est pas empêchée par la répulsion électrostatique. Dès que la concentration en Au^0 est suffisante (c'est-à-dire que la probabilité de collision est suffisamment importante), une multitude de germes composés de quelques atomes d'or apparaissent en un temps court (nucléation) [16,17]. À leur tour, les germes non chargés vont entrer en collision pour former des particules (Figure 1.4). En outre, cette étape de nucléation s'accompagne d'une baisse brutale de la quantité d'atome d'or isolés. Les atomes restants participeront également à la phase de croissance des particules. La suspension est composée de particules présentant une distribution en taille relativement large. Une homogénéisation de la taille est observée au cours du temps par mûrissement d'Ostwald. Ce principe de nucléation/croissance vaut aussi bien pour les méthodes chimiques que pour certaines méthodes physiques lors de la synthèse des nanoparticules d'or.

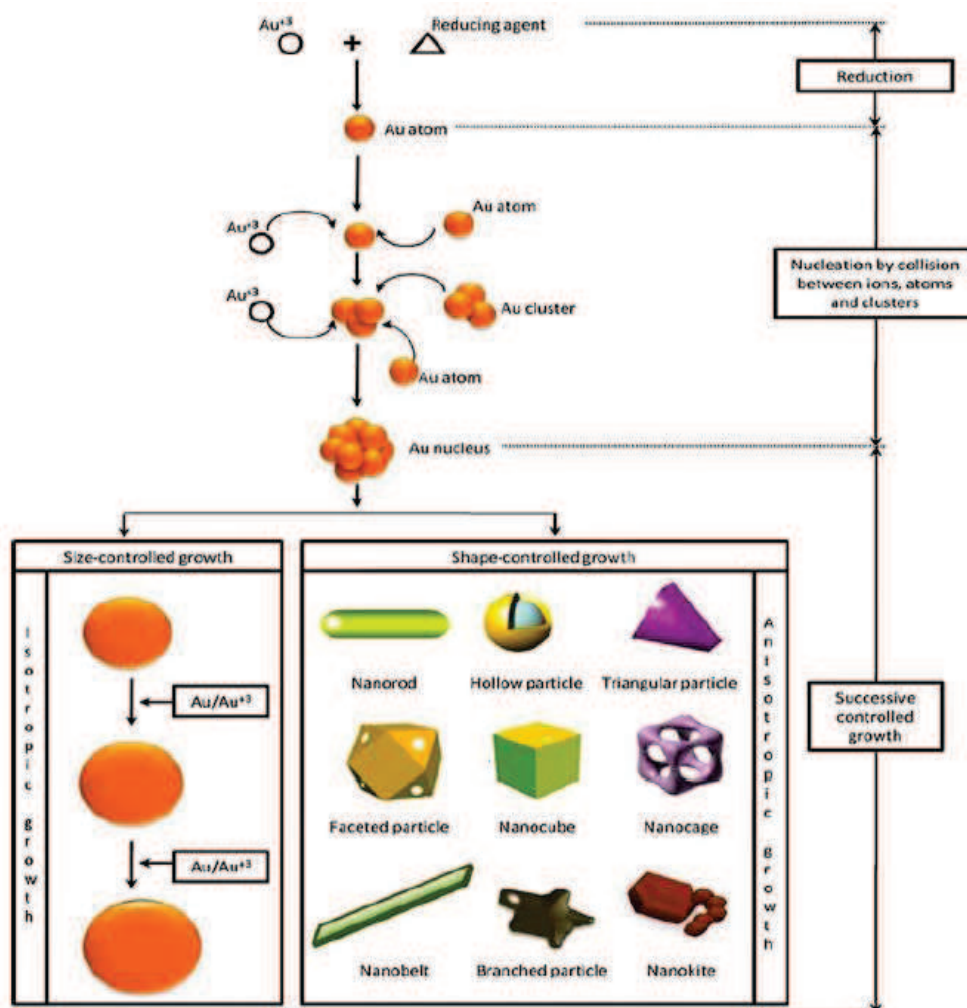


Figure 1.4 : Préparation par réduction chimique de nanoparticules d'or avec obtention de différentes tailles et formes [18].

3.3.1°/ Méthodes par réduction chimique

L'objectif de la réduction chimique est de réduire Au(III) en or métallique (Au^0) dans un milieu aqueux ou biphasique en présence d'un agent stabilisant. La réduction peut être réalisée par ajout d'espèces réductrices (ions citrate, ions tétrahydruroborate) ou par voie électrochimique. La réduction chimique est de loin la méthode la plus utilisée pour la synthèse de nanoparticules d'or car elle permet de mieux contrôler des paramètres comme la taille, la morphologie et la distribution de taille [18].

3.3.1.1°/ Méthodes de Turkevich-Frens : réduction d'un sel d'or en milieu aqueux

Parmi les méthodes classiques de synthèse des nanoparticules d'or, la plus connue a été détaillée par Turkevich en 1951 [19]. Il s'agit d'une réduction de $HAuCl_4$ par des ions citrate en solution aqueuse, ces derniers jouant non seulement le rôle de réducteur mais aussi de stabilisant. On obtient des nanoparticules d'or de taille comprise entre 10 et 20 nm de diamètre. Puis, cette méthode a été améliorée par Frens qui, grâce au contrôle du rapport sel d'or/citrate, est parvenu à obtenir des nanoparticules d'or de taille comprise entre 15 et 150 nm de diamètre [20]. La quantité d'ajout de cet agent permet de contrôler la taille des particules : plus la quantité d'agent stabilisant est grande, plus les NP sont petites ; car les agents vont permettre de stopper la croissance de particules d'or en se greffant autour de ce dernier. Ces nanoparticules d'or sont chargées négativement. Même s'il s'agit certainement de la méthode la plus simple à mettre en œuvre, les mécanismes de croissance des particules et l'influence de facteurs comme le pH, la concentration en citrate, commencent seulement à être compris [21]. Le mécanisme global de la réaction et par conséquent la taille des nanoparticules sont principalement déterminé par le pH de la solution qui est imposé par la concentration de citrate de sodium [21].

La méthode de Turkevich-Frens présente comme inconvénient majeur un manque de stabilité colloïdale qui résulte de la faible interaction entre la couche de citrate et l'or. Ce manque de stabilité colloïdale constitue probablement la raison pour laquelle les suspensions Au@citrate sont faiblement concentrées.

Les avantages de cette méthode de synthèse reposent sur une large gamme de tailles de particule contrairement à la méthode de Brust et sur la nature du solvant (eau). Enfin l'inconvénient de la faible liaison or/citrate peut être retourné comme un avantage car elle permet de remplacer facilement les ions citrate par des dérivés thiol à condition que ces derniers soient solubles dans l'eau. Les particules issues des synthèses Turkevich-Frens ayant une taille comprise entre 15 et 150 nm présentent par conséquent une palette de couleur qui va du rouge-orangé jusqu'au violet en passant par le rouge et le bleu.

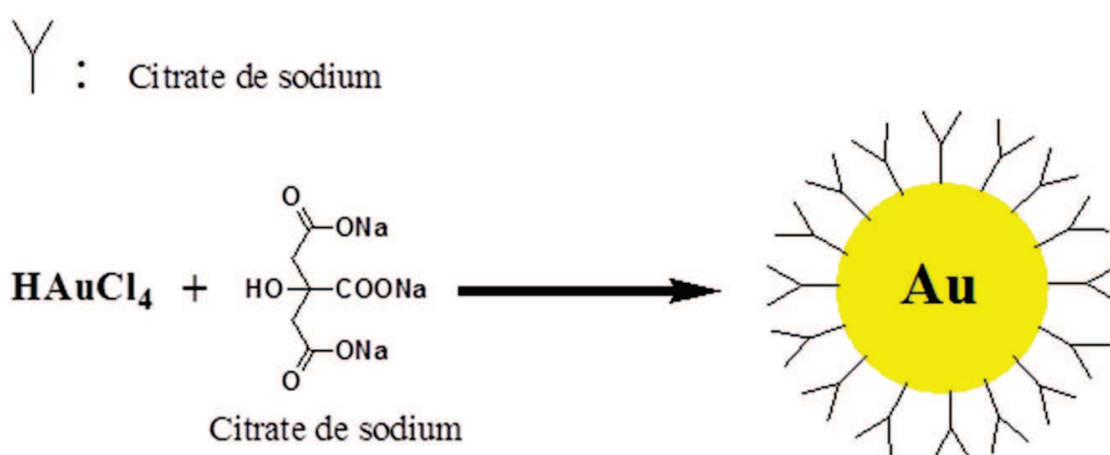


Figure 1.5 : Synthèse des nanoparticules d'or par la voie « citrate » (méthode de Turkevich-Frens) [20].

3.3.1.2°/ Méthodes de Brust : réduction d'un sel d'or en milieu organique

Contrairement à la méthode de Turkevich qui permet d'obtenir des colloïdes en milieu aqueux, Brust et ses collègues ont publié en 1994 et 1995 une méthode pour synthétiser des nanoparticules d'or en suspension en milieu organique [22] ou aquo-alcoolique [23]. Elle repose sur la réduction de AuCl_4^- par un réducteur puissant (NaBH_4) en présence d'alcanethiols qui en raison de la forte affinité du soufre pour l'or permet de contrôler la croissance et d'éviter leur agglomération en s'absorbant sur les germes d'or en croissance. Ainsi cette technique de synthèse a conduit à la formation de nanoparticules stabilisées par le mercaptophénol en une seule étape (Figure 1.6). Ces travaux ont ouvert la voie vers la synthèse de nanoparticules stabilisées par une grande variété de ligands thiolés [24].

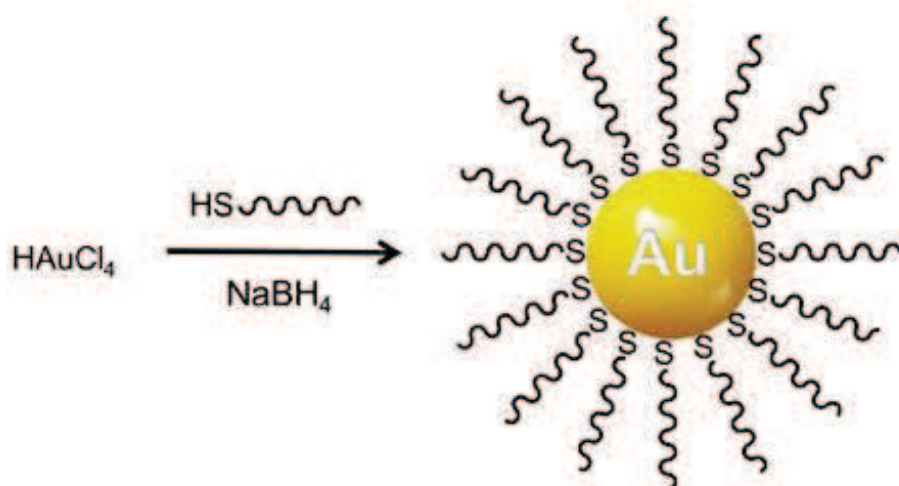


Figure 1.6 : Synthèse des nanoparticules d'or par la méthode de Brust [24].

En particulier, cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules d'or de toute petite taille (inférieure à 5 nm) et relativement homogène en taille. La quantité de NaBH_4 a une influence sur le diamètre des nanoparticules d'or synthétisées par cette voie plus la quantité de NaBH_4 ajoutée est importante, plus les particules sont petites [25]. Ces nanoparticules d'or sont recouvertes par une couche organique de molécules soufrées (thiol, sulfure) qui est solidement accrochée à la surface de l'or contrairement à la couche de citrate en raison de la forte affinité du soufre pour l'or. Pour cette raison, la méthode de Brust mène à des suspensions colloïdales nettement plus concentrées (plusieurs g/L au lieu de quelques mg/L). Par contre, cette méthode est moins adaptée pour la multifonctionnalisation des nanoparticules que la méthode « citrate ».

L'autre intérêt de la méthode proposée par Brust et ses collègues réside dans la possibilité de préparer des nanoparticules d'or « solubles » dans les solvants organiques ou en phase aqueuse en jouant sur la nature des molécules thiolées qui recouvrent les nanoparticules d'or au cours de la synthèse. Chaque cas nécessite des conditions expérimentales légèrement différentes. C'est pour cette raison que cette voie de synthèse est déclinée en deux variantes qui dépendent de la solubilité des thiols : la méthode biphasique et la méthode monophasique.

- *Méthode biphasique :*

La méthode biphasique de Brust permet de préparer des solutions colloïdales d'or dans des solvants organiques non miscibles avec l'eau, comme le toluène (ou le chloroforme). Le

principe de cette synthèse consiste à transférer le sel d'or (acide tétrachloraurique HAuCl_4) initialement présent en solution aqueuse vers une solution organique (toluène) à l'aide d'un agent de transfert de phase tel que le bromure de tétraoctylammonium (TOAB). Le TOAB, situé à l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse, est un agent de transfert qui permet de faire passer les composés polaire hydrophiles de la phase aqueuse à la phase organique. Cette méthode biphasique de Brust est parfaitement adaptée aux thiols qui ne sont pas solubles en phase aqueuse et conduit donc à la formation de nanoparticules d'or qui forment des colloïdes stables en solvant organique apolaire (toluène, chloroforme ...).

- *Méthode monophasique :*

Comme le sel d'or HAuCl_4 , $3\text{H}_2\text{O}$ et certaines molécules thiolées sont solubles dans l'eau ou dans un mélange aquo-alcooliques, il est possible de réaliser la synthèse des nanoparticules d'or dans un milieu monophasique. Elle est très particulièrement adaptée aux molécules thiolées qui sont solubles dans les solvants polaires tels que l'eau ou l'alcool.

3.3.2°/ Méthodes physiques

Comme son nom l'indique, ces méthodes permettent de réduire des précurseurs métalliques sans utiliser d'agents chimiques. Il existe plusieurs techniques :

➤ **La décomposition thermique (thermolyse) :** La décomposition thermique consiste en la décomposition d'un complexe métallique dans un solvant organique en présence de ligands ou dans un solvant qui se comporte également comme ligand. On obtient en général des nanoparticules bien cristallisées, avec une monodispersité moyenne qui présentent l'avantage d'être fonctionnalisées *in situ* par une couche organique, ce qui assure leur stabilité en suspension dans les solvants organiques.

La décomposition thermique du précurseur est réalisée à des températures élevées (aux alentours de 180°C). Concernant le contrôle de la taille des nanoparticules obtenues, la taille dépend du nombre de germe formée lors de la germination et de l'importance de la phase de croissance, étapes qui peuvent être contrôlées en variant la concentration du précurseur, la quantité de ligands ajoutés, la vitesse de chauffage, ainsi que la durée et la température d'ébullition du solvant. Par exemple, la thermolyse de $[\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{Me}_3\text{N}][\text{Au}(\text{SC}_{12}\text{H}_{25})_2]$ à 180°C permet d'obtenir des nanoparticules d'or stables avec une taille de 26 nm de diamètre [26].

Il est possible aussi de contrôler la forme des nanoparticules en jouant sur la nature des ligands utilisés et sur la vitesse de montée en température. Par ailleurs Chaudret et son équipe ont réussi à obtenir des nanoparticules d'or par décomposition de AuCl(THT) (THT : tétrahydrothiophène) dans un solvant organique (tétrahydrofurane) sous atmosphère réductrice (CO ou H₂) et en présence d'alkylamine (1-octylamine (OA), 1-dodécylamine (DDA), et 1-hexadécylamine (HDA)) comme agents stabilisants [27]. Ces particules constituées d'un cœur d'or dont la taille dépend de la nature du ligand (OA, DDA ou HDA) et du rapport molaire Au(I)/ligand forment des suspensions colloïdales stables pendant plusieurs mois.

➤ **La photolyse et la radiolyse** : la photolyse est une réaction chimique dans laquelle un composé chimique est décomposé par la lumière UV-visible [28]. L'objectif principal est de mettre en œuvre une irradiation qui entraîne la réduction de sels métalliques ou de complexes, en présence de stabilisants tels que des tensioactifs, des cyclodextrines ou des copolymères [29]... La radiolyse quant à elle, consiste à irradier par des rayonnements ionisants (rayons gamma) un solvant contenant le soluté d'intérêt. La radiolyse est une méthode extrêmement favorable à la synthèse de nanoparticules métalliques par la réduction d'ions métalliques, en solution ou *in situ* en milieu hétérogène, en atomes qui subissent une nucléation contrôlée. Lorsque ce genre de synthèse a lieu dans l'eau, radicaux H· et OH· ainsi que des électrons solvatés sont produits. Ils vont réagir avec des ions métalliques pour former des radicaux réactifs secondaires, conduisant à la formation des nanoparticules d'or [30]. Cette méthode permet la synthèse de nanoparticules de taille, de forme et de structure contrôlées.

4°/ Modification des surfaces par différentes méthodes de greffage

La surface, étant le lieu de contact entre les matériaux et l'environnement, joue un rôle prépondérant. Pour protéger la surface d'une quelconque dégradation, il est nécessaire de maîtriser correctement la fonctionnalisation de celle-ci. La modification chimique et

morphologique de la surface engendrée par la fonctionnalisation permet également d'apporter de nouvelles propriétés à ces matériaux.

La modification de surface peut-être une opération mécanique, chimique, électrochimique ou physique qui a pour conséquence de modifier l'aspect ou la fonction de la surface des matériaux afin de l'adapter aux conditions. Par ailleurs, elle permet d'apporter des propriétés supplémentaires et complémentaires aux matériaux de base.

Bien qu'il existe de nombreuses méthodes de fonctionnalisation de surface, nous nous limiterons à la présentation des voies chimiques et électrochimiques qui ont été explorées au cours de cette thèse.

- la voie chimique : le matériau est traité avec différents réactifs qui permettront d'engendrer des groupes fonctionnels de surface.

- la voie électrochimique : La fonctionnalisation par voie électrochimique ou électrogreffage est une technique qui va permettre la création contrôlée de liaisons fortes entre un substrat et un film ou une molécule organique. Cette méthode peut se diviser en deux étapes, d'abord une étape de greffage puis une étape de croissance de la couche. Sa mise en œuvre se fait selon deux modes distincts (le mode direct ou indirect) selon que le substrat soit connecté électriquement ou pas. Cette technique permet de réaliser un greffage localisé sur diverses surfaces et ce à diverses échelles. De plus, elle est assez simple à mettre en œuvre, rapide et économique. Elle peut permettre d'évaluer la quantité de composés organiques déposés à partir du moment où le mécanisme de dépôt est connu. Parmi les composés utilisés dans la fonctionnalisation par voie électrochimique, les sels de diazonium sont parmi les plus populaires.

Il existe différentes stratégies pour modifier une surface :

- soit par des méthodes basées sur des interactions de faible énergie entre le substrat et la couche de molécules ou polymère qu'il faut déposer (exemple : interaction de « Van der Waals »).

- Soit par des méthodes basées sur des interactions de forte énergie. Dans ce cas, les liaisons qui s'établissent entre le substrat et le dépôt nécessite une forte dépense d'énergie pour les rompre. Il en résulte que ces liaisons sont difficilement réversibles.

En raison de la fragilité des liaisons qui s'établissent entre les espèces physisorbées et le substrat, les méthodes de modification de surface reposant sur la chimisorption (c'est-à-dire sur des interactions fortes) sont privilégiées afin de garantir une durée de vie du matériau modifié suffisante pour l'application visée. Dans ce contexte, les travaux de Pinson et de ses collègues sur la réduction des cations aryldiazonium [31] et du groupe de Whitesides sur les monocouches autoassemblées [32–34] revêtent une importance considérable car ces techniques de fonction de surface produisent des films organiques où chaque espèce est liée si fortement aux atomes de surface que l'énergie de liaison est de l'ordre de grandeur de celle d'une liaison covalente.

4.1°/ Greffage et électrogreffage via la « click chemistry »

Vu les enjeux concernant les matériaux multifonctionnels, il est important de maîtriser les différentes techniques de greffage pour pouvoir s'adapter à chaque type d'application et à chaque type de matériaux. Récemment une technique de greffage chimique est apparue : la chimie « click ». Cette technique semble être très intéressante pour la fonctionnalisation des matériaux. Développée et introduite par Sharpless *et al.* en 2001 [35], la chimie Click (click Chemistry) permet d'assembler de manière covalente des molécules, des films ou des nanoparticules par un lien carbone-hétéroatome-carbone (C-X-C). Pour qu'une réaction puisse être qualifiée de « click » elle doit respecter un certain nombre de critères:

- Grande modularité lui permettant plusieurs applications telles que le domaine biomédical.
- Rendements élevés (85 %).
- Pas de sous-produits ou les sous-produits générés sont inoffensifs.
- Réactions stéréospécifiques, mais pas nécessairement énantiosélectives.
- Conditions réactionnelles « standards »: réactifs insensibles à l'oxygène et à l'eau.
- Réactions sans solvant, ou avec des solvants simples comme l'eau, ou des solvants faciles à éliminer (éthanol).
- Produit de réaction stable.

Il est important que ces réactions de « Click Chemistry » aient une force motrice thermodynamique élevée (le plus souvent supérieure à 20 kcal.mol⁻¹). En outre, telles réactions doivent être rapides et très sélectives.

Ces réactions sont classées en quatre catégories:

- Cycloadditions d'espèces insaturées, en particulier les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire mais aussi les cycloadditions de Diels-Alder.
- Les substitutions nucléophiles, en particulier les réactions par ouverture d'hétérocycles tendus tels que les époxydes, les aziridines, les ions aziridiniums et épisulfoniums.
- La chimie des carbonyles non énolisables, comme la formation d'urées, de thiourées, d'hétérocycles aromatiques et d'amides.
- Les additions sur des liaisons carbone-carbone multiples, en particulier les réactions d'oxydation telles que l'époxydation, la dihydroxylation, l'aziridination, mais aussi les additions de Michaël.

Quelle que soit la stratégie de « Click-Chemistry » mise en œuvre, il est indispensable de fonctionnaliser au préalable la surface par un des groupements « Clickables ». Or la façon la plus courante de fonctionnaliser la surface des métaux nobles consiste à recouvrir le matériau par des molécules thiolées qui forment une monocouche très adhérente en raison de la forte interaction entre les atomes métalliques (Au, Ag, Pd...) et les atomes de soufre.

Les matériaux oxyde sont en générale modifiés par condensation d'organo(alcoxysilane) à la surface. Les monocouches auto-assemblées appelées SAM (Self-Assembles Monolayers en anglais) sont des édifices moléculaires auto-organisés formés par adsorption directe de molécules amphiphile sur un substrat. Les composés organosoufrés constituent la famille la plus développée pour la fabrication de SAMs sur l'or. La possibilité d'insérer des groupes fonctionnels différents sur la partie terminale des monocouches de thiols permet de construire une grande variété de surfaces ayant des propriétés mécaniques, chimiques et physiques différentes.

Whitesides et son équipe ont été les premiers à étudier la formation de SAM simple (constitué par le même type de composé thiolé) et mixte (constitué par la coadsorption de deux thiols distincts) sur un même substrat d'or [33,34]. Dans le cas des SAM mixtes, ces monocouches sont préparées à partir de solutions composées de deux thiols différents du type SH-(CH₂)_n-X, où X est un groupement CH₃, OH, COOH etc... et n un entier naturel quelconque.

Parmi les quatre catégories de réaction, la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu(I) entre un alcyne et un azoture (CuAAC (Cu(I)-catalysed Azide-Alkyne 1,3 dipolar Cycloaddition)), découvert en 2002 simultanément par le groupe de Meldal [36] et de Sharpless [37], est particulièrement intéressante à cause de sa simplicité de réalisation. Ces dernières années, les recherches en « click chemistry » sont si importantes et efficaces que la click chemistry est devenu un outil incontournable aussi bien pour les biologistes que pour les organiciens ou les chimistes des matériaux.

4.1.1°/ Cycloaddition de Huisgen

La réaction de Huisgen est une cycloaddition entre un alcyne terminal et un azoture pouvant conduire à deux triazoles régioisomères. Découverte par Michael à la fin du 19^{ème} siècle puis développée ensuite par Huisgen à partir de 1963, cette réaction nécessite des temps de réactions longs, des températures élevées et est rarement stéréospécifique car on obtient un mélange d'isomères 1,4 et 1,5 du cycle triazole (Figure 1.7). Les triazoles font partie de la famille des azoles qui sont des composés hétérocycliques à cinq atomes, contenant au moins un atome d'azote. Les triazoles présentent une structure aromatique qui se traduit notamment par la possibilité de former des interactions π - π . Ce sont des composés très stables, généralement inertes face à des conditions réductives ou oxydantes et cela même à température élevée.

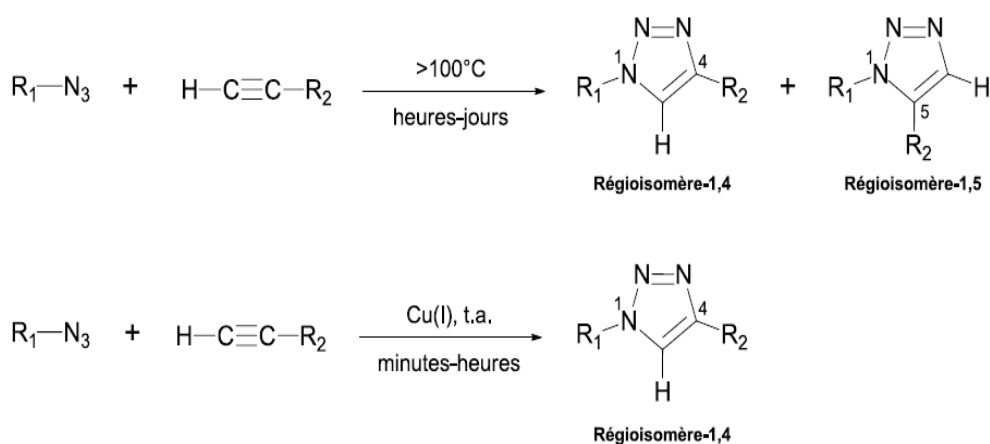


Figure 1.7 : Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne par processus thermique (en haut) et catalysée par le cuivre(I) (en bas).

En 2002, les groupes de Sharpless et Meldal ont découvert simultanément que cette réaction peut être catalysée par le cuivre(I) (CuAAC) pour donner exclusivement l'isomère-1,4 (Figure 1.7) [37][38]. Le cuivre(I) permet de diminuer les temps de réaction et de réaliser la réaction à température ambiante. Depuis cette découverte, les importants avantages de cette cycloaddition sont devenus clairs. Cette réaction tolère une grande variété de groupes fonctionnels, est très sélective, permet de former un lien rigide et très stable entre deux molécules, et ne génère pas de sous-produits. Tous ces avantages rendent cette réaction, pour laquelle de nombreux systèmes catalytiques ont été développés et étudiés [38], très intéressante et très pratique pour différentes applications dans les domaines des sciences chimiques et biologiques [39].

La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre commence par une addition oxydante autrement dit c'est la déprotonation de l'alcyne pour former un complexe Cu-acétylure. Ensuite l'azoture se lie au cuivre(I) via l'azote interne suivi d'un complexe Cu-acétylure-azoture qui se forme un cycle par une cycloaddition métal-induite (métallo-cycle intermédiaire). Puis une contraction de cycle suivie d'une protonation conduit au triazole désiré après une élimination réductrice. Une fois le triazole formé, il y a régénération du catalyseur par scission de la liaison Cu-C (Figure 1.8).

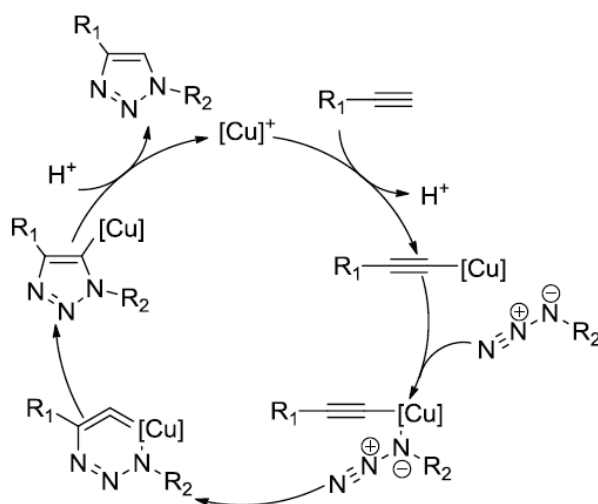


Figure 1.8 : Mécanisme proposé en 2002 par Sharpless et Fokin pour la CuAAC [71].

4.1.1.1°/ Système catalytique avec ligand

L'ajout de ligand dans le système catalytique permet d'accélérer la réaction et joue le rôle de protection vis-à-vis des ions Cu(I) tout en améliorant le mécanisme de catalyse. Fokin *et al.* ont démontré l'efficacité de ligands de type triazolamine et bipyridine [40]. Il semblerait que les ligands les plus performants pour stabiliser le Cu(I) sont des oligotriazoles comme la tris-(benzyltriazolylméthyle)amine ou TBTA (Figure 1.9). Ces ligands sont généralement utilisés dans des réactions de « Click Chemistry » en milieu biologique [41].

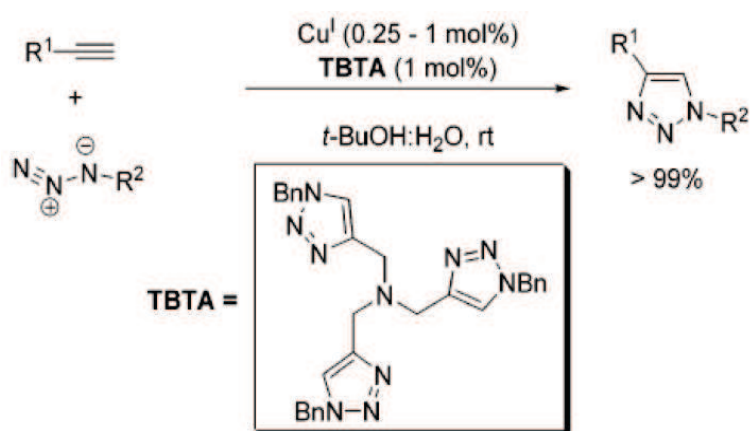


Figure 1.9 : Synthèse de 1,2,3-triazole en présence du ligand TBTA

4.1.1.2°/Principaux systèmes catalytiques sans ligand

4.1.1.2.1°/ Réduction *in situ* des sels de cuivre(II)

Ce système catalytique reste encore aujourd'hui très utilisé [37]. Il consiste à réduire *in situ* CuSO₄ en présence d'ascorbate de sodium (asc-Na) en excès (5 équivalents) comme réducteur (Figure 1.10), dans un mélange eau/tert-butanol (1/1) et à température ambiante. Les triazoles sont en général isolés avec de bons rendements, en 12-24 heures par simple filtration. Ce système catalytique, qui est efficace, peu coûteux et simple à mettre en œuvre, nécessite souvent des charges catalytiques élevées et se limite aux réactions en milieu aqueux. D'autres réducteurs peuvent aussi être utilisés pour réduire les sels de cuivre(II), telle que la tris(carboxyéthyl)phosphine (TCEP) [42], ou l'hydroquinone [43].

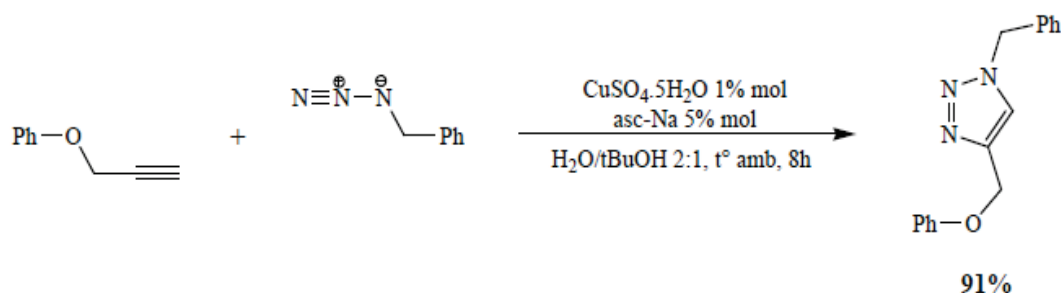


Figure 1.10 : Cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le Cu(I) obtenu par réduction du Cu(II) par asc-Na.

Cependant ce système catalytique présente un inconvénient : le cuivre sans ligand peut être piégé par les triazoles formés au cours de la réaction. Cela nécessite alors une étape de lavage à l'ammoniaque pour éliminer le cuivre du produit.

4.1.1.2.2°/ Oxydation du cuivre métallique

L'oxydation du cuivre métallique est une autre façon de générer du cuivre(I). La réaction s'opère en mettant un excès de tournures de cuivre au mélange azoture/alcyne. Cependant, cette méthode requiert des temps de réaction longs ainsi qu'une plus grande quantité de cuivre [44]. Le cuivre solide peut également être utilisé sous forme de poudre, en présence de sels de chlorhydrate de triéthylamine pour catalyser l'oxydation [45]. L'inconvénient majeur qui limite l'application de ce protocole reste la nécessité d'opérer en milieu légèrement acide pour dissoudre ces particules dont le coût est plus élevé que les autres formes de cuivre. Cette méthode s'avère toutefois être une bonne alternative pour le couplage de composés ne tolérant pas l'utilisation de bases telles que l'ascorbate de sodium par exemple. La [figure 1.11](#) présente le couplage d'un pentaérythritol di-azoturé en présence de tournures de cuivre avec un rendement de 98%.

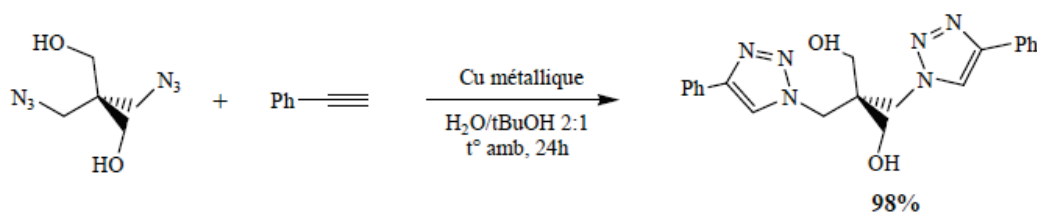


Figure 1.11 : Exemple de « Chimie Clic » catalysée par le cuivre métallique décrit par Himo [79].

4.1.1.2.3°/ Utilisation directe de sels de Cuivre(I)

L'utilisation directe des sels de Cu(I) est possible et paraît être la méthode la plus sensible aux conditions réactionnelles. Différents composés à base de cuivre (I) ont été utilisés tels que CuBr, CuI, [Cu(OTf)(C₆H₆)], [Cu(Ph₃P)₃Br] ou [Cu(NCCH₃)₄][PF₆] [46]. Ces réactions nécessitent la présence d'une base azotée telle que la triéthylamine, la N,N-diisopropyléthylamine (DIPEA), la pyridine ou encore la 2,6-lutidine (Figure 1.12) [47]. Grâce à un excès de ces bases, les réactions de chimie click sont accélérées et produisent le cycle triazole avec un meilleur rendement.

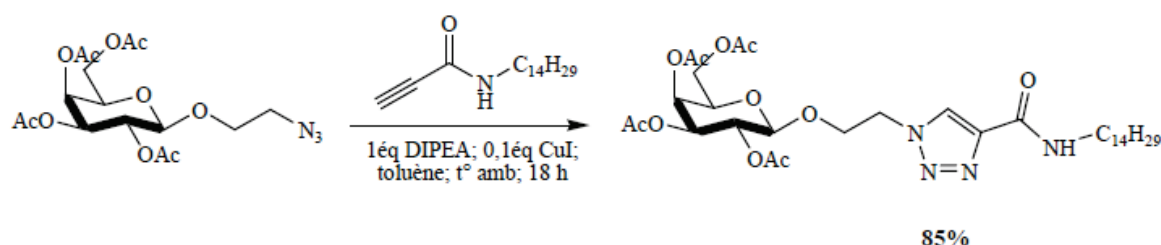


Figure 1.12 : Exemple de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par les sels de Cu(I) décrite par Fazio [47].

Le tableau 1.1 résume les principaux systèmes catalyseur-solvant cités dans la majorité des publications focalisées par la Click Chemistry :

Tableau 1.1 : Les principaux systèmes catalytiques pour la cycloaddition 1,3-dipolaire [48].

Degré d'oxydation initial	Catalyseurs (0,25-2 mol%)	Agent réducteur ou oxydant	Bases additionnelles	Solvants
Cu ^I	CuI CuBr Cu(PPh ₃) ₃ Br	Aucun	Triéthylamine	DMF
			2,6-lutidine	THF
			DIPEA	Toluène
			PMDETA	CH ₃ CN
Cu ^{II}	CuSO ₄ ·5H ₂ O	Ascorbate de sodium	Aucune	1:1 H ₂ O/ <i>t</i> -BuOH 1:1 H ₂ O/EtOH
Cu ⁰	Cuivre métal Poudres/ nanoparticules	Sel d'ammonium	Aucune	2:1 H ₂ O/ <i>t</i> -BuOH

4.1.2°/ Fonctionnalisation des nanoparticules par Click Chemistry

De nos jours, la majeure partie des recherches en click Chemistry se consacre à la cycloaddition 1,3-dipolaire. Devenue un outil incontournable aussi bien pour les organiciens que pour les chimistes des matériaux ou les biochimistes, de nombreux exemples de son utilisation dans la chimie supramoléculaire sont présentés dans la revue de Binder et Sachsenhofen publiée en 2007 [49], puis mise à jour en 2008 [50]. La cycloaddition 1,3-dipolaire s'avère être une méthode attractive pour la fonctionnalisation de cœurs rigides comme les fullerènes et les nanoparticules d'or. Récemment, des nanoparticules d'or fonctionnalisées par de petites molécules organiques ou organométalliques ainsi que par des polymères et des brins d'ADN ont également été synthétisées avec succès [51].

Cependant dans la littérature, plusieurs méthodes ont été décrites pour fonctionnaliser les nanoparticules par click chemistry. Par exemple en 2006, Fleming [52] et ces collègues ont synthétisé des nanoparticules couvertes de fonctions azoture pour faire réagir avec des composés modifiés par un alcynes. Dans le cadre d'une étude destinée à démontrer l'intérêt de cette stratégie, ils ont réalisé avec succès une série de différentes fonctionnalisations de particules par des molécules organiques qui auraient pu être greffées par des voies plus classiques. Cependant ces travaux ouvraient la voie pour la fonctionnalisation de nanoparticules par des biomolécules en appliquant la stratégie de click chemistry. L'équipe de Brennan [53] en 2006 et de Maltzahn [54] en 2008 ont clairement montré qu'il était possible de fonctionnaliser des nanoparticules par une biomolécule via la technique de click chemistry tout en préservant ses propriétés (catalyse, ciblage *in vivo* de cellules tumorales).

