



HAL
open science

Synthès de nano-films bio-fonctionnels pour l'immobilisation spécifique d'espèces biologiques

Yannick Mousli

► **To cite this version:**

Yannick Mousli. Synthès de nano-films bio-fonctionnels pour l'immobilisation spécifique d'espèces biologiques. Chimie organique. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0840 . tel-02453633

HAL Id: tel-02453633

<https://theses.hal.science/tel-02453633>

Submitted on 24 Jan 2020

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

Par Yannick MOUSLI

**Synthèse de nano-films biofonctionnels pour
l'immobilisation spécifique d'espèces biologiques**

Sous la direction de : Luc VELLUTINI

Membres du jury :

Mme LECOMTE Sophie
M. HUMBLLOT Vincent
M. TRON Thierry
Mme ISHOW Elena
Mme GENIN Emilie
M. VELLUTINI Luc

Directrice de Recherche, Université de Bordeaux
Chargé de Recherche, UPMC Paris 6
Directeur de Recherche, Université Aix-Marseille
Professeure, Université de Nantes
Maitre de Conférence, Université de Bordeaux
Maitre de Conférence, Université de Bordeaux

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Directeur de
thèse

REMERCIEMENTS

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein de l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux, dirigé par Eric FOUQUET, parmi le groupe Chimie Moléculaire et Matériaux, dirigé successivement par Thierry TOUPANCE et Luc VELLUTINI. Je tiens à leur exprimer ma gratitude pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse, et accueilli, au sein de ce laboratoire.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe C2M, permanents comme doctorants et post-doctorants, pour m'avoir chaleureusement accueilli et m'avoir rapidement accepté au sein de l'équipe. Je souhaite sincèrement remercier mon directeur de thèse, Luc VELLUTINI, pour m'avoir aidé, accompagné, et soutenu durant ces trois années, plus ou moins difficiles, et pour avoir su être présent et disponible au jour le jour.

Je tiens tout particulièrement à exprimer mon immense gratitude envers deux personnes qui ont joué un rôle proéminent durant ces trois dernières années, et sans qui je n'aurais sûrement pas écrit le présent manuscrit. Tout d'abord Marie DEGUEIL, que je remercie infiniment d'avoir été là, autant d'un côté scientifique que personnel : merci pour tout ce que tu m'as apporté et pour ta sympathie quotidienne, pour tous ces moments passés durant cette thèse, et bien d'autres encore ! Je suis aussi extrêmement reconnaissant envers Emilie GENIN, avec qui une relation toute particulière a pris place à son arrivée dans notre groupe. Je tiens à la remercier pour la rigueur qu'elle a su m'apporter, ainsi que pour son dynamisme, sa gentillesse, sa bienveillance, ... Je ne saurais où m'arrêter en adjectifs, ... mais j'espère qu'elle sait que pour moi, sa présence était essentielle.

Je voudrais aussi remercier Odile BABOT, Karine HEUZE et Bernard BENNETAU, pour leur sympathie et gentillesse au quotidien.

Un grand merci également aux thésards du groupe matériaux, pour tous les bons moments passés ensemble. Merci à Amandine et à Guillaume pour m'avoir introduit au groupe : vous avez pris bien soin du petit nouveau ! Merci à Imane dite *Barbarita* pour sa bonne humeur mais aussi pour son grain de folie, toujours prompt à égayer le labo ! Je n'oublie pas de remercier également tous les autres doctorants du laboratoire, qui participent activement à la bonne ambiance et à la cohésion du groupe.

To my English speaking friends, I'd like to particularly thank my labmate Susanne, whom I shared an office with for almost two years. Thank you for the talks and the support, and all those Harribos directly imported from Germany : they've been put to great use ! I would also like to thank Caroline, for her fun and easy-going spirit, and for enabling me to speak english with a « proper Brit » ! Finally, I wish good luck to Juan, whom I hopefully will see defend in exactly a year !

Enfin, j'aimerais remercier des personnes qui me sont proches. Mes parents, bien sûr, pour m'avoir poussé à poursuivre des études scientifiques, mais aussi Jérémie, pour m'avoir supporté tout au long de cette thèse ! Un grand merci à ma colloc' de toujours, Rosine : pour ces trois années qui resteront un excellent souvenir.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : Etude bibliographique	5
A- Bio-capteurs	7
a- Description des bio-capteurs	7
b- Classification des bio-capteurs	8
1- <i>Transducteurs</i>	8
2- <i>Bio-récepteur</i>	10
B- Immobilisation de bio-récepteurs	12
a- Immobilisation non covalente	12
1- <i>Adsorption physique</i>	12
2- <i>Microencapsulation et inclusion</i>	13
3- <i>Affinité biologique</i>	14
b- Immobilisation covalente	16
1- <i>Par réticulation</i>	17
2- <i>Par couplage à des monocouches auto-assemblées</i>	17
C- Les Self-assembled monolayers (SAMs)	20
a- Formation des SAMs sur SiO ₂	22
b- Paramètres physiques influençant la formation des SAMs	24
1- <i>Le solvant</i>	24
2- <i>La température</i>	25
c- Paramètres structuraux influençant la formation des SAMs	26
1- <i>La longueur de chaîne alkyle</i>	26
2- <i>Le groupement fonctionnel terminal</i>	26
3- <i>Fonctions chimiques favorisant l'auto-assemblage et la cohésion des SAMs</i>	29
i- Formation de liaisons hydrogène intermoléculaires	29
ii- Utilisation du π -stacking	32
d- Les SAMs mixtes	32
D- Résumé	34
CHAPITRE II : Synthèse de SAMs azoture	41
A- Les azotures	44
a- Chimie des azotures	44
b- Surfaces modifiées par des azotures	46
B- Synthèse d'agents de couplage comportant un motif urée et une fonction azoture	49