4.1.3°/ Modification de surface par click chemistry

De nombreux travaux permettent d'utiliser la technique de « click chemistry » pour fonctionnaliser les surfaces par des ligands, molécules ou ADN [55][56]. Par exemple, pour la biofonctionnalisation par l'hémoglobine, Jin et son équipe [57] ont tout d'abord fonctionnalisé une surface d'or par des monocouches auto assemblées (SAM) qui présente une fonction thiol pour l'accrochage sur la surface d'or et à l'autre extrémité une fonction azoture. Via la « click chemistry », les fonctions azoture assurent la fonctionnalisation de la

monocouche par des groupements acide carboxylique. L'activation de ces derniers par le carbodiimide EDC et NHS permet l'immobilisation de l'hémoglobine (Figure 1.13).

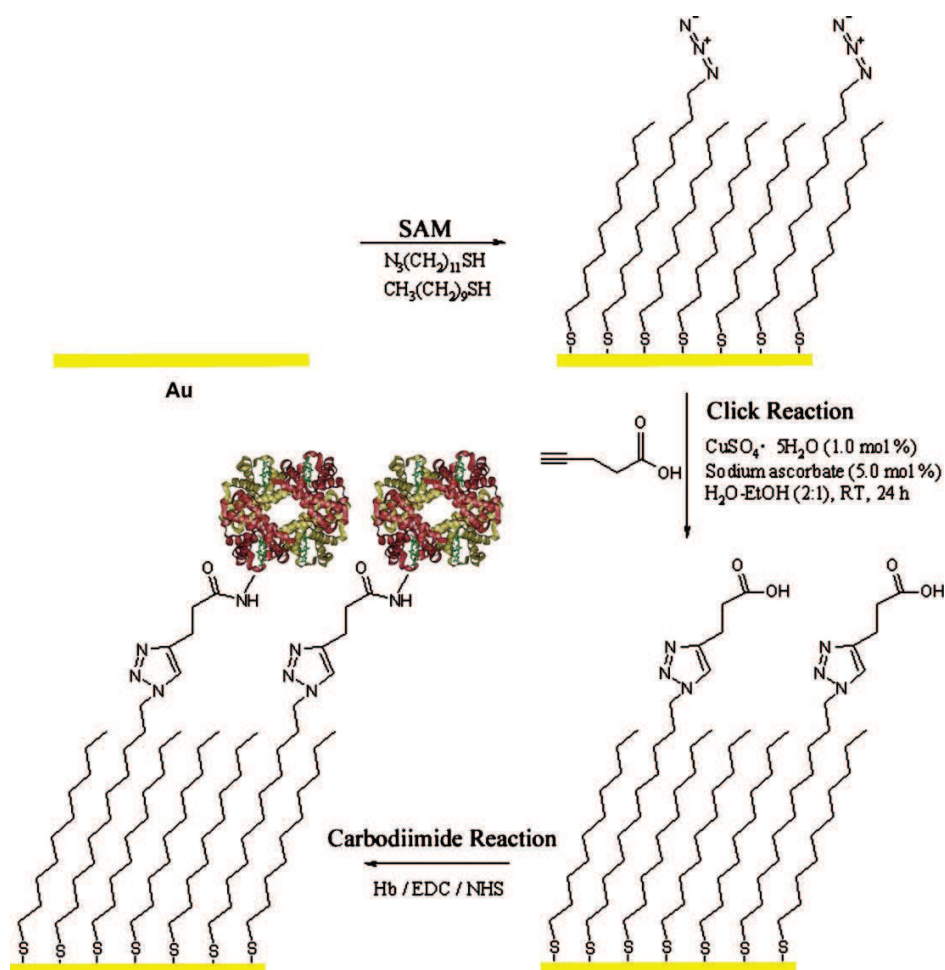


Figure 1.13 : Immobilisation de l'hémoglobine sur une électrode d'or par « click chemistry » [57].

Une des stratégies pour obtenir une surface nanostructurée par greffage de nanoparticules via la « click chemistry » consiste à fonctionnaliser les nanoparticules par des fonctions azoture en appliquant différentes méthodes décrites dans la littérature.

- La réaction d'échange de ligands : c'est une méthode très utilisée pour la fonctionnalisation de nanoparticules d'or [58]. Le principe, simple, réside dans l'échange ou le remplacement d'une partie des ligands alcanethiolates entourant les nanoparticules d'or par d'autres ligands thiolates porteur d'un groupement bromo (exemple un 11-bromo-1-undecanethiol) (Figure 1.14).

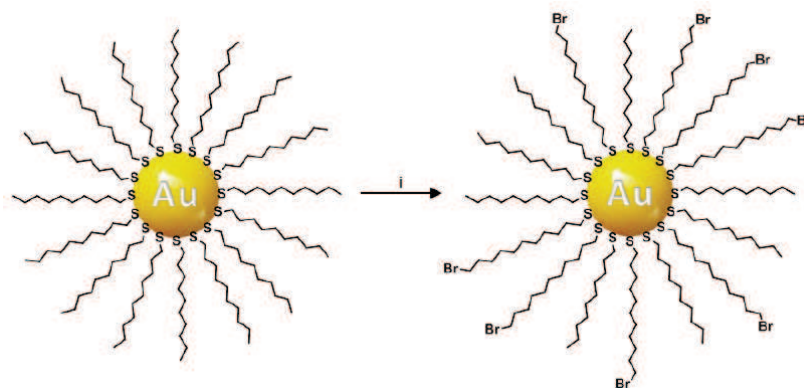


Figure 1.14 : Réaction d'échange de ligands alcanethiol par des ligands bromoalcanethiol à la surface d'une nanoparticule d'or ; (i) : toluène à température ambiante [59].

La quantité de ligands échangés (bromoalcanethiol) présente à la surface des nanoparticules d'or va dépendre du rapport moléculaire R-SH/Br-SH. Par exemple, dans les travaux de thèse de Mischler [59], pour avoir des nanoparticules d'or présentant à la surface un taux de recouvrement jusqu'à 80% de ligands bromoalcanethiol, il faut rajouter trois équivalents supplémentaires tous les sept jours et pendant quatre semaines.

Comme la substitution nucléophile des atomes de brome par le groupement azoture n'est pas totale, la quantité de groupements azoture présente à la surface des nanoparticules d'or reste modéré (Figure 1.15).

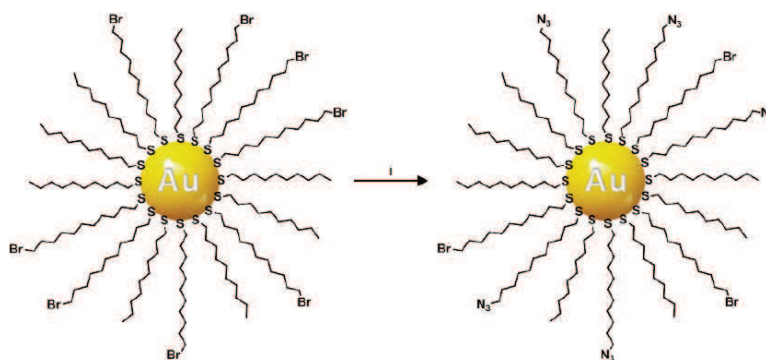


Figure 1.15 : substitution nucléophile partielle des atomes de brome par les groupements azotures, (i) : NaN_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMSO}$ (1:1), t.a., 2 jours [59].

Afin d'augmenter la quantité de groupements azoture, Mischler a tenté de préparer des nanoparticules d'or recouvertes d'une monocouche composée uniquement de bromo-ligands. En utilisant la méthode de Brust-Schiffrin, ces nanoparticules d'or fonctionnalisées uniquement par des molécules de bromoalcanethiol ont été synthétisées en réduisant

l'acide tétrachloroaurique par NaBH_4 en présence de ces molécules. Les atomes de brome de la couche organique ont ensuite été substitués par des fonctions azoture (Figure 1.16).

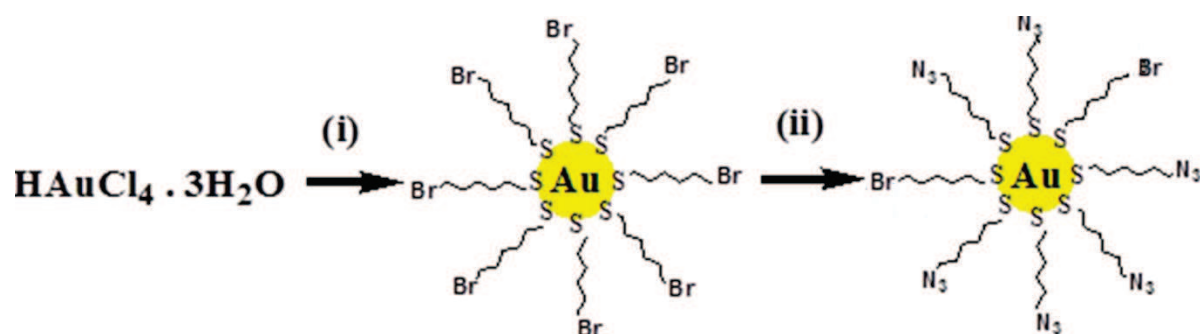


Figure 1.16 : différentes étapes de synthèse de particules d'or fonctionnalisées par des groupements azoture: (i) NaBH_4 , 11-bromo-1-undecanethiol, (ii) NaN_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMSO}$.

Par ailleurs, Carole Chaix et son équipe ont également montré qu'il était possible de greffer sur des électrodes d'or des particules de silice fluorescentes par click chemistry électrocatalysé avec un bon rendement [60]. Ils ont démontré que le greffage par l'intermédiaire de la formation de 1,2,3-triazole entre une surface fonctionnalisée d'un alcyne et des particules de silice recouvertes de fonctions azoture peut être contrôlée par application d'un potentiel négatif pour générer le catalyseur Cu(I) *in situ* et ils ont confirmé l'efficacité de la réaction de « click chemistry » par la caractérisation XPS et la visualisation au microscope optique.

4.2°/ les sels de diazonium : des agents de fonctionnalisation de surface prometteurs

4.2.1°/ Généralités sur les sels de diazonium

Les sels de diazoniums sont des composés caractérisés par la présence du groupement $-\text{N}_2^+$ et d'un contre-ion (par exemple BF_4^-). Ces composés sont connus, pour leur caractère instable et leur grande réactivité. Dans certains cas, ils se détériorent facilement à température ambiante et le plus souvent leur synthèse est effectuée à basse température. Grâce à l'effet stabilisant de la résonance, les sels de diazonium aromatique sont plus stables

que les sels de diazonium aliphatique qui sont très instables. Ils sont relativement stables en milieu acide mais leur stabilité diminue à mesure que le pH augmente. En raison de leur relative stabilité en milieu aqueux et acide, les sels de diazonium aromatique sont les seuls à pouvoir être utilisés pour la fonctionnalisation de surface. Depuis quelques années, les sels de diazonium sont utilisés afin de modifier, par greffage électrochimique, différents types de surface comme le carbone, le silicium et les métaux [13] (fer, or, palladium...) dans le cadre de la protection contre la corrosion [14], la fabrication de capteurs [61], ou l'électronique moléculaire [15].

Découverts en 1858 par Johann Peter Griess [62], les sels de diazonium aromatique sont généralement préparés à partir de l'arylamine correspondante en présence d'une source de nitrite [63]. On peut préparer le sel de diazonium soit en milieu aqueux en utilisant le nitrite de sodium en milieu acide fort [64] ou bien en milieu organique en utilisant du nitrite de tert-butyle ((CH₃)₃CONO).

La [figure 1.17](#) décrit la préparation en milieu aqueuse des sels de diazonium qui se déroule en deux étapes :

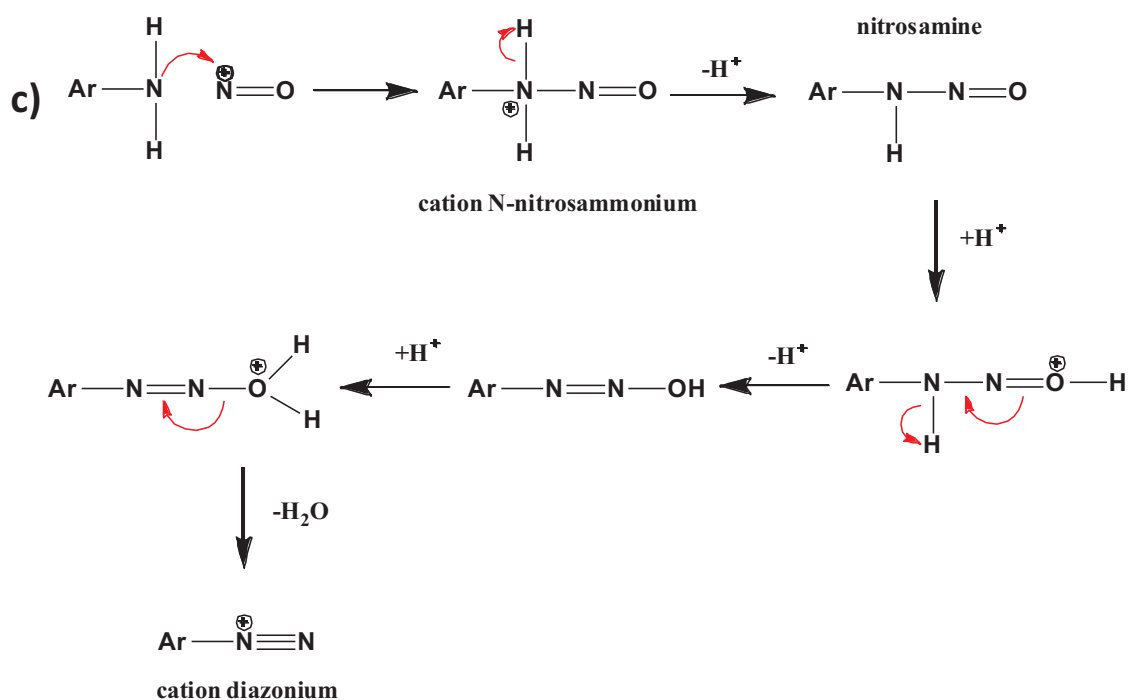
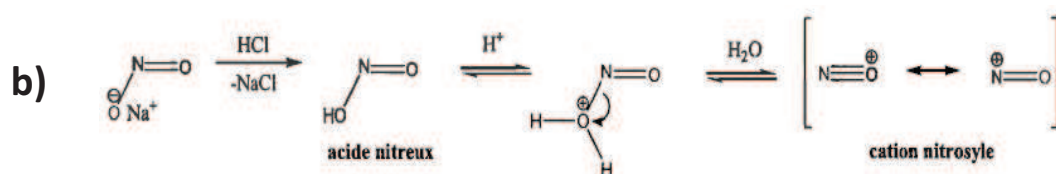


Figure 1.17: a) Equation générale de la préparation des sels de diazonium en milieu aqueux ; b) mécanisme de formation du cation nitrosyle et c) mécanisme de formation du cation diazonium à partir du cation nitrosyle et de l'amine primaire.

Dans un premier temps, le nitrite de sodium réagit en milieu acide pour former l'acide nitreux qui se décompose en cation nitrosyle [65] (Figure 1.17 b). Ce dernier peut ensuite se décomposer en monoxyde d'azote. C'est la raison pour laquelle il est important que la solution acide de nitrite de sodium, soit fraîchement préparée lors de son utilisation.

La seconde étape est la réaction de diazotation qui a lieu par l'interaction du cation nitrosyle sur l'amine primaire. Cela entraîne la formation d'un sel de N-nitrosammonium qui libère un proton pour former une N-nitrosamine primaire. Ensuite, cette dernière se réarrange par tautomérie en un diazohydroxyde, qui subit une protonation puis une perte d'eau pour former le sel de diazonium correspondant [65] (Figure 1.17 c).

À pH neutre et basique, ces sels donnent des diazohydroxydes et des diazoates. La particularité de la réactivité des sels de diazonium aromatique réside dans la perte de N_2 accompagnée de la formation d'un radical aryle Ar^\bullet ou d'un cation Ar^+ . Cette particularité a été largement étudiée par différentes techniques comme la chromatographie en phase liquide à haute performance [66] [67]. des mesures électrochimiques en milieu aqueux [68,69], et de la spectroscopie RMN en milieu aqueux [68,69]. Dans le cas du greffage sur une surface, c'est la formation du radical Ar^\bullet [70,71] qui doit être favorisée pour attacher des molécules sur différents matériaux [31], [72]. La formation de ce radical peut être spontanée [73] ou induite par rayonnements UV [74] ou micro-ondes [75], par ultrasons [76], par traitement thermique [77] ou par électrochimie [78]. Comme elles permettent un bon contrôle spatial et temporel de la réaction, seules les méthodes électrochimiques seront traitées dans ce chapitre car elles sont particulièrement adaptées pour l'objectif fixé dans le cadre de ce travail de thèse.

4.2.2°/ Modification chimique de la surface par réduction de sels de diazonium

Il existe différentes façons de modifier chimiquement les surfaces par les sels de diazonium :

- Soit grâce à une molécule qui va jouer le rôle d'un réducteur et qui sera une source d'électrons. Ces électrons seront donnés aux cations diazonium qui se transformeront en radical qui va s'accrocher à la surface par la suite. Effectivement, des réducteurs chimiques comme la poudre de fer, $NaBH_4$ et l'acide hypophosphoreux peuvent être utilisés pour la modification de surface à condition toutefois que le sel de diazonium soit présent en concentration suffisamment élevée. Ces derniers processus ne nécessitent aucun appareillage électrochimique spécifique et peuvent donc trouver des applications industrielles intéressantes.
- Soit par greffage spontané du cation à la surface (travaux de Palacin [79]). Il s'agit de la modification spontanée de la surface par simple immersion du substrat qui joue alors le rôle de réducteur à la place du courant cathodique. Le sel de diazonium est réduit et s'accroche sur la surface du substrat. Palacin [79] et son groupe ont a priori montré que ce greffage spontané ne fait pas intervenir le radical aryle mais plutôt le cation aryle. Ils ont réussi à greffer spontanément le cation aryldiazonium sur le

cuire et ont caractérisé la liaison covalente métal-carbone par XPS. Lors du greffage spontané du cation diazonium sur le substrat d'or, ils n'ont pas pu prouver la présence de la liaison Au-N mais plutôt la liaison Au-carbone.

- Soit le greffage d'un cation diazonium sur un noyau aromatique par une réaction appelé couplage azoïque qui permet d'obtenir un dérivé azo [80][81].

La modification chimique de surface par des sels de diazonium peut aussi s'appliquer à différents milieux (aqueux, organique, liquide ionique [82]). Elle permet d'introduire une grande variété de fonctions à la surface. Une des inconvénients de cette méthode est que le taux de recouvrement de la surface est inférieur à celui obtenu par réduction électrochimique des sels de diazonium [83]. D'autre part, la méthode chimique de greffage ne permet pas de contrôler ni l'épaisseur, ni la localisation du dépôt, contrairement aux méthodes électrochimiques.

4.2.3°/ Modification électrochimique de la surface par réduction de sels de diazonium

Les premières études de greffage d'un sel de diazonium ont été menées par Delamar *et al.* qui ont constaté que la fonction $-N_2^+$ présente la particularité de se réduire assez facilement, conduisant à la formation d'un radical aryle très réactif [78]. Ce radical permet le greffage par liaison covalente de la molécule associée sur un substrat de carbone (C), métallique (M) ou semi-conducteur (SC) (Figure 1.18).

Lors du greffage électrochimique, le sel de diazonium est préalablement dissous dans une solution aqueuse acidifiée (typiquement, HCl ou H₂SO₄ 1 M). La surface à modifier est utilisée comme électrode de travail et le potentiel est contrôlé par un potentiostat. La surface peut être modifiée soit par balayage des potentiels, soit à potentiel imposé. En pratique, le potentiel appliqué est inférieur de 100 ou 200 mV de celui du pic de réduction du sel de diazonium. Le potentiel appliqué et la durée du greffage électrochimique (de quelques secondes à quelques minutes) ont un effet direct sur l'efficacité de la modification de surface. L'avantage du greffage électrochimique des sels de diazonium pour la fonctionnalisation de surface réside dans le fait qu'il résulte d'une réaction de réduction. L'électrode de travail qui se comporte donc comme une cathode est préservé de toute dissolution. Par cette méthode, les dépôts peuvent être effectués sur tous les types

d'électrode, même les matériaux oxydables (les métaux, les surfaces carbonées, le silicium etc...). Cette technique d'électrogreffage via la réduction de sel de diazonium permet d'obtenir des couches très fines au niveau de la surface d'électrode.

La réduction électrochimique de sels de diazonium conduit à la formation de diazote et de radicaux aryles. Ces radicaux ainsi formés peuvent ensuite réagir avec la surface de manière à former des liaisons covalentes qui assurent un ancrage durable de la couche organique (Figure 1.18). Les propriétés de cette couche de dérivés benzéniques dépendent de la présence et de la nature du ou des substituants portés par le cycle.

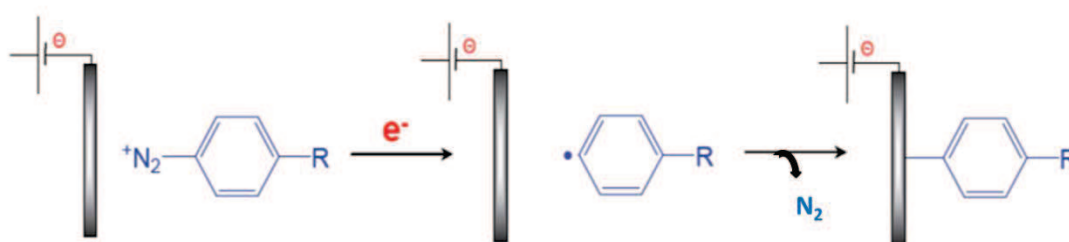


Figure 1.18 : principe du greffage électrochimique de sels de diazonium.

De nombreuses équipes ont essayé de mettre en évidence la liaison covalente entre la surface et la couche organique par des techniques de spectroscopie. L'un des premiers arguments pour prouver la présence de liaisons covalentes entre les atomes de la surface et les cycles aromatiques repose sur la stabilité de la couche immobilisée [84] [85]. Ces couches organiques résistent à un traitement par ultrasons. En 1997, Savéant et son groupe ont montré que la seule façon d'enlever la couche organique sur une électrode de carbone vitreux modifiée était le polissage physique.

La présence d'un lien covalent n'est pas évidente à démontrer mais a été prouvée grâce à des techniques expérimentales adaptées (la spectroscopie infra-rouge (IR), la spectroscopie de photoélectron X (XPS pour X-ray photoelectron spectroscopy), l'ellipsométrie, la microscopie à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscopy), la microscopie à effet tunnel et l'électrochimie) et à des calculs théoriques [31]. McCreery *et al.* ont démontré la liaison substrat-aryle par spectroscopie Raman pour différents substrats carbonés [86], [87] dont l'électrode de carbone vitreux [88] alors que Combellas *et al.* ont identifié la liaison C-C sur l'électrode de carbone vitreux par ToF-SIMS (Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry) [89]. Si la formation de la liaison covalente C-C entre le substrat carboné (par exemple carbone vitreux) et le radical aryle formé par réduction du cation diazonium n'est

pas surprenante, la formation métal-carbone est plus inattendue. Le groupe de Pinson est parvenu à mettre en évidence la liaison Fe–C, preuve directe d'un carbure de fer [90], [91] par spectroscopie XPS avec la présence d'un épaulement à 283,3 eV pour les films de polycarboxyphénylène. En revanche, Bélanger *et al.* ne sont pas, quant à eux, parvenus à démontrer clairement par spectroscopie XPS l'existence d'une liaison Au–C [81]. Cependant, McDermott et son groupe ont montré, grâce à la comparaison du spectre SERS avec des spectres modèles calculés à partir de la théorie fonctionnelle de densité, la présence d'une liaison covalente Au-C à la surface de la nanoparticule d'or parés contact avec un sel de diazonium (nitrobenzène).

4.2.4°/ Production "*in situ*" de sels de diazonium

Il est à noter que la modification de surface se fait par réduction des sels de diazonium préalablement synthétisés et isolés. Dernièrement, pour remédier à l'instabilité de certains sels de diazonium et pour faciliter leur préparation, des auteurs ont proposé de générer *in situ* le sel de diazonium dans la cellule électrochimique, quelques instants avant sa réduction électrochimique. En pratique, l'amine primaire correspondante est utilisée comme précurseur. En milieu aqueux acidifié [92], les amines sont converties en sels de diazonium par diazotation avec le nitrite de sodium. Bélanger *et al.* ont aussi montré qu'il était possible de greffer un film organique par réduction électrochimique de cations diazoniums formés *in situ* à partir des molécules p-phénylènediamine [93].

La transformation des amines est très rapide et la réaction de couplage entre le sel formé et l'amine de départ en solution n'a pas été observée. Lorsque l'amine n'est pas soluble dans l'eau (comme l'aminoanthraquinone) ou porte des substituants hydrolysables, les sels de diazonium peuvent être préparés en milieu organique avec l'emploi d'un nitrite d'alkyle comme agent de diazotation (Figure 1.19) [94].

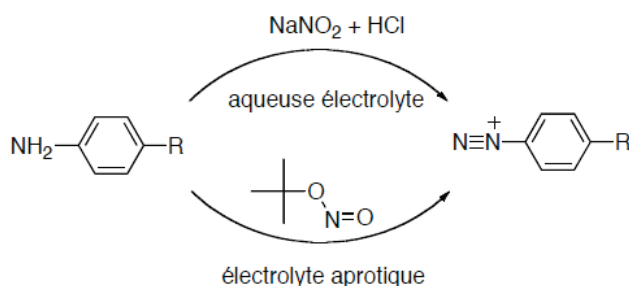


Figure 1.19 : Production *in situ* de sel de diazonium à partir de l'amine correspondante.

Il est important de souligner que la couche organique greffée par réduction de sels de diazonium générés *in situ* montre des caractéristiques proches de celle obtenue par réduction du sel de diazonium préalablement synthétisé [94,95]. Enfin, en 2010, Lacroix et son équipe ont montré que les amines qui ne se dissolvent pas en milieux aqueux peuvent tout de même être utilisées dans l'eau avec l'emploi de cyclodextrines comme agent de complexation [96].

4.2.5°/ Structure de la couche organique

La formation d'une monocouche par réduction des sels de diazonium a été rapportée par plusieurs travaux [97] [98] [99]. L'épaisseur de la couche peut être contrôlée par le suivi de la charge consommée (étroitement liée au temps de polarisation) et par la concentration du sel de diazonium en solution. En contrôlant rigoureusement la charge électrique consommée au cours de la réduction, des monocouches ont été obtenues sur une surface d'or, une surface de carbone et sur une surface de silicium H-Si (111). En raison du caractère isolant de la première couche déposée, la formation d'une monocouche semble privilégiée. Mais les travaux décrits dans la littérature [100] permettent de conclure que le radical aryle obtenu par réduction du sel de diazonium peut se lier aux premières molécules greffées, formant ainsi une multicouche organique dont la structure ressemble à celle des polyphénylènes (Figure 1.20). Une multicouche de 100 nm d'épaisseur a été produite [101], sachant qu'une monocouche biphénylique a en moyenne 1,11 nm d'épaisseur [102]. Il a également été établi que la formation de la première couche est beaucoup plus rapide que la croissance des couches suivantes car cette première couche, étant faiblement conductrice, rend difficile le passage des électrons [81]. Le mécanisme [89] de formation de ces multicouches organiques a été rapporté pour des substrats à base de graphite (HOPG), de carbone vitreux,

et métaux [103]. De plus l'existence de liaisons azoïques (-N=N-) du couplage de sels de diazonium a été révélée par XPS sur une surface d'or [81] [104]. Elle provient du couplage de sel de diazonium avec les dérivés benzéniques immobilisés à la surface du matériau en cours de fonctionnalisation.

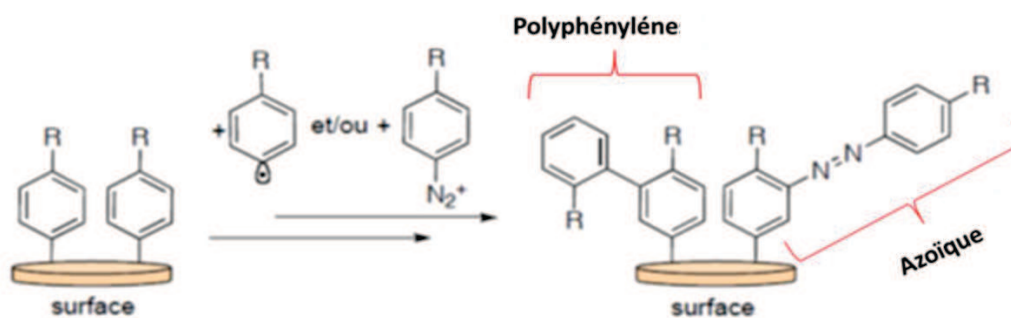


Figure 1.20 : Formation de la multicouche organique.

4.2.6°/ Greffage direct et indirect des nanoparticules par la réduction des sels de diazonium

Le potentiel de la réduction des sels de diazonium pour fonctionnaliser les surfaces a récemment été exploité pour immobiliser des nanoparticules sur différents supports. Deux stratégies différentes ont été développées, les greffages direct et indirect :

- Concernant le greffage indirect des nanoparticules par la réduction des sels de diazonium, Mangeney *et al.* ont élaboré une stratégie permettant d'immobiliser des nanoparticules d'or sur une surface d'or fonctionnalisée en combinant la méthode de greffage par le sel de diazonium et la méthode de greffage par click chemistry (Figure 1.21) [105].

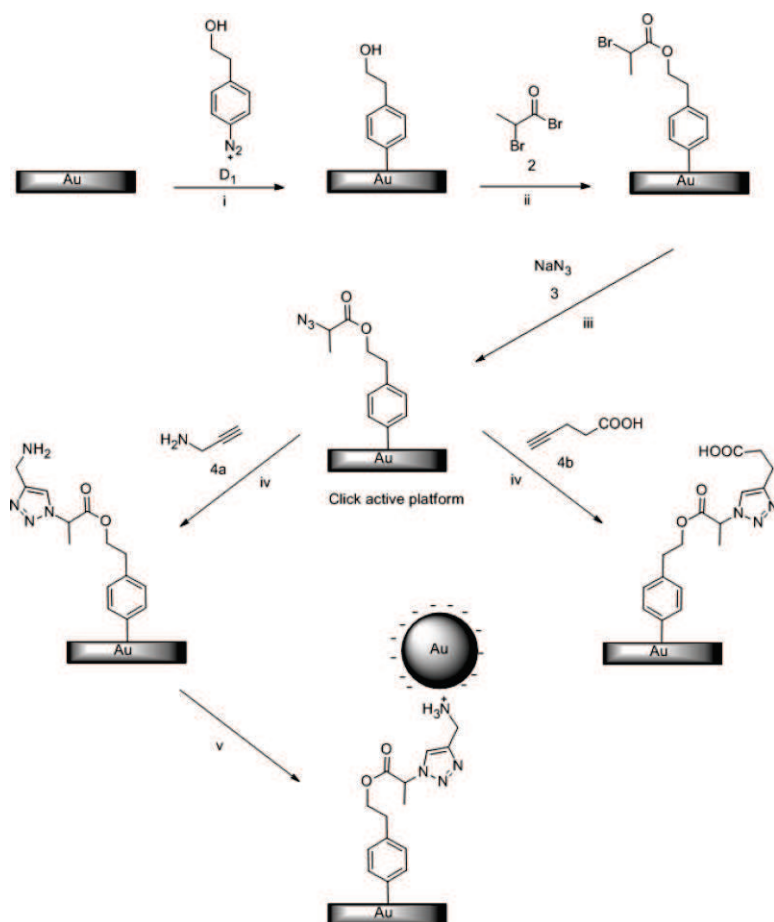


Figure 1.21 : Figure illustrant les différentes étapes de fonctionnalisation de surface permettant d'immobiliser des nanoparticules d'or chargées négativement [105].

Dans un premier temps, la surface d'or est recouverte d'un film organique obtenue par réduction électrochimique du cation p-(2-hydroxyéthyl)benzène-diazonium. La fonction alcool de ce film est ensuite estérifiée par un bromure de 2-bromopropionyle. Cette réaction d'estérification est quasi-totale. Le groupement bromo de l'ester est substitué par l'anion azoture. La fonction azoture ainsi introduite dans la couche organique permet la fonctionnalisation par une réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire (chimie click) avec la propargylamine (fonction alcyne). La présence de la fonction amine, ionisable en raison de ses propriétés acido-basiques, confère une charge positive au film qui permet l'immobilisation de nanoparticules d'or chargées négativement (par une couche de ligands citrate). Cette surface fonctionnalisée avec des nanoparticules d'or a été caractérisée par XPS et Pm-IRRAS. L'épaisseur de la couche organique obtenue est d'environ 3 à 4 nm. Au-delà de ces résultats, ces travaux soulignent clairement l'intérêt d'utiliser des sels d'aryldiazonium pour fonctionnaliser les surfaces d'or de manière à obtenir des surfaces

nanostructurées avec des propriétés optiques originales [106]. Des études ont montré qu'il existe des polymères (comme le PNIPAM (poly(N-isopropylacrylamide)) dont la solubilité dépend de la température. Ce polymère se rétracte et devient hydrophobe quand on augmente la température ; et il se dilate et devient hydrophile quand la température diminue. La technique utilisée pour cela est appelée la LCST (lower critical solution temperature) ; cependant l'équipe de Mangeney a exploité ce phénomène (LCST) pour contrôler la distance entre les particules d'or et la surface sur laquelle elles ont été déposées [107].

Gooding et son équipe ont également réussi à immobiliser des nanoparticules d'or après modification de la surface du substrat (GC) par réduction électrochimique de cation diazonium fonctionnalisé [106]. Leur stratégie repose sur le greffage électrochimique réalisé à partir de deux précurseurs de cation diazonium (mercaptoaniline et p-phénylènediamine). Dans le cas de la mercaptoaniline, ils ont immergé la surface fonctionnalisée dans une solution colloïdale des nanoparticules d'or pendant trois heures. En raison de la forte affinité entre les atomes de soufre et d'or, les nanoparticules ont été immobilisées à la surface. Dans le cas de la p-phénylènediamine, le greffage des nanoparticules d'or a été réalisé par voie électrochimique (Figure 1.22). La voltamétrie cyclique, la spectroscopie d'impédance électrochimique, la spectroscopie de photoélectron X et la microscopie électronique à balayage ont été utilisées pour caractériser les surfaces nanostructurées. Il s'est avéré que les nanoparticules greffées par voie électrochimique présentent une bonne stabilité et résistent mieux à la sonication dans de l'eau que les autres méthodes de greffage indirect mises en œuvre dans cette étude (Figure 1.22).

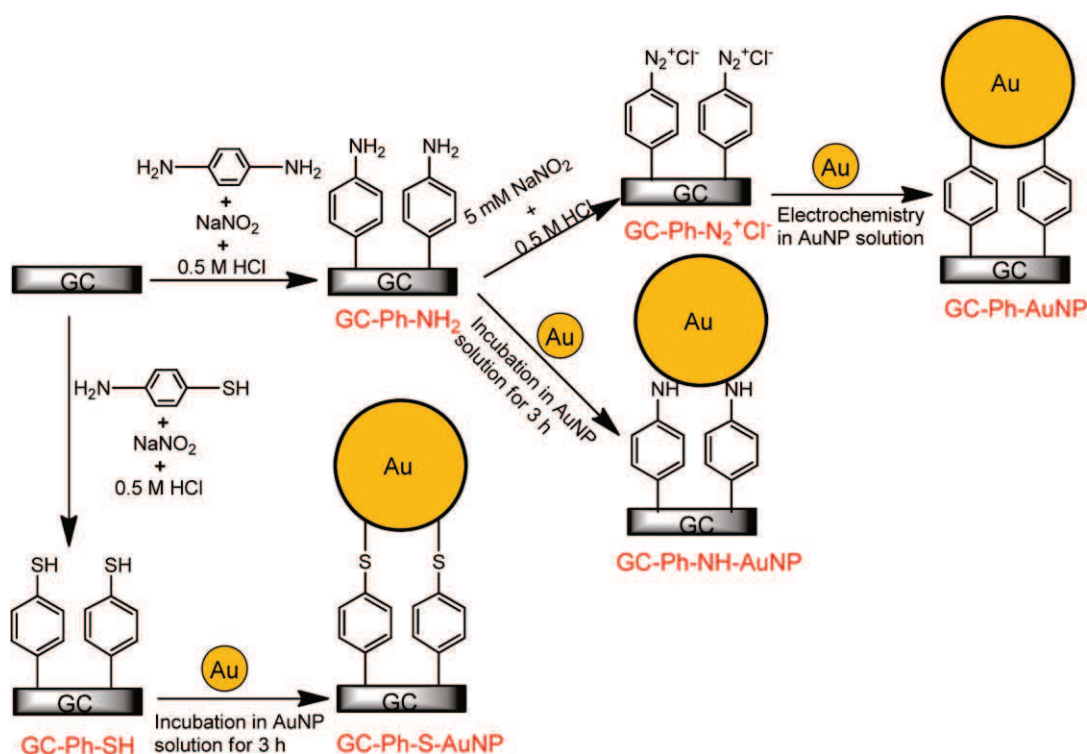


Figure 1.22 : Différentes stratégies de greffage indirect des nanoparticules d'or [106].

- Le greffage direct des nanoparticules par la réduction des sels de diazonium constitue une voie intéressante car elle ne nécessite pas la modification de la surface à recouvrir. En 2009, Williams et son équipe ont réussi à greffer par voie électrochimique des nanoparticules de silice [108]. Pour y parvenir, ils ont fonctionnalisé des nanoparticules de silice par des groupements de diazonium (Figure 1.23). Les nanoparticules de silice fonctionnalisées ont alors été greffées par réduction électrochimique à des surfaces d'or de manière covalente. Par ailleurs, les nanoparticules fonctionnalisées par des diazonium ont également été déposées sur une surface de fer. A la différence de la surface d'or, la fonctionnalisation sur la surface de fer n'a pas eu recours à des techniques électrochimiques. Le greffage a été effectué de manière spontanée. Williams *et al.* ont constaté dans le cas de dépôt sur le fer, une couverture homogène de la surface avec une très faible tendance à former des particules en grappes contrairement à la surface de l'or. La différence de morphologie du dépôt résulte de la formation de liaison « azo » qui est à l'origine de la multicouche des nanoparticules sur l'or.

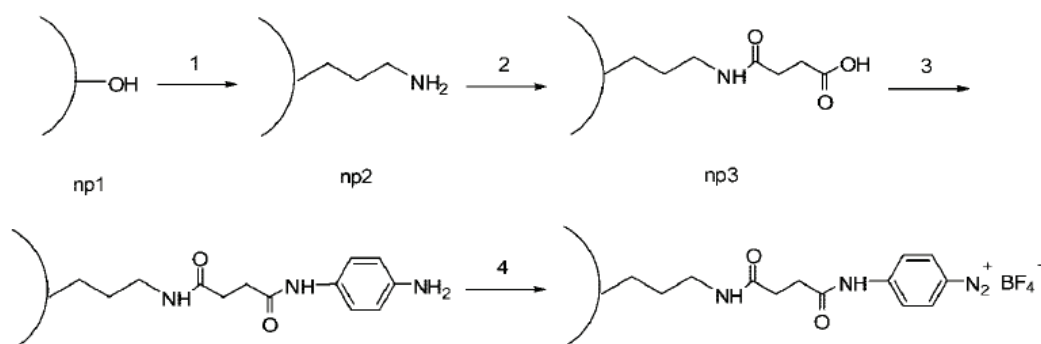


Figure 1.23 : Fonctionnalisation de la surface des nanoparticules de silice par un sel de diazonium. Réactifs utilisés: **(1)** (a) NH_3 , EtOH, H_2O ; (b) APS (aminopropyltriéthoxysilane); **(2)** anhydride succinique, THF; **(3)** (a) EDC (1-Ethyl-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide), NHS (N-hydroxysuccinimide), DMAP (N-diméthylaminopyridine)/ CH_2Cl_2 , DMF; (b) p-phénylènediamine; **(4)** HBF_4 , nitrite d'isoamyle/ EtOH.

5°/ But du travail de thèse

Comme l'ont montré les travaux de Bin *et al.*, la nanostructure de la surface sensible d'un biocapteur génère un abaissement du seuil de détection. Le greffage des nanoparticules apparaît comme un moyen efficace pour contrôler la structuration de la surface à l'échelle nanométrique. Parmi les nombreux stratégies de greffage des nanoparticules sur un substrat macroscopique, les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un azoture et un alcyne en présence d'un catalyseur à base de Cu(I) et la réduction de cation aryl-diazonium présentent des avantages décisifs pour garantir un greffage efficace dans l'eau.

L'immobilisation des particules par cycloaddition dipolaire requiert la présence de fonction alcyne sur les particules et de l'azoture sur le substrat (ou l'inverse). En tenant compte de ces particularités, nous avons développé des nanostructures hybrides fluorescentes constituées d'une particule de silice fonctionnalisées par des nanoparticules d'or. La particule de silice a été conçue de façon à permettre la détection de la nanostructure par fluorescence alors que les nanoparticules d'or ont été fonctionnalisés par la propargylamine (-alcyne vrai) afin d'assurer le greffage sur les particules de silice et sur le substrat macroscopique par cycloaddition 1,3-dipolaire (chapitre 2). Puisque la catalyse par les ions

Cu(I) est nécessaire, le greffage des nanostructures a été étudié en produisant de manière chimique et électrochimique l'ion cuivre (I) (Figure 1.24).

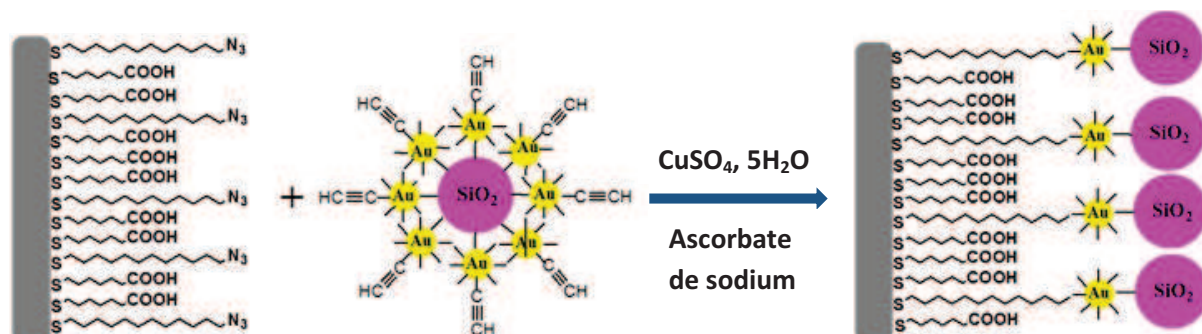


Figure 1.24 : Greffage via click chemistry des nanoparticules sur une surface d'or.

Afin d'exploiter le potentiel très prometteur de la réduction électrochimique des cations diazoniums pour fonctionnaliser les surfaces conductrices par des nanoparticules, nous avons développé la synthèse de nanoparticules d'or recouvertes par la mercaptoaniline. Cette molécule possède une fonction thiol qui est censée assurer l'immobilisation du ligand sur les cœurs d'or en raison de la forte affinité entre l'or et le soufre et un groupement amine aromatique primaire. Ce dernier peut être converti en cations diazonium par réactions avec le nitrite de sodium en milieu acide. Les nanoparticules Au@MA peuvent être perçues comme des objets fonctionnalisés par des précurseurs de cation diazonium dont la conversion devrait conduire au greffage électrochimiques des nanoparticules d'or (Figure 1.25).

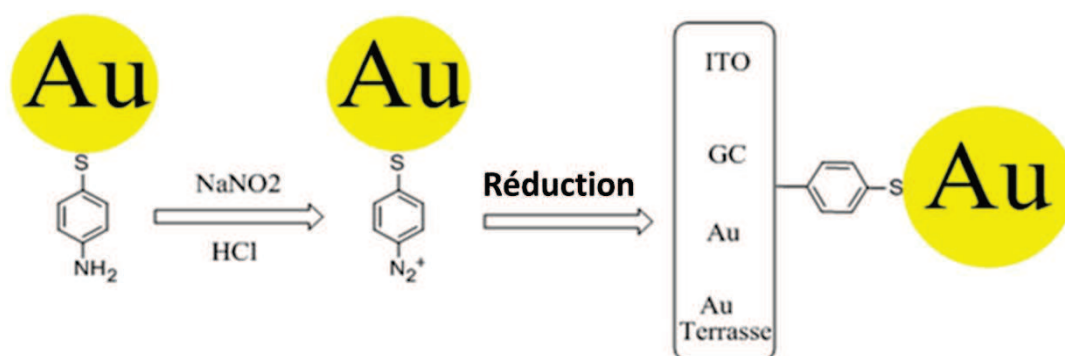


Figure 1.25: greffage électrochimique des nanoparticules d'or Au@MA.

Références

- [1] X. Bin, E.H. Sargent, S.O. Kelley, Nanostructuring of Sensors Determines the Efficiency of Biomolecular Capture, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 5928–5931.
- [2] V. Balzani, Nanoscience and Nanotechnology: A Personal View of a Chemist, *Small*, 1 (2005) 278–283.
- [3] B.F.G. Johnson, The chemistry of gold, *Gold Bull.*, 4 (1971) 9–11.
- [4] J.F. Hainfeld, D.N. Slatkin, H.M. Smilowitz, The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice, *Phys. Med. Biol.*, 49 (2004) N309–315.
- [5] I. Miladi, C. Alric, S. Dufort, P. Mowat, A. Dutour, C. Mandon, G. Laurent, E. Bräuer-Krisch, N. Herath, J.-L. Coll, M. Dutreix, F. Lux, R. Bazzi, C. Billotey, M. Janier, P. Perriat, G. Le Duc, S. Roux, O. Tillement, The In Vivo Radiosensitizing Effect of Gold Nanoparticles Based MRI Contrast Agents, *Small*, 10 (2014) 1116–1124.
- [6] A.S. Thakor, J. Jokerst, C. Zavaleta, T.F. Massoud, S.S. Gambhir, Gold Nanoparticles: A Revival in Precious Metal Administration to Patients, *Nano Lett.*, 11 (2011) 4029–4036.
- [7] A. Baeissa, N. Dave, B.D. Smith, J. Liu, DNA-Functionalized Monolithic Hydrogels and Gold Nanoparticles for Colorimetric DNA Detection, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2 (2010) 3594–3600.
- [8] A.C. Manikas, F. Causa, R. Della Moglie, P.A. Netti, Tuning Gold Nanoparticles Interfaces by Specific Peptide Interaction for Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) and Separation Applications, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 5 (2013) 7915–7922.
- [9] J.B. Richter, *Ueber Nieuern Gegenstände Chem.*, (1802) 82.
- [10] M. Faraday, The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 147 (1857) 145–181.
- [11] A. Kawabata, R. Kubo, Electronic Properties of Fine Metallic Particles II Plasma Resonance Absorption, *J. Phys. Soc. Jpn.*, 21 (1966) 1765–1772.
- [12] S.L. Logunov, T.S. Ahmadi, M.A. El-Sayed, J.T. Khoury, R.L. Whetten, Electron Dynamics of Passivated Gold Nanocrystals Probed by Subpicosecond Transient Absorption Spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 3713–3719.
- [13] J. Pinson, F. Podvorica, Attachment of organic layers to conductive or semiconductive surfaces by reduction of diazonium salts, *Chem. Soc. Rev.*, 34 (2005) 429–439.
- [14] A. Chaussé, M.M. Chehimi, N. Karsi, J. Pinson, F. Podvorica, C. Vautrin-UI, The Electrochemical Reduction of Diazonium Salts on Iron Electrodes The Formation of Covalently Bonded Organic Layers and Their Effect on Corrosion, *Chem. Mater.*, 14 (2002) 392–400.
- [15] C. Fave, Y. Leroux, Gaele Trippé, H. Randriamahazaka, V. Noel, J.-C. Lacroix, Tunable Electrochemical Switches Based on Ultrathin Organic Films, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 1890–1891.
- [16] J. Polte, X. Tuae, M. Wuithschick, A. Fischer, A.F. Thuenemann, K. Rademann, R. Kraehnert, F. Emmerling, Formation Mechanism of Colloidal Silver Nanoparticles: Analogies and Differences to the Growth of Gold Nanoparticles, *ACS Nano*, 6 (2012) 5791–5802.
- [17] J. Polte, T.T. Ahner, F. Delissen, S. Sokolov, F. Emmerling, A.F. Thünemann, R. Kraehnert, Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 1296–1301.
- [18] D.T. Nguyen, D.-J. Kim, K.-S. Kim, Controlled synthesis and biomolecular probe application of gold nanoparticles, *Micron Oxf. Engl.* 1993, 42 (2011) 207–227.
- [19] J. Turkevich, Colloidal gold Part I, *Gold Bull.*, 18 (1985) 86–91.
- [20] G. Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nature*, 241 (1973) 20–22.

- [21] X. Ji, X. Song, J. Li, Y. Bai, W. Yang, X. Peng, Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate, *J. Am. Chem. Soc.*, 129 (2007) 13939–13948.
- [22] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1994) 801–802.
- [23] Z. Ge, D.G. Cahill, P.V. Braun, AuPd Metal Nanoparticles as Probes of Nanoscale Thermal Transport in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. B*, 108 (2004) 18870–18875.
- [24] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin, C. Kiely, Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1995) 1655–1656.
- [25] N. Pérignon, J.-D. Marty, A.-F. Mingotaud, M. Dumont, I. Rico-Lattes, C. Mingotaud, Hyperbranched Polymers Analogous to PAMAM Dendrimers for the Formation and Stabilization of Gold Nanoparticles, *Macromolecules*, 40 (2007) 3034–3041.
- [26] M. Nakamoto, M. Yamamoto, M. Fukusumi, Thermolysis of gold(I) thiolate complexes producing novel gold nanoparticles passivated by alkyl groups, *Chem. Commun.*, (2002) 1622–1623.
- [27] P.-J. Debouttière, Y. Coppel, P. Behra, B. Chaudret, K. Fajerweg, One-pot organometallic synthesis of well-controlled gold nanoparticles by gas reduction of Au(I) precursor: a spectroscopic NMR study, *Gold Bull.*, 46 (2013) 291–298.
- [28] T. Sato, S. Kuroda, A. Takami, Y. Yonezawa, H. Hada, Photochemical formation of silver-gold (Ag/Au) composite colloids in solutions containing sodium alginate, *Appl. Organomet. Chem.*, 5 (1991) 261–268.
- [29] L. Bronstein, D. Chernyshov, P. Valetsky, N. Tkachenko, H. Lemmetyinen, J. Hartmann, S. Förster, Laser Photolysis Formation of Gold Colloids in Block Copolymer Micelles, *Langmuir*, 15 (1999) 83–91.
- [30] M. Michaelis, A. Henglein, Reduction of palladium (II) in aqueous solution: stabilization and reactions of an intermediate cluster and palladium colloid formation, *J. Phys. Chem.*, 96 (1992) 4719–4724.
- [31] D. Bélanger, J. Pinson, Electrografting: a powerful method for surface modification, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 3995–4048.
- [32] J.C. Love, L.A. Estroff, J.K. Kriebel, R.G. Nuzzo, G.M. Whitesides, Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chem. Rev.*, 105 (2005) 1103–1170.
- [33] C.D. Bain, E.B. Troughton, Y.T. Tao, J. Evall, G.M. Whitesides, R.G. Nuzzo, Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 321–335.
- [34] C.D. Bain, J. Evall, G.M. Whitesides, Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent, *J. Am. Chem. Soc.*, 111 (1989) 7155–7164.
- [35] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 40 (2001) 2004–2021.
- [36] C.W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides, *J. Org. Chem.*, 67 (2002) 3057–3064.
- [37] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002) 2596–2599.
- [38] L. Liang, D. Astruc, The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) “click” reaction and its applications An overview, *Coord. Chem. Rev.*, 255 (2011) 2933–2945.
- [39] M.G. Finn, V.V. Fokin, Click chemistry: function follows form, *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2010) 1231–1232.
- [40] W.G. Lewis, F.G. Magallon, V.V. Fokin, M.G. Finn, Discovery and Characterization of Catalysts for Azide–Alkyne Cycloaddition by Fluorescence Quenching, *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (2004) 9152–9153.

- [41] Q. Wang, T.R. Chan, R. Hilgraf, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, M.G. Finn, Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 3192–3193.
- [42] K.E. Beatty, J.C. Liu, F. Xie, D.C. Dieterich, E.M. Schuman, Q. Wang, D.A. Tirrell, Fluorescence Visualization of Newly Synthesized Proteins in Mammalian Cells, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 45 (2006) 7364–7367.
- [43] J.P. Collman, N.K. Devaraj, R.A. Decreau, Y. Yang, Y.-L. Yan, W. Ebina, T.A. Eberspacher, C.E.D. Chidsey, A Cytochrome c Oxidase Model Catalyzes Oxygen to Water Reduction Under Rate-Limiting Electron Flux, *Science*, 315 (2007) 1565–1568.
- [44] V.O. Rodionov, V.V. Fokin, M.G. Finn, Mechanism of the Ligand-Free CuI-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44 (2005) 2210–2215.
- [45] F. Himoto, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 210–216.
- [46] R. Gujadhur, D. Venkataraman, J.T. Kintigh, Formation of aryl–nitrogen bonds using a soluble copper(I) catalyst, *Tetrahedron Lett.*, 42 (2001) 4791–4793.
- [47] F. Fazio, M.C. Bryan, O. Blixt, J.C. Paulson, C.-H. Wong, Synthesis of Sugar Arrays in Microtiter Plate, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 14397–14402.
- [48] M. Meldal, C.W. Tornøe, Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2952–3015.
- [49] W.H. Binder, R. Sachsenhofer, “Click” Chemistry in Polymer and Materials Science, *Macromol. Rapid Commun.*, 28 (2007) 15–54.
- [50] W.H. Binder, R. Sachsenhofer, “Click” Chemistry in Polymer and Material Science: An Update, *Macromol. Rapid Commun.*, 29 (2008) 952–981.
- [51] C.J. Thode, M.E. Williams, Kinetics of 1,3-dipolar cycloaddition on the surfaces of Au nanoparticles, *J. Colloid Interface Sci.*, 320 (2008) 346–352.
- [52] D.A. Fleming, C.J. Thode, M.E. Williams, Triazole Cycloaddition as a General Route for Functionalization of Au Nanoparticles, *Chem. Mater.*, 18 (2006) 2327–2334.
- [53] J. Brennan, N. Hatzakis, T. Tshikhudo, N. Dirvianskyte, V. Razumas, S. Patkar, J. Vind, A. Svendsen, R. Nolte, A. Rowan, M. Brust, Bionanoconjugation via Click Chemistry: The Creation of Functional Hybrids of Lipases and Gold Nanoparticles, *Bioconjugate Chem.*, 17 (2006) 1373–1375.
- [54] G. von Maltzahn, Y. Ren, J.-H. Park, D.-H. Min, V.R. Kotamraju, J. Jayakumar, V. Fogel, M.J. Sailor, E. Ruoslahti, S.N. Bhatia, In Vivo Tumor Cell Targeting with “Click” Nanoparticles, *Bioconjug. Chem.*, 19 (2008) 1570–1578.
- [55] J. Xie, N. Bogliotti, Synthesis and Applications of Carbohydrate-Derived Macrocyclic Compounds, *Chem. Rev.*, 114 (2014) 7678–7739.
- [56] C. Troiber, E. Wagner, Nucleic Acid Carriers Based on Precise Polymer Conjugates, *Bioconjug. Chem.*, 22 (2011) 1737–1752.
- [57] L. Wang, Q. Ran, Y. Tian, J. Xu, Y. Xian, R. Peng, L. Jin, Covalent immobilization of redox protein via click chemistry and carbodiimide reaction: Direct electron transfer and biocatalysis, *J. Colloid Interface Sci.*, 350 (2010) 544–550.
- [58] M.J. Hostetler, A.C. Templeton, R.W. Murray, Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules, *Langmuir*, 15 (1999) 3782–3789.
- [59] S. Mischler, La chimie click pour la conception de nanoparticules d’or liquides-cristallines, Université de Neuchâtel, 2012.
- [60] M. Ripert, DEVELOPPEMENT D’UNE STRATEGIE D’ADRESSAGE SUR OR PAR CHIMIE « CLICK » ELECTRO-CATALYSEE : APPLICATION A LA DETECTION SANS MARQUAGE DE BIOMOLECULES, L’UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1, 2013.
- [61] G. Liu, T. Böcking, J.J. Gooding, Diazonium salts: Stable monolayers on gold electrodes for sensing applications, *J. Electroanal. Chem.*, 600 (2007) 335–344.
- [62] P. Griess, XLVI—On a new class of organic compounds in which hydrogen is replaced by nitrogen, *J. Chem. Soc.*, 18 (1865) 298–318.

- [63] S. Sengupta, S.K. Sadhukhan, SYNTHESIS OF SYMMETRICAL trans -STILBENES BY A DOUBLE HECK REACTION OF (ARYLAZO)AMINES WITH VINYLTRIETHOXYSILANE : trans-4,4'-DIBROMOSTILBENE, *Org. Synth.*, (2004) 263.
- [64] C. Combellas, F. Kanoufi, J. Pinson, F.I. Podvorica, Sterically Hindered Diazonium Salts for the Grafting of a Monolayer on Metals, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 8576–8577.
- [65] K.P.C. Vollhardt, N.E. Schore, *Traité de chimie organique*, De Boeck, Bruxelles, 2009.
- [66] A. Chaudhuri, J.A. Loughlin, L.S. Romsted, J. Yao, Arenediazonium salts: new probes of the interfacial compositions of association colloids 1 Basic approach, methods, and illustrative applications, *J. Am. Chem. Soc.*, 115 (1993) 8351–8361.
- [67] M.C. Garcia-Meijide, C. Bravo-Díaz, L.S. Romsted, A new method for monitoring dediazonation reactions: Simultaneous monitoring of concentration and rates of product formation and loss of starting material for the dediazonation of p-methylbenzenediazonium tetrafluoroborate, *Int. J. Chem. Kinet.*, 30 (1998) 31–39.
- [68] J. Agullo, S. Canesi, F. Schaper, M. Morin, D. Bélanger, Formation and Reactivity of 3-Diazopyridinium Cations and Influence on Their Reductive Electrografting on Glassy Carbon, *Langmuir*, 28 (2012) 4889–4895.
- [69] J. Agullo, M. Morin, D. Bélanger, Modification of Glassy Carbon Electrode by Electrografting of In Situ Generated 3-diazopyridinium Cations, *J. Electrochem. Soc.*, 159 (2012) H758–H764.
- [70] M.E. Romero-Nieto, C. Bravo-Díaz, B. Malvido-Hermelo, E. González-Romero, Electrochemical determination of rate constants and product yields for the spontaneous dediazonation of p-nitrobenzenediazonium tetrafluoroborate in acidic aqueous solution, *Int. J. Chem. Kinet.*, 32 (2000) 419–430.
- [71] C. Galli, Radical reactions of arenediazonium ions: An easy entry into the chemistry of the aryl radical, *Chem. Rev.*, 88 (1988) 765–792.
- [72] S. Mahouche-Chergui, S. Gam-Derouich, C. Mangeney, M.M. Chehimi, Aryl diazonium salts: a new class of coupling agents for bonding polymers, biomacromolecules and nanoparticles to surfaces, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 4143–4166.
- [73] M. Toupin, D. Bélanger, Thermal Stability Study of Aryl Modified Carbon Black by in Situ Generated Diazonium Salt, *J. Phys. Chem. C*, 111 (2007) 5394–5401.
- [74] Y. Pan, B. Tong, J. Shi, W. Zhao, J. Shen, J. Zhi, Y. Dong, Fabrication, Characterization, and Optoelectronic Properties of Layer-by-Layer Films Based on Terpyridine-Modified MWCNTs and Ruthenium(III) Ions, *J. Phys. Chem. C*, 114 (2010) 8040–8047.
- [75] J. Liu, M. Rodriguez i Zubiri, B. Vigolo, M. Dossot, B. Humbert, Y. Fort, E. McRae, Microwave-assisted functionalization of single-wall carbon nanotubes through diazonium, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 7 (2007) 3519–3523.
- [76] C. Mangeney, Z. Qin, S.A. Dahoumane, A. Adenier, F. Herbst, J.-P. Boudou, J. Pinson, M.M. Chehimi, Electroless ultrasonic functionalization of diamond nanoparticles using aryl diazonium salts, *Diam. Relat. Mater.*, 17 (2008) 1881–1887.
- [77] J.L. Bahr, J.M. Tour, Highly Functionalized Carbon Nanotubes Using in Situ Generated Diazonium Compounds, *Chem. Mater.*, 13 (2001) 3823–3824.
- [78] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.M. Saveant, Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 5883–5884.
- [79] A. Mesnage, X. Lefèvre, P. Jégou, G. Deniau, S. Palacin, Spontaneous grafting of diazonium salts: chemical mechanism on metallic surfaces, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, 28 (2012) 11767–11778.
- [80] N. Marshall, J. Locklin, Reductive Electrografting of Benzene (p-Bisdiazonium Hexafluorophosphate): A Simple and Effective Protocol for Creating Diazonium-Functionalized Thin Films, *Langmuir*, 27 (2011) 13367–13373.
- [81] A. Laforgue, T. Addou, D. Bélanger, Characterization of the Deposition of Organic Molecules at the Surface of Gold by the Electrochemical Reduction of Aryldiazonium Cations, *Langmuir*, 21 (2005) 6855–6865.

- [82] P. Actis, G. Caulliez, G. Shul, M. Opallo, M. Mermoux, B. Marcus, R. Boukherroub, S. Szunerits, Functionalization of Glassy Carbon with Diazonium Salts in Ionic Liquids, *Langmuir*, 24 (2008) 6327–6333.
- [83] Reaction of carbon black with diazonium salts, resultant carbon black products and their uses, n.d.
- [84] D.J. Garrett, B.S. Flavel, J.G. Shapter, K.H.R. Baronian, A.J. Downard, Robust Forests of Vertically Aligned Carbon Nanotubes Chemically Assembled on Carbon Substrates, *Langmuir*, 26 (2010) 1848–1854.
- [85] P. Allongue, M. Delamar, B. Desbat, O. Fagebaume, R. Hitmi, J. Pinson, J.-M. Savéant, Covalent Modification of Carbon Surfaces by Aryl Radicals Generated from the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (1997) 201–207.
- [86] A.M. Nowak, R.L. McCreery, Characterization of Carbon/Nitroazobenzene/Titanium Molecular Electronic Junctions with Photoelectron and Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 1089–1097.
- [87] Y.-C. Liu, R.L. McCreery, Raman Spectroscopic Determination of the Structure and Orientation of Organic Monolayers Chemisorbed on Carbon Electrode Surfaces, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2091–2097.
- [88] T. Itoh, R.L. McCreery, In Situ Raman Spectroelectrochemistry of Electron Transfer between Glassy Carbon and a Chemisorbed Nitroazobenzene Monolayer, *J. Am. Chem. Soc.*, 124 (2002) 10894–10902.
- [89] C. Combellas, F. Kanoufi, J. Pinson, F.I. Podvorica, Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectroscopy Characterization of the Covalent Bonding between a Carbon Surface and Aryl Groups, *Langmuir*, 21 (2005) 280–286.
- [90] K. Boukerma, M.M. Chehimi, J. Pinson, C. Blomfield, X-ray Photoelectron Spectroscopy Evidence for the Covalent Bond between an Iron Surface and Aryl Groups Attached by the Electrochemical Reduction of Diazonium Salts, *Langmuir*, 19 (2003) 6333–6335.
- [91] A. Adenier, M.C. Bernard, M.M. Chehimi, E. Cabet-Deliry, B. Desbat, O. Fagebaume, J. Pinson, F. Podvorica, Covalent modification of iron surfaces by electrochemical reduction of aryldiazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 4541–4549.
- [92] J.-M. Noël, B. Sjöberg, R. Marsac, D. Zigah, J.-F. Bergamini, A. Wang, S. Rigaut, P. Hapiot, C. Lagrost, Flexible Strategy for Immobilizing Redox-Active Compounds Using in Situ Generation of Diazonium Salts Investigations of the Blocking and Catalytic Properties of the Layers, *Langmuir*, 25 (2009) 12742–12749.
- [93] J. Lyskawa, D. Bélanger, Direct Modification of a Gold Electrode with Aminophenyl Groups by Electrochemical Reduction of in Situ Generated Aminophenyl Monodiazonium Cations, *Chem. Mater.*, 18 (2006) 4755–4763.
- [94] S. Baranton, D. Bélanger, In situ generation of diazonium cations in organic electrolyte for electrochemical modification of electrode surface, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 6961–6967.
- [95] M. Toupin, D. Belanger, Spontaneous Functionalization of Carbon Black by Reaction with 4-Nitrophenyldiazonium Cations, *Langmuir*, 24 (2008) 1910–1917.
- [96] L. Santos, J. Ghilane, P. Martin, P.-C. Lacaze, H. Randriamahazaka, J.-C. Lacroix, Host–Guest Complexation: A Convenient Route for the Electroreduction of Diazonium Salts in Aqueous Media and the Formation of Composite Materials, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 1690–1698.
- [97] A. Ricci, C. Bonazzola, E.J. Calvo, An FT-IRRAS study of nitrophenyl mono- and multilayers electro-deposited on gold by reduction of the diazonium salt, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 8 (2006) 4297–4299.
- [98] P. Allongue, C. Henry de Villeneuve, G. Cherouvrier, R. Cortès, M.-C. Bernard, Phenyl layers on H–Si(111) by electrochemical reduction of diazonium salts: monolayer versus multilayer formation, *J. Electroanal. Chem.*, 550–551 (2003) 161–174.
- [99] P.A. Brooksby, A.J. Downard, Electrochemical and Atomic Force Microscopy Study of Carbon Surface Modification via Diazonium Reduction in Aqueous and Acetonitrile Solutions, *Langmuir*, 20 (2004) 5038–5045.

- [100] X.T. Le, P. Viel, P. Jégou, A. Garcia, T. Berthelot, T.H. Bui, S. Palacin, Diazonium-induced anchoring process: an application to improve the monovalent selectivity of cation exchange membranes, *J. Mater. Chem.*, 20 (2010) 3750–3757.
- [101] Procède de greffage et de croissance d'un film organique conducteur sur une surface, n.d.
- [102] F. Anariba, S.H. DuVall, R.L. McCreery, Mono- and Multilayer Formation by Diazonium Reduction on Carbon Surfaces Monitored with Atomic Force Microscopy "Scratching," *Anal. Chem.*, 75 (2003) 3837–3844.
- [103] A. Adenier, C. Combellas, F. Kanoufi, J. Pinson, F.I. Podvorica, Formation of Polyphenylene Films on Metal Electrodes by Electrochemical Reduction of Benzenediazonium Salts, *Chem. Mater.*, 18 (2006) 2021–2029.
- [104] W. Maneerprakorn, M.A. Malik, P. O'Brien, Developing Chemical Strategies for the Assembly of Nanoparticles into Mesoscopic Objects, *J. Am. Chem. Soc.*, 132 (2010) 1780–1781.
- [105] H. Gehan, L. Fillaud, N. Felidj, J. Aubard, P. Lang, M.M. Chehimi, C. Mangeney, A General Approach Combining Diazonium Salts and Click Chemistries for Gold Surface Functionalization by Nanoparticle Assemblies, *Langmuir*, 26 (2010) 3975–3980.
- [106] G. Liu, E. Luais, J.J. Gooding, The Fabrication of Stable Gold Nanoparticle-Modified Interfaces for Electrochemistry, *Langmuir*, 27 (2011) 4176–4183.
- [107] H. Gehan, L. Fillaud, M.M. Chehimi, J. Aubard, A. Hohenau, N. Felidj, C. Mangeney, Thermo-induced Electromagnetic Coupling in Gold/Polymer Hybrid Plasmonic Structures Probed by Surface-Enhanced Raman Scattering, *ACS Nano*, 4 (2010) 6491–6500.
- [108] M. Joselevich, F.J. Williams, Synthesis and Characterization of Diazonium Functionalized Nanoparticles for Deposition on Metal Surfaces, *Langmuir*, 24 (2008) 11711–11717.

CHAPITRE 2 : Synthèse, fonctionnalisation et greffage par Click Chemistry de particules silice-or sur des substrats d'or.

1°/ Introduction

Un des objectifs de la thèse consiste à immobiliser de façon covalente des objets de taille nanométrique sur des surfaces conductrices. Afin d'atteindre ce but, nous avons opté pour une stratégie de greffage qui repose sur la cycloaddition 1,3-dipolaire (une des nombreuses réactions de la « Click Chemistry »). Elle conduit à la formation d'un cycle 1, 2, 3-triazole extrêmement résistant par addition d'un groupe azoture sur la triple liaison $\text{--C}\equiv\text{C--}$ d'un alcyne. Cette réaction de couplage présente un autre avantage : elle a lieu en phase aqueuse. Comme la cycloaddition fait intervenir deux groupements réactionnels, il est nécessaire de fonctionnaliser les nanoparticules à immobiliser par les fonctions réactives et la surface à recouvrir par les fonctions réactives complémentaires. Nous avons choisi de fonctionnaliser des nanoparticules d'or par des fonctions alcynes et le substrat d'or plan par une monocouche autoassemblée de thiols dont certains sont terminés par des fonctions azoture. Afin de faciliter la caractérisation des surfaces après immersion dans les suspensions de particules, nous avons dans un premier temps cherché à accrocher les nanoparticules d'or porteuses de triples liaisons $\text{C}\equiv\text{C}$ sur des particules de silice fluorescentes fonctionnalisées par des groupements azoture. cet assemblage sera en effet plus facile à visualiser que les nanoparticules d'or en raison d'une taille nettement plus importante qui permettra une observation en MEB et des propriétés de fluorescence provenant des fluorophores liés au réseau de polysiloxane des particules de silice. En outre, la réalisation d'un tel assemblage confirmera la présence des fonctions alcyne sur les nanoparticules d'or.

1.1°/ Généralités sur l'élaboration des nanoparticules d'or Au@DTDTPA

L'élaboration de nanoparticules d'or peut être réalisée par un large panel de méthodes qu'elles soient chimiques ou physiques. Nous nous sommes pour notre part concentrés sur les méthodes chimiques de synthèse (méthode de Brust).

L'or présente une importante stabilité chimique (résistance à l'oxydation) et apparait comme l'un des métaux les plus biocompatibles, même à l'échelle nanométrique. Les nanoparticules d'or font l'objet d'intenses recherches qui ont finalement mené à une connaissance approfondie de la synthèse de nanoparticules de taille, de forme et de propriétés de surface très diverses. Les deux méthodes de synthèse les plus utilisées pour préparer des nanoparticules d'or sphériques sont celles de Frens et de Brust, qui conduisent à deux types de nanoparticules différents :

- La méthode de Frens [1] consiste en la réduction d'un sel d'or (HAuCl_4) par un réducteur doux (citrate de sodium) dont la taille est comprise dans la gamme 10-150 nm et qui peuvent ensuite être fonctionnalisées par des molécules thiolées ou aminées.
- La méthode de Brust [2] consiste en la réduction d'un sel d'or (HAuCl_4) par un réducteur fort (NaBH_4) en présence de ligands thiolés. Cette méthode permet l'obtention de nanoparticules d'or, de taille très réduite (2-10 nm) comme elles sont recouvertes de molécules thiolées, elles donnent des colloïdes très stables, ce qui permet d'atteindre des concentrations plus élevées que celles obtenues avec la méthode de Frens.

Notre choix s'est porté sur l'élaboration de nanohybrides constitués d'un cœur d'or métallique encapsulé dans une couche organique de dérivés dithiolés de l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (DTDTPA). La présence de deux fonctions thiol permet un accrochage robuste sur les surfaces des nanoparticules d'or en raison de la grande affinité du soufre pour l'or [3,4]. En outre, Alric *et al.* ont montré que cette couche organique peut être utilisée pour assurer la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or, complexer des ions possédant des propriétés intéressantes pour l'imagerie et/ou pour servir de site d'ancrage en vue d'une post-fonctionnalisation (greffage d'effecteurs biologiques) car le DTDTPA possède plusieurs fonctions acide carboxylique.

1.2°/Généralités sur la synthèse de particules de silice SiO₂

La silice ou dioxyde de silicium, de formule brute générale SiO₂, est l'un des matériaux les plus abondants de l'écorce terrestre. Elle existe à l'état naturel sous différentes formes cristallines mais également à l'état amorphe.

La silice colloïdale est définie comme une dispersion stable, appelée aussi sol, de petites particules de silice amorphe dans un milieu liquide aqueux ou organique. Ces particules de silice, de forme sphérique dont le diamètre est compris entre quelques nm et quelques μm, sont présentes dans de nombreuses applications comme les capteurs chimiques dans le domaine de la biologie [5,6], les nanocomposites [7], les polymères [8] ou les pièges à métaux pour la dépollution de l'environnement [9]. Les applications souhaitées nécessitent des nanoparticules de silice avec une bonne réactivité de surface, ce sont donc les réactions impliquées dans la voie humide qui seront utilisées. Le principe de synthèse consiste à hydrolyser et condenser un alcoxy silane tel que le tétraéthoxysilane (TEOS).

De nombreux articles traitent de la synthèse en phase liquide de nanoparticules de silice sphériques. Elle découle du procédé sol-gel décrit par Ebelmen en 1845 qui permet de préparer des polymères inorganiques.

La réaction sol-gel repose sur une succession de réactions d'hydrolyse-condensation des précurseurs, principalement des alkoxydes M(OR)_n, dans lesquels l'atome métallique M est lié à des groupements alkoxy OR où R est un groupement alkyle. Dans le cas de la silice, les réactions d'hydrolyse-condensation de précurseurs alcoxysilanes de formule générale Si(OR)₄ entraînent la formation d'espèces de plus en plus condensées qui conduisent à des particules de silice colloïdales. Elles sont susceptibles de former des sols puis des gels d'où le nom du procédé « sol-gel ».

Par ailleurs, Stöber *et al.* [10] ont été les premiers à utiliser le procédé sol-gel pour l'élaboration de nanoparticules de silice. Ils ont montré qu'en présence d'eau et d'ammoniaque, l'hydrolyse puis la condensation du tétraéthoxysilane (TEOS) mis en solution dans l'éthanol conduit à la formation de particules de silice.

1.3°/Généralités sur le greffage via la « Click Chemistry »

La fonctionnalisation de nanoparticules ou l'assemblage des nanoparticules par des liens covalents repose dans de nombreux cas décrits dans la littérature sur la formation d'un ester (condensation entre une fonction acide carboxylique et un groupement alcool) ou d'un amide (condensation entre une fonction acide carboxylique et une amine). Ce mode de fonctionnalisation est cependant pénalisé par un faible rendement lorsque le couplage a lieu en phase aqueuse. L'utilisation du mélange EDC + NHS génère une amélioration du rendement qui reste modérée.

Pour contourner ces difficultés, nous avons choisi de faire appel aux réactions de « Click Chemistry ». Elles présentent en effet plusieurs avantages (rendement élevé, facilité de mise en œuvre dans des conditions douces etc...).

La réaction de « Click Chemistry » offre une alternative particulièrement intéressante aux différentes réactions souvent utilisées pour la fixation « covalente » et spécifique de ligands sur des surfaces. L'exemple le plus connu dans la littérature est la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée entre un alcyne et un azoture, qui conduit de manière irréversible à la formation d'un cycle hétéroaromatique de type 1, 2, 3-triazole [11]. De très nombreuses architectures macromoléculaires obtenues par cette réaction ont été décrites récemment dans la littérature [12]. Parmi elles, nous pouvons citer le greffage de fluorophores sur de la cellulose [13], la fonctionnalisation de nanoparticules d'or par des dendrimères poly(éthylèneglycol) [14] et de nanoparticules de silice par des chaînes de polyéthylène glycol [15] et par polymérisation RAFT [16].