a- Synthèse du 10-isocyanatodéc-1-ène 7	50
b- Synthèse du 8-azido-1-octylamine à partir du 8-amino-1-octanol	51
1- <i>Protection de la fonction amine et activation du groupement hydroxyle</i>	51
i- Protection de l'amine par un groupement BOC	51
ii- Activation du groupement hydroxyle en méthanesulfonate	51
2- <i>Obtention de l'azoture 4 par substitution nucléophile</i>	52
3- <i>Obtention du sel de 8-azido-1-octylammonium 5</i>	52
c- Couplage avec le 10-isocyanato-déc-1-ène 7	52
d- Hydrosilylation du précurseur urée-azoture 8	53
1- <i>Hydrosilylation catalytique des oléfines terminales</i>	53
2- <i>Hydrosilylation d'oléfine modèle</i>	55
i- Synthèse du 11-azido-undéc-1-ène 11	55
ii- Hydrosilylation de la molécule modèle 11	57
3- <i>Hydrosilylation de l'azoture-urée insaturé 8</i>	60
C- Synthèse et caractérisation de SAMs 100% urée-azoture	64
a- Substrats de greffage	64
b- Synthèse et caractérisation de la SAM-alkyle-N ₃	65
1- <i>Greffage du 11-azidoundécyltriméthoxysilane 12</i>	65
2- <i>Formation d'une SAM-N₃ par post-fonctionnalisation</i>	69
c- Synthèse de la SAM-urée-N ₃ -100%	72
1- <i>Caractérisation par PM-IRRAS</i>	73
2- <i>Caractérisation par AFM</i>	74
3- <i>Comparaison des SAM-urée-N₃-100% et SAM-alkyle-Br/N₃</i>	75
D- Synthèse et caractérisation de SAMs mixte	78
a- SAMs-urée mixtes azoture/méthyle 50% et 25%	78
1- <i>Etude comparative des SAMs en PM-IRRAS</i>	79
2- <i>Caractérisation par AFM des deux SAMs mixtes</i>	80
b- SAM-urée libre-N ₃ -50%	82
1- <i>Caractérisation par PM-IRRAS</i>	83
2- <i>Caractérisation par AFM</i>	84
E- Bio-fonctionnalisation des SAMs azoture par chimie « click »	85
a- Mise au point de la chimie click sur les surfaces « azoture »	85
1- <i>Synthèse de la molécule sonde 4-(4-nitrophenoxy)-but-1-yne 23</i>	85
2- <i>Mise au point des conditions pour la chimie « click » de surface</i>	86
i- Essais dans le DMF	87
ii- Essais dans le mélange DMSO/H ₂ O	88
3- <i>Application à la SAM-urée-N₃-100%</i>	88
b- Click de la biotine-alcyne	91
1- <i>Mise au point sur la SAM-alkyle-Br/N₃</i>	91
2- <i>Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée-N₃-100%</i>	92
3- <i>Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée-N₃-50% et la SAM-urée-N₃-25%</i>	94
i- Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée-N ₃ -50%	94

ii- Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée-N ₃ -25%	95
4- <i>Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée libre-N₃-50%</i>	96
F- Conclusion	99

CHAPITRE III : Synthèse de SAMs biotine 103

A- La biotine	105
a- Généralités et historique	105
b- Utilisation en biochimie	107
c- Utilisation de la biotine pour des systèmes biosenseurs	110
B- Synthèse d'agents de couplage contenant un motif urée et une biotine terminale	113
a- Synthèse du sel de 1-biotine-3,6-dioxaoctane-8-ammonium 28	114
1- <i>Mono-protection de la fonction amine et couplage avec la biotine</i>	114
i- Protection de l'amine par un groupement BOC	115
ii- Couplage entre la molécule 26 et la biotine	115
2- <i>Déprotection de la fonction amine et obtention du sel de 1-biotine-3,6-dioxaoctane-8-ammonium 28</i>	116
b- Synthèse du précurseur éthylénique 29	117
c- Hydrosilylation du précurseur urée-biotine 29	118
C- Synthèse et caractérisation de la SAM-urée-PEG-biotine-100%	120
a- Caractérisation de la SAM-urée-PEG-biotine obtenue à 12h de greffage	121
1- <i>Caractérisation par PM-IRRAS</i>	121
2- <i>Caractérisation par AFM</i>	123
b- Comparaison entre différents temps de greffage pour la SAM-urée-PEG-biotine-100%	124
1- <i>Etude de la formation de la SAM-urée-PEG-biotine-100% de 12h à 16h</i>	124
2- <i>Etude de la formation de la SAM-urée-PEG-biotine-100% à 24h et 48h</i>	
D- Conclusion	129

CHAPITRE IV : Tests d'activité biologique 131

A- Mise au point d'un test biochimique sur les substrats biotinylés	133
a- Définition du système	133
b- Calculs	137
c- Blancs et courbes de calibration	141
1- <i>Courbes de calibration</i>	141
i- Courbe de calibration pour le test direct	141
ii- Courbe de calibration pour le test indirect	142

2- <i>Expériences de référence</i>	143
B- Application du test enzymatique aux surfaces biotinylées	147
a- Test sur les SAMs azoture après biofonctionnalisation par chimie click	147
1- <i>Test de la SAM-alkyle-Br/N₃ biofonctionnalisée</i>	147
2- <i>Test des SAM-urée-N₃ biofonctionnalisées</i>	151
i- Test de la SAM-urée-N ₃ -100%	151
ii- Comparaison des SAM-urée-N ₃ mixtes	154
b- Test sur la SAM-urée-PEG-biotine-100%	156
C- Conclusion	158
CONCLUSION	161
PARTIE EXPERIMENTALE	166

INTRODUCTION

L'immobilisation de biomolécules sur une surface est une étape clé pour beaucoup de processus et applications en biotechnologie. Elle intervient dans des champs d'application aussi variés que la création de puces à ADN, la confection d'implants biocompatibles, ou la mise au point de bio-capteurs.