Dans le cadre de ce travail de thèse au cours duquel nous avons cherché à greffer des nanoparticules sur des substrats conducteurs, nous avons opté pour les réactions de Click Chemistry afin de préparer des nanostructures hybrides silice-or en assemblant une particule de silice recouverte de fonction azoture et plusieurs nanoparticules d'or fonctionnalisées par la propargylamine (alcyne vrai). Les fonctions alcynes n'ayant pas participé au greffage des nanoparticules sur les particules de silice peuvent à leur tour assurer l'immobilisation des nanostructures ($\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$) sur des surfaces planes recouvertes de monocouche autoassemblée comportant des groupements azoture.

2°/ Partie expérimentale

La synthèse de nanoparticules d'or et de particules de silice a été réalisée dans des ballons préalablement lavés à l'eau régale (deux portions d'acide chlorhydrique (37%) pour une portion d'acide nitrique (64%)), rincés à l'eau distillée et séchés. Les produits utilisés sont pour la plupart des produits achetés chez Sigma Aldrich.

2.1°/ Synthèse et fonctionnalisation des Au@DTDTPA via la propargylamine

Dans ce paragraphe, nous décrivons la synthèse des nanoparticules d'or Au@DTDTPA que nous avons ensuite fonctionnalisées par des fonctions alcyne via la propargylamine.

2.1.1°/ Synthèse de nanoparticules d'or Au@DTDTPA

Dans un ballon de 250 mL, le sel d'or $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (192 mg ; $4,9 \cdot 10^{-4}$ mol) a été dissous dans 60 mL de méthanol. Nous obtenons alors une solution de coloration jaune claire qui est vigoureusement agitée. Puis une solution aqueuse de DTDTPA (256 mg ; $5 \cdot 10^{-4}$ mol dans 38 mL d'eau distillée) a été ajoutée à la solution de sel d'or. Après quelques minutes d'agitation, l'acide acétique (1,92 mL) a été introduit dans le mélange. Ensuite une solution aqueuse (13,2 mL) de NaBH_4 (182 mg ; $4,8 \cdot 10^{-3}$ mol dans 13,2 mL) est ajoutée par portions. Le mélange final est maintenu sous agitation durant 1h.

Au bout d'une heure d'agitation magnétique, une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (1M, 2 mL) a été ajoutée au mélange réactionnel qui est agité durant 15 minutes avant de le laisser reposer pendant 15 autres minutes.

La solution colloïdale de nanoparticules Au@DTDTPA obtenue est ensuite filtrée sous pression réduite sur une membrane dont la porosité est de l'ordre de 0,22 μm . Les nanoparticules sont ensuite lavées avec différentes solutions (3 x 10 mL d'acide chlorhydrique à 0,1M, puis 3 x 10 mL d'eau distillée et enfin 2 x 10 mL d'éther diéthylique). Les nanoparticules sont finalement séchées sous aspiration durant environ une heure. La poudre noire de nanoparticules Au@DTDTPA obtenue ($m = 220$ mg) est ensuite redispersée

dans une solution aqueuse de NaOH (1.10^{-2} M), à une concentration de 10 g.L^{-1} en or. Le pH de la solution colloïdale contenant les nanoparticules Au@DTDTPA obtenue est alors compris entre 5 et 6.

2.1.2°/ Fonctionnalisation des nanoparticules Au@DTDTPA par des groupes alcynes

Une solution aqueuse (1 mL, pH 5) de N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (EDC,) (19,2 mg ; 1.10^{-4} mol) et de N-hydroxysuccinimide (NHS, 23 mg ; 2.10^{-4} mol) est ajoutée à une suspension colloïdale de Au@DTDTPA (1 gAu.L^{-1} ; 5 mL). Après 1h30 d'agitation, le pH du mélange est ajusté à 8. Une solution de DMF (100 μL) contenant la propargylamine (7 μL ou 35 μL) est ajoutée au colloïde. Après 4h d'agitation, les particules d'or sont purifiées par dialyse contre l'eau. Les solutions colloïdales ont ensuite été caractérisées par différentes méthodes pour obtenir les informations sur la taille, la forme, la stabilité colloïdale, la charge de surface (potentiel zêta). Pour cela, nous avons utilisé la microscopie électronique à transmission pour déterminer la morphologie et la taille du cœur d'or, le dosage par ICP-OES de l'or (Au) et du soufre (S), la spectrométrie UV-visible pour confirmer la présence des nanoparticules d'or en suspension dans la solution et estimer la stabilité colloïdale, la mesure du potentiel zêta pour évaluer la charge de surface.

2.2°/ Différentes méthodes de caractérisation de Au@DTDTPA et Au@DTDTPA-Alcyne

2.2.1°/ Microscopie Electronique en Transmission (TEM)

La microscopie TEM haute résolution est utilisée pour obtenir des informations structurales et morphologiques sur les échantillons de solutions colloïdales. Les clichés sont réalisés sur un microscope JEOL 2010 à 200 kV au sein du laboratoire MATEIS (UMR CNRS 5510, INSA de Lyon). Les échantillons pour le TEM sont préparés en déposant une goutte de solution colloïdale diluée de Au@DTDTPA et de Au@DTDTPA-Alcyne sur des grilles de carbone et en les laissant sécher à l'air ambiant. La détermination des tailles a été réalisée en calculant la

moyenne d'au moins une centaine de diamètres mesurés à l'aide de la règle sur une dizaine de clichés TEM.

2.2.2°/ Spectrophotométrie d'absorption UV-visible et étude de la stabilité colloïdale en fonction du pH

Les spectres d'extinction UV-visible ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible model SPECORD 250 dans la gamme de longueur d'onde 400-800 nm. La communication et le traitement des spectres s'effectuent via l'interface du logiciel Win ASPECT. Les suspensions colloïdales ont été diluées de façon à ce que l'absorbance ne dépasse pas la valeur de 2,5. Concernant l'étude de la stabilité colloïdale des nanoparticules Au@DTDTPA en fonction du pH, les suspensions ont préalablement été diluées à une concentration en or de 0,1 g.L⁻¹. Leur pH a été ajusté à la valeur désirée par ajout de solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique 1 M et 0,5 M.

2.2.3°/ Mesure du potentiel zêta et Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures du potentiel zêta ξ et du diamètre hydrodynamique des nanoparticules Au@DTDTPA ont été réalisées en utilisant un granulomètre-Zetamètre (Zetasizer Malvern Nano ZS). Ces mesures ont été effectuées sur des suspensions colloïdales de concentration égale à 1 g.L⁻¹ en or et 10⁻² M en NaCl, ajustées au pH désiré par ajout de solutions aqueuses d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (1 M et/ou 0,5 M). Chaque mesure est réalisée trois fois et les résultats sont donnés sous forme de moyenne. Les solutions Au@DTDTPA (1g.L⁻¹) sont prélevées et introduites dans une cuve jetable en polystyrène. Avant d'insérer l'échantillon dans l'appareil, la solution est introduite de manière à remplir suffisamment la cuve (environ 2 mL) afin que le faisceau laser monochromatique traverse le cœur de la solution. La distribution de taille obtenue résulte de la moyenne de trois mesures sur un échantillon donné. Ces analyses ont été effectuées au laboratoire QUALIO Analyses & environnement (Besançon).

2.3°/ Synthèse, fonctionnalisation et caractérisation des particules fluorescentes de silice de 50 nm par des fonctions azoture

La synthèse et la fonctionnalisation des particules fluorescentes de silice de 50 nm par des groupements azoture se fait en quatre étapes : synthèse de nanoparticules de silice fluorescentes, qui seront fonctionnalisées par des groupements amine. Ils serviront de sites d'accrochage du chlorure de 2-bromopropionyle dont l'atome de brome sera substitué par le groupement azoture.

➤ Synthèse des particules de silice (SiO_2) de 50 nm :

La rhodamine B isothiocyanate RITC (0,0235 g ; $0,44 \cdot 10^{-4}$ mol) a été dissous dans 2 mL d'APTES (3-Aminopropyltriéthoxysilane) et laissé sous agitation durant 24h. Cette dernière a été ajoutée dans un ballon de 250 mL contenant un mélange d'éthanol (120 mL) et d'hydroxyde d'ammonium 30% (5,3 mL). Le mélange vigoureusement agité pendant 24h est de couleur rose. Puis 4,5 mL de TEOS (tétraéthoxysilane) a été ajouté au mélange précédent. Après 24h d'agitation, la suspension des particules de silice est purifiée par dialyse contre l'eau et le contre-dialysat est renouvelé au bout de 3h, 6h, 12h et 24h. Une solution de 100 mL de DMF (diméthylformamide) a été ajoutée à la suspension des particules de silice purifiée. Puis l'eau et l'éthanol ont été évaporés sous vide en chauffant à 80°C de sorte à récupérer 100 mL à la fin d'évaporation (soit 0,02 mol en silicium).

➤ Fonctionnalisation de la surface des particules de silice par NH_2 :

Pour avoir des fonctions amine primaire autour des particules de silice, l'APTES (300 μL) a été ajouté dans un ballon de 50 mL contenant la suspension de particules de silice de 50 nm (10 mL) et de DMF (5 mL). Ce mélange est laissé sous agitation pendant la nuit à l'aide d'un montage à reflux (130°C).

➤ Fonctionnalisation des particules de silice ($\text{SiO}_2\text{-NH}_2$) par des groupements azoture :

Dans un petit bécher contenant la suspension de particules $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ (5 mL), a été ajoutée la solution de chlorure de 2-bromopropanoyle (10 μL , $\text{CH}_3\text{-CHBr-COCl}$) et de triéthylamine (10

μL , $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_3$). Après 1h d'agitation, les particules de silice $\text{SiO}_2\text{-Br}$ sont purifiées par lavage avec du DMF (4 mL) (trois cycles de centrifugation, élimination du surnageant, redispersion dans DMF).

Afin de réaliser la substitution nucléophile de Br par N_3 sur $\text{SiO}_2\text{-Br}$, l'azoture de sodium NaN_3 (650 mg ; 1.10^{-3} mol) a été dissous dans 10 mL de DMF. La solution de NaN_3 (60 μL ; $5,980.10^{-5}$ mol) a été ajoutée dans 5 mL de la suspension de particules $\text{SiO}_2\text{-Br}$. Après une nuit d'agitation, la suspension de particules de silice $\text{SiO}_2\text{-N}_3$ est purifiée par dialyse. Pour terminer, la suspension de particules de silice $\text{SiO}_2\text{-N}_3$ est introduite dans un boudin de dialyse. Ce dernier est placé dans un grand volume d'eau distillée qui est renouvelé au bout de 3h, 15h et 21h.

2.4°/ Fonctionnalisation des particules de silice $\text{SiO}_2\text{-N}_3$ par des nanoparticules d'or Au@DTDTPA-alcyne par cycloaddition 1,3-dipolaire

Dans un ballon de 50 mL contenant une suspension de nanoparticules d'or Au@DTDTPA-alcyne (25 mL ; 1 g.L^{-1}) a été ajoutée une suspension de particules de silice $\text{SiO}_2\text{-N}_3$ (2.5 mL). Après quelques minutes d'agitation, le catalyseur $\text{CuSO}_4\text{-ascorbate de sodium}$ (2.5 mL ; $\text{CuSO}_4, 5\text{H}_2\text{O} : 1 \text{ mM/Ascorbate de sodium} : 25 \text{ mM}$) est ajouté au mélange précédent. Après une nuit sous agitation, la suspension des particules est purifiée par dialyse tout en renouvelant le contre-dialysat au bout de 3h, 15h et 21h.

2.5°/ Préparation et fonctionnalisation de la surface d'or par des fonctions azoture

- **Préparation du substrat d'or :** Le substrat d'or a été rincé abondamment à l'eau distillée et l'acétone puis séché à l'étuve (25°C) pendant 10min.
- **Préparation de la solution mixte de dérivés thiolés :** Dans un bécher de 50 mL, deux dérivés thiolés, 11-azotoundécane-1-thiol (1 μL ; $0,1.10^{-3}$ mol/L) et l'acide 6-mercaptophexanoïque (4,2 μL ; 1.10^{-3} mol/L) sont mélangés dans 30 mL d'éthanol.

Ce mélange est maintenu sous agitation pendant 10 min pour bien homogénéiser la solution.

- **Modification de la surface d'or par des fonctions azotures :** Le substrat d'or est ensuite immergé dans la solution mixte pendant 48 heures à l'abri d'éventuelles contaminations. L'échantillon est rincé abondamment avec de l'éthanol et de l'eau pour enlever l'excès de molécules thiolées puis séché à l'étuve (25°C) pour éliminer le solvant résiduel.

2.6°/ Greffage chimique des particules SiO₂-Au@alcyne sur des surfaces d'or « azoturées »

Dans un petit bécher contenant 5 mL de la suspension colloïdale de particules silice-or SiO₂-Au@alcyne est plongée la surface d'or fonctionnalisée par des azotures. La solution du catalyseur (1 mL CuSO₄, 5H₂O (1 mM)/Ascorbate de sodium (25 mM)) a ensuite été ajouté. Le mélange a été agité délicatement pour homogénéiser le milieu puis isolé de l'environnement extérieur pendant 48H. La dernière étape consiste à rincer abondamment la surface d'or modifiée avec de l'eau distillée.

2.7°/ Greffage électrocatalysé des particules SiO₂-Au@alcyne sur des surfaces d'or « azoturées »

- **Préparation du complexe de Cu (II) :** nous avons dissous le Tris-(benzylpropyltriazolylméthyl)amine (TBTA 5,3 mg ; 10 μM)/ CuSO₄, 5H₂O (2,5 mg ; 10μM) dans 1 L d'eau distillée.
- **Préparation de la solution électrolytique à partir du complexe de Cu (II) :** l'hexafluorophosphate de potassium KPF₆ (552 mg ; 0,1 M) a été dissous dans 30 mL de la solution précédente (complexe Cu (II)).
- **Réalisation du greffage électrocatalysé :** Les expériences électrochimiques du greffage électrocatalysé ont été effectuées à partir d'un montage à trois électrodes en utilisant un potentiostat VoltaLab (modèle PGZ 100) piloté par un ordinateur

équipé du logiciel VoltaMaster 4 pour traiter les données enregistrées. Les trois électrodes utilisées sont l'électrode de travail (substrats d'or), la contre-électrode de platine (Pt) et une électrode de référence au calomel saturée (ECS) de potentiel standard de $E^0 = 0,2445V$ à 298K. Une cellule permettant d'installer les trois électrodes, a été introduite une solution colloïdale diluée de particules SiO_2 -Au@alcyne (5 mL dans 30 mL de la solution électrolytique en présence du complexe de Cu (II)). Le mélange est laissé sous agitation pendant quelques minutes (2 à 3 min). Les greffages électrochimiques ont été réalisés par chronocoulométrie en appliquant un potentiel de -500 mV pendant 10 min. Enfin la surface d'or modifiée est rincée abondamment avec de l'eau distillée.

2.8°/ Caractérisation de la surface d'or modifiée

2.8.1°/ Spectroscopie Infrarouge Pm-IRRAS

Les surfaces modifiées par les dépôts des particules via la Click Chemistry ont été caractérisées par spectroscopie Infrarouge Pm-IRRAS avec l'appareil « Vertex 70 Bruker » sur une large gamme d'analyse (de 400 à 4000 cm^{-1}) en présence d'un détecteur MCT refroidi à l'azote liquide.

2.8.2°/ MEB

Les surfaces nues et modifiées par des particules silice-or (SiO_2 -Au@alcyne) via la Click ont ensuite été caractérisées par MEB en salle blanche à Temis avec un appareil model Dual Beam (SEM-FIG) Fei Helios 600i.

2.8.3°/ Par imagerie fluorescence

Les surfaces nues et modifiées par des particules silice-or (SiO_2 -Au@alcyne) via la Click ont été caractérisées par fluorescence pour détecter la présence des particules des silices fluorescente en utilisant un microscope (Olympus IX51) équipé de fluorescence à l'université de Lyon.

2.8.4°/ par SDL

Les surfaces modifiées ont également été caractérisées par SDL permettant d'obtenir les profils de répartition des éléments en profondeur grâce à l'appareil « GD Profiler HORIBA Jobin Yvon ».

3°/ RESULTATS ET DISCUSSION.

La synthèse des nanoparticules d'or fonctionnalisées par le DTDTPA (Au@DTDTPA) est obtenue en adaptant la méthode décrite par Brust *et al.* [17]. Elle consiste à réduire un sel d'or (HAuCl_4 , $3\text{H}_2\text{O}$) par le tétrahydruroborate de sodium (NaBH_4) en présence d'espèces thiolées (en l'occurrence le DTDTPA), dans un milieu aquo-alcoolique [18] (Schéma 2.1). Alric *et al.* ont montré l'intérêt du ligand DTDTPA en listant les multiples rôles qu'il peut jouer, depuis la synthèse des nanoparticules d'or jusqu'à leur utilisation en tant qu'objets multifonctionnels. Tout d'abord, en s'adsorbant à la surface des nanoparticules d'or en cours de croissance, le DTDTPA peut contribuer à en assurer le contrôle de la taille et la stabilité colloïdale (par répulsion électrostatique) en suspension aqueuse [19]. Ensuite le DTDTPA peut complexer des ions aux propriétés intéressantes, apportant par cette voie de nouvelles fonctionnalités aux nanoparticules d'or à la surface desquelles il est greffé (par exemple, le paramagnétisme si l'ion Gd^{3+} est complexé) [18–20] ; et enfin grâce à ses fonctions acide carboxylique, le DTDTPA pourrait être utilisé comme site d'ancrage permettant le greffage d'entités chimiques ou biologiques apportant de nouvelles propriétés aux nanoparticules d'or. La molécule DTDTPA (Schéma 2.1) présente plusieurs groupes réactionnels tels que deux fonctions thiols (-SH) qui permettront un solide ancrage à la surface des nanoparticules d'or et trois fonctions acide carboxylique (-COOH), qui permettront la post-fonctionnalisation des nanoparticules.

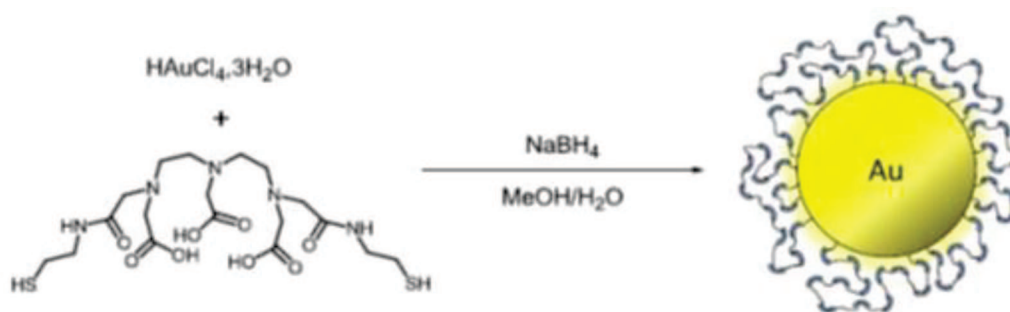


Schéma 2.1: Synthèse des nanoparticules Au@DTDTPA [18].

En raison de la couche de molécules thiolées solidement ancrées à leur surface, les nanoparticules Au@DTDTPA présentent une excellente stabilité colloïdale grâce à laquelle il est possible d'obtenir des suspensions concentrées de nanoparticules d'or.

La présence des nanoparticules d'or Au@DTDTPA dans la suspension aqueuse a été confirmée par TEM. Cette caractérisation permet de déterminer la morphologie et la taille du cœur de particules d'or. La microscopie électronique nous montre effectivement que la suspension contient des nanoparticules d'or de diamètre de $2,5 \pm 0,4$ nm comme le montre la photo TEM (Figure 2.1).

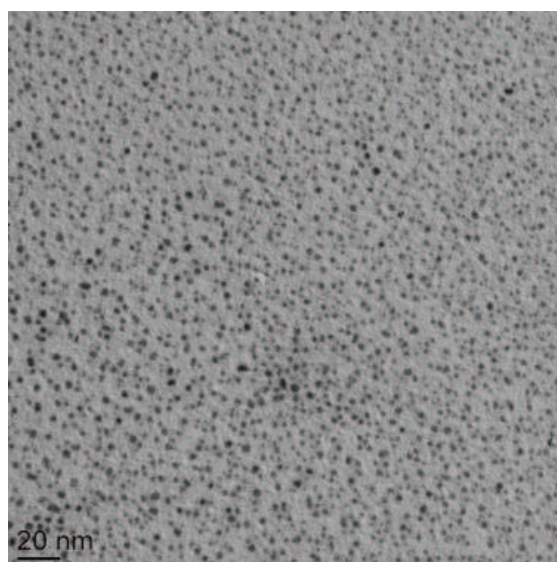


Figure 2.1 : Cliché TEM des nanoparticules d'or Au@DTDTPA.

De plus sur ce cliché TEM (Figure 2.1), nous remarquons que ces particules semblent présenter une bonne homogénéité en taille. La distribution homogène des nanoparticules d'or sur la grille semble confirmer l'absence d'agglomérats. Afin d'avoir une vision plus

globale de l'échantillon, nous avons effectué des mesures de diamètre hydrodynamique par DLS.

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules Au@DTDTPA en suspension aqueuse a été évalué à $6,6 \pm 1,5$ nm (Figure 2.2). Cette valeur est supérieure à celle déterminée par TEM car elle prend en compte le diamètre du cœur d'or, l'épaisseur de la couche organique et de la couche de solvatation alors qu'en TEM seule la partie dense en l'occurrence le cœur d'or, est visible. Cependant l'écart entre ces deux valeurs est important et plus grand que ce qui était attendu. Des analyses complémentaires ont permis d'expliquer que l'écart résultait de la formation d'une multicouche autour du cœur d'or [19].

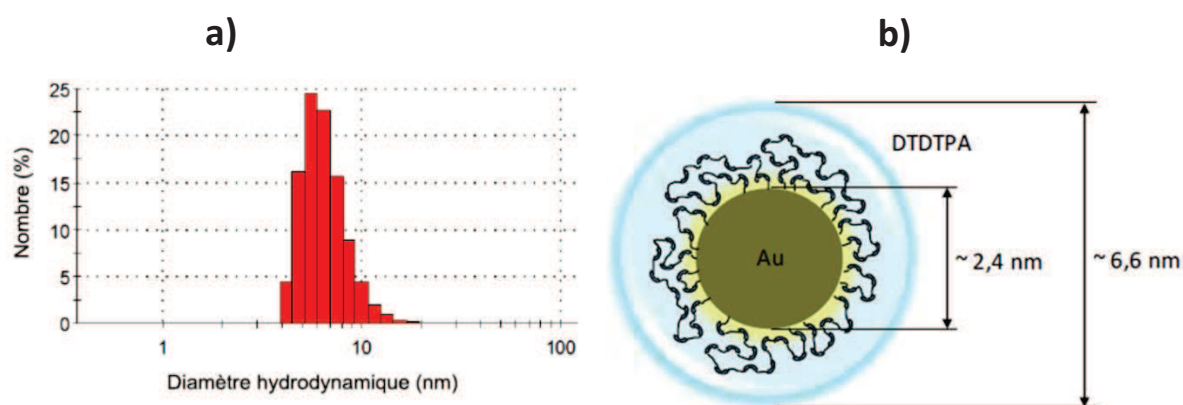


Figure 2.2 : a) Histogramme de distribution de taille des nanoparticules Au@DTDTPA en suspension aqueuse et b) Représentation d'une nanoparticule Au@DTDTPA dans une suspension colloïdale (cœur d'or en jaune et multicouche de ligands DTDTPA solvatés en bleu) et

En raison du faible étalement des valeurs, l'histogramme obtenu (Figure 2.2b) confirme l'homogénéité de la taille des nanoparticules d'or Au@DTDTPA.

En raison du phénomène de résonance de plasmon qui est associé à l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction, les nanoparticules d'or absorbent fortement la lumière visible dans une région spectrale comprise entre 500 à 550 nm. Comme la position et la forme de la bande d'absorption dépendent de la taille, de la morphologie et de l'environnement, la spectrophotométrie UV-visible apparaît donc particulièrement adaptée pour caractériser les suspensions de nanoparticules d'or et en particulier pour étudier la stabilité colloïdale des suspensions en fonction du pH. Sur les spectres de la figure 2.3, nous constatons un épaulement autour de 523 nm quel que soit le pH. L'allure de ces spectres est

caractéristique de suspensions colloïdales contenant des nanoparticules d'or présentant un diamètre inférieur à 3 nm.

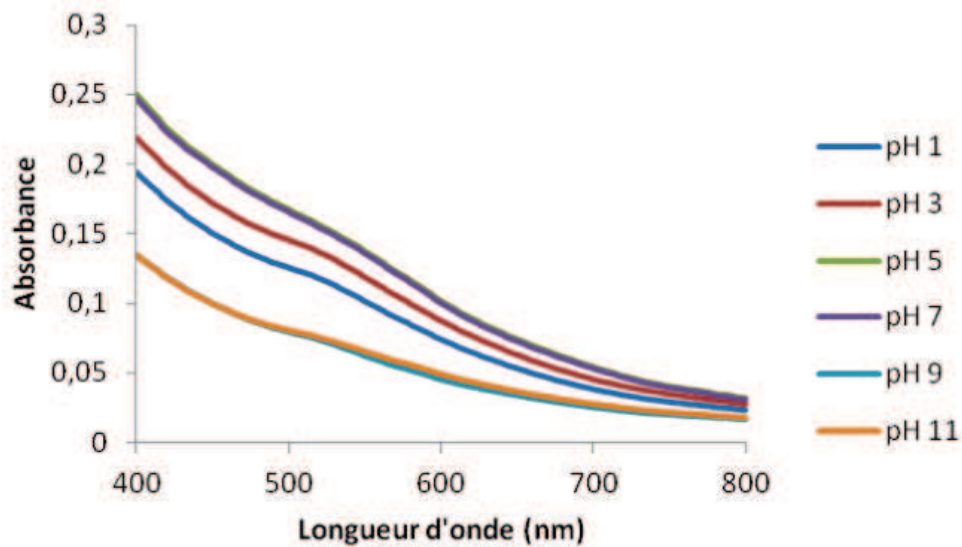


Figure 2.3 : Spectres UV-visible des suspensions colloïdales Au@DTDTPA ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$) à différents pH.

En outre, l'absence de modification des spectres malgré les variations du pH sur une large gamme indique que la stabilité colloïdale est importante.

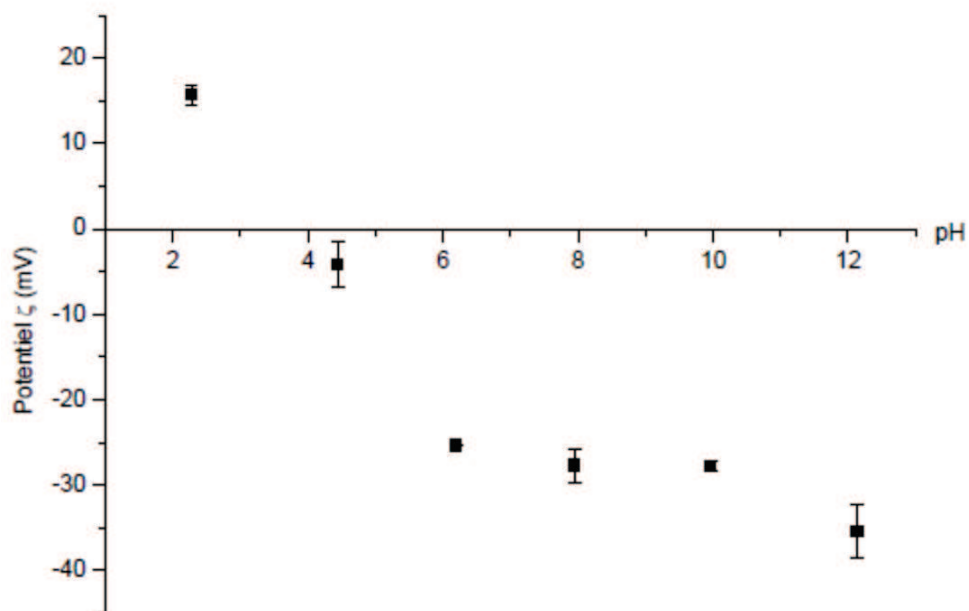


Figure 2.4 : Evolution du potentiel ζ des suspensions colloïdales des nanoparticules d'or Au@DTDTPA en fonction du pH.

La grande stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules Au@DTDTPA est attribuée à la répulsion électrostatique entre les nanoparticules chargées, comme le montre l'évolution du potentiel ζ entre les pH 2 et 12 (Figure 2.4). L'importante charge négative des nanoparticules pour un pH supérieur à 5 est attribuée à la déprotonation des fonctions acide carboxylique, tandis que la charge positive pour un pH inférieur à 4 provient de la protonation des amines tertiaires lorsque les fonctions acides carboxyliques se trouvent sous forme -COOH.

La multicouche de ligands DTDTPA qui se forme autour des nanoparticules d'or au cours de leur synthèse confère une stabilité colloïdale importante. Elle peut être utilisée comme site d'ancrage grâce à la création de liaisons covalentes entre les fonctions acide carboxylique des nanoparticules d'or et des groupements réactifs comme les amines.

Comme nous cherchons à accrocher les nanoparticules d'or sur des particules de silice et sur des substrats planes par click chemistry, il est nécessaire de modifier la composition chimique de surface des nanoparticules d'or Au@DTDTPA en introduisant des fonctions alcyne. La propargylamine présente des atouts indéniables pour adapter les nanoparticules d'or Au@DTDTPA à la Click Chemistry. En plus d'une fonction alcyne vraie indispensable pour la Click Chemistry, elle porte à l'extrémité opposée un groupement amine qui en formant un amide après réaction avec une des fonctions -COOH de la couche de DTDTPA assurera l'immobilisation de fonction alcyne sur les nanoparticules d'or. Afin de favoriser la formation des liens amide, les fonctions acide carboxylique sont, au préalable, activées par l'ajout d'EDC (un dérivé carbodiimide) et le N-hydroxysuccinimide (NHS) [3] (Schéma 2.2).

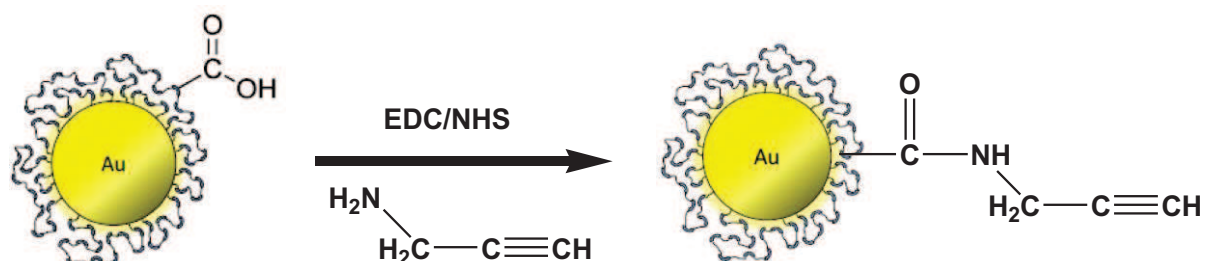


Schéma 2.2 : Fonctionnalisation des nanoparticules d'or Au@DTDTPA par la propargylamine.

Le TEM réalisé après réaction avec la propargylamine montre que les nanoparticules demeurent « sphériques » et conservent leur taille ($2,3 \pm 0,5$ nm) (Figure 2.5).

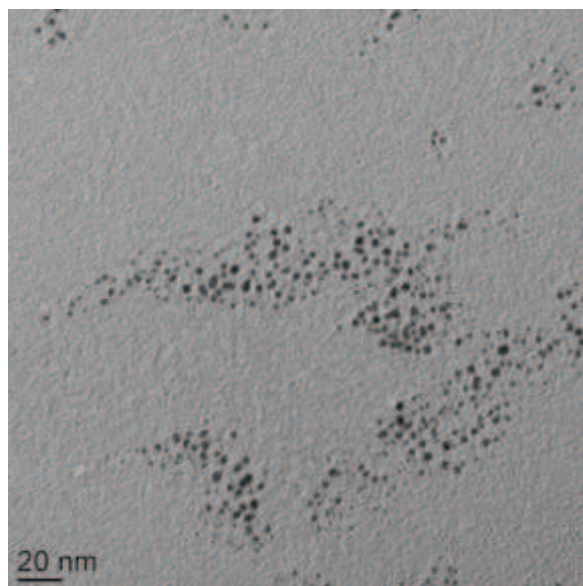


Figure 2.5 : Cliché TEM des nanoparticules d'or Au@DTDTPA-alkyne.

La figure 2.6 montre les spectres UV-visible de suspensions aqueuses des nanoparticules d'or Au@DTDTPA avant et après réaction avec la propargylamine. Nous pouvons remarquer que les nanoparticules d'or Au@DTDTPA-alkyne absorbent dans le visible autour de 523 nm exactement à la même longueur d'onde des particules d'or Au@DTDTPA. En outre, aucune modification notable du spectre n'est observée. Il en résulte donc que la réaction avec la propargylamine n'a pas modifié la taille des nanoparticules ni altéré la stabilité colloïdale. En revanche, il est impossible à partir de ces spectres de mettre en évidence la présence de l'alkyne sur les particules car la signature de la propargylamine se situe en dehors du domaine visible, dans une région spectrale où les nanoparticules d'or absorbent très fortement.

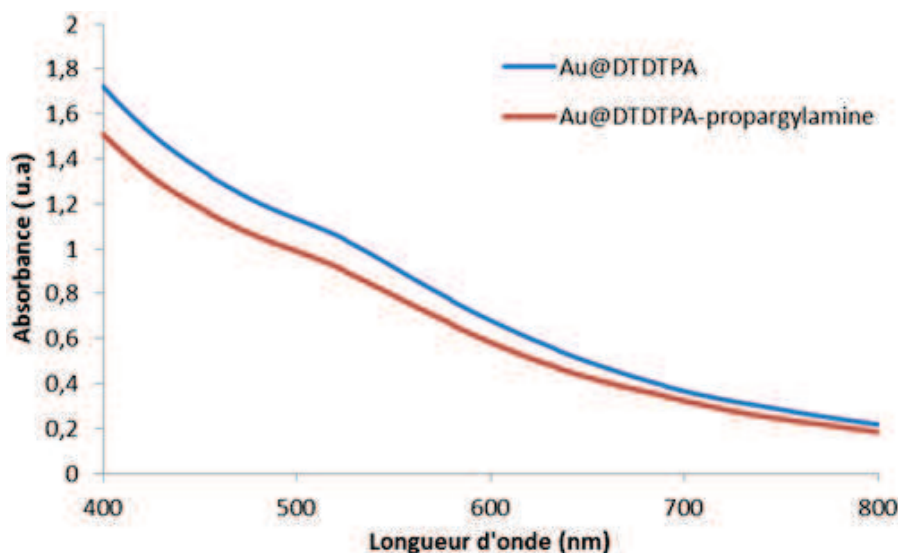


Figure 2.6 : Spectres UV-visible des suspensions colloïdales Au@DTDTPA avant et après fonctionnalisation par la propargylamine.

Les suspensions colloïdales obtenues après réaction avec la propargylamine possèdent une grande stabilité sur une large gamme de pH. Comme précédemment les particules sont chargées négativement (Figure 2.7). Cette charge provient de la déprotonation du groupement COOH. On observe une différence à la surface des nanoparticules avant et après greffage de propargylamine. Contrairement à ce qui était attendu, le potentiel zêta des nanoparticules d'or est plus important après le greffage qu'avant le greffage. En convertissant une partie des fonctions acide carboxylique (présentes sous la forme d'anion carboxylate à $\text{pH} \geq 7$) en amide non chargé, le greffage de la propargylamine devrait diminuer la charge de surface des nanoparticules d'or.

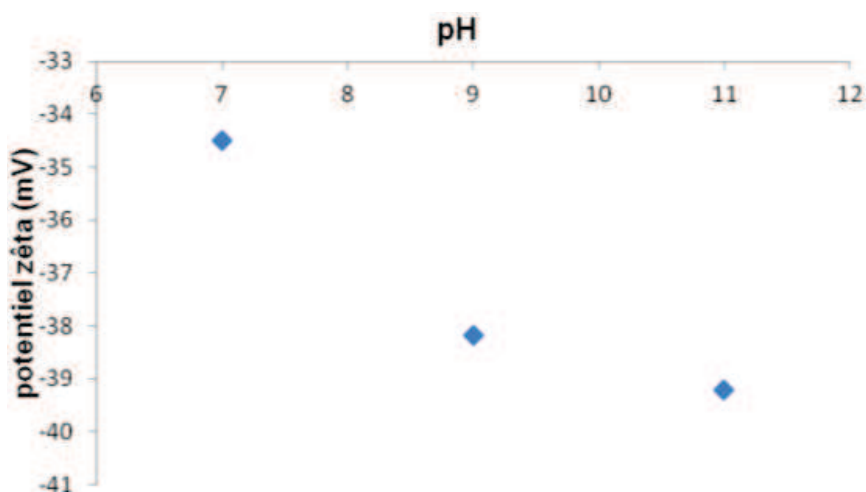


Figure 2.7 : Evolution du potentiel ζ des suspensions colloïdales des nanoparticules d'or Au@DTDTPA après réaction avec la propargylamine en fonction du pH.

Ces résultats nous permettent de confirmer que la stabilité colloïdale des nanoparticules d'or, même après réaction avec la propargylamine, est restée intacte. Malheureusement, nous n'avons toujours pas pu démontrer et confirmer la présence des groupements alcyne autour des nanoparticules Au@DTDTPA. Nous avons donc mis au point une méthode indirecte pour confirmer ou infirmer le succès du greffage de la propargylamine sur Au@DTDTPA. Cette méthode repose sur la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire en essayant d'immobiliser les nanoparticules autour des particules de silice. Pour démontrer la présence d'un groupement alcyne sur les nanoparticules d'or après réaction avec la propargylamine, les nanoparticules d'or ont été mises en contact de nanoparticules de silice porteuses de groupements azoture en présence de Cu (I). Si les groupements alcyne sur Au@DTDTPA et azoture sur SiO₂ sont effectivement présents, les nanoparticules d'or devraient être accrochées sur les nanoparticules de silice. Une telle association pourra être observée en TEM. Nous avons également réalisé des témoins négatifs entre les nanoparticules d'or et de silice dont la composition chimique de surface ne permet pas le couplage entre ces particules. Parmi ces témoins, nous avons préparé des particules de silice SiO₂-NH₂ et les nanoparticules d'or Au@DTDTPA sans les fonctionnaliser par des groupements azoture et alcyne, respectivement.

Enfin afin de renforcer les conclusions tirées des différentes expériences, des particules SiO₂-N₃ et des nanoparticules d'or Au@DTDTPA@alcyne ont été mises en contact sans le catalyseur de cuivre Cu (I) qui est pourtant essentiel au couplage de ces dernières. La première étape de ce travail consiste à réaliser la synthèse de nanoparticules de silice fluorescentes avec des fonctions azoture SiO₂-N₃. Les particules de silice ont été obtenues par voie sol gel en adaptant le protocole décrit par Stöber. L'hydrolyse-condensation du tétraéthoxysilane (TEOS) et du (3-Aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) modifié par un fluorophore (Rhodamine-isothiocyanate)) dans l'éthanol par une solution aqueuse d'ammoniaque (NH₃) conduit à la formation de particules de silice SiO₂ sphériques dont les dimensions dépendent du rapport H₂O/TEOS. Les particules de silice portant des fonctions azotures ont été produites à partir de particules de silice riches en fonction amine primaire (SiO₂-NH₂). Les fonctions NH₂, apportées par la condensation de l'APTES sur les particules de SiO₂, ont servi de sites d'ancrage pour le chlorure de 2-bromopropanoyle. La formation de l'amide aboutit à la présence d'un atome de brome qui par substitution nucléophile par

l'anion azoture devrait garantir la fonctionnalisation des nanoparticules de silice par des groupements azoture (Schéma 2.3).

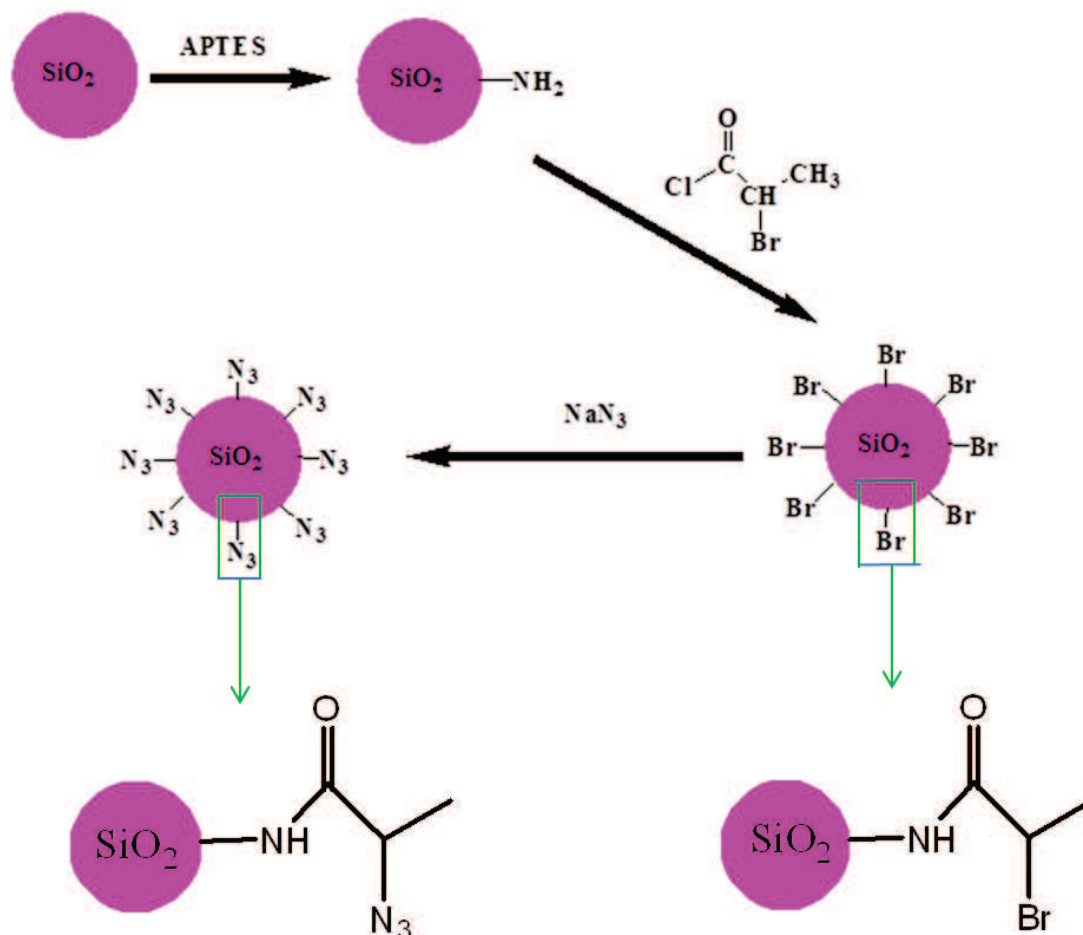


Schéma 2.3 : les différentes étapes de la fonctionnalisation de particules de silice fluorescentes pour obtenir de particules de silice avec des fonctions azoture.

Les fonctions alcyne sur les nanoparticules d'or Au@DTDTPA@alcyne et les fonctions azoture sur les particules de silice fluorescentes devraient permettre l'assemblage à température ambiante des nanoparticules de silice et d'or par réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par les ions Cu(I) (Schéma 2.4). Ces derniers sont produits par action de l'ascorbate de sodium sur le sulfate de cuivre (II).

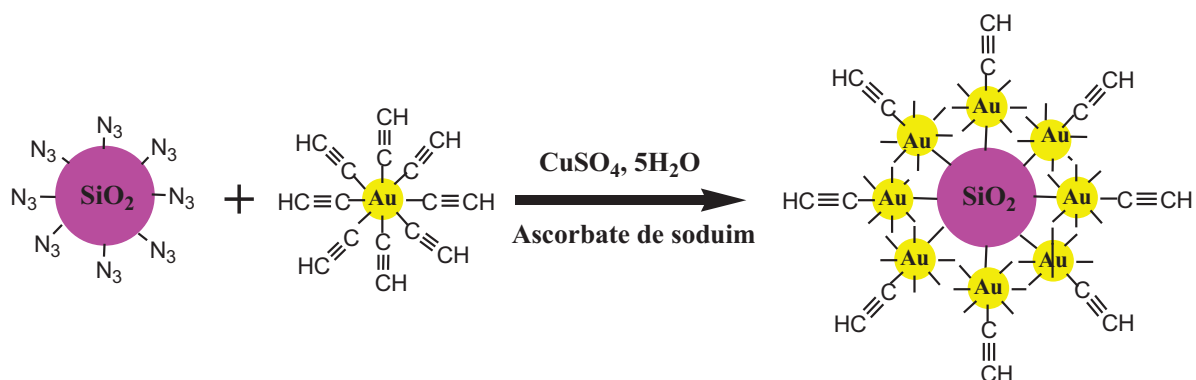


Schéma 2.4: Greffage via la Click Chemistry des nanoparticules d'or sur des particules de silice fluorescentes par cycloaddition 1,3-dipolaire.

Après mise en contact des nanoparticules d'or et des particules de silice fluorescentes dans différentes conditions, extraction et purification, les échantillons ont été observés en TEM (Figure 2.8). Les clichés TEM nous montrent que les particules d'or modifiées par l'alcyne sont accrochées sur les particules de silice fonctionnalisées par des groupements azoture en présence du cuivre (I) (Figure 2.8 a). Pour montrer que ces particules sont accrochées par click chemistry, nous avons comparé avec des systèmes témoins. Pour cela, nous avons mis en contact les particules d'or (Au@DTDTPA) avec les particules de silice (SiO₂-NH₂) (Figure 2.8 b) et les particules d'or Au@DTDTPA modifiées par l'alcyne avec les particules de silice fonctionnalisées par des groupements azoture mais en l'absence du cuivre (I) (Figure 2.8 c). Nous observons sur les clichés **b** et **c** qu'il n'y a pas eu d'accrochage car on ne voit que les particules de silice. On peut donc en déduire que les assemblages observées sur le cliché **a** de la figure 2.8 ne s'explique que par la présence de fonctions alcyne sur Au@DTDTPA et de fonctions azoture sur les particules de silice SiO₂. Cela prouve indirectement le succès du greffage de la propargylamine sur les nanoparticules d'or Au@DTDTPA.

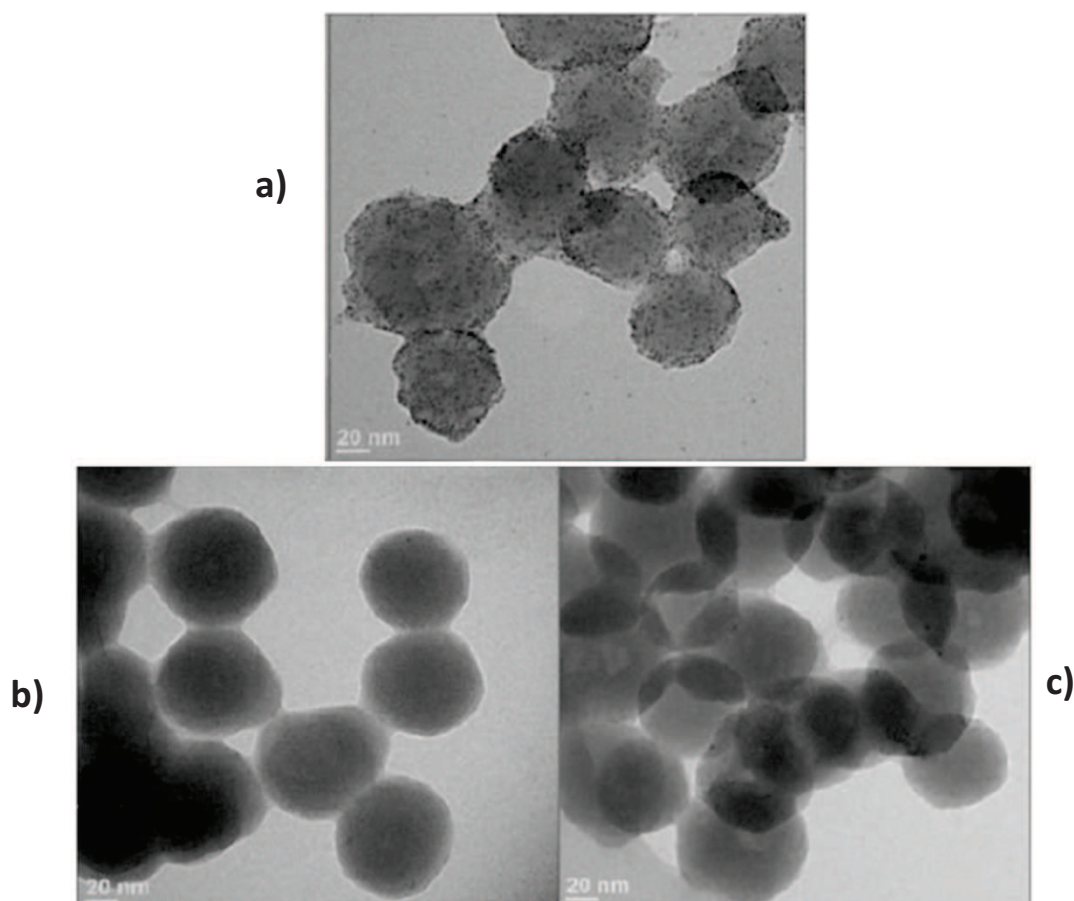


Figure 2.8 : Image TEM des particules silice après contact avec des nanoparticules d'or. **a)** $\text{SiO}_2\text{-N}_3 + \text{Au@DTDTPA@alkyne}$ en présence du catalyseur Cu (I) , **b)** $\text{SiO}_2\text{-NH}_2 + \text{Au@DTDTPA}$ en présence du catalyseur Cu (I) , **c)** $\text{SiO}_2\text{-N}_3 + \text{Au@DTDTPA@alkyne}$ en absence de catalyseur.

En plus de permettre l'assemblage avec des particules de silice fluorescente porteuse des fonctions azoture (Figure 2.8), la présence de groupements alcyne sur les particules d'or peut être exploitée pour le greffage de ces assemblages $\text{SiO}_2\text{-Au@alkyne}$ sur des surfaces d'or recouverte de fonctions azoture (Figure 2.9). En s'inspirant des méthodes décrites dans la littérature pour former des monocouches auto assemblées, la fonctionnalisation des substrats d'or a été réalisée par immersion dans une solution éthanolique contenant l'acide 1-mercaptohexanoïque et le 11-azotoundécane-1-thiol (thiol-azoture) [21]. Les molécules possédant une fonction thiol sont en effet connues pour former des monocouches compactes et relativement adhérentes à la surface de substrat d'or [22,23]. En outre, il a été montré que la post-fonctionnalisation des monocouches auto assemblées était plus efficace si le groupe réactif permettant le greffage était « dilué ». C'est la raison pour laquelle le thiol-azoture (site de greffage) a été mélangé à l'acide 1-mercaptohexanoïque (Figure 2.9).

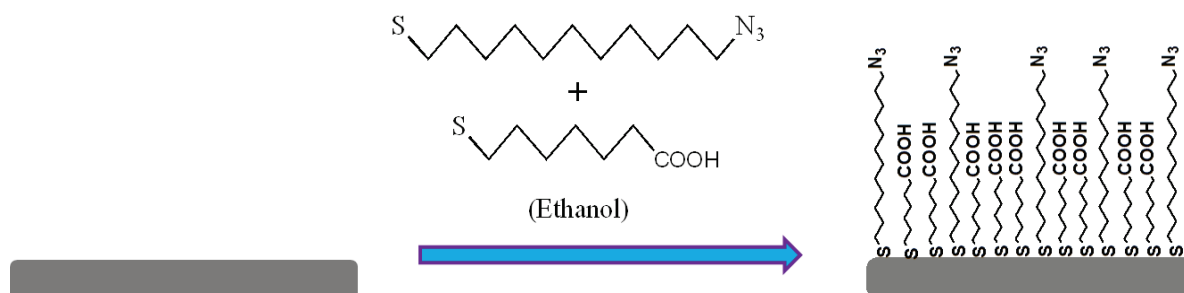


Figure 2.9 : Fonctionnalisation d'une surface d'or par une monocouche auto assemblée d'un mélange de molécules thiolées terminées par des groupements acide carboxylique (-COOH) et azoture (-N₃).

Ces monocouches constituées des deux différentes molécules thiolées sont réalisées par immersion du substrat d'or dans une solution éthanolique très faiblement concentrée en thiols pendant deux jours. Après une série de rinçages par l'éthanol et l'eau destinés à éliminer toute impureté, les surfaces modifiées sont immergées dans des suspensions de particules SiO₂-Au@alcyne en présence de Cu(I) obtenue par réduction chimique de Cu(II) par l'anion ascorbate ou par réduction électrochimique (électrocatalyse). Grâce à la réaction entre les fonctions alcyne portées par les particules d'or greffées aux particules de silice et les fonctions azoture présentes dans la monocouche, les assemblages silice-or devraient être immobilisés à la surface des substrats d'or (Figure 2.10).

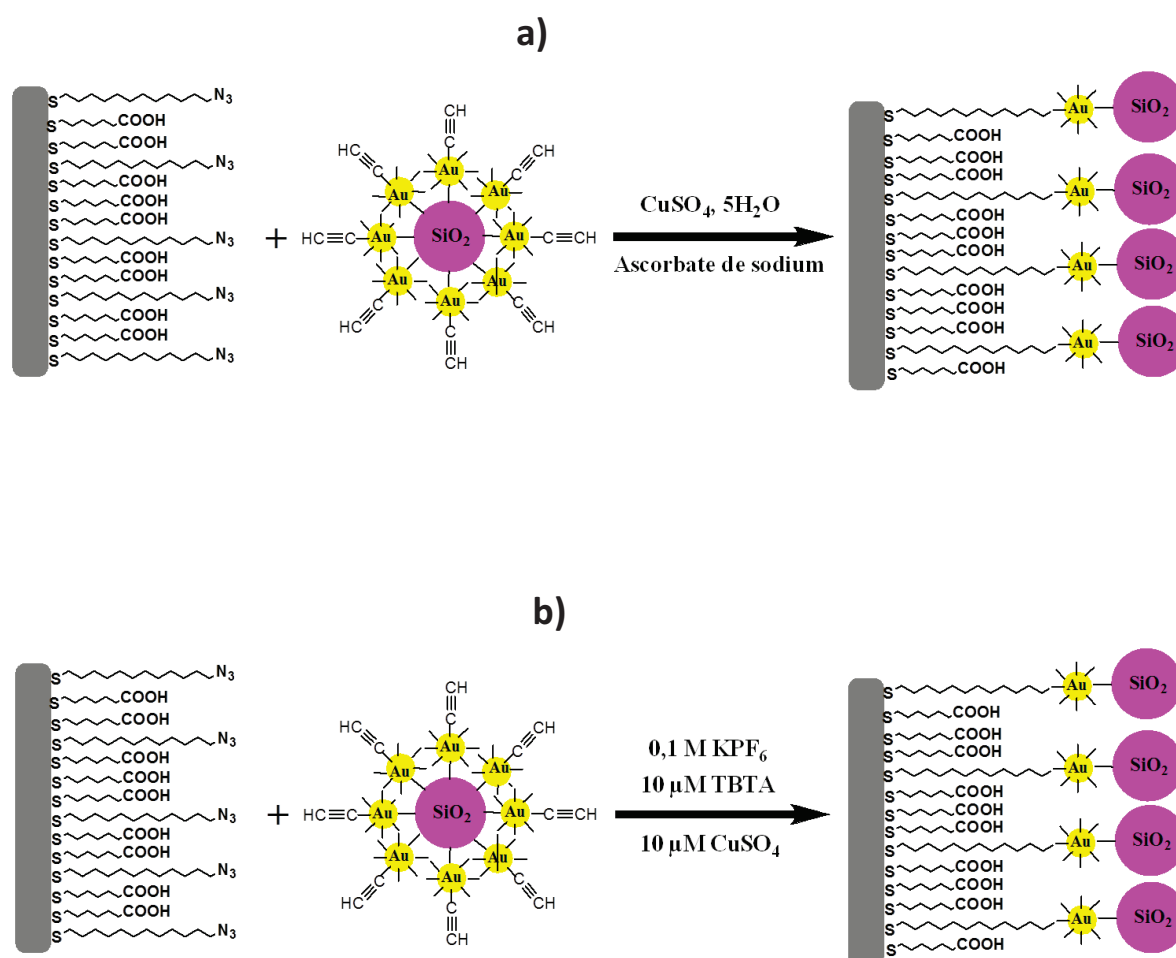


Figure 2.10 : **a)** Greffage chimique des particules $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$ sur des surfaces d'or azoturées par Click Chemistry **b)** Greffage électrocatalysé des particules $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$ sur des surfaces d'or azoturées par Click Chemistry.

Après séchage, cette surface est ensuite caractérisée par Pm-IRRAS. La spectroscopie infrarouge conventionnelle atteint ses limites de sensibilité et de détection dans le cas de couche ultra mince d'épaisseur inférieure à 50 nm (monocouches déposées). Il est alors préférable d'utiliser une méthode plus sensible : la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption par modulation de polarisation (Pm-IRRAS).

Des spectres ont été enregistrés avant et après formation de la monocouche mixte de thiols, après mise en contact avec les particules $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$ en présence de Cu(I) , obtenu par voie chimique ou électrochimique (Figure 2.11). Comme l'appareillage n'est pas purgé, la présence de la bande de vibration attribuée à CO_2 (présent dans l'atmosphère) est inévitable entre $2300\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$.

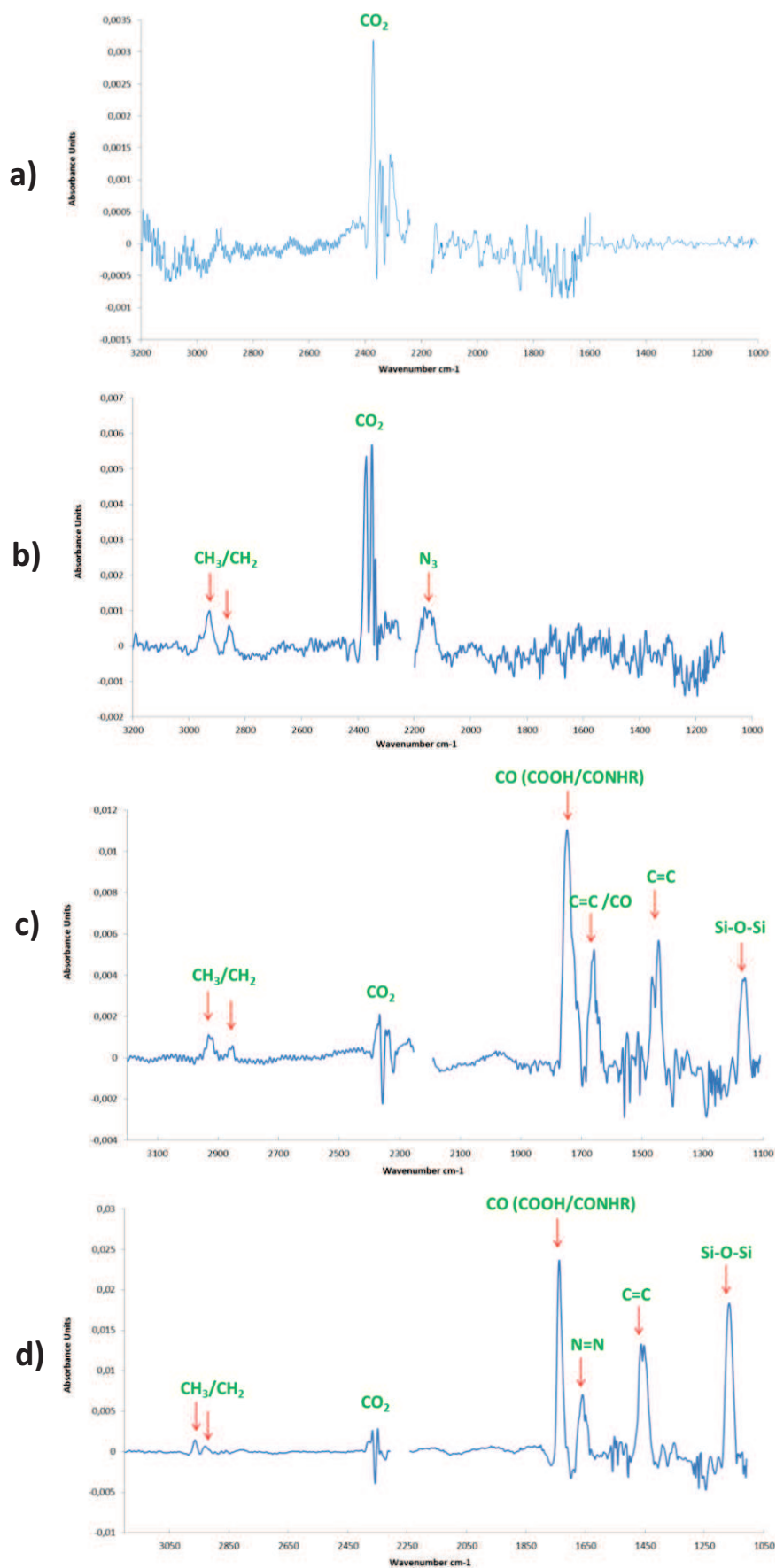


Figure 2.11 : Spectres (Pm-IRRAS) de la surface du substrat d'or **a)** avant et **b)** après immersion dans la solution de thiols puis après immersion dans la suspension de nanoparticules contenant Cu(I) obtenu par réduction **c)** chimique et **d)** électrochimique.

La comparaison de ces quatre spectres montre des différences qui peuvent être attribuées au changement dans la composition chimique de la surface. Le spectre de la surface nue ne présente aucune bande de vibration, excepté celle de CO₂ (entre 2300-2400 cm⁻¹) (Figure 2.11a). Cela indique l'absence de contamination (en particulier par des solvants organiques) à la surface du matériau à fonctionnaliser. Après immersion de la surface nue dans la solution éthanolique de thiols, deux bandes apparaissent dans la région 2800-3000 cm⁻¹ et une autour de 2100 cm⁻¹ (Figure 2.11b). Elles reflètent la modification de la surface après immersion. Les bandes situées entre 2800-3000 cm⁻¹ peuvent être attribuées sans aucun doute aux vibrations d'élongations de la liaison C_{sp3}-H ($\nu_{\text{Csp3-H}}$), qui sont caractéristiques d'une molécule organique. L'attribution de la bande autour de 2100 cm⁻¹ est plus discutable. Sur la base des travaux antérieurs de Chidsey et de ses collaborateurs, la bande d'absorption autour de 2100 cm⁻¹ pourrait correspondre au mode d'étirement asymétrique d'un azoture d'alkyle [21,22]. En plus de la bande attribuée à l'azoture, la présence de bandes caractéristiques de la fonction acide carboxylique (présente dans la deuxième molécule thiolée) était attendue. L'absence de telles bandes est surprenante. S'il est difficile de conclure clairement sur la présence de l'azoture en comparant les deux premiers spectres de la série (Figures 2.11a-b), la disparition de la bande vers 2100 cm⁻¹ après immersion du substrat dans la suspension de nanoparticules contenant l'ion Cu(I) plaide effectivement en faveur d'une signature caractéristique de la fonction azoture (Figure 11c et 11d). En effet, le greffage des particules SiO₂-Au@alcyne sur les surfaces azoturées induit la disparition de la fonction azoture qui en réagissant avec la triple liaison C≡C, conduit à la formation du cycle triazole. En outre, la disparition de la bande attribuée à l'azoture s'accompagne de l'apparition de bandes d'absorption qui peuvent être attribuées aux différents constituants des particules SiO₂-Au (Tableau 2.1, Figures 2.11c-2.11d). La présence des particules de silice sur le substrat est confirmée par l'apparition de la bande d'absorption à 1100 cm⁻¹ qui est caractéristique de Si-O-Si. La présence des particules d'or (greffées sur les particules de silice) est également confirmée mais de manière indirecte par la bande d'absorption intense entre 1700-1750 cm⁻¹. Elle peut être attribuée sans ambiguïté aux fonctions acide et amide qui sont présentes dans la couche organique qui entoure les nanoparticules d'or (couche de DTDTPA). En revanche, l'attribution des bandes situées vers 1660 cm⁻¹ et 1450 cm⁻¹ est plus ambiguë (Tableau 2.1, Figures 2.11c-2.11d) mais au vu du contexte elle pourrait s'expliquer par la formation du cycle triazole résultant de la cycloaddition 1,3-dipolaire de l'alcyne sur

l'azoture. Enfin, il est important de souligner la ressemblance des spectres des figures 2.11c et 2.11d.

Différentes liaisons	Nombre d'onde (en cm^{-1})
CH_3/CH_2	2950 – 2850
CO_2	2380
N=N-N (Azoture)	2130
Carbonyle CO (COOH/ CONHR)	1750
C=C aromatique/ carbonyle CO (CONHR)	1660
N=N aromatique	1650
C=C (cycle triazole)	1450
Si-O-Si (silice)	1150

Tableau 2.1 : Tableau récapitulatif des valeurs des nombres d'onde obtenues des spectres Infrarouge.

Le tableau semble indiquer que la catalyse chimique et électrochimique aboutit au même changement. Si l'analyse et la comparaison des spectres Pm-IRRAS ne permettent pas de conclure définitivement, elles fournissent des indices probants quant à la présence de particules $\text{SiO}_2\text{-Au}$ accrochées au substrat d'or par Click Chemistry. Afin de confirmer la présence des particules de $\text{SiO}_2\text{-Au}$ à la surface du substrat d'or, des profils de concentration des éléments ont été réalisés de la surface vers l'intérieur du matériau par Spectroscopie de Décharge Luminescente (SDL). La figure 2.12 permet de comparer la surface nue (c'est-à-dire avant modification) et la surface après immersion successive dans la solution éthanolique de molécules thiolées (dont le « thiol-azoture ») et dans la suspension de particules $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$ en présence de Cu(I) . L'ordre d'apparition des éléments reflète la disposition relative de différentes couches. Dans le cas de la surface nue constitué d'un film d'or sur du verre, l'élément Au (caractéristique du film d'or) apparaît comme attendu avant l'élément Si qui caractérise le verre sur lequel est déposé le film d'or (Figure 2.12a). La croissance

brutale et rapide de la teneur en Si coïncide avec la décroissance rapide de la teneur en Au. Cela indique une séparation nette et franche entre le film d'or et le support en verre.

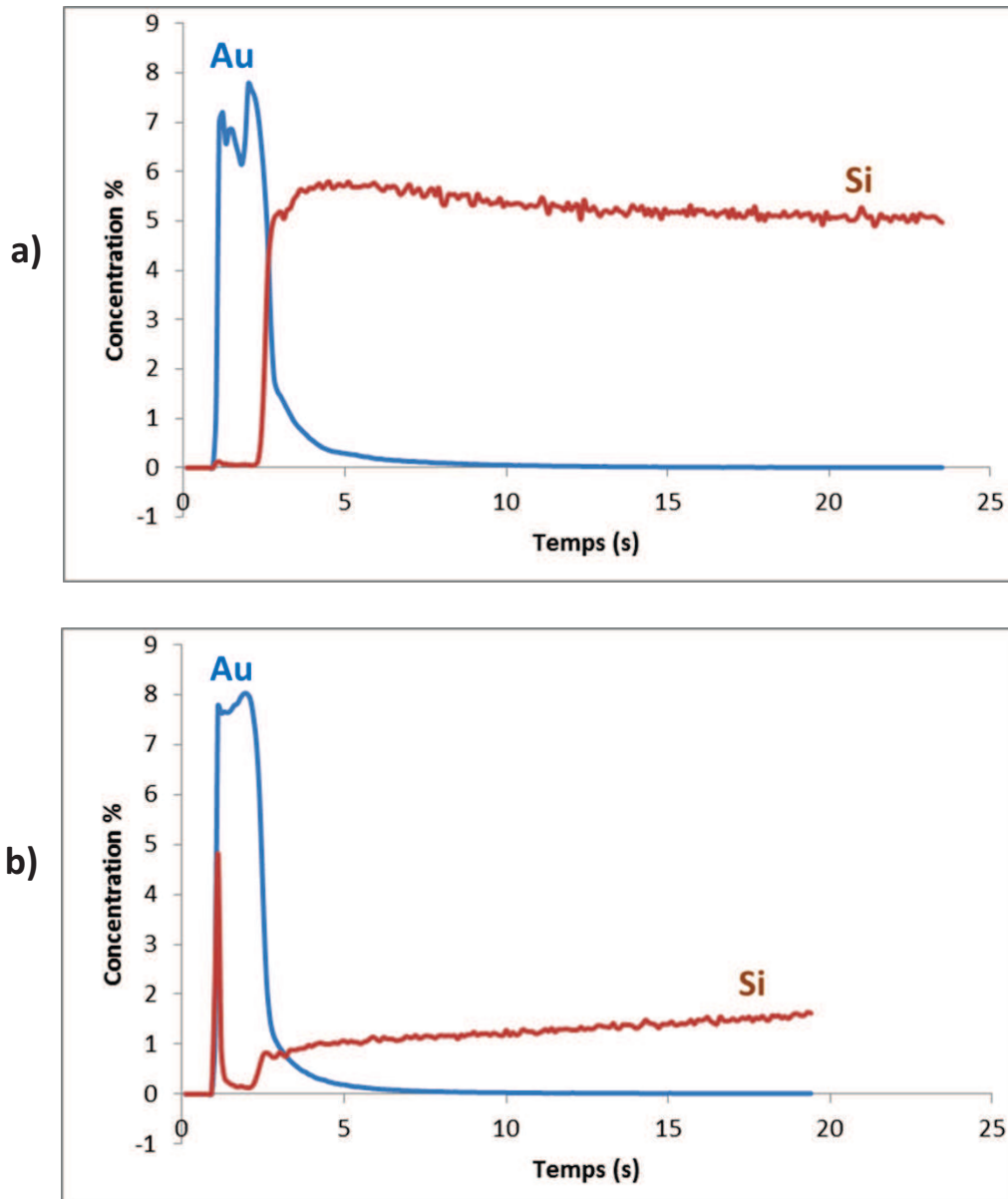


Figure 2.12 : Profils de concentration obtenu par SDL **a)** pour une surface nue (substrat constitué d'une fine couche d'or sur un verre (silice)), **b)** pour une surface modifiée par une couche de particules $\text{SiO}_2\text{-Au@aclyne}$ sur le substrat **(a)**.

Le profil de ce même substrat mais après immersion dans les différents mélanges (dont celui contenant les particules) présente une différence notable avec celui de la surface nue (Figure 2.12b). Avant d'observer le palier de l'élément Si un pic étroit est visible. Il est quasiment superposé avec la courbe qui reflète la croissance de la teneur en or. Ce pic de

l'élément Si et sa position reflètent la présence de particules SiO₂-Au déposées sur le film d'or. Cette couche est tellement fine qu'il est difficile de distinguer la séparation entre la couche de particules et le film d'or. Si ce pic de l'élément Si permet de confirmer la présence de particules SiO₂-Au, la présence des nanoparticules d'or greffées sur les particules de silice n'est pas observable en raison du film d'or relativement épais et compact (rapporté à la taille des nanoparticules d'or. Néanmoins la présence des particules de silice permet d'en déduire celle des nanoparticules d'or (Figure 2.8).

La présence de ces particules de silice est confirmée par des méthodes de caractérisation moins équivoques. Comme les particules de silice sont rendues fluorescentes par l'incorporation de rhodamine liée au réseau de polysiloxane de manière covalente en raison du couplage de la rhodamine isothiocyanate avec la fonction amine de l'APTES, leur présence peut être mise en évidence par la microscopie de fluorescence (Figure 2.13).

Nous pouvons constater sur les figures 2.13 b et 2.13 c, que la surface du substrat est couverte de points fluorescentes. Ils caractérisent la présence des particules de silice SiO₂-Au@alcyne fluorescentes.

Nous pouvons constater sur la figure 2.13 que seules les surfaces fonctionnalisées par une monocouche autoassemblée de molécules thiolées dont certaines sont terminées par la fonction azoture sont couvertes de points fluorescentes après immersion dans une suspension de particules SiO₂-Au@alcyne (Figure 2.13b et 2.13c). Les surfaces sans fonction azoture ne présentant pas de fluorescences (Figure 2.13a). De ces observations nous pouvons en déduire que les nanostructures SiO₂-Au@alcyne sont immobilisées sur les films d'or par cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne porté par les nanoparticules d'or de la nanostructure hybride et un groupement azoture de la monocouche autoassemblée qui recouvre le film d'or. Cependant le taux de greffage de SiO₂-Au@alcyne semble dépendre du type de catalyse. Lorsque le catalyseur à base de Cu⁺ est obtenu par réduction chimique de Cu²⁺, la couverture en nanostructures fluorescentes est plus dense (Figure 2.13b) que celle qui se forme en ayant recours à la réduction électrochimique de Cu²⁺ (Figure 2.13c).

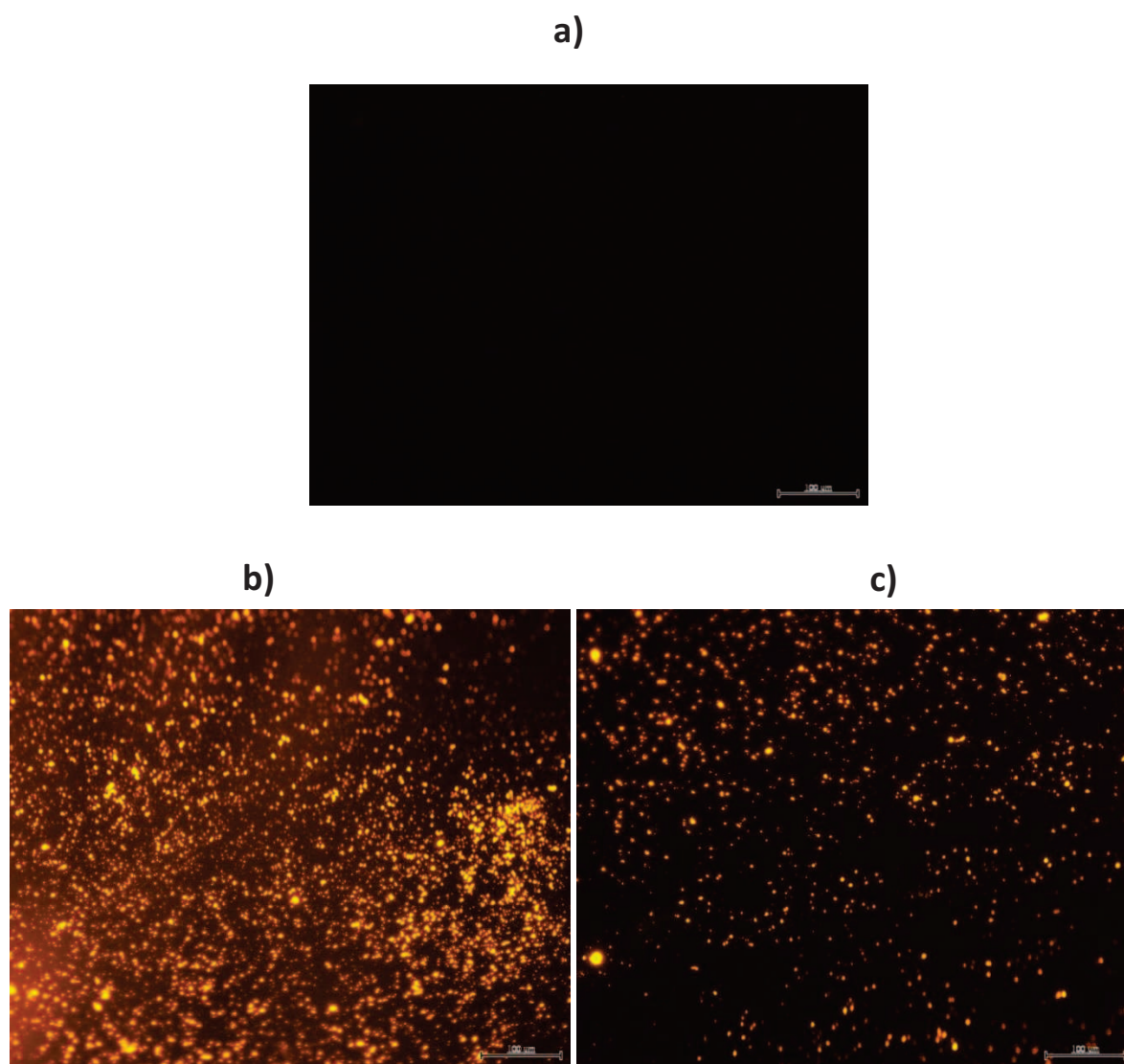


Figure 2.13 : Clichés réalisés en microscopie de fluorescence de surface après immersion dans une suspension de particules fluorescentes $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$. **a)** surface sans fonction azoture, **b)** surface avec azoture et catalyse chimique **c)** surface avec azoture et catalyse électrochimique.