Sur ce dernier point en particulier, l'utilisation de biosenseurs dans le domaine biomédical connaît actuellement un intérêt grandissant en raison de leurs divers avantages sur les techniques de détection traditionnelles. En effet, ceux-ci sont réputés plus fiables, plus sensibles, et permettant une analyse en temps réel, ce qui est impossible lors de l'utilisation de tests classiques tels que les test ELISA par exemple.

Pour la confection d'un bio-capteur, l'immobilisation d'une espèce biologique sur une surface est une étape capitale pour le développement du système car il faut que celle-ci garde toute son activité après sa fixation sur un substrat. La mise au point d'un biosenseur performant dépend donc de la maîtrise du processus d'immobilisation d'un bio-récepteur sur une surface solide. Cela passe par le contrôle de l'immobilisation en elle-même, mais aussi par la fonctionnalisation du support solide afin que l'objet biologique puisse s'accrocher efficacement sur la surface.

Les performances finales de l'outil de détection vont alors grandement dépendre de l'état de surface du substrat, de la capacité du support à immobiliser efficacement les biomolécules d'intérêt, ainsi que de sa biocompatibilité.

Pour répondre à ces problématiques, et en vue de créer une plateforme de détection efficace, nous nous proposons de modifier des surfaces de silice à l'aide d'agents de couplage siliciés fonctionnels capable de former une monocouche auto-assemblée homogène et fonctionnelle sur le substrat.

L'objectif de ces travaux est tout d'abord d'obtenir des agents de couplage chimio- ou biofonctionnels possédant un motif urée au sein de leur structure afin de faciliter la synthèse et les capacités d'auto-assemblage de telles molécules. Il s'agit dans un second temps de greffer ces molécules sur des substrats de silice afin de créer un nano-film homogène et fonctionnel. Ces surfaces modifiées seront caractérisées par diverses analyses physicochimiques, principalement la Microscopie à Force Atomique (*Atomic Force Microscopy*, AFM) et la PM-IRRAS (Spectroscopie de réflexion-absorption par modulation de polarisation).

Pour ces travaux de thèse, nous avons décidé d'aborder la biofonctionnalisation de surface selon deux angles différents. Premièrement, il apparût intéressant de créer des agents de couplage de type azoture afin de les greffer et d'obtenir en une seule étape des surfaces présentant des N_3 de surface. Cette approche, novatrice à notre connaissance, permet de tirer partie de la cycloaddition de Huisgens afin d'introduire, par la suite, diverses fonctionnalités (comme la biofonctionnalité) sur la surface. Deuxièmement, nous avons décidé de synthétiser un agent de couplage déjà biofonctionnel afin de pouvoir obtenir une surface biocompatible en une seule étape.

Ces deux approches, aboutissant toutes deux à un substrat biofonctionnel et biocompatible, ont par la suite été comparées grâce à un protocole de test mis au point au laboratoire, afin de définir quel type de surface était le plus approprié pour la confection d'une plateforme sensible.

Ces travaux ont été réalisés à l'Institut des Sciences Moléculaires de Bordeaux (ISM, UMR 5255), d'Octobre 2014 à Septembre 2017, au sein du groupe Chimie Moléculaire et Matériaux (C2M), sous la direction du Dr. Luc Vellutini. Les analyses physicochimiques ont été réalisées en collaboration avec le Groupe Spectroscopie Moléculaire (GSM) de l'ISM, en la personne de Thierry Buffeteau pour les analyses PM-IRRAS et Julien Hunel pour les caractérisations par AFM.

Le présent manuscrit s'articule en quatre parties distinctes :

- ❖ Le premier chapitre constitue une étude bibliographique qui s'attache à présenter et décrire les bio-capteurs, mais aussi à montrer les différentes stratégies de fonctionnalisation de surface afin d'immobiliser de façon covalente des bio-récepteurs.
- ❖ Le deuxième chapitre décrit la synthèse novatrice d'agents de couplage possédant un motif urée ainsi qu'un azoture. Il présente aussi leur greffage dans différentes conditions afin d'obtenir différents types de monocouches qui sont ensuite engagées dans une réaction de chimie « click » pour introduire la biofonctionnalité sur la surface.
- ❖ Le troisième chapitre aborde la synthèse et le greffage d'agents de couplage déjà biofonctionnels possédant une partie biotine.
- ❖ Le quatrième et dernier chapitre présente la mise au point ainsi que la mise en œuvre d'un test biochimique de type enzymatique afin de caractériser l'efficacité et la biocompatibilité des différentes monocouches biofonctionnelles obtenues durant ces travaux.

CHAPITRE I : ***ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE***

A- Bio-capteurs

a- Description des bio-capteurs

Les bio-capteurs (ou « biosenseurs ») sont devenus depuis quelques années des outils analytiques de plus en plus prometteurs. Avec de larges domaines d'applications comme le diagnostic biomédical, les sciences environnementales, ou encore l'industrie agroalimentaire, ils se sont imposés comme des dispositifs de détection à la fois puissants, fiables, rapides et capables de fournir une analyse en temps réel.

Pour ces raisons, le développement des biosenseurs débutât dès le début des années 1930 avec les travaux préliminaires de O. Warburg sur la détection du système NADH/NADPH qui débouchât plus tard sur la création d'appareils de reconnaissance optique par activité enzymatique¹. Il faudra cependant attendre les années 1960 et les travaux de L. C. Clark sur la mesure du taux d'oxygénation du sang par électrode de platine pour réellement voir le développement de bio-capteurs au sens moderne du terme ; comme défini en 1997 par l'IUPAC². Avec ces découvertes, diverses méthodes ont été développées, des années 1970 à nos jours, afin de créer des outils de plus en plus performants et capables d'analyser des analytes de plus en plus variés et aux concentrations de plus en plus faibles dans des milieux toujours plus complexes³.