La présence des nanostructures hybrides $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$ sur les surfaces fonctionnalisées par des groupements azoture est confirmée par les clichés obtenus en MEB ([Figure 2.14](#)) qui montrent que le taux de greffage des particules $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$ paraît supérieur lorsque le catalyseur est préparé par voie chimique.

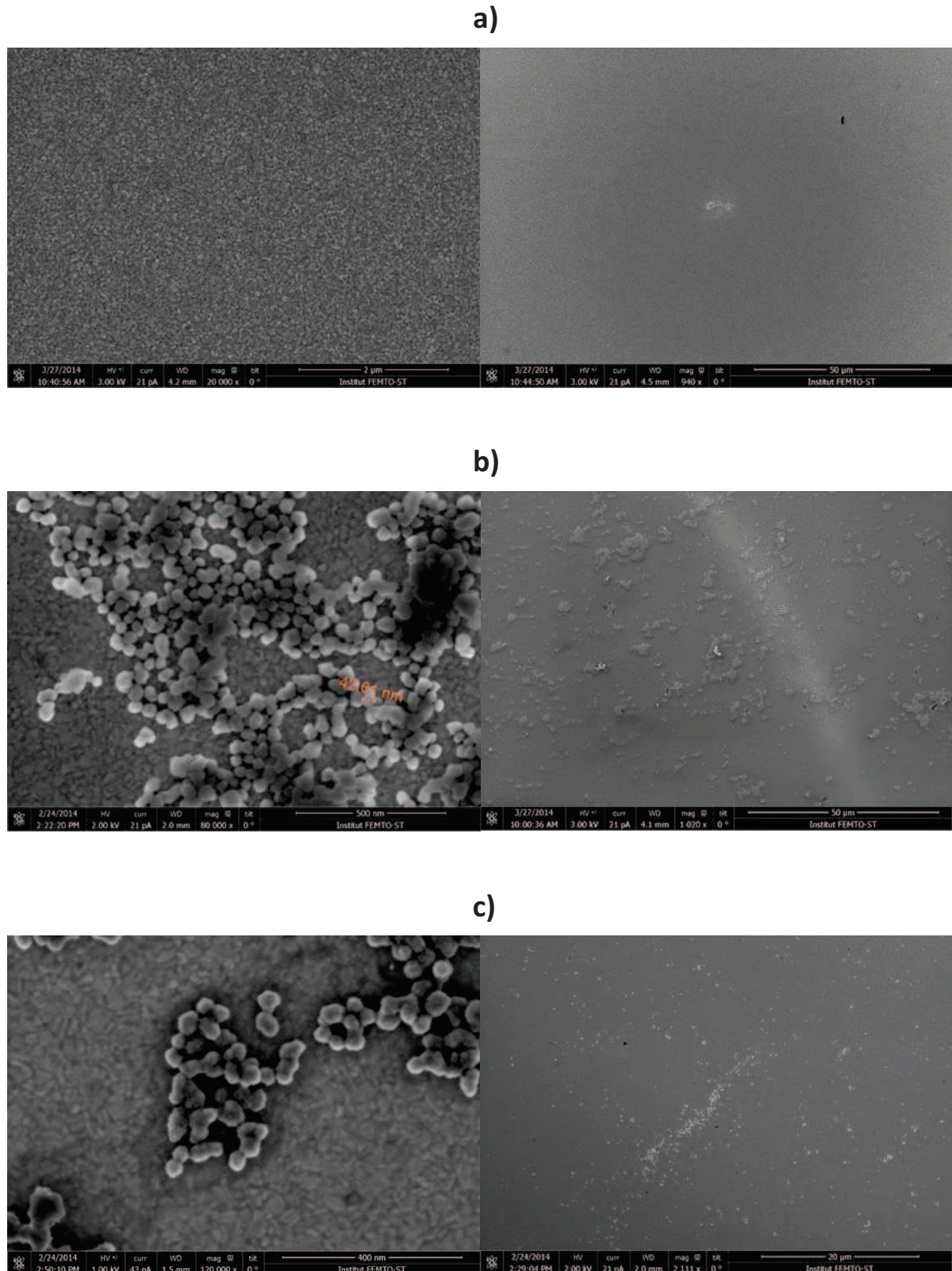


Figure 2.14 : Clichés MEB de surface après immersion dans une suspension de particules fluorescentes $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$. **a)** surface sans fonction azoture, **b)** surface avec azoture et catalyse chimique **c)** surface avec azoture et catalyse électrochimique.

4°/ Conclusion

La post-fonctionnalisation de Au@DTDTPA par la propargylamine a permis d'introduire à la surface de ces nanoparticules d'or des fonctions alcyne vrai (-C≡C-). Elles sont connues pour former des cycles triazoles avec les fonctions azoture par cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par Cu⁺. Une réaction a été mise en œuvre avec succès pour former des nanostructures hybrides fluorescentes SiO₂-Au@alcyne et immobiliser ces dernières sur des films d'or plans. Le taux de couverture est plus important lorsque le catalyseur est préparé par réduction chimique de Cu²⁺. Il est cependant relativement modeste et la couverture discontinue qui en résulte n'est pas adaptée pour une application en biodétection. Dans l'espoir d'obtenir des revêtements de nanoparticules sans défaut de recouvrement, nous sommes tournés vers le greffage électrochimique de nanoparticules d'or Au@MA.

Références

- [1] G. Frens, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nature*, 241 (1973) 20–22.
- [2] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1994) 801–802.
- [3] S. Roux, B. Garcia, J.-L. Bridot, M. Salomé, C. Marquette, L. Lemelle, P. Gillet, L. Blum, P. Perriat, O. Tillement, Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol, *Langmuir*, 21 (2005) 2526–2536.
- [4] B. Garcia, M. Salomé, L. Lemelle, J.-L. Bridot, P. Gillet, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, Sulfur K-edge XANES study of dihydrolipoic acid capped gold nanoparticles: dihydrolipoic acid is bound by both sulfur ends, *Chem. Commun.*, (2005) 369–371.
- [5] A. Azioune, A. Ben Slimane, L. Ait Hamou, A. Pleuvy, M.M. Chehimi, C. Perruchot, S.P. Armes, Synthesis and Characterization of Active Ester-Functionalized Polypyrrole–Silica Nanoparticles: Application to the Covalent Attachment of Proteins, *Langmuir*, 20 (2004) 3350–3356.
- [6] H. Yang, Y. Zhu, A high performance glucose biosensor enhanced via nanosized SiO₂, *Anal. Chim. Acta*, 554 (2005) 92–97.
- [7] M.J. Percy, J.I. Amalvy, D.P. Randall, S.P. Armes, S.J. Greaves, J.F. Watts, Synthesis of Vinyl Polymer–Silica Colloidal Nanocomposites Prepared Using Commercial Alcoholic Silica Sols, *Langmuir*, 20 (2004) 2184–2190.
- [8] S. Maeda, R. Corradi, S.P. Armes, Synthesis and Characterization of Carboxylic Acid-Functionalized Polypyrrole–Silica Microparticles, *Macromolecules*, 28 (1995) 2905–2911.
- [9] E. Bae, S. Chah, J. Yi, Preparation and Characterization of Ceramic Hollow Microspheres for Heavy Metal Ion Removal in Wastewater, *J. Colloid Interface Sci.*, 230 (2000) 367–376.
- [10] W. Stöber, A. Fink, E. Bohn, Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range, *J. Colloid Interface Sci.*, 26 (1968) 62–69.
- [11] V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkynes, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 41 (2002) 2596–2599.
- [12] M. Meldal, Polymer “Clicking” by CuAAC Reactions, *Macromol. Rapid Commun.*, 29 (2008) 1016–1051.
- [13] J. Hafrén, W. Zou, A. Córdova, Heterogeneous “Organoclick” Derivatization of Polysaccharides, *Macromol. Rapid Commun.*, 27 (2006) 1362–1366.
- [14] E. Boisselier, L. Salmon, J. Ruiz, D. Astruc, How to very efficiently functionalize gold nanoparticles by “click” chemistry, *Chem. Commun.*, (2008) 5788–5790.
- [15] C. Tissandier, N. Diop, M. Martini, S. Roux, O. Tillement, T. Hamaide, One-Pot Synthesis of Hybrid Multifunctional Silica Nanoparticles with Tunable Coating by Click Chemistry in Reverse W/O Microemulsion, *Langmuir*, 28 (2012) 209–218.

- [16] Y. Li, B.C. Benicewicz, Functionalization of Silica Nanoparticles via the Combination of Surface-Initiated RAFT Polymerization and Click Reactions, *Macromolecules*, 41 (2008) 7986–7992.
- [17] M. Brust, J. Fink, D. Bethell, D.J. Schiffrin, C. Kiely, Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1995) 1655–1656.
- [18] C. Alric, J. Taleb, G.L. Duc, C. Mandon, C. Billotey, A.L. Meur-Herland, T. Brochard, F. Vocanson, M. Janier, P. Perriat, S. Roux, O. Tillement, Gadolinium Chelate Coated Gold Nanoparticles As Contrast Agents for Both X-ray Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging, *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (2008) 5908–5915.
- [19] P.-J. Debouttière, S. Roux, F. Vocanson, C. Billotey, O. Beuf, A. Favre-Réguillon, Y. Lin, S. Pellet-Rostaing, R. Lamartine, P. Perriat, O. Tillement, Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging, *Adv. Funct. Mater.*, 16 (2006) 2330–2339.
- [20] D.R. Arifin, C.M. Long, A.A. Gilad, C. Alric, S. Roux, O. Tillement, T.W. Link, A. Arepally, J.W.M. Bulte, Trimodal gadolinium-gold microcapsules containing pancreatic islet cells restore normoglycemia in diabetic mice and can be tracked by using US, CT, and positive-contrast MR imaging, *Radiology*, 260 (2011) 790–798.
- [21] J.P. Collman, N.K. Devaraj, T.P.A. Eberspacher, C.E.D. Chidsey, Mixed Azide-Terminated Monolayers: A Platform for Modifying Electrode Surfaces, *Langmuir*, 22 (2006) 2457–2464.
- [22] R. Valiokas, S. Svedhem, S.C.T. Svensson, B. Liedberg, Self-Assembled Monolayers of Oligo(ethylene glycol)-Terminated and Amide Group Containing Alkanethiolates on Gold, *Langmuir*, 15 (1999) 3390–3394.
- [23] N.K. Devaraj, G.P. Miller, W. Ebina, B. Kakaradov, J.P. Collman, E.T. Kool, C.E.D. Chidsey, Chemoselective Covalent Coupling of Oligonucleotide Probes to Self-Assembled Monolayers, *J. Am. Chem. Soc.*, 127 (2005) 8600–8601.

CHAPITRE 3 : Synthèse et greffage électrochimique des nanoparticules Au@MA. Vers des biocapteurs plus sensibles ?

1°/ Introduction

Dans ce travail de thèse nous cherchons à greffer des nanoparticules sur des surfaces conductrices dans l'espoir d'améliorer la sensibilité de la surface d'un biocapteur. Des travaux antérieurs ont produit des résultats suggérant le rôle important de la structuration de la surface à l'échelle nanométrique (augmentation de la surface disponible, meilleur orientation des ligands de capture). Lorsque les nanostructures sont à base d'or métallique, les propriétés catalytiques de l'or qui apparaissent à cette échelle peuvent être exploitées avantageusement pour rehausser la chimiluminescence du luminol qui est très utilisée pour la biodétection. Dans ce contexte, nous avons choisi d'élaborer des particules d'or recouvertes par des molécules de mercaptoaniline (MA) en adaptant la méthode biphasique de Brust [1].

Le choix de la mercaptoaniline comme ligand s'explique par sa structure moléculaire et donc les propriétés physico-chimiques qui en résultent. La mercaptoaniline est constitué d'un cycle benzène portant une fonction amine primaire ($-NH_2$) et en para une fonction thiol ($-SH$). Chacune de ces fonctions est censée jouer un rôle important. La fonction $-SH$, du fait de la forte affinité entre les atomes de soufre et d'or, permettra l'immobilisation de MA sur les germes en croissance des nanoparticules d'or et empêchera l'agglomération des nanoparticules d'or. Le rôle de la fonction amine primaire est double. En raison de ses propriétés acido-basiques, la fonction amine sera protonnée à pH acide et sera donc chargée positivement. La charge positive que les fonctions amine conféreront à la nanoparticule devrait garantir la stabilité colloïdale à pH acide par répulsion électrostatique. De plus, la fonction amine primaire aromatique peut être considérée comme un précurseur d'un cation phényldiazonium dont la réduction conduit au greffage du dérivé benzénique sur une surface.

Parmi les différentes stratégies pour modifier la composition chimique de la surface et donc pour apporter des propriétés complémentaires au matériau final, le greffage électrochimique présente des atouts intéressants. Proposée en 1992 par l'équipe de Savéant et Pinson [2], cette approche vise à former une liaison covalente entre le substrat conducteur et la couche organique censée modifier le matériau à recouvrir. La réduction électrochimique de sels d'aryl diazonium conduit à la formation d'une couche organique immobilisée à la surface du substrat par la formation d'une liaison forte entre les atomes de surface du substrat et les atomes de carbone de chaque noyau aryle qui était lié au groupement diazonium avant la réduction. En effet, la réduction de ces ions peut être réalisée sur un composé solide conducteur par voie chimique ou électrochimique. Comme la réduction électrochimique des sels de diazonium s'est révélée extrêmement performante pour fonctionnaliser des surfaces, elle a été exploitée pour fonctionnaliser les surfaces par des nanoparticules. S'il existe de nombreux exemples de greffage indirect (immobilisation de nanoparticules par interaction avec une couche organique greffée à la surface du substrat par réduction de sels de diazonium), les études consacrées au greffage direct de nanoparticules fonctionnalisées par des sels de diazonium sur des substrats nus sont beaucoup plus rares. En dehors du fait qu'il nous a semblé intéressant de combler cette lacune, le greffage direct de nanoparticules semble plus avantageux car il dispense de fonctionnaliser au préalable la surface du substrat. Pour cette raison, nous avons développé des nanoparticules d'or recouvertes de mercaptoaniline. Même s'il a été démontré que la fonctionnalisation de surface par des sels de diazonium pouvait être réalisée par réduction chimique sur des matériaux isolants, nous avons opté pour la voie électrochimique car elle est rapide, facile à contrôler sur le plan chimique, temporel et spatial. En gardant à l'esprit que l'objectif de ce travail de thèse est de développer la partie sensible d'un biocapteur multiplexé, un tel contrôle serait très utile pour l'élaboration de différentes zones nanostructurées sur un même substrat.

A la suite de leur synthèse et leur caractérisation, les nanoparticules d'or Au@MA seront greffé sur un substrat plan via la réduction électrochimique des cation diazonium obtenus par conversion des fonctions amine aromatique première portées par la mercaptoaniline qui recouvre les nanoparticules d'or. L'effet du greffage des nanoparticules sur la biodétection reposant sur la chimiluminescence du luminol a été évalué sur des surfaces d'or ultraplans développées pour être incorporé dans des biocapteurs.

2°/ Synthèse et caractérisation des nanoparticules d'or fonctionnalisées

2.1°/ Quelle stratégie pour des nanoparticules d'or Au@MA

La synthèse de nanoparticules d'or par réduction chimique est l'une des techniques de synthèse la plus utilisée et la plus commune pour produire des solutions colloïdales de nanoparticules métalliques [3–5]. En plus, parmi toutes les techniques de synthèse, la méthode de synthèse par réduction chimique permet non seulement le meilleur contrôle de la taille mais également le contrôle de forme et de stabilité [6]. Elle est basée principalement sur l'utilisation de trois espèces chimiques : un sel métallique précurseur des nanoparticules, un agent réducteur et enfin un agent stabilisant.

Comme la solubilité de la mercaptoaniline (MA) est limitée dans les milieux aquo-alcooliques, nous avons opté pour la synthèse biphasique de Brust [1,7,8]. La phase aqueuse assure la dissolution du sel d'or alors que la phase organique (toluène) facilitera la dissolution de la MA. Le contact entre l'or réduit et la MA qui est indispensable pour contrôler la croissance des nanoparticules et éviter l'agglomération aura été rendu possible par l'ajout du TOAB qui joue le rôle d'agent de transfert des cations Au^{3+} vers la phase organique.

2.2°/ Partie expérimentale

Les réactifs utilisés (sels d'or, réducteur, ligands, solvant...) sont pour la plupart des produits achetés chez Sigma Aldrich. La verrerie est traitée la veille avec de l'eau régale (deux portions d'acide chlorhydrique (37%) pour une portion d'acide nitrique (64%)) rincée à l'eau distillée et séchée.

2.2.1°/ Synthèse des nanoparticules d'or fonctionnalisées Au@MA

Dans un ballon de 100 mL, le sel d'or HAuCl_4 (119 mg ; $3,02 \cdot 10^{-4}$ mol) est dissous dans 15 mL d'eau distillée. La solution de couleur jaune est vigoureusement agitée. Puis une solution de toluène (25 mL) contenant l'agent de transfert, le bromure de tétraoctylammonium (TOAB, 711 mg ; $13,02 \cdot 10^{-4}$ mol), est ajoutée à la solution aqueuse de sel d'or. Cet ajout s'accompagne d'un changement de couleur dans chacune des deux phases ; la phase aqueuse qui initialement était jaune devient incolore et la phase organique qui était incolore devient rouge-orangé.

Ensuite une solution de toluène (10 mL) dans laquelle est dissous la mercaptoaniline MA (71,5 mg ; $5,71 \cdot 10^{-4}$ mol) est ajoutée au mélange biphasique. Lors de cet ajout, la couleur de la phase organique devient orange.

La dernière étape, effectuée sous agitation vigoureuse, consiste à ajouter goutte à goutte une solution aqueuse de NaBH_4 (12,5 mg ; $3,30 \cdot 10^{-4}$ mol dissous dans 12 mL d'eau). Le mélange final est maintenu sous agitation durant 4H30.

Une fois la synthèse terminée, les nanoparticules d'or Au@MA ont été soumises à différentes étapes de lavage et de purification afin d'éliminer toute trace de réactif résiduel qui n'a pas réagi à cause de leur excès. Ces nanoparticules d'or seront ensuite caractérisées par différentes méthodes physico-chimiques.

2.2.2°/ Les différentes étapes de purification des nanoparticules

Au@MA (lavage par décantation et dialyse)

2.2.2.1°/ Lavage par décantation des nanoparticules Au@MA

Une fois la synthèse terminée, le mélange biphasique est transvasé dans une ampoule à décanter pour séparer la phase organique et la phase aqueuse. Comme l'indique l'apparition de la couleur noire, la phase aqueuse contient les nanoparticules d'or Au@MA. La phase aqueuse est lavée trois fois avec du toluène.

2.2.2.2°/ Purification par dialyse des nanoparticules Au@MA

Après extraction liquide-liquide, la phase aqueuse contenant des nanoparticules d'or est introduite dans un boudin de dialyse qui est constitué d'une membrane tubulaire de cellulose (MWCO : 6000-8000 Da). Ce boudin est placé dans un grand volume de solution (500 mL) d'acide chlorhydrique HCl (1M) à pH ~ 1. Le contre-dialysat est renouvelé au bout de 3h, 15h et 21h (Figure 3.1).

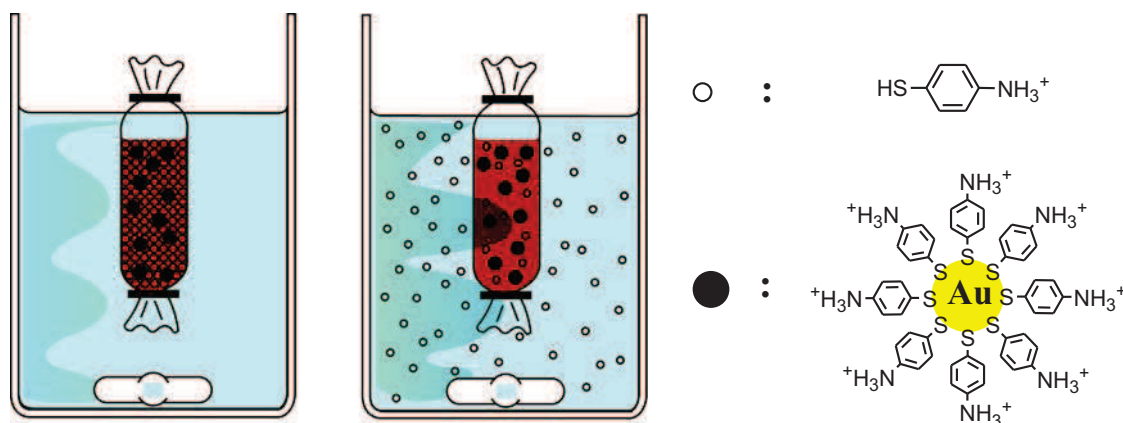


Figure 3.1 : Processus de purification par dialyse des nanoparticules d'or Au@MA à l'aide d'une membrane.

2.2.3°/ Caractérisation des nanoparticules d'or Au@MA

2.2.3.1°/ Microscopie Electronique en Transmission (TEM)

L'étude par microscopie électronique en transmission (TEM) des nanoparticules Au@MA a été réalisée en utilisant un appareil JEOL 2010 FEG opérant à 200 kV au sein du laboratoire MATEIS (UMR CNRS 5510, INSA de Lyon). Les échantillons ont été préparés en déposant une goutte de suspension colloïdale de nanoparticules d'or Au@MA sur une grille de cuivre recouverte d'un film de carbone et en laissant le solvant (l'eau) s'évaporer à l'air. La détermination des tailles a été réalisée en mesurant manuellement le diamètre des nanoparticules d'or visible sur les clichés TEM.

2.2.3.2°/ Spectrophotométrie d'absorption UV-visible et étude de la stabilité colloïdale au cours du temps et du pH

- Les spectres d'extinction UV-visible ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible SPECORD 250 dans la gamme de longueur d'onde 400-800 nm. La communication et le traitement des spectres ont été réalisés via l'interface du logiciel Win ASPECT. Les colloïdes nanoparticules d'or Au@MA dans l'eau sont caractérisés par spectrophotométrie UV-visible. Etant donné que la solution Au@MA est trop concentrée (5 g/L), elle a été diluée par 20 (0,25 g/L) avec la solution de HCl (1 M) avant de placer l'échantillon dans le spectrophotomètre. Les cuves dans lesquelles la suspension colloïdale a été versée ont été rincées et nettoyées préalablement à l'eau distillée.
- La stabilité colloïdale en fonction du temps et du pH a été étudiée par spectrophotométrie UV-visible. Les suspensions colloïdales de nanoparticules ont été préalablement diluées par 20 (0,25 g/L) et ajustées au pH désiré par ajout de solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (1 M et/ou 0,5 M) avant d'enregistrer les spectres. Nous avons procédé de la même façon trois jours plus tard pour évaluer l'influence du temps sur la stabilité.

2.2.3.3°/ Mesure du potentiel zêta et du diamètre hydrodynamique par DLS

Les mesures du potentiel zêta ξ et du diamètre hydrodynamique des nanoparticules Au@MA ont été réalisées en utilisant un Zetamètre-granulomètre (Zetasizer Malvern Nano ZS). Ces mesures ont été effectuées sur des suspensions colloïdales de concentration égale à 1 g.L^{-1} en or et 10^{-2} M en NaCl, ajustées au pH désiré par ajout de solutions aqueuses d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (1 M et/ou 0,5 M). Chaque mesure est réalisée trois fois et les résultats sont donnés sous forme de moyenne. Les solutions Au@MA (1 g.L^{-1}) sont prélevées et introduites dans une cuve jetable en polystyrène dont les quatre faces sont lisses et transparentes. Avant d'insérer l'échantillon dans l'appareil, la solution est introduite de manière à remplir suffisamment la cuve (environ 2 mL) afin que le faisceau laser monochromatique traverse le cœur de la solution. La distribution de taille obtenue résulte de la moyenne de trois mesures sur un échantillon donné. Ces analyses sont effectuées au laboratoire QUALIO Analyses & environnement.

2.2.3.4°/ Dosage par ICP-OES de l'or (Au) et du soufre (S)

Nous avons effectué des analyses élémentaires ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) au Laboratoire QUALIO Analyses & environnement. L'objectif de cette analyse est de déterminer la quantité de l'or et le rapport or-soufre en utilisant la spectrométrie d'émission atomique après excitation au moyen d'un plasma (Varian/Agilent modèle 720 ES) équipé d'une torche axiale, d'une chambre de nébulisation cyclonique et d'un nébuliseur concentrique (type K) qui le relie à un passeur automatique (Varian/Agilent modèle 720 ES). Pour chaque analyse, la suspension de nanoparticules d'or Au@MA (0,5 mL à environ 5 g/L) a été diluée quatre fois avec 1,5 mL d'eau régale.

2.3°/ Résultats et discussion

La synthèse des nanoparticules d'or Au@MA a été réalisée selon la méthode biphasique de Brust. Cette méthode consiste à faire réagir l'acide tétrachloroaurique HAuCl_4 avec le tétrahydroborate de sodium NaBH_4 en présence de mercaptoaniline MA qui joue plusieurs rôles importants. D'abord cette molécule assure le contrôle de la croissance des nanoparticules d'or et empêche leur agglomération grâce à l'adsorption de la

mercaptoaniline sur les germes d'or qui est rendue possible par la forte affinité du soufre (présent dans la fonction thiol de MA) pour les atomes d'or (Schéma 3.1). D'autre part, la MA présente une fonction amine primaire aromatique qui peut être transformée en cation diazonium dont la réduction devrait permettre le greffage de Au@MA sur différents types de substrats (voir paragraphe 3).

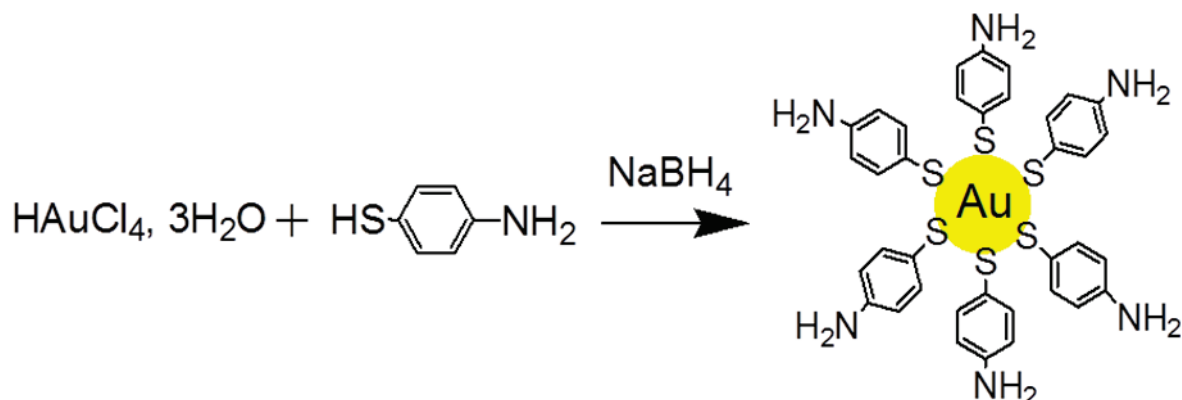


Schéma 3.1: Schéma de la synthèse des nanoparticules Au@MA.

Comme la miscibilité de la molécule MA dans l'eau est faible en milieu basique contrairement à celle de HAuCl_4 et de NaBH_4 , il est difficile de réaliser la synthèse de ces nanoparticules d'or en milieu polaire. C'est la raison pour laquelle, la méthode biphasique a été choisie. Dans ce cas, le sel d'or a été dissous dans l'eau (phase aqueuse jaune). Le transfert des anions AuCl_4^- vers la phase toluène dans laquelle la MA est soluble a été assuré par le bromure de tétraoctylammonium TOAB préalablement dissous dans le toluène. Le TOAB est une espèce amphiphile possédant une partie lipophile (les quatre chaînes octyles) et une tête cationique hydrophile (l'azote du groupement ammonium). Par interaction électrostatique entre la tête chargée positivement du TOAB et la charge négative des AuCl_4^- , il se forme une paire d'ions soluble dans le toluène en raison des chaînes lipophile du TOAB. Grâce à cette astuce expérimentale, le sel d'or et les ligands MA sont ensemble dans la phase organique. Ce transfert est facilement visualisé par le changement de couleur des différentes phases liquides. La phase aqueuse initialement de couleur jaune devient incolore alors que la phase organique incolore devient rouge (Figure 3.2a). Le réducteur NaBH_4 a été ajouté goutte à goutte au mélange biphasique qui prend progressivement une coloration noire. Cet ajout de NaBH_4 s'accompagne également d'un fort dégagement gazeux de dihydrogène qui est un indice de l'oxydation brutale du réducteur. La coloration sombre du

mélange reflète la formation des nanoparticules d'or Au@MA dans le mélange. Autrement dit, NaBH_4 a réduit Au^{3+} en Au^0 (Figure 3.2b). Après l'avoir séparée de la phase organique, l'avoir lavée avec le toluène et l'avoir purifiée par dialyse, une suspension aqueuse de nanoparticules d'or a été récupérée et caractérisée par différentes techniques.

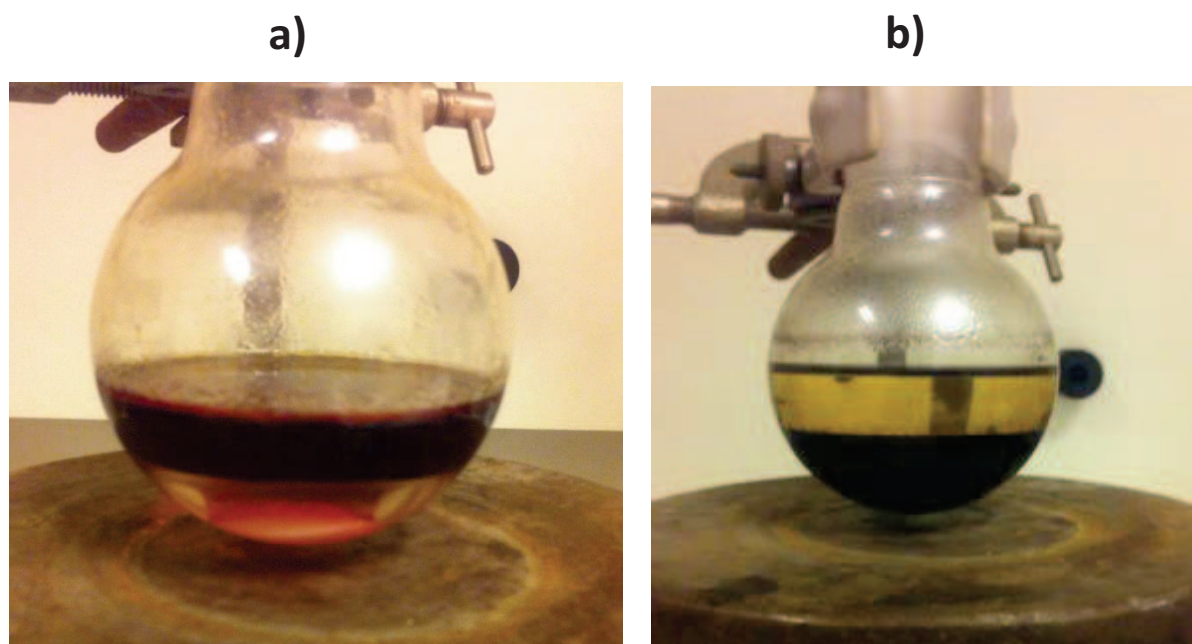


Figure 3.2 : **a)** Transfert des ions AuCl_4^- de la phase aqueuse (solution incolore) vers la phase organique (solution rouge brique) et **b)** présence des nanoparticules d'or Au@MA en phase aqueuse.

La présence des nanoparticules d'or Au@MA dans la suspension aqueuse a été confirmée par TEM et ICP.

La caractérisation par TEM nous a permis non seulement de déterminer la morphologie et la taille du cœur de particules mais aussi elle nous a permis constater l'absence d'agrégation des nanoparticules d'or. Le traitement manuel (en mesurant le diamètre des particules à l'aide de la règle) et informatique (logiciel image J) des images, nous a permis de déterminer la taille moyenne des particules. La microscopie électronique nous montre effectivement que la suspension contient des nanoparticules de diamètre de $3,5 \pm 0,5$ nm comme le montre la photo TEM (Figure 3.3).

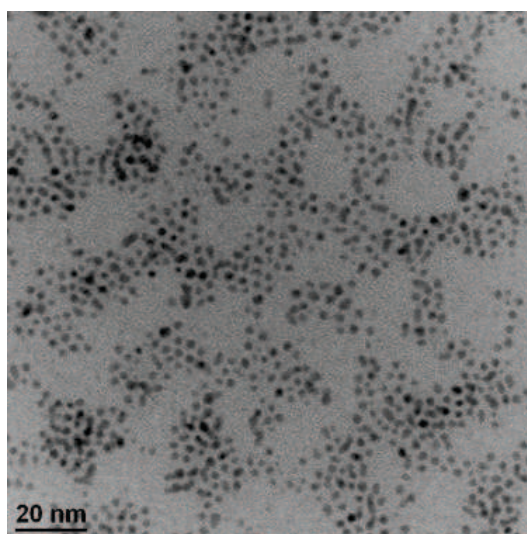


Figure 3.3 : Image de microscopie TEM des Au@MA de taille environ $3,5 \pm 0,5$ nm.

Nous pouvons observer sur ce cliché TEM ([Figure 3.3](#)), que ces particules présentent une bonne homogénéité en taille et que l'espacement entre chaque particule est suffisamment grand pour supposer que l'échantillon est exempt d'agglomération.

Cependant, cette analyse n'est pas suffisante car le TEM est une technique de caractérisation trop localisée qui ne permet pas d'avoir une vision globale de l'échantillon. C'est ce qui nous a amené à mesurer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or Au@MA et la distribution en taille par DLS.

L'analyse par DLS effectuée au laboratoire Qualio, nous a fourni la mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'or à partir d'une suspension diluée (1 g/L) et la distribution en taille ([Figure 3.4](#)). D'après la [figure 3.4a](#), la distribution en taille des particules est relativement étroite : l'échantillon semble relativement homogène sur le plan de la taille des nanoparticules d'or. Cette mesure confirme l'impression donnée par les clichés TEM après dialyse. En revanche, sur la [figure 3.4b](#) le diamètre hydrodynamique (29 ± 1 nm) est nettement supérieur au diamètre du cœur d'or ($3,5 \pm 0,5$ nm). Le diamètre hydrodynamique représente l'encombrement maximal de la particule en solution. Or une particule d'or en solution est constituée du cœur d'or, de la couche de ligands qui assure la stabilité colloïdale et apporte des fonctions complémentaires et des couches de solvatation immobiles (par rapport à la solution). Comme seul le cœur d'or est visible au TEM, le diamètre hydrodynamique possède une valeur nécessairement plus élevée que le diamètre du cœur.

Cependant la valeur de 29 nm semble exagérément plus grande que celle du diamètre du cœur ($3,5 \pm 0,5$ nm). Cette différence ne peut pas s'expliquer par la couche de ligands (épaisseur estimée à 1 nm) et celle de solvation. En effet pour atteindre une telle valeur, il faudrait que la couche de solvation ait une épaisseur de 11 à 12 nm. Une telle valeur est peu crédible. Pour expliquer un tel écart, quatre hypothèses peuvent être émises :

- Fiabilité douteuse de la mesure. En effet, la mesure du diamètre hydrodynamique de nanoparticules d'or Au@MA si petites est relativement délicate à effectuer.
- Multicouche de ligands mercaptoaniline autour du cœur d'or. Elle serait maintenue par les liaisons hydrogènes (Figure 3.5a).
- Assemblage discret de nanoparticules d'or Au@MA. Un assemblage de six nanoparticules avec une symétrie octaédrique serait circonscrit dans une sphère de diamètre ~ 23 nm (hypothèse : épaisseur de la couche ligands ~ 1 nm et celle de solvation ~ 1 nm) (Figure 3.5b).
- Agglomération au cours de la mesure.

Cette dernière hypothèse est la moins pertinente car elle est peu compatible avec la fine distribution en taille.

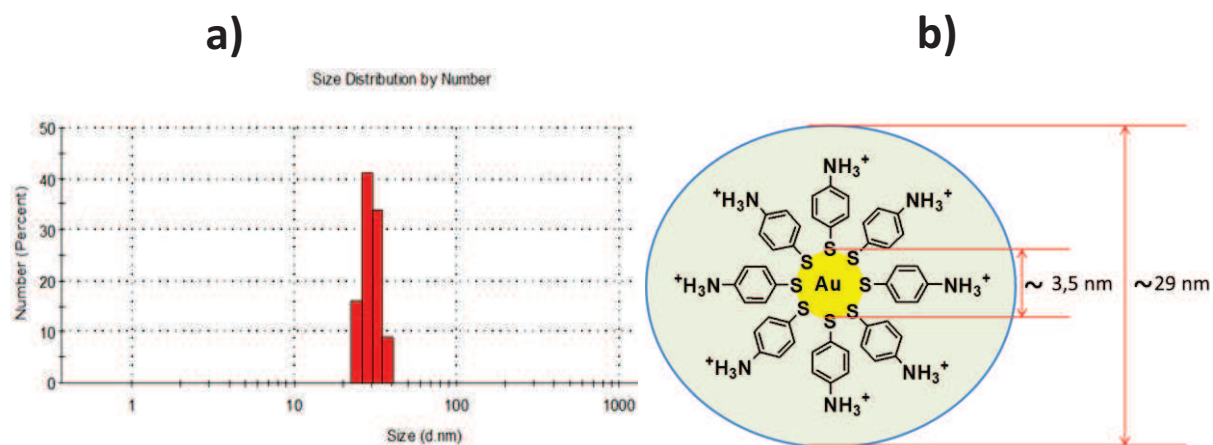


Figure 3.4 : a) Histogramme de la distribution de taille des nanoparticules Au@MA en suspension colloïdale aqueuse et b) représentation schématique d'une nanoparticule Au@MA en suspension dans l'eau (cœur d'or en jaune et les ligands MA solvatés en bleu).