Dans leur définition actuelle⁴, les bio-capteurs sont des dispositifs de détections composés de matériaux bio-sensibles et semi-biologiques, capables de reconnaître des molécules cibles dans un milieu (eau, air, sol, milieu biologique...). Ces outils sont principalement composés de trois éléments : l'élément de reconnaissance (aussi appelé le bio-récepteur), qui permet de capturer de façon sélective la cible d'intérêt ; le transducteur, qui permet de transmettre un signal physique suite à cette détection ; et l'appareil de visualisation, qui permet à l'utilisateur d'observer ce signal⁵ (**Figure 1**).

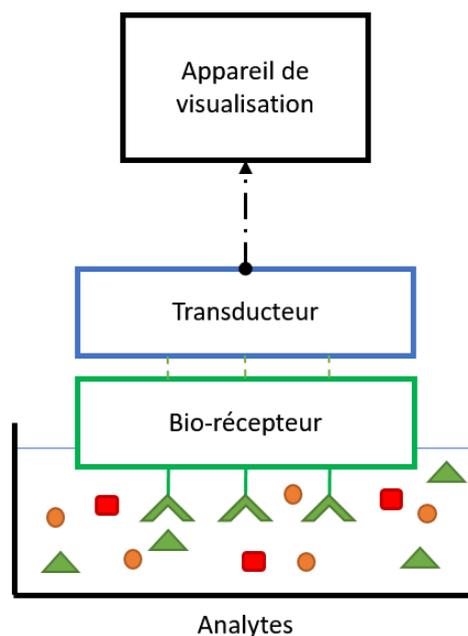


Figure 1. Schéma général d'un biosenseur

Le bio-récepteur constitue la partie la plus importante du dispositif car c'est elle qui témoigne de la présence ou de l'absence de l'élément cible dans le milieu⁶. Un soin tout particulier est alors apporté à la confection de cette partie sensible, et concentre à l'heure actuelle une part importante des recherches menées sur la mise au point des biosenseurs⁷⁻⁹.

b- Classification des bio-capteurs

Au vu de la grande variété des biosenseurs existants, il est nécessaire de pouvoir en faire une classification systématique afin de les décrire avec précision. Comme chaque élément et chaque étape de la conception du dispositif influencent les performances finales du capteur, il est communément admis de catégoriser les biosenseurs en fonction du bio-récepteur et du transducteur¹⁰ (**Figure 2**).

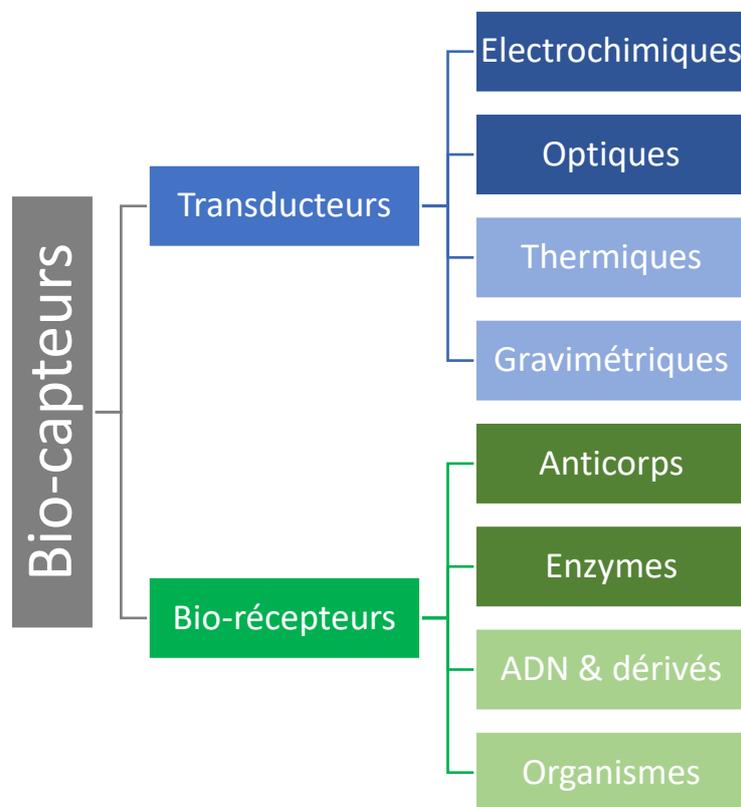


Figure 2. Classification des biosenseurs par bio-récepteurs et transducteurs

1- Transducteurs

Diverses méthodes de transduction ont été développées durant les dernières décennies et, bien que de nouvelles méthodes fassent leur apparition régulièrement dans la littérature, il est possible de classer les moyens de transduction en quatre grandes catégories : les capteurs à transduction électrochimique, la détection optique, les transducteurs thermométriques et gravimétriques¹¹.

A l'heure actuelle le mode de transduction le plus répandu est le transducteur électrochimique, où l'interaction entre le bio-récepteur et l'analyte engendre un changement dans les propriétés électriques de la solution analysée¹². Il peut alors être observé une évolution du potentiel, du courant, de la conductivité ou bien encore de l'impédance en solution. Pour ce genre de dispositif, le bio-récepteur est simplement immobilisé sur une électrode capable de détecter les changements engendrés par l'interaction avec la cible. C'est donc naturellement que ce mode de transduction fut l'un des premiers développé, la technologie étant existante dès le début des années 1950. Plus de 80% des bio-capteurs actuels utilisent un transducteur électrochimique.

La seconde méthode de transduction la plus répandue est la détection optique. Dans ce cas, le signal mesuré est un signal lumineux, modifié, généré ou atténué par l'interaction spécifique avec l'analyte. Beaucoup de méthodes permettent d'obtenir un transducteur optique : mesure de fluorescence, cytométrie de flux¹³, résonance des plasmons de surface (SPR)¹⁴, chimioluminescence et bioluminescence.

Une autre méthode de transduction est de se baser sur les changements d'ordre thermique qui peuvent se produire au moment de l'interaction entre le bio-récepteur et l'analyte. Les transducteurs de type thermométrique permettent d'observer l'évolution énergétique associée à la réaction biochimique au niveau du récepteur. L'augmentation (ou plus rarement la diminution) de la température est mesurée par microcalorimétrie et l'intensité de ce changement témoigne directement du nombre d'analytes captés par le bio-récepteur. De tels transducteurs ont été par exemple employés par Ramanathan et al. pour la création d'un biosenseur à glucose¹⁵ mais restent assez marginaux dû à leur forte sensibilité et difficulté de mise en œuvre.

Enfin, les transducteurs à détection de masse (ou gravimétriques) permettent de mesurer les changements de masse dus à l'interaction entre l'analyte et le bio-récepteur, notamment grâce à des systèmes piézoélectriques ou des microbalances à cristaux de quartz (quartz crystal microbalance, QCM). Bien que peu répandus, les transducteurs à détection de masse sont considérés comme parmi les plus précis et sensibles à l'heure actuelle.

Chaque transducteur présente des avantages et des inconvénients qui lui sont propres (**Tableau 1**), mais tous peuvent avoir un intérêt en fonction du type de bio-récepteur utilisé.

Transducteur	Avantages	Inconvénients
Electrochimique	Simple, rapide d'utilisation, faible coût, déjà très développé et utilisé	Sensible aux milieux d'utilisation, peu spécifique
Optique	Rapide, spécifique	Coût, requiert parfois un marquage préalable
Thermique	Très sensible, large gamme d'utilisation	Coût de développement, difficulté d'utilisation
Gravimétrique	Très sensible, précis, inerte dans la plupart des milieux	Sensible aux perturbations extérieures

Tableau 1. Avantages et inconvénients des différentes techniques de transduction

2- Bio-récepteurs

Une fois le transducteur identifié, il convient de classer le biosenseur en fonction de son bio-récepteur. Le bio-récepteur est très souvent une biomolécule (anticorps, antigène, enzyme, ADN, ...) plus ou moins importante (de quelques Da à plusieurs KDa), voire un système biologique complet comme une cellule ou des tissus vivants¹⁶ (**Figure 3**).

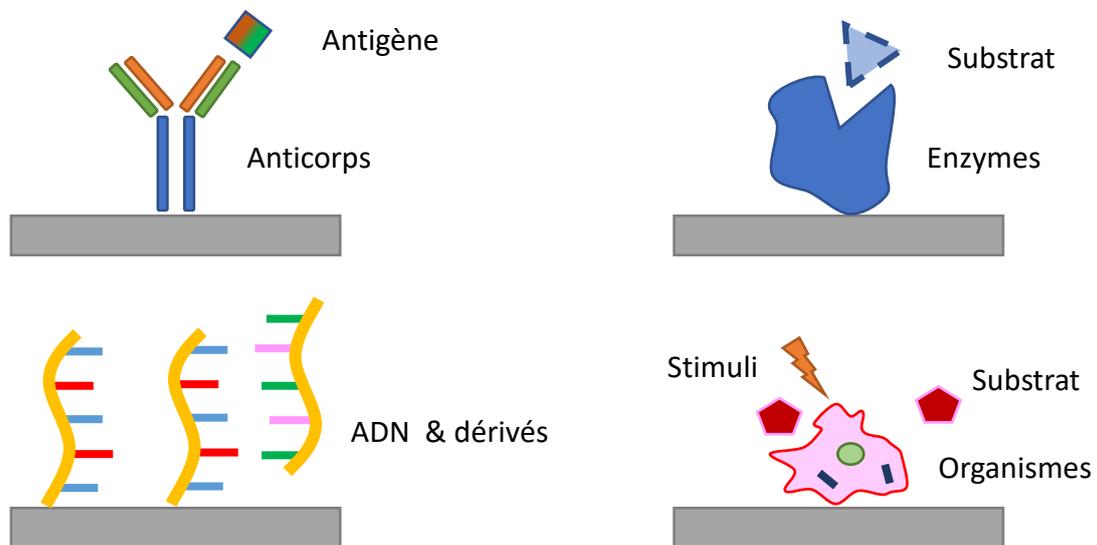


Figure 3. Les quatre grandes catégories de bio-récepteur¹⁶

Les bio-récepteurs les plus couramment retrouvés dans la littérature sont les anticorps et les enzymes. Bien que leurs modes de fonctionnement soient assez différents, ils ont tous deux l'avantage d'être aisément immobilisés et de présenter bien souvent une bonne reproductibilité ainsi qu'une bonne spécificité. Les anticorps se retrouvent principalement dans le biomédical, pour la détection d'antigènes spécifiques^{17,18}, couplé à un transducteur (électrochimique ou optique principalement), alors que les biosenseurs à enzymes ont un plus

large domaine d'application. L'intérêt des enzymes est multiple car elles ont l'avantage de traduire l'interaction avec l'analyte cible par la formation d'un produit. Le choix du transducteur est *de facto* facilité car il est alors possible de suivre la détection de l'analyte non plus seulement par son interaction avec le bio-récepteur, mais aussi par la formation du produit de réaction. L'un des bio-capteurs les plus couramment utilisés à ce jour est le biosenseur enzymatique à la *glucose oxydase* (GOD) pour la détection de glucose dans le sang, principalement développé et diffusé auprès du grand public pour la prise en charge des diabétiques¹⁹.