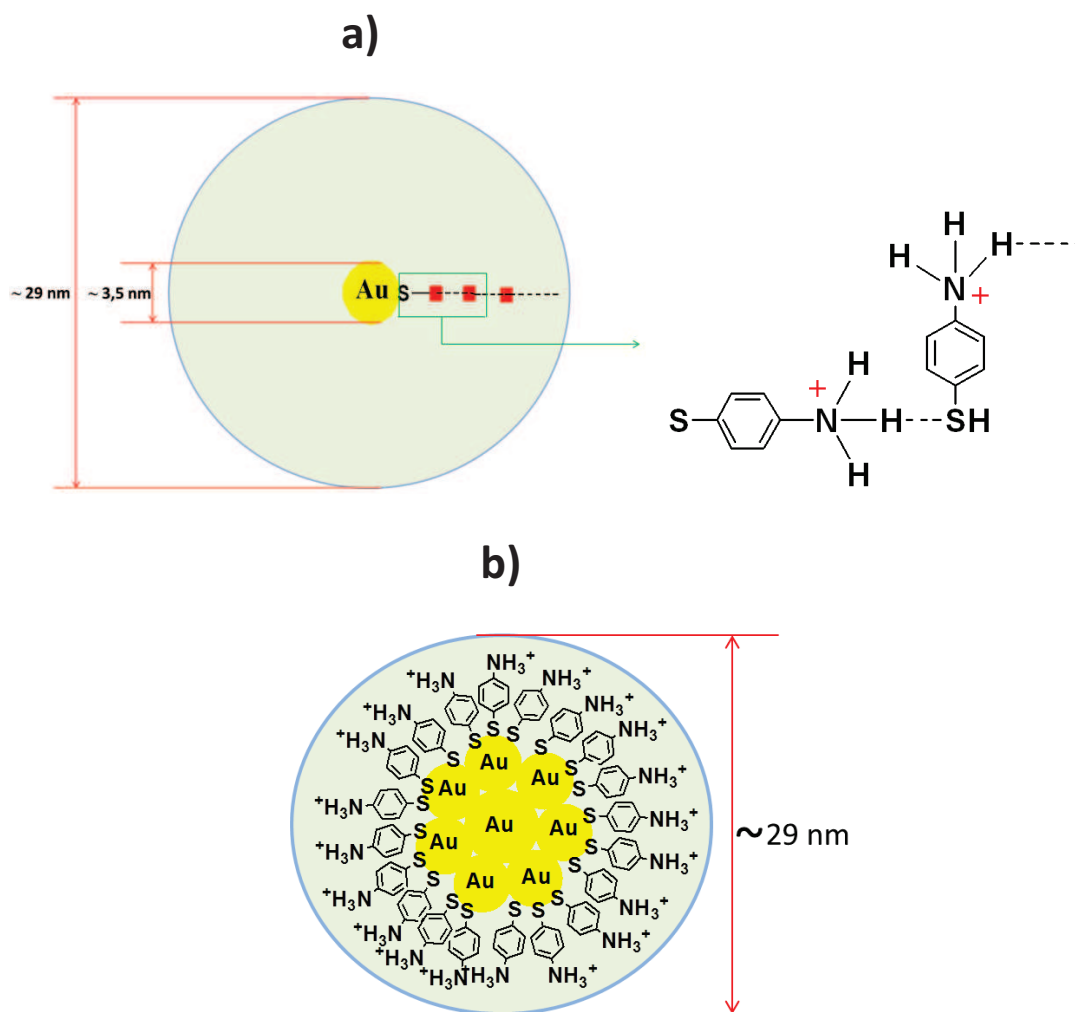


Figure 3.5 : a) multicouche de MA sur le cœur d'or et b) assemblage discret de cœur d'or

A partir du rapport Au/S déterminé par des analyses par ICP-OES et de la taille du cœur des particules d'or, il est possible de proposer un portrait-robot des nanoparticules d'or Au@MA. Ces dernières sont composées d'un cœur métallique constitué d'environ 1900 atomes d'or et encapsulé dans une coquille organique composée d'environ 612 ligands MA. Comme il y a 766 atomes d'or en surface, cela représente donc moins d'un ligand par atome d'or. Or, d'après la littérature, il faut compter un ligand thiolé pour 2-4 atomes d'or. Il y aurait donc un excédent de 306-459 ligands pour une monocouche. Ces ligands excédentaires forment probablement une deuxième couche maintenue par liaison hydrogène. Malgré la présence d'une éventuelle bicouche de ligands, le diamètre hydrodynamique ne peut pas atteindre la valeur mesurée. Ce nombre de ligands par nanoparticule est nettement différent avec les valeurs rapportées par Hostetler *et al.* dans le

cas de nanoparticules d'or fonctionnalisées par des chaînes de dodécane-thiol (monothiol) [9]. A partir de ces données, on peut dire que l'hypothèse de la disposition des ligands MA en multicouche ne tient pas. Cette hypothèse est donc écartée.

En raison du phénomène de résonance de plasmon qui est associé à l'oscillation collective des électrons de la bande de conduction, les nanoparticules d'or absorbent fortement la lumière visible dans une région spectrale comprise entre 500-550 nm. Comme la position et la forme de la bande d'absorption dépendent de la taille, de la morphologie et de l'environnement, la spectrophotométrie UV-visible apparaît donc particulièrement adaptée pour caractériser les suspensions de nanoparticules d'or et en particulier pour étudier la stabilité colloïdale des suspensions en fonction du pH et du temps.

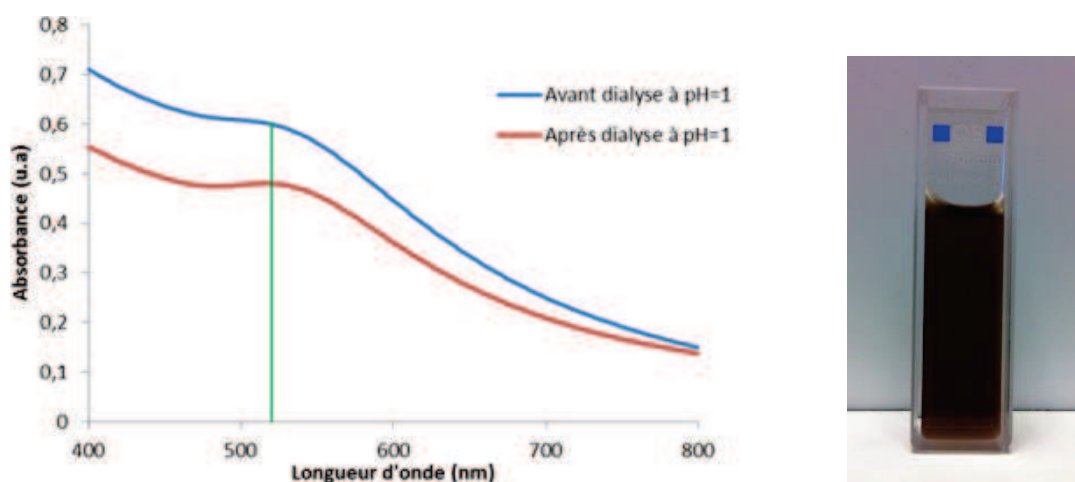


Figure 3.6 : Spectres UV-visible avant et après dialyse d'une suspension de nanoparticules d'or Au@MA à 1 g.L^{-1} et cliché de suspension colloïdale.

Sur les spectres de la [figure 3.6](#) qui sont obtenus par l'enregistrement de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde avant et après dialyse, nous pouvons remarquer que les nanoparticules d'or Au@MA absorbent dans le visible autour de 520 nm. La diminution d'absorbance de l'échantillon dialysé s'explique par le fait que la dialyse induit une dilution de la suspension colloïdale Au@MA. La dialyse n'engendre donc pas de modifications des nanoparticules d'or car l'allure des spectres (à part la différence liée à la dilution) est très semblable avant et après dialyse. Elle est caractéristique de nanoparticules d'or parfaitement dispersées. Cela permet d'écarter l'hypothèse de l'agglomération des nanoparticules pour expliquer la valeur du diamètre hydrodynamique. Bien que les

suspensions de nanoparticules d'or Au@MA et de nanoparticules d'or recouvertes d'ions citrate (Au@citrate, méthode de Frens) présentent une bande plasmon centrée autour de 520 nm, leurs couleurs sont nettement différentes (Figures 3.6 et 3.7). Les suspensions colloïdales Au@Citrate exhibent la couleur rouge caractéristique des nanoparticules d'or alors que celles de Au@MA possède une coloration marron sombre. Cette différence de couleur s'explique par la différence d'allure de la bande plasmon de chaque suspension qui est associée à la taille des nanoparticules. La bande plasmon des suspensions Au@Citrate est nettement plus importante que celle des Au@MA. L'absorption étant très marquée dans cette région du spectre autour de 520 nm, il en résulte que le colloïde apparait rouge alors que dans le cas de la suspension de nanoparticules d'or Au@MA, la bande d'absorption est très faible. L'absorption n'a donc plus lieu sur une zone restreinte du spectre de la lumière visible mais sur une zone plus étendue d'où la couleur sombre.

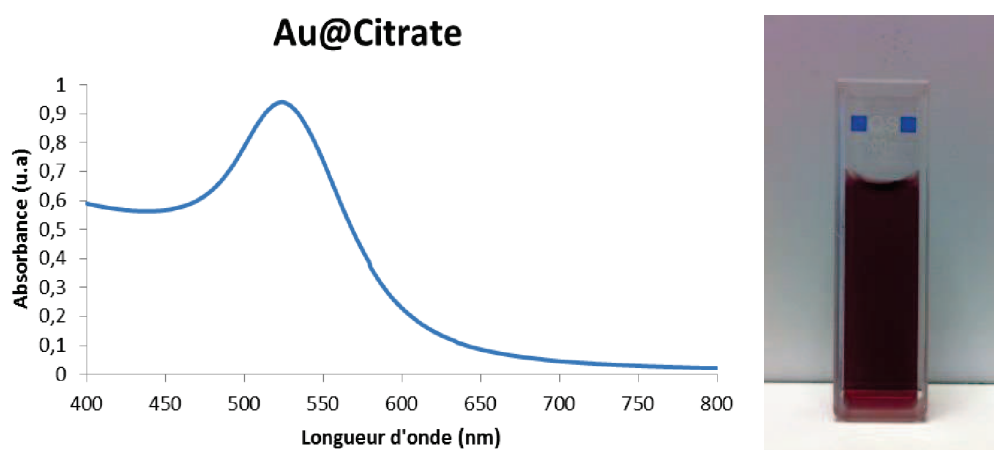


Figure 3.7 : Au@Citrate de taille 41 nm à $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ avec une coloration rouge pourpre et son spectre UV-visible présentant une importante bande d'absorption.

La très faible intensité de la bande plasmon observée sur le spectre d'absorption UV-visible des nanoparticules Au@MA est caractéristique des nanoparticules d'or de faible taille. Néanmoins elle est supérieure à 3 nm car en dessous de cette taille la bande d'absorption plasmon n'est plus visible. L'allure du spectre UV-visible des suspensions des nanoparticules d'or Au@MA fournit une information concordante concernant la taille des nanoparticules d'or Au@MA déterminée par TEM [10].

Par ailleurs, il faut savoir que la position du maximum de la bande plasmon et sa largeur dépendent respectivement des dimensions des nanoparticules et de leur dispersion en taille

dans la solution. Plus la taille des nanoparticules est petite plus le maximum de la bande plasmon est déplacée vers le bleu. Plus les nanoparticules sont grosses plus le maximum de la bande plasmon se situe vers le rouge du spectre d'absorption. Cependant, la largeur de la bande plasmon est, quant à elle, fonction de la dispersion en taille des nanoparticules. La mesure du spectre d'absorption étant le signal moyen de l'échantillon, plus la dispersion sera grande au sein de l'échantillon, plus la bande de plasmon sera large puisqu'à chaque taille correspond une résonance et donc une longueur d'onde dans la bande plasmon.

En s'appuyant sur les données acquises par TEM et DLS, nous avons montré que les nanoparticules d'or Au@MA possèdent un cœur métallique à une taille de $3,5 \pm 0,5$ nm et présentent une faible dispersion en taille. Comme l'allure du spectre UV-visible des nanoparticules d'or Au@MA dépend de leur taille, de leur forme et de leur état d'agrégation, la comparaison des spectres enregistrés à différents pH et temps nous permettra d'étudier la stabilité colloïdale en fonction de ces paramètres (Figure 3.8).

Le pH de la suspension Au@MA initiale étant de 1, nous avons augmenté progressivement le pH de la solution à 3, 5, 7, 9 et 11 avec une solution de NaOH (0,5 M) en complétant tous les échantillons avec de l'eau distillée pour avoir la même concentration de nanoparticules d'or. Nous avons remarqué clairement en comparant les spectres que la bande plasmon à pH 1 est nettement visible alors qu'elle s'élargit et se déplace quand le pH augmente (Figure 3.8a).

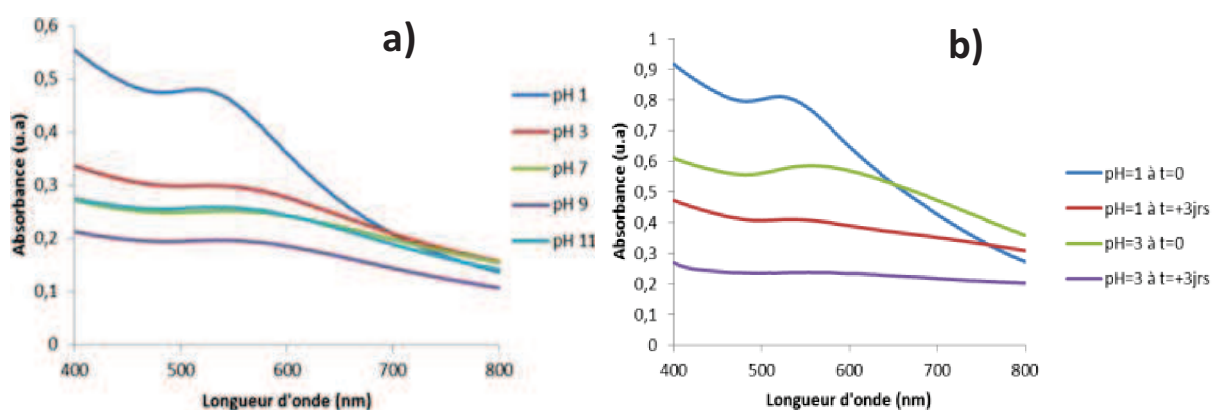


Figure 3.8 : Spectres UV-visible de la suspension colloïdale Au@MA à différents **a)** pH et **b)** temps.

A pH 1, en raison de la forte acidité, la fonction amine primaire capte un proton pour donner le cation anilinium. La présence de ces charges positives à la surface des nanoparticules génère ainsi une répulsion électrostatique entre nanoparticules qui se tiennent alors

suffisamment éloignées les unes des autres. Cette répulsion électrostatique assure donc la stabilité des suspensions Au@MA à pH 1.

Cependant elle est de courte durée car l'allure du spectre enregistré trois jours après la synthèse présente des modifications (diminution de l'absorbance, élargissement et déplacement de la bande d'absorption) qui sont caractéristiques de la déstabilisation du colloïde (Figure 3.8b). Ces signes caractéristiques d'une agglomération des nanoparticules d'or Au@MA sont également observés pour les pH supérieurs à 1. L'augmentation du pH induit également une perte de la stabilité colloïdale (Figure 3.8a). L'observation visuelle vient confirmer l'interprétation des spectres car nous avons observé une sédimentation des nanoparticules d'or Au@MA au fond du bécher pour les pH supérieurs à 3 et à partir de trois jours de stockage.

Afin d'expliquer le comportement des colloïdes Au@MA vis-à-vis du pH, le potentiel zêta des différentes suspensions a été mesuré. La valeur du potentiel zêta mesurée pour chacune des suspensions montre que les nanoparticules d'or Au@MA en suspension sont chargées positivement (Figure 3.9).

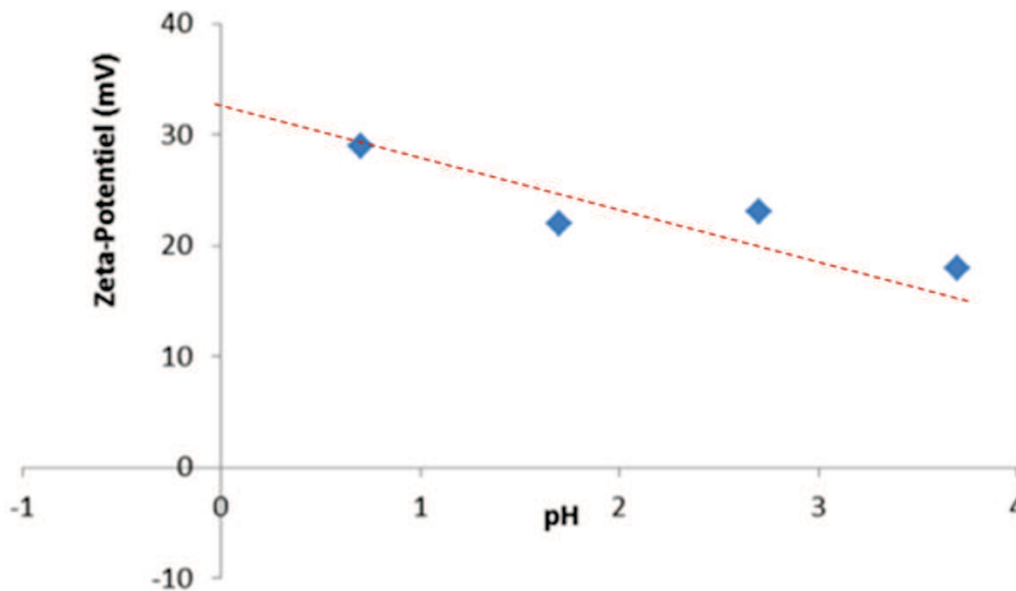


Figure 3.9 : Mesure du potentiel ξ en fonction du pH de la suspension des nanoparticules d'or Au@MA. (La ligne en pointillé est un guide pour la lecture).

Cependant, le potentiel zêta (et donc la charge positive) diminue lorsque le pH augmente (de + 29 mV (pH 1) à + 18 mV (pH 4)). La variation du potentiel zêta observée quand le pH augmente est parfaitement cohérente avec le comportement du colloïde déduit des

spectres UV-visible et de l'observation visuelle. A pH 1, le potentiel zêta est fortement positif. Les nanoparticules d'or Au@MA sont donc fortement chargées positivement. Cette charge positive provient de la protonation de la fonction amine primaire des molécules de mercaptoaniline qui recouvrent la surface des nanoparticules d'or Au@MA. Comme des particules de même signe se repoussent, la stabilité colloïdale observée à pH 1 résulte de la répulsion électrostatique des nanoparticules d'or. Mais lorsque le pH augmente, le potentiel zêta diminue suffisamment en raison de la déprotonation des fonctions amine pour que la répulsion électrostatique entre les nanoparticules chargées positivement ne soit plus suffisamment intense pour assurer la stabilité colloïdale.

3°/ Greffage électrochimique des nanoparticules Au@MA

3.1°/ Stratégie pour le greffage électrochimique des nanoparticules d'or Au@MA ?

Dans l'étude précédente, nous avons montré qu'il était possible de synthétiser des nanoparticules d'or Au@MA avec une taille d'environ $3,5 \pm 0,5$ nm formant des colloïdes relativement stables à pH 1. La présence de groupements amine aromatique primaire à la surface des nanoparticules d'or Au@MA permet d'envisager la conversion de ces fonctions en cation diazonium dont la réduction électrochimique devrait conduire au greffage des nanoparticules.

3.2°/ Partie expérimentale

3.2.1°/ Différents substrats conducteurs utilisés

3.2.1.1°/ La surface de carbone vitreux

Le carbone vitreux est très utilisé en tant que matériau d'électrode en électrochimie car il possède des propriétés physico-chimiques intéressantes, à savoir une grande résistance thermique, une haute inertie chimique, une large fenêtre de potentiel et une bonne conductivité électrique. Par ailleurs, il est peu coûteux et possède une chimie de surface

pouvant être exploitée pour influencer sa réactivité [11]. De plus, sa large plage de potentiel permet une bonne étude d'un point de vue électrochimique et il réagit peu avec des solvants aqueux ou organique. Il existe différents types de carbone avec des propriétés propres à chacun. Certains paramètres tels que la rugosité et le pourcentage d'espèces oxydées à la surface ont un fort impact sur les propriétés du carbone. La rugosité intervient essentiellement au niveau de la couche de diffusion et influence les résultats électro-analytiques tandis que le pourcentage d'espèces oxygénées modifie la cinétique de transfert des électrons.

3.2.1.2°/ La surface d'or

Les substrats d'or sont très utilisés en raison de leur capacité à être facilement modifiés chimiquement, et du large éventail de méthodes qui peuvent être utilisées pour caractériser la surface (résonance plasmonique de surface (SPR), microbalance électrochimique à cristal de quartz (EQCM)). En outre, de nombreux systèmes de détection reposent sur des surfaces d'or modifiées.

3.2.1.3°/ La surface d'oxyde d'indium et d'étain (Indium Tin Oxide (ITO))

L'Oxyde d'indium et d'étain est l'un des oxydes conducteurs les plus largement utilisés en raison de sa conductivité électrique et de la transparence optique qui le caractérise. Les électrodes ITO ont l'avantage d'être transparentes dans le domaine UV-Visible, ce qui permet, sur une même surface, de réaliser des mesures électrochimiques mais aussi spectroscopiques. En combinant les informations complémentaires obtenues par ces deux techniques, de telles surfaces peuvent être utilisées pour développer des biocapteurs grâce à leurs caractéristiques optiques et électrochimiques [12,13].

3.2.2°/ Préparation des substrats conducteurs

3.2.2.1°/ Substrat de carbone vitreux (GC)

Il est nécessaire, avant toute utilisation, de nettoyer soigneusement l'électrode de carbone vitreux pour être sûr d'enlever une éventuelle couche déposée suite à l'expérience

précédente et d'éliminer toute contamination de la surface lors de son stockage. Pour cela nous avons poli la surface d'électrode de carbone avec une bande de polissage humidifiée (carbure de silicium) sur une polisseuse Mecapol 2B. Puis nous avons soigneusement rincé l'électrode polie avec de l'eau distillée, de l'acétone et séchée à l'aide d'un chiffon en papier doux.



Photo 3.1 : Photo d'électrode de carbone vitreux propre.

3.2.2.2°/ Substrat d'ITO

Les substrats d'ITO, utilisés dans le cadre de la thèse, se présentent sous forme de couche mince d'environ 100 nm d'épaisseur déposées par pulvérisation sur substrat de verre, dont la résistance superficielle est inférieure à 100 Ω /sq et la transmission d'environ égale à 80 % dans le visible.

Ces substrats sont initialement plongés dans une solution d'acétone puis ce bain d'acétone est soumis aux ultra-sons pendant quelques minutes (5 min), et enfin les électrodes ITO sont rincées plusieurs fois à l'eau distillée. Dans une seconde manipulation, nous avons procédé à l'identique mais avec un bain d'éthanol. Dans ce cas, en fin de traitement, nous avons séché le substrat à l'étuve (30°C) pendant 10min.



Photo 3.2 : Photo d'une surface d'ITO propre.

3.2.2.3°/ Substrat d'or

Les surfaces d'or rugueuses et planes nous proviennent de l'institut Femto-ST. Les surfaces d'or planes (appelées par la suite « terrasse ») sont constituées d'une mosaïque de terrasses, géométriquement planes faisant environ $1 \mu\text{m}^2$ de dimension, déposée sur de fines lames de verre. Ces différents types de surface qui ont été développés par Wilfrid Boireau et ses collègues à l'institut Femto-ST (université de Franche-Comté) permettent une caractérisation biomoléculaire à l'échelle nanométrique [14]. Ces substrats d'or ont été rincés abondamment à l'eau distillée et à l'acétone puis séchés à l'étuve (25°C) pendant 10min.



Photo 3.3 : Photo d'une surface d'or propre.

3.2.3°/ Électrogreffage des nanoparticules Au@MA sur les substrats conducteurs

Les expériences électrochimiques (greffage et caractérisation) ont été effectuées à partir d'un montage à trois électrodes en utilisant un potentiostat VoltaLab (modèle PGZ 100) piloté par un ordinateur équipé du logiciel VoltaMaster 4 pour traiter les données enregistrées. Les trois électrodes utilisées sont l'électrode de travail (carbone vitreux (GC), ITO et Au), la contre-électrode de platine (Pt) et une électrode de référence au calomel saturée (ECS) de potentiel standard $E^0 = 0,2445V$ à 298K. Les dépôts électrochimiques sur les différentes surfaces (GC, ITO et Au) ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales, avec différents temps de dépôt.

Dans une cellule permettant d'installer les trois électrodes, a été introduite une solution colloïdale diluée de nanoparticules d'or Au@MA (5 mL à 5 g/L dans 45 mL d'une solution aqueuse de HCl (1M)). Le mélange dégazé est laissé sous agitation pendant quelques minutes (2 à 3 min). Les greffages électrochimiques ont été réalisés par chronocoulométrie en appliquant un potentiel de -430 mV pendant un temps variable (20s, 40s, 60s, 120s et 240s). Le nitrite de sodium (172 mg ; $2,4 \cdot 10^{-3}$ mol) a été ajouté 10s après avoir appliqué le potentiel.

3.2.4°/ Caractérisation des surfaces

3.2.4.1°/ Voltamétrie cyclique (cas des substrats GC et ITO)

Après le dépôt électrochimique des nanoparticules Au@MA sur les surfaces GC et ITO, nous avons soigneusement lavé à l'eau distillée ces surfaces dans le but d'enlever tout résidu non greffé sur ces surfaces (GC et ITO) modifiées. Elles ont, par la suite, été caractérisées (voltamétrie cyclique) dans une solution électrolytique agressive (50 mL) composée de NaBr (0,1 M)/HCl (0,1 M). En partant de la valeur la plus basse, les cycles balaient l'intervalle de potentiels compris entre - 0,1 V et + 0,8 V à une vitesse de balayage de 50 mV/s.

3.2.4.2°/ Imagerie AFM (cas des substrats ITO et or)

Après dépôt des nanoparticules d'or Au@MA, les surfaces ont été abondamment rincées à l'eau distillée et séchées à l'étuve. Ces derniers ont été caractérisés par imagerie AFM à l'institut FEMTO-ST grâce à un microscope Nanoscope III (Veeco, Santa Barbara, CA, USA) en mode contact, avec des pointes de nitrure de silicium en forme de V.

3.2.4.3°/ Analyse élémentaire ICP (cas du substrat d'ITO)

Les surfaces modifiées d'ITO ont été immergées pendant 48 h dans une solution d'eau régale (7 mL) constituée d'un volume d'acide nitrique pour deux volumes d'acide chlorhydrique afin de dissoudre le dépôt. Puis cette solution a été analysée par ICP-MS au laboratoire Qualio de Besançon pour déterminer sa teneur en or.

3.3°/ Résultats et discussion

Le greffage électrochimique des nanoparticules Au@MA nécessite la conversion des fonctions amine primaire aromatique en cations diazonium (diazotation) qui par réduction électrochimique formeront des radicaux aryle capables de former des liaisons covalentes avec les atomes du substrat. Pour cette raison, la stabilité colloïdale à pH 1 constitue un atout pour le greffage covalent des nanoparticules d'or Au@MA sur les électrodes car la réaction de diazotation a lieu à pH \sim 1. D'après des expériences de voltampérométrie cyclique réalisées avec des suspensions de Au@MA en présence de NaNO₂, un pic de réduction est visible entre - 100 mV et + 800 mV. A partir de cette étude préliminaire, le potentiel imposé pour le greffage des nanoparticules d'or durant un temps variable a été fixé à - 430 mV/ECS. Quelle que soit la nature de l'électrode (GC, ITO ou or), la charge reste proche de 0 mC quand le potentiel de - 430 mV/ECS est appliqué à un colloïde de Au@MA à pH 1 en absence de nitrite de sodium (NaNO₂) (Figure 3.10). En revanche, la charge devient, après l'addition de NaNO₂, de plus en plus négative au fur à mesure que le temps durant lequel ce potentiel est appliqué augmente (Figure 3.10).

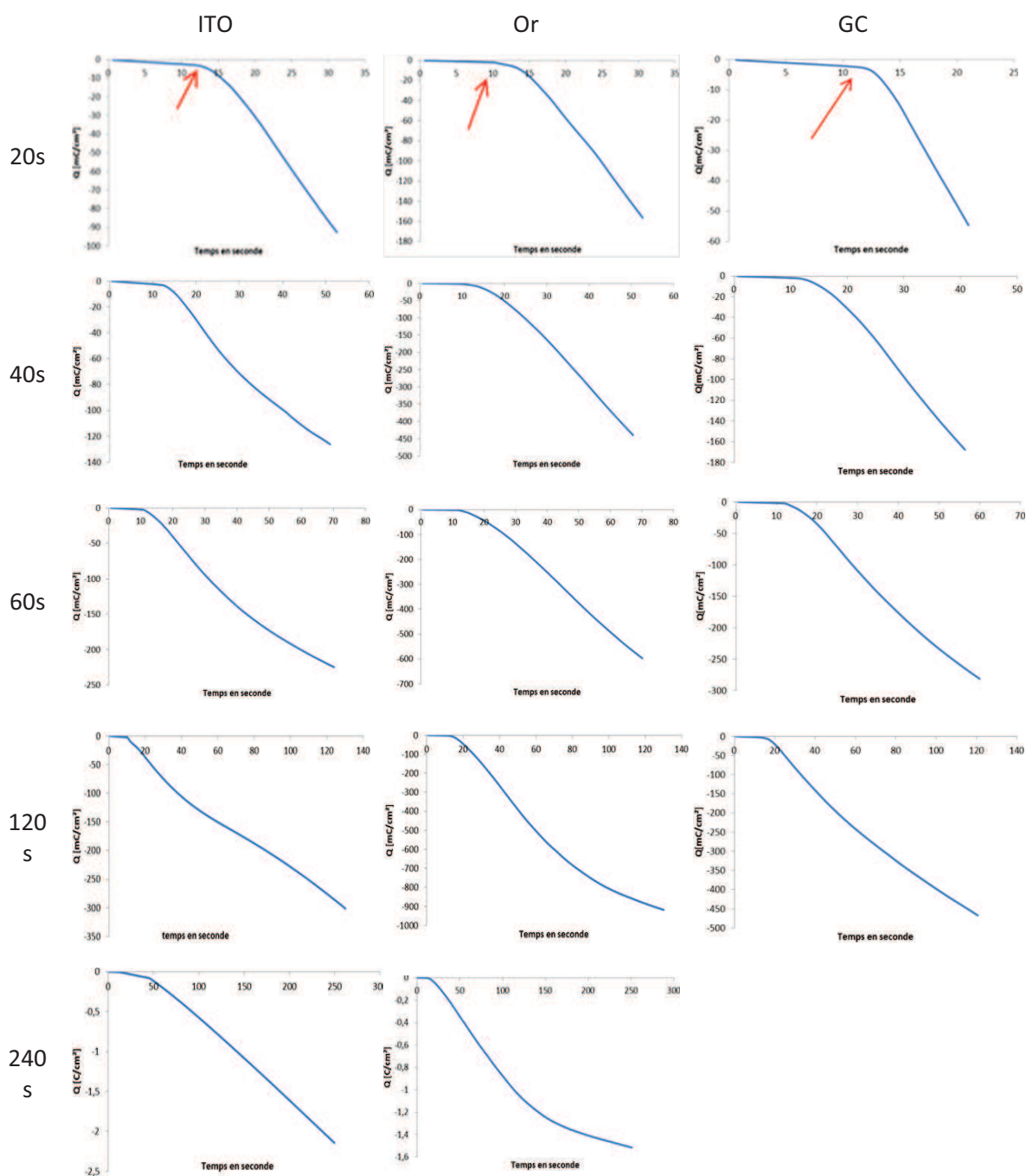


Figure 3.10 : Courbes représentant l'évolution de la charge en fonction du temps avant a) 20s, b) 40s, c) 60s, d) 120s et e) 240s et après ajout de NaNO_2 pour l'électrode d'ITO, GC et Au. La flèche rouge indique le moment de l'ajout de NaNO_2 dans la suspension colloïdale.

Il est également à noter que l'allure des courbes ne dépend pas de la nature de l'électrode car pour un même temps, l'allure des courbes est très semblable. L'évolution de la charge à -

430 mV/ECS indique que la réduction électrochimique a lieu uniquement après l'addition de NaNO_2 dont la présence en milieu acide est requise pour convertir les fonctions amine aromatique primaire des nanoparticules Au@MA en cations diazonium. La mise en évidence d'une réaction de réduction à la surface des électrodes semble indiquer que les nanoparticules d'or sont greffées sur les substrats conducteurs. En outre, la quantité de nanoparticules augmente avec le temps de dépôt. Lorsque l'expérience électrochimique est réalisée avec une électrode de travail transparente (ITO), la partie immergée de l'électrode devient gris-noir (Photo 3.4).

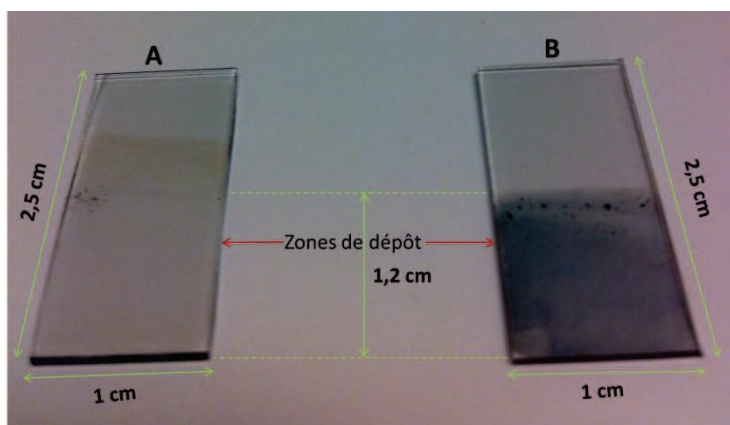


Photo 3.4: Photo de deux électrodes, plongées dans la même solution de suspension colloïdale Au@MA, dont l'une (A) non connectée et l'autre (B) connectée au système électrochimique.

Ce changement de couleur est attribué au dépôt de nanoparticules d'or. Comme les cations diazonium peuvent se greffer spontanément sur différents matériaux, le dépôt peut également être observé en absence de potentiel électrique [15,16]. Cependant le changement de couleur (c'est-à-dire la quantité de nanoparticules d'or greffées) est beaucoup moins visible quand l'électrode ITO est immergée dans la même suspension électrolytique durant la même durée mais sans connexion électrique, comme le montre la Photo 3.4. La présence des nanoparticules d'or a été confirmée par analyse élémentaire sur des électrodes ITO qui contrairement aux électrodes d'or ne contient l'élément or. Après avoir été soumis au potentiel de -430 mV dans une suspension de nanoparticules Au@MA contenant NaNO_2 , les substrats (lavés à l'acétone) ont été immergés dans une solution d'eau régale connue pour dissoudre l'or métallique. L'analyse de ces solutions révèle d'une part la

présence d'or qui provient nécessairement des surfaces traitées à l'eau régale et donc du greffage des nanoparticules sur les électrodes. D'autre part, l'analyse élémentaire montre que la quantité d'or augmente linéairement avec le temps (Figure 3.11 et Tableau 3.1).

Temps (s)	Teneur Au (mg/L)	Masse Au (mg)	Nombre de couches de nP Au	n(Au)/cm ²	nP(Au) mol/cm ²	Diazo mol/cm ²	Diazo réduit/nP
40	0,67	0,00469	9,0453	1,5871.10 ⁻⁵	8,3533. 10 ⁻⁹	3,10. 10 ⁻⁶	3,71. 10 ²
60	0,72	0,00504	9,7203	1,7055. 10 ⁻⁵	8,9767. 10 ⁻⁹	4,14. 10 ⁻⁶	4,61. 10 ²
120	1,61	0,01127	21,7357	3,8138. 10 ⁻⁵	2,0073. 10 ⁻⁸	6,42. 10 ⁻⁶	3,20. 10 ²
240	3,23	0,02261	43,6065	7,6514. 10 ⁻⁵	4,0270. 10 ⁻⁸	1,03. 10 ⁻⁵	2,56. 10 ²

Tableau 3.1 : Analyse ICP, quantité des nanoparticules d'or déposées à la surface d'ITO par temps de dépôt.

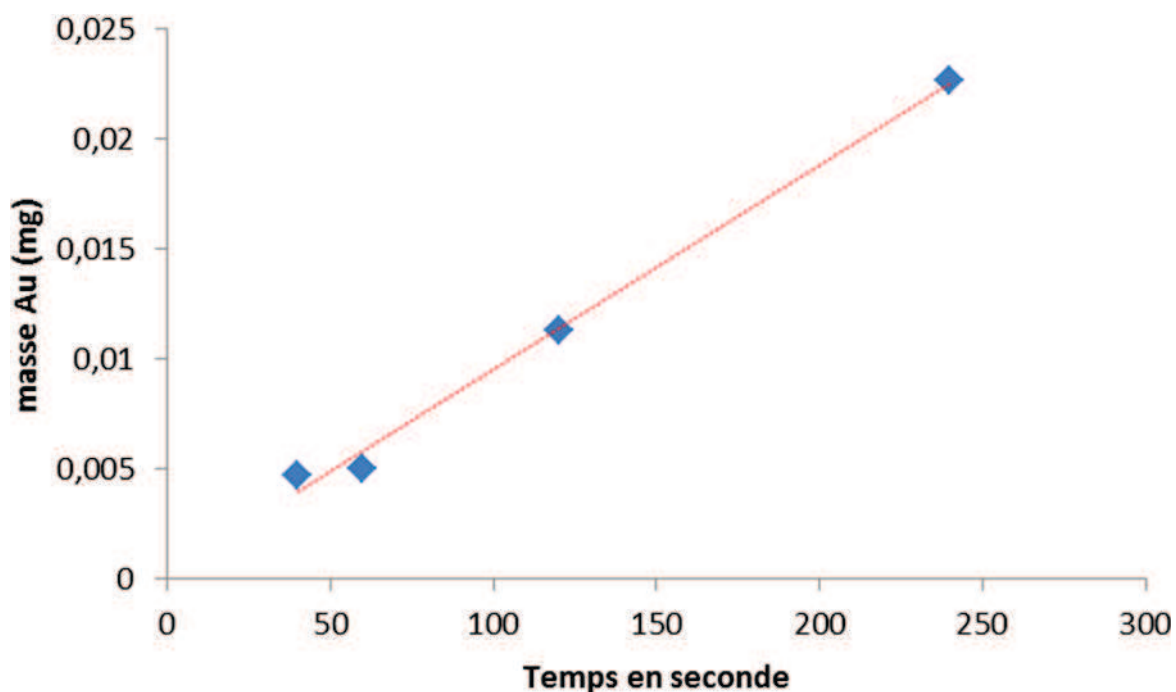


Figure 11 : figure représentant la quantité de masse d'or sur le substrat en fonction du temps.