Il est aussi possible d'utiliser des dérivés d'ADN, principalement des acides nucléiques ou des aptamères, afin d'utiliser leur propriété d'hybridation comme bio-récepteurs. En effet, si la cible du biosenseur est du matériel génétique, il convient d'immobiliser des monobrans d'ADN comme récepteurs, et ceux-ci vont capter par reconnaissance les brins complémentaires. Un avantage non négligeable de cette méthode joue sur la propriété de l'ADN double-brin à se dénaturer en présence d'une charge ionique prédéfini : il est alors possible de régénérer le bio-récepteur et donc la plateforme de détection. Ce type de bio-capteur est en plein essor et présente déjà des résultats impressionnants, avec des limites de détections très basses, comme démontré par Yeh et al. avec la création d'une puce à ADN pour la détection spécifique de bactéries capable de descendre à 8.25 ng/mL en limite de détection²⁰.

Enfin, il est aussi possible d'utiliser des organismes entiers comme bio-récepteurs. Ces systèmes sont basés sur la capacité des cellules à détecter les changements au sein de leur milieu intra-cellulaire ou extra-cellulaire. Les microorganismes, comme les bactéries ou les champignons, sont en effet capables de répondre plus ou moins spécifiquement à divers *stimuli*, et donc de rendre compte de leur « perception » de l'environnement. L'utilisation de ce type de biosenseur est assez unique et se heurte à diverses problématiques bien différentes de celles rencontrées avec les autres récepteurs. Il faut en effet considérer que le système est vivant, et donc que sa stabilité au long terme peut être un frein majeur au développement de tels appareils²¹.

Le choix de l'utilisation d'un bio-récepteur spécifique se fait bien entendu en fonction de la cible à détecter, mais aussi en accord avec les diverses contraintes de mise au point du dispositif : suivant le milieu d'utilisation, le transducteur choisi, la réutilisation du biosenseur ou le coût alloué au développement, il est possible de favoriser un récepteur au détriment d'un autre. Une contrainte limitante à l'utilisation et au développement des biosenseurs est aussi l'immobilisation du bio-récepteur à l'interface du transducteur. Cette étape de la conception va avoir un impact direct sur les performances finales du dispositif, et doit être au préalable optimisée afin de conserver la bio-activité du récepteur.

B- Immobilisation de bio-récepteurs

Avec une demande croissante en biosenseurs, l'étude de l'immobilisation d'objets bioactifs, et donc de bio-récepteurs, a connu un intérêt grandissant. Dans le cas des bio-capteurs, cette étape d'immobilisation signifie soit incorporer le récepteur dans un support soit le lier à une surface.

Il existe plusieurs méthodes afin d'immobiliser un objet biologique, et il est possible de les distinguer entre immobilisations covalentes et immobilisations non covalentes (**Figure 4**).

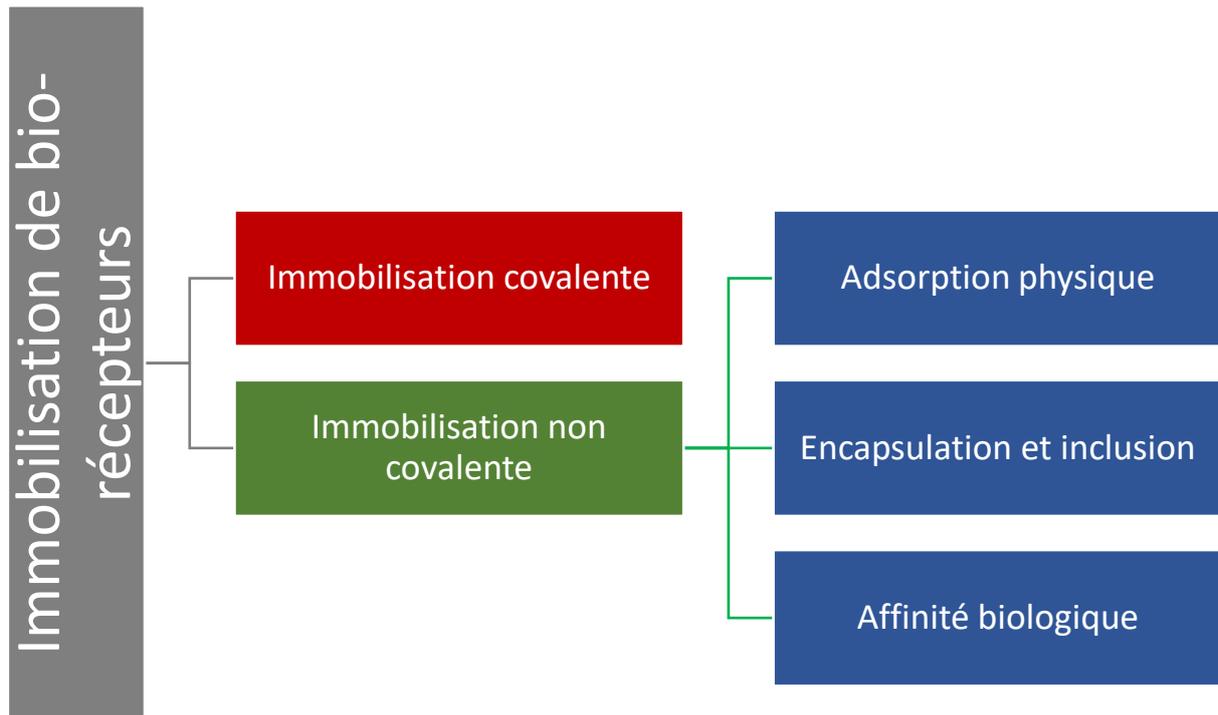


Figure 4. Différentes méthodes d'immobilisation de bio-récepteur sur une surface

a- Immobilisation non covalente

1- Adsorption physique

L'une des méthodes les plus simples et rudimentaires pour l'immobilisation de bio-récepteurs est l'adsorption physique. Cette méthode rapide à mettre en œuvre est naturellement la première développée afin de déposer des molécules bioactives sur une surface^{22,23}. Elle présente cependant trois inconvénients majeurs. Tout d'abord, même si le dépôt peut être homogène, elle ne permet pas un contrôle sur l'orientation des molécules, ce qui peut être problématique en vue de l'utilisation avec des récepteurs à sites actifs comme les anticorps ou les enzymes.