A partir d'un modèle géométrique simple dans lequel nous supposons un arrangement hexagonal compact (avec une compacité de 0,74) et une surface occupée correspondant à une nanoparticule de 6,5 nm de diamètre (diamètre du cœur : 3,5 nm et distance interparticulaire : 3 nm d'après clichés TEM), il est possible de montrer que les dépôts sont constitués de plusieurs couches de nanoparticules dont le nombre augmente avec le temps de dépôt (Tableau 3.1). La formation de ces multicouches résulte probablement de la réaction entre radicaux phényle portés par des particules différentes (formation de ponts biphenyle entre deux nanoparticules) et/ou entre cations diazonium et cycles aromatiques (ponts azoïques) (Chapitre 1). Le nombre relativement élevé de couches formé semble indiquer que le dépôt conserve un caractère conducteur grâce au cœur d'or de chaque nanoparticule.

La voltampérométrie cyclique réalisée en milieu corrosif (0, 1 M NaBr / 0.1 M HCl_{aq}) a également permis de mettre en évidence la présence des nanoparticules d'or sur les électrodes ITO et GC. Après avoir été soumises à un potentiel de - 430 mV en présence de nanoparticules Au@MA et de NaNO₂, les électrodes ITO et GC abondamment rincées ont subi un balayage cyclique de potentiels de - 100 mV à + 800 mV/ECS à une vitesse de 50 mV.s⁻¹. Quelle que soit la nature de l'électrode (ITO ou GC) et la durée du dépôt, les cycles résultants présentent un pic anodique ($E_{pa} = 700$ mV/ECS) et un pic cathodique ($E_{pc} = 250$ mV/ECS) (Figure 3.12). En outre la hauteur de ces pics augmente avec la durée du dépôt. Le pic anodique est attribué à l'oxydation de l'or métallique (Au⁰) qui confirme que des nanoparticules d'or ont été greffées sur ces surfaces et que leur quantité augmente avec le temps de dépôt. Le pic cathodique est le reflet de l'oxydation de l'or métallique car il résulte de la réduction des ions Au³⁺ libérés au cours de la dissolution anodique.

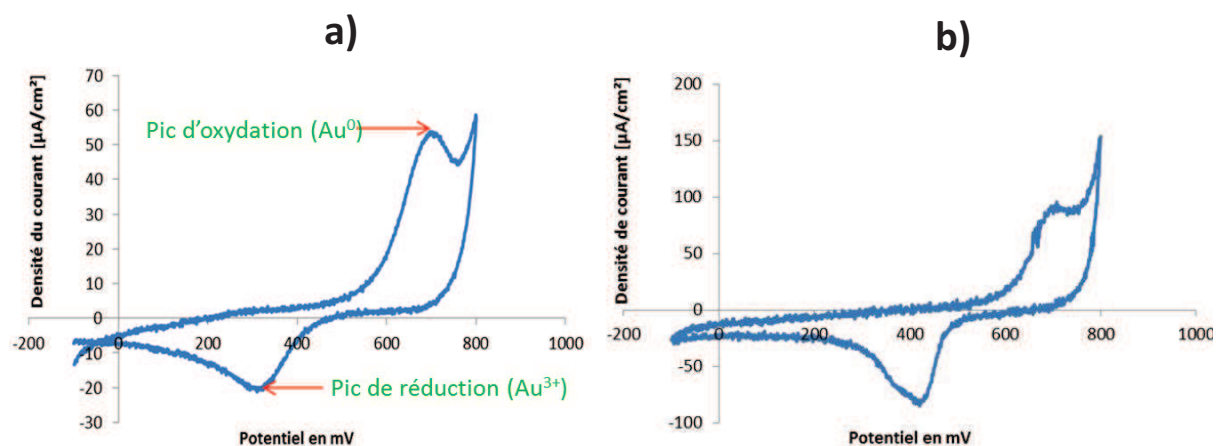


Figure 3.12 : Voltammogramme cyclique des dépôts électrochimiques des Au@MA **a)** sur l'électrode d'ITO à $t = 20s$ et **b)** sur l'électrode de GC à $t = 40s$.

La présence de l'or sur les électrodes ITO et GC révélée par l'analyse élémentaire et par la dissolution anodique suivie par voltampérométrie cyclique permet de déduire que l'addition de NaNO_2 à une suspension de nanoparticules d'or Au@MA à $\text{pH} \sim 1$ conduit au greffage de plusieurs couches de nanoparticules d'or lorsque un potentiel de -430 mV/ECS a été appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence. Cependant ces techniques de caractérisation qui reposent sur la détection de l'or ne peuvent pas être mises en œuvre lorsque le dépôt de nanoparticules d'or a été réalisé sur un substrat d'or. La comparaison des courbes qui représentent la charge déposée en fonction du temps sur les différents types d'électrode montre qu'il n'existe pas de différence significative entre les expériences réalisées sur les électrodes d'or et celles effectuées sur les électrodes ITO et GC. Pour cette raison, nous pouvons raisonnablement penser que les nanoparticules d'or ont également été greffées sur les électrodes d'or par réduction électrochimique des cations diazonium. Afin de confirmer leur présence, la morphologie des substrats a été étudiée par microscopie à force atomique (AFM) avant et après électrogreffage. L'AFM est un outil adapté pour fournir des informations détaillées sur la topographie de surface de l'échantillon et la distribution des particules greffées sur le substrat. Nous avons opéré en mode contact qui repose sur des forces répulsives de très courte portée (quelques nm au maximum) ce qui permet d'atteindre des résolutions atomiques de bonne qualité. Cependant la visualisation de si petites nanoparticules (diamètre du cœur d'or $3,5 \text{ nm}$) nécessite de travailler sur des surfaces ultraplans afin d'observer la modification de la rugosité engendrée par le greffage

des nanoparticules d'or. C'est la raison pour laquelle nous avons travaillé avec des électrodes d'or dont la surface est constituée d'une mosaïque de terrasses ultraplans. Ces substrats d'or, qui ont été pour des applications de biodétection par l'équipe de Wilfrid Boireau (FEMTO-ST) paraissent par conséquent bien adaptés pour étudier l'influence de la morphologie des surfaces sur la sensibilité. La microscopie réalisée sur des surfaces nues, met clairement en évidence la planéité des terrasses d'or (Figure 3.13a). L'aspect lisse de ces terrasses disparaît rapidement lorsque ces électrodes à terrasses d'or sont soumises au processus qui conduit au greffage électrochimie des nanoparticules Au@MA. Même pour les temps courts (20 s), le dépôt apparaît granuleux sur toute la surface analysée (Figure 3.13b-d). Cette modification d'aspect de la surface résulte du greffage des nanoparticules d'or dont la répartition semble homogène. A partir de 60 s, la différence de niveau entre les terrasses est nettement estompée. Cela confirme que l'épaisseur du dépôt et donc la quantité de nanoparticules greffées augmente avec le temps de dépôt.

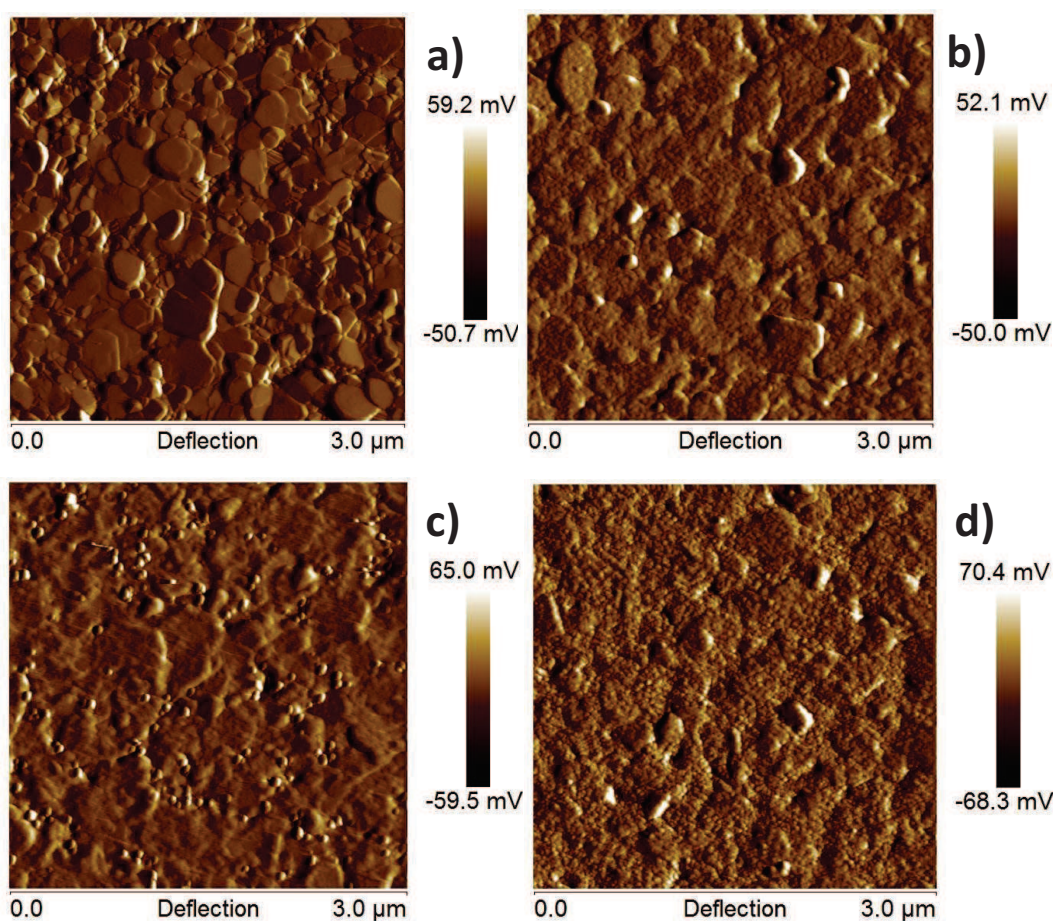


Figure 3.13 : Image AFM des dépôts électrochimique des Au@MA sur des surfaces d'or terrasses à différents temps **a)** la surface terrasse sans modification ; puis la surface terrasse avec modification **b)** à t=20s, **c)** à t=40s et **d)** à t=60s.

Le greffage électrochimique des nanoparticules Au@MA est validé par les différentes techniques de caractérisation que nous avons mises en œuvre. Puisque nous avons réussi à transformer des surfaces totalement planes en surface rugueuse, il reste désormais à vérifier l'influence de la nanostructuration sur la sensibilité de ces substrats d'or à détecter un événement de capture de molécules biologiques (biodétection). En effet, les travaux de Bin ont montré qu'une surface rugueuse présentait une meilleure sensibilité.

Afin de réaliser une telle étude avec le moins de biais possible, le comportement des terrasses d'or modifiées par des nanoparticules d'or a été comparé avec celui de la surface ultraplaine non modifiée de la même électrode. Les électrodes à recouvrir ont donc été plongées dans la solution électrolytique (contenant les nanoparticules d'or Au@MA et NaNO_2) de façon à laisser une partie émergée suffisante (environ la moitié de l'électrode). Cette partie émergée (ultraplaine) ne sera donc pas modifiée contrairement à la partie immergée qui sera recouverte par les nanoparticules, comme nous l'avons démontré précédemment. Les essais de biodétection reposeront sur la reconnaissance de la streptavidine par la biotine. Ce couple de biomolécules est très utilisé pour ce type d'application car ces deux biomolécules possèdent une forte affinité entre elles et établissent une interaction spécifique et quasi irréversible. La détection de la capture de la streptavidine par la biotine sera assurée par le phénomène de chimiluminescence du luminol. Le luminol est connu pour produire de la lumière (c'est-à-dire pour émettre des photons dans le domaine du visible) au cours de son oxydation par le peroxyde d'hydrogène (par exemple). Le schéma 3.2 décrit la succession de réactions qui conduit à la luminescence lorsque le luminol (5-amino-2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione) est mis en contact avec l'oxydant (le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)) en milieu basique. Cet enchaînement produit l'anion aminophthalate dont le retour à l'état fondamental s'accompagne de l'émission d'un photon. Cependant cette réaction nécessite d'être catalysée pour permettre une observation dans un délai raisonnable.

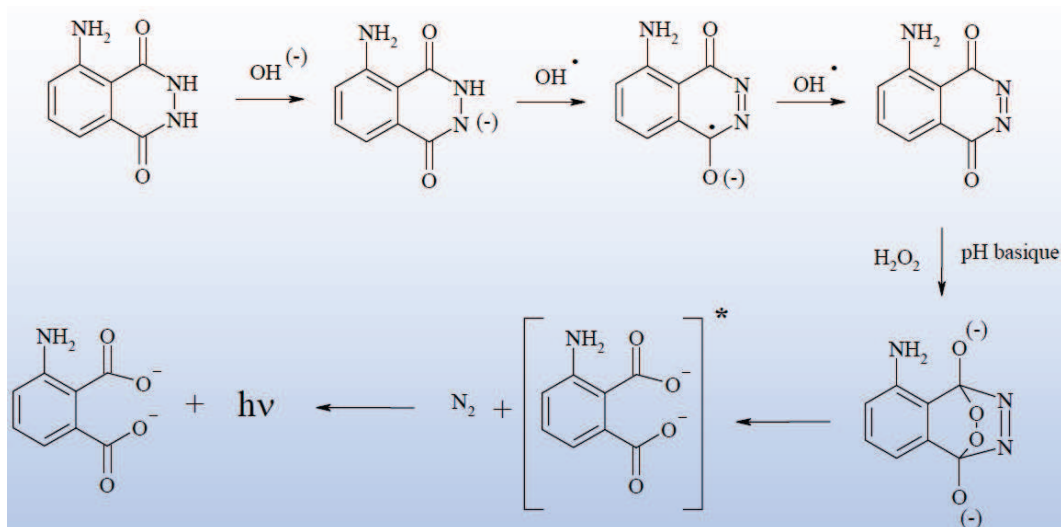


Schéma 3.2 : Mécanisme réactionnel de la chimiluminescence du luminol (sans catalyseur).

En 1997, Blum et son équipe ont montré que la réaction entre le luminol et le peroxyde d'hydrogène était catalysée en présence de la peroxydase (une enzyme) [17] (**Schéma 3.3**). C'est pour cette raison que les tests de détection par chimiluminescence reposant sur la reconnaissance de la streptavidine par la biotine sont réalisés avec une streptavidine couplée à la peroxydase (composé commercialement disponible).

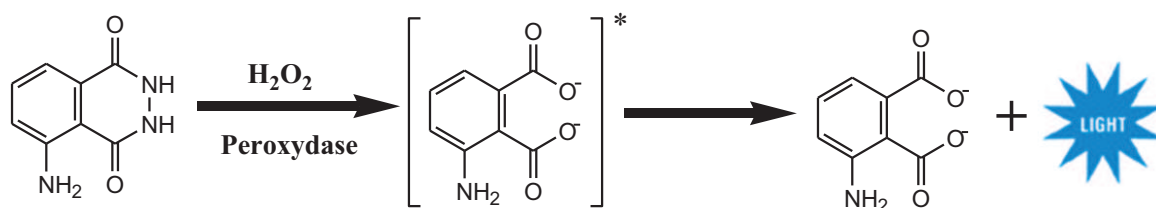


Schéma 3.3 : Chimiluminescence du luminol catalysée par la peroxydase.

Dans le cadre de notre étude visant à mettre en évidence l'effet de la nanostructuration sur la sensibilité de la détection, les surfaces ont été recouvertes par un chapelet linéaire de zones circulaires riches en biotine. Cette dernière a été immobilisée à la surface des deux parties du substrat d'or (rugueuse et ultraplaine) grâce à une modification préalable par un pentapeptide (P5). Parmi les cinq motifs acide aminé, P5 est composé de trois motifs cystéine consécutifs à l'extrémité opposée de la biotine. Comme la cystéine porte une

fonction thiol, cette succession de trois motifs cystéine est censée favoriser un accrochage durable de ce peptide et donc de la biotine. Après lavage et saturation de la surface non biotinylée par l'albumine (afin d'éviter l'adsorption non-spécifique), l'ensemble des zones biotinylées est exposé à une solution de streptavidine-peroxydase puis après incubation et lavage à une solution contenant le luminol et le peroxyde d'hydrogène (Figure 3.14).

La lumière produite par l'oxydation catalysée du luminol qui reflète l'interaction biotine-streptavidine est ensuite détectée par une caméra CCD (Figure 3.15).

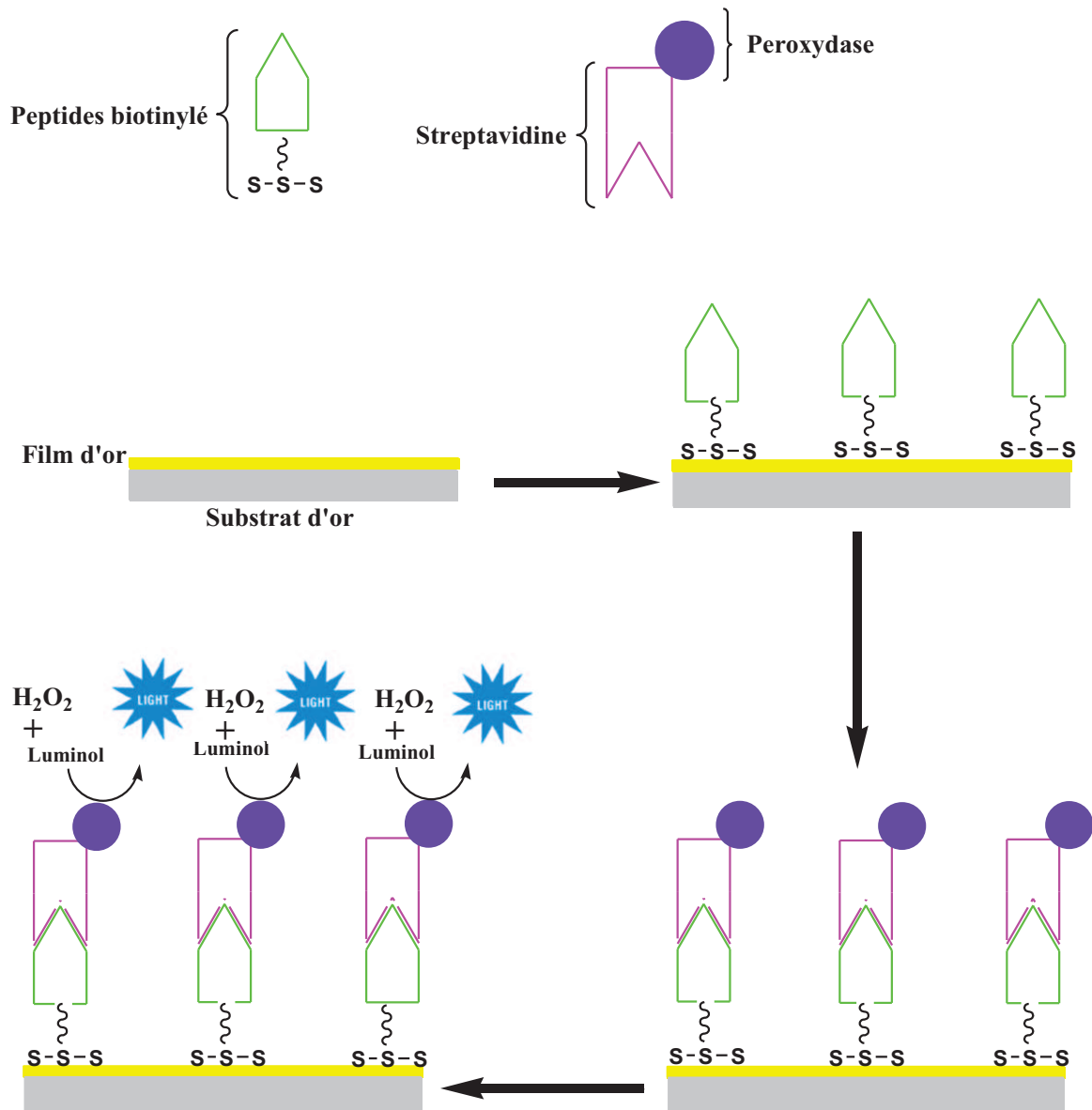


Figure 3.14 : principe de la biodétection Biotine/Streptavidine par chimiluminescence du luminol.

D'après les images enregistrées par la caméra CDD, les zones riches en biotine deviennent lumineuses dès qu'elles sont en contact avec le luminol. Puisque la luminescence provient de l'oxydation du luminol catalysée par la peroxydase couplée à la streptavidine, nous pouvons affirmer que la streptavidine-peroxydase a été immobilisée à la surface de l'électrode. Cela montre clairement que la biotine a conservé sa capacité à reconnaître la streptavidine malgré sa modification par le peptide. De plus, nous pouvons remarquer que la lumière est produite sur toute la longueur du chapelet de zones enrichies en biotine (et donc en streptavidine peroxydase). La production de lumière est donc observée sur les terrasses ultraplans et sur les terrasses fonctionnalisées par les nanoparticules d'or. Cependant, il apparaît clairement que, pour un temps de dépôt donné, l'intensité lumineuse est nettement supérieure lorsque l'oxydation du luminol a lieu sur les terrasses recouvertes par les nanoparticules d'or (Figure 3.15). Afin de comparer l'effet du temps de dépôt, l'intensité lumineuse de la surface rugueuse a été, pour un temps de dépôt donné (20, 40 et 60 s), rapportée à celle de la surface ultraplaine de la même électrode (Figure 3.16). S'il est difficile d'extraire une tendance significative avec seulement trois temps de dépôt, il semble tout de même qu'il existe un temps optimal de dépôt (40 s) pour lequel la lumière émise par l'oxydation du luminol est presque quatre fois plus intense que dans le cas des temps de dépôt plus courts (20 s) et plus long (60 s).

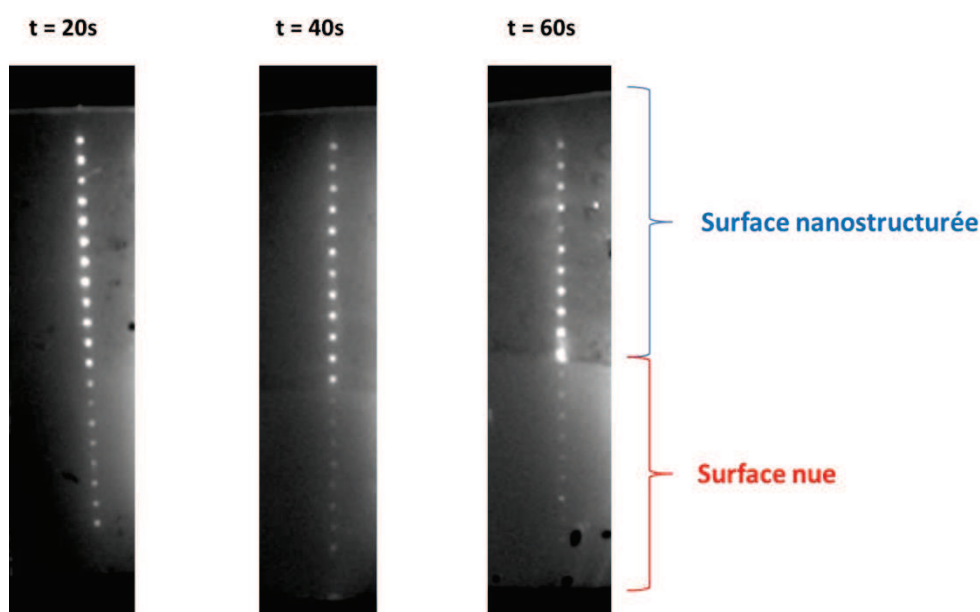


Figure 3.15 : Substrats d'or couverts de terrasses ayant été soumis à des tests de reconnaissance biotine/streptavidine après différents temps de dépôts de nanoparticules Au@MA.

Ces expériences de reconnaissance biotine/streptavidine par la chimiluminescence du luminol montrent que l'aspect de la surface joue un rôle important sur la sensibilité. Les terrasses d'or rendues rugueuses par le greffage électrochimique de nanoparticules d'or favorisent l'oxydation du luminol car la lumière produite est au moins deux fois plus intense que celle produite par l'oxydation du luminol sur les terrasses ultraplans. Cette augmentation est liée à la présence de nanoparticules. Mais il est difficile de distinguer l'effet de l'augmentation de surface résultant de la présence des nanoparticules qui conduit à immobiliser un plus grand nombre de biotine et donc de streptavidine-peroxydase de l'effet catalytique des nanoparticules d'or révélé par des travaux précédents sur des suspensions de nanoparticules d'or fonctionnalisées par le luminol et sur des surfaces d'or dont la nanostructuration était contrôlée par un traitement thermique [Langmuir 2005, AdvFunctMater 2006...][18]..

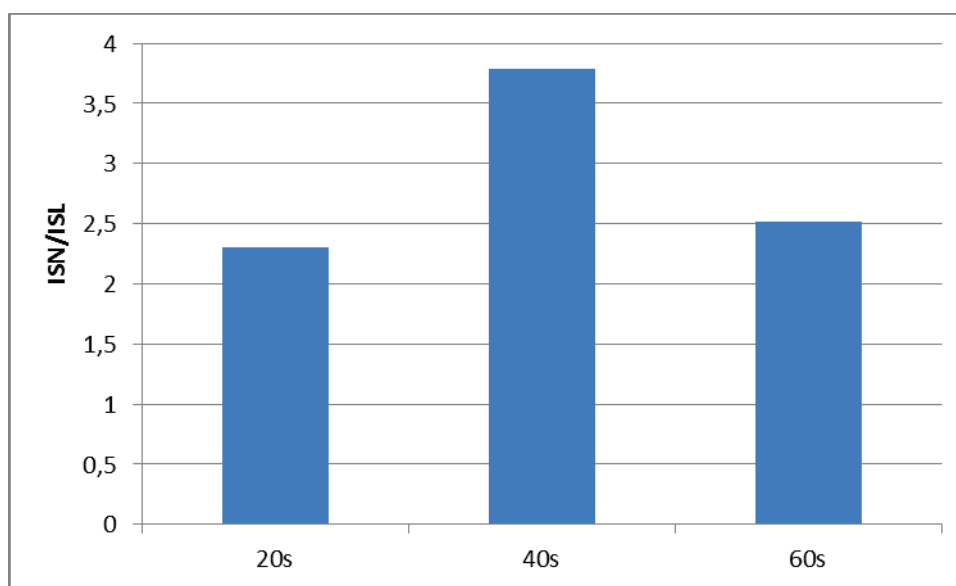


Figure 3.16 : Intensité lumineuse produite à partir de la surface nanostructurée (ISN) rapportée à celle produite à partir de la surface lisse (ISL) en fonction du temps de dépôt des nanoparticules Au@MA sur des substrats couverts de terrasses d'or.

4°/ Conclusion

En s'inspirant de la méthode biphasique de Brust, nous avons réussi à obtenir des nanoparticules hybrides composées d'un cœur d'or d'environ 3,5 nm de diamètre fonctionnalisé par une couche organique constituée de molécules de mercaptoaniline (environ 600 ligands par nanoparticules d'or). Ces ligands thiolés permettent le contrôle de la taille des nanoparticules d'or durant la synthèse des nanoparticules. Ils assurent également la stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules Au@MA par répulsion électrostatique pour de faibles valeurs de pH (inférieures à 3). La stabilité colloïdale à pH 1 est une caractéristique essentielle car elle a permis d'envisager le greffage électrochimique des nanoparticules d'or qui repose sur une réaction de diazotation se produisant en phase aqueuse à pH 1.

L'ajout de NaNO_2 à une suspension colloïdale de nanoparticules Au@MA à pH 1 maintenue au potentiel de -430 mV a rendu possible le greffage des nanoparticules d'or sur différentes surfaces conductrices (carbone vitreux, ITO et terrasses d'or) comme l'ont révélé les différentes caractérisations (voltampérométrie cyclique, analyse élémentaire ICP et imagerie AFM). Lorsque ces nanoparticules d'or ont été greffées par voie électrochimique sur des électrodes d'or constituées d'une mosaïque de terrasses ultraplans, une augmentation de la sensibilité a été constatée dans le cas de la reconnaissance de la biotine par la streptavidine-peroxydase. La capture spécifique et quasi irréversible de la streptavidine a été révélée par la chimiluminescence du luminol catalysée par la peroxydase couplée à la streptavidine. La lumière produite par l'oxydation du luminol est en effet plus intense (d'un facteur 4) dans les zones où les terrasses ont été fonctionnalisées par des particules d'or. Le greffage de nanoparticules d'or s'avère donc très efficace pour améliorer la sensibilité d'une surface sensible d'un biocapteur. Cependant à ce stade de l'étude, il est difficile de distinguer la contribution de l'augmentation de la surface résultant de l'immobilisation des nanoparticules d'or de celle de l'effet catalytique des nanoparticules d'or greffées.

Références

- [1] M. Brust, M. Walker, D. Bethell, D.J. Schiffrin, R. Whyman, Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1994) 801–802.
- [2] M. Delamar, R. Hitmi, J. Pinson, J.M. Saveant, Covalent modification of carbon surfaces by grafting of functionalized aryl radicals produced from electrochemical reduction of diazonium salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 114 (1992) 5883–5884.
- [3] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology*, *Chem. Rev.*, 104 (2004) 293–346.
- [4] Nanofabrication Towards Biomedical Applications - C S S R Kumar, Docstoc.com, (n.d.).
- [5] P.N. Prasad, *Introduction to Biophotonics*, John Wiley & Sons, 2004.
- [6] N. Toshima, T. Yonezawa, Bimetallic nanoparticles—novel materials for chemical and physical applications, *New J. Chem.*, 22 (1998) 1179–1201.
- [7] T. Graham, Liquid Diffusion Applied to Analysis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, 151 (1861) 183–224.
- [8] M. Giersig, P. Mulvaney, Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition, *Langmuir*, 9 (1993) 3408–3413.
- [9] M.J. Hostetler, J.E. Wingate, C.-J. Zhong, J.E. Harris, R.W. Vachet, M.R. Clark, J.D. Londono, S.J. Green, J.J. Stokes, G.D. Wignall, G.L. Glish, M.D. Porter, N.D. Evans, R.W. Murray, Alkanethiolate Gold Cluster Molecules with Core Diameters from 15 to 52 nm: Core and Monolayer Properties as a Function of Core Size, *Langmuir*, 14 (1998) 17–30.
- [10] S. Chen, K. Kimura, Synthesis and Characterization of Carboxylate-Modified Gold Nanoparticle Powders Dispersible in Water, *Langmuir*, 15 (1999) 1075–1082.
- [11] R.L. McCreery, *Advanced Carbon Electrode Materials for Molecular Electrochemistry*, *Chem. Rev.*, 108 (2008) 2646–2687.
- [12] C.A. Paddon, F. Marken, Hemoglobin adsorption into TiO₂ phytate multi-layer films: particle size and conductivity effects, *Electrochem. Commun.*, 6 (2004) 1249–1253.
- [13] M.K. Ram, P. Bertoncello, H. Ding, S. Paddeu, C. Nicolini, Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique, *Biosens. Bioelectron.*, 16 (2001) 849–856.
- [14] C. Elie-Caille, J.-Y. Rauch, A. Rouleau, W. Boireau, Preparation of flat gold terraces for protein chip developments, *IET Micro Nano Lett.*, 4 (2009) 88–94.
- [15] M. Joselevich, F.J. Williams, Synthesis and Characterization of Diazonium Functionalized Nanoparticles for Deposition on Metal Surfaces, *Langmuir*, 24 (2008) 11711–11717.
- [16] A. Mesnage, X. Lefèvre, P. Jégou, G. Deniau, S. Palacin, Spontaneous grafting of diazonium salts: chemical mechanism on metallic surfaces, *Langmuir ACS J. Surf. Colloids*, 28 (2012) 11767–11778.
- [17] L.J. Blum, *Bio- and Chemi-Luminescent Sensors*, WORLD SCIENTIFIC, 1997.
- [18] S. Roux, B. Garcia, J.-L. Bridot, M. Salomé, C. Marquette, L. Lemelle, P. Gillet, L. Blum, P. Perriat, O. Tillement, Synthesis, Characterization of Dihydrolipoic Acid Capped Gold Nanoparticles, and Functionalization by the Electroluminescent Luminol, *Langmuir*, 21 (2005) 2526–2536.

CONCLUSION GENERALE

Le travail de cette thèse s'est inscrit dans un projet plus global qui vise à améliorer la sensibilité des biocapteurs développés pour la détection de biomarqueurs du cancer à partir de fluides biologiques complexes. La présence de ces biomarqueurs à l'état de traces dans les fluides biologiques complexes peut souvent être interprétée comme un signe précoce de l'apparition d'un cancer. Une telle détection permettrait d'établir un diagnostic fiable bien avant les symptômes et donc de garantir un traitement plus confortable et plus efficace pour le patient. Parmi les différentes stratégies développées afin d'améliorer la sensibilité des biocapteurs, la nanostructuration est une voie d'exploration en plein essor. Dans cette perspective, l'objectif de cette thèse a donc consisté à développer des méthodes de greffage (préférentiellement électrochimique) de nanoparticules afin de modifier la topographie de la surface. L'immobilisation de nanoparticules doit en effet déboucher sur une amélioration de la sensibilité en augmentant le nombre de ligands de capture (en raison de l'augmentation de la surface) et en ajustant favorablement leur orientation.

Dans un premier temps nous avons développé deux types de structures nanométriques : des particules de silice fluorescentes recouvertes par des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des groupements alcyne ($\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$) et des nanoparticules d'or fonctionnalisées par la mercaptoaniline (Au@MA). Les nanostructures $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$ ont été assemblées par et conçues pour le greffage par cycloaddition 1,3-dipolaire. L'assemblage des nanoparticules d'or et des particules de silice a été rendu possible par la fonctionnalisation des particules de silice fluorescentes par des groupements azoture et des particules d'or par des triples liaisons $\text{C}\equiv\text{C}$ (greffage de la propargylamine). La réaction catalysée par le cuivre(I) entre les fonctions azoture et alcyne a permis la décoration des particules de silice fluorescentes par plusieurs dizaines de nanoparticules d'or. Comme seule une faible proportion des fonctions alcyne est, pour des raisons géométriques, impliquée dans le couplage des nanoparticules d'or et des particules de silice, les fonctions alcyne intactes (sur la partie qui n'est pas en contact avec la silice) ont été exploitées pour immobiliser ces structures $\text{SiO}_2\text{-Au@alcyne}$ sur des surfaces planes d'or. Nous avons montré que le greffage de ces nanostructures fluorescentes était possible en présence d'un catalyseur à base de

cuivre(I) si la surface plane d'or était au préalable recouverte d'une monocouche autoassemblée de molécules thiolées dont certaines sont terminées par une fonction azoture. D'autre part, le greffage chimique semble plus efficace que la méthode électrochimique car elle permet une meilleure couverture du substrat par les particules SiO₂-Au@alcyne. La différence constatée entre ces deux voies résulte probablement d'une meilleure disponibilité du cuivre (I) produite par réduction chimique du cuivre(II) par l'acide ascorbique. Cependant le taux de couverture n'est pas suffisant pour exploiter cette modification de surface pour des applications de biodétection.

En parallèle, nous avons travaillé sur le développement de nanoparticules d'or recouvertes de fonctions amine aromatique primaire avec l'objectif de les greffer par voie électrochimique. Dans un premier temps, des nanoparticules d'or fonctionnalisées par la mercaptoaniline ont été synthétisées en réduisant un sel d'or (HAuCl₄, 3H₂O) par NaBH₄ en présence de ligands dans un système biphasique eau-toluène (adaptation de la méthode biphasique de Brust). Ces nanoparticules sont constituées d'un cœur d'or (diamètre 3,5 nm) et d'une couche organique de mercaptoaniline qui assure par répulsion électrostatique la stabilité colloïdale à pH 1. Comme la diazotation a lieu dans ce domaine de pH, la stabilité colloïdale à pH 1 est donc très importante car elle garantit la possibilité de convertir les fonctions amine primaire aromatique en cations diazonium sans altérer la suspension colloïdale. En présence de nitrite de sodium qui est un acteur essentiel pour convertir les fonctions amine primaire de la mercaptoaniline en cations diazonium, il a été possible de greffer les nanoparticules Au@MA par voie électrochimique sur différentes surfaces conductrices. Contrairement au greffage des nanostructures fluorescentes SiO₂-Au@alcyne par cycloaddition 1,3-diploaire (*vide supra*), cette stratégie de greffage reposant sur la réduction électrochimique des cations diazonium possède l'avantage de ne pas requérir de fonctionnalisation préalable du substrat à recouvrir. En outre, une couverture complète de la surface immergée des électrodes est rapidement obtenue.

Le greffage des nanoparticules d'or sur des surfaces d'or recouvertes d'une mosaïque de terrasses ultraplans rend ces surfaces beaucoup plus sensibles. Leur capacité à détecter des événements de reconnaissance entre la biotine et la streptavidine par chimiluminescence du luminol a été accrue d'un facteur 4. A ce stade il reste cependant difficile d'évaluer les contributions respectives de l'augmentation de surface et de l'effet catalytique des

nanoparticules d'or sur l'oxydation du luminol. Ces résultats très prometteurs nous encouragent à persévérer dans cette voie afin d'abaisser encore le seuil de détection. Dans cette optique, il semble important d'étudier l'influence de la taille des cœurs d'or, de la nature du métal (argent, platine, palladium) et du taux de greffage de nanoparticules.