Aussi, adsorber directement des biomolécules sur une surface inerte peut engendrer des changements de conformation, des dénaturations dans le cas des protéines, ou des gênes stériques défavorables entraînant une perte de l'activité des récepteurs²⁴. Enfin, l'adsorption

physique directe ne permet pas une accroche fiable du bio-récepteur en surface. Il a ainsi été prouvé que cette méthode ne permettait pas d'obtenir des systèmes stables dans le temps, et que du matériel pouvait fuir très rapidement dans le milieu analysé en fonction du pH, de la température, ou de la force saline de la solution¹⁰. Néanmoins, cette technique présente aussi l'avantage d'être facilement mise en œuvre pour des tests rapides et en parallèle, comme les tests ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), réalisés sur des plaques à micro-puits^{25,26} (**Figure 5**).

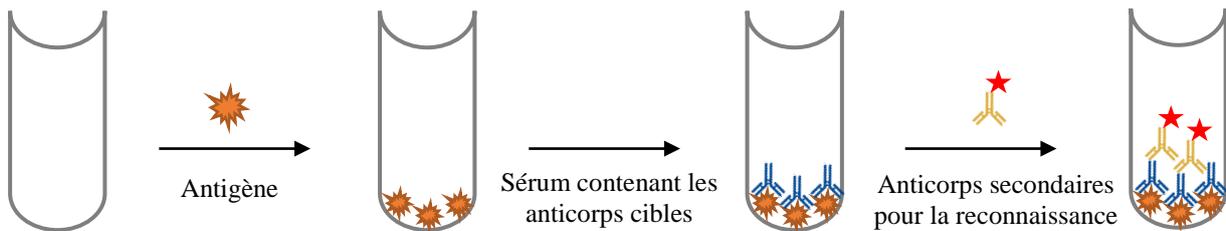


Figure 5. Exemple d'adsorption physique d'antigène sur une surface pour la mise en œuvre de tests ELISA indirects

2- Microencapsulation et inclusion

Sous ces deux appellations se retrouve un même principe : piéger le bio-récepteur au sein d'un édifice chimique capable de le retenir tout en laissant passer les analytes².

La microencapsulation est une méthode très répandue qui consiste à placer la biomolécule dans une matrice formant une membrane semi-perméable à proximité du transducteur. Il suffit d'utiliser des gels polymères (comme des polyacrylamides, des polyuréthanes ou encore des polyvinylalcools) préparés par émulsion inverse afin d'obtenir un réseau capable de retenir le bio-récepteur⁴.

L'intérêt de cette technique est que la biomolécule n'est que retenue au sein du matériaux, et n'est pas liée de façon covalente à la matrice, ce qui permet d'en conserver la bioactivité en évitant les problèmes de dénaturation¹¹. Néanmoins, un des inconvénients de cette technique est la diffusion lente des analytes au sein de la membrane, qui accroît le temps de réponse du système¹⁰ (**Figure 6**).

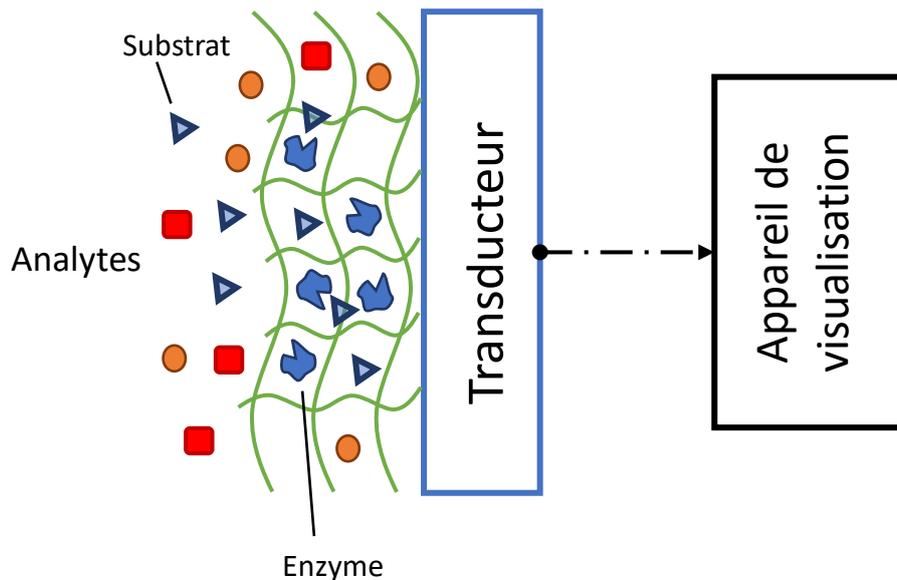


Figure 6. Microencapsulation d'enzymes dans une matrice polymère

Outre la rétention du bio-récepteur dans une membrane semi-perméable, celui-ci peut être inclus au sein de films déposés à proximité du transducteur⁵. La biomolécule peut alors être piégée au sein de couches bi-lipidiques, ou même de mono-couches auto-assemblées (*self-assembled monolayers*, SAMs) directement à la surface du transducteur^{27,28} (**Figure 7**).

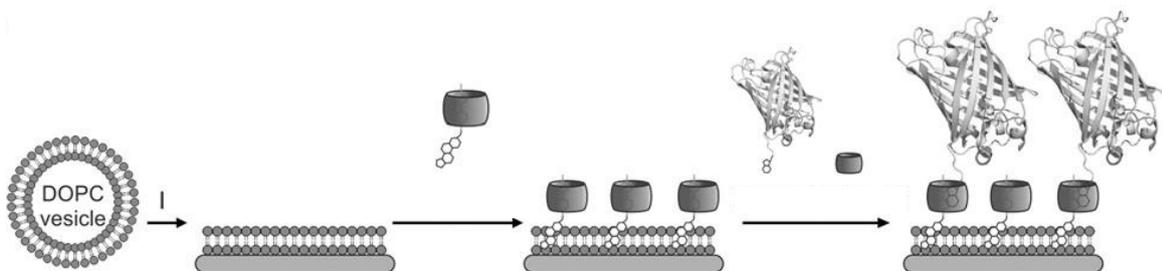


Figure 7. Immobilisation de protéines *via* inclusion dans une couche bi-lipidique comme décrit par Bosman et al.²⁷

3- Affinité biologique

Afin de contrecarrer les effets d'orientation aléatoire ou de dénaturation des bio-récepteurs, il est aussi possible de jouer sur leur affinité biologique pour les immobiliser de façon favorable sur une surface. Divers systèmes sont en effet connus en biochimie pour interagir de façon très forte entre eux, comme les brins complémentaires d'ADN, certains couples protéine-protéine ou encore ligand-protéine. Il suffit alors d'ancrer durablement (voie covalente) un

des deux composants du système sur une surface pour pouvoir ensuite immobiliser par affinité biologique l'autre membre complémentaire. Comme au cours de cette thèse le système biotine-streptavidine sera largement étudié, il est intéressant de le prendre dès à présent comme exemple d'immobilisation par affinité biologique.

Le couple biotine-streptavidine est très stable, et constitue l'interaction biologique non covalente la plus forte observée dans la nature, dont la protéine est capable d'accueillir jusqu'à quatre résidus biotine. Ainsi, en immobilisant de la biotine sur une surface, il est possible d'y adsorber de la streptavidine, par pure affinité biologique. C'est ce qui a été fait par Pavlickova et al. qui ont modifié une surface d'or via un thiol biotinylé, la rendant ainsi capable d'immobiliser de la streptavidine²⁹. Ce système peut ensuite être utilisé afin d'accueillir une nouvelle molécule biotinylée, venant s'accrocher à la streptavidine. Il est ainsi possible de construire des édifices très stables en utilisant seulement les interactions biologiques et capables d'orienter favorablement les biomolécules en surface (**Figure 8**).

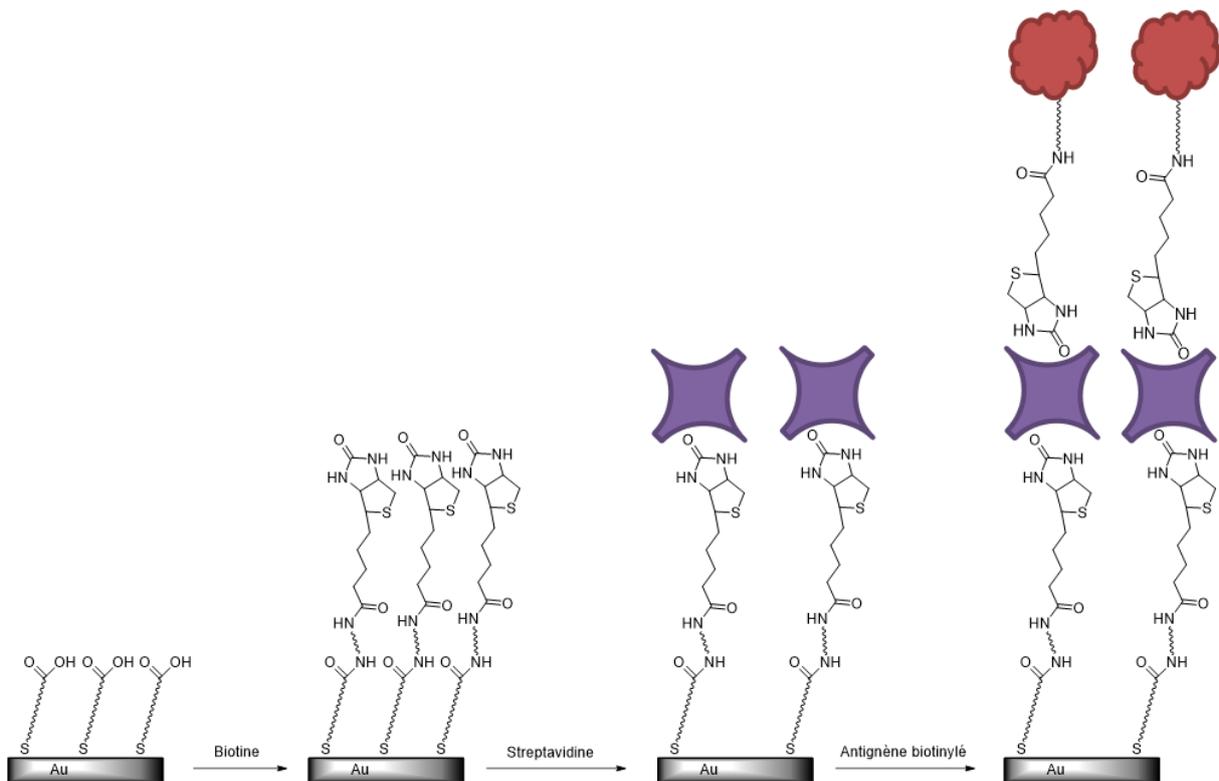


Figure 8. Immobilisation par affinité biologique d'antigènes biotinylés sur une surface²⁹

Cette utilisation de la streptavidine en « sandwich » entre deux parties biotinylées a été régulièrement employée afin de fonctionnaliser des surfaces, notamment des surfaces d'or, dans le but de créer des bio-capteurs. Habituellement une partie biotine est fixée de façon covalente sur une surface puis l'édifice est construit comme précédemment, par bio-affinité. Ce système a été utilisé par Wei et al. afin de créer un biosenseur capable de détecter certains virus de plante (notamment le « virus du sommet touffu du bananier », *Nanoviridae*

Babuvirus) grâce à des brins d'ADN biotinylés immobilisés via leur interaction avec la streptavidine³⁰ (**Figure 9**).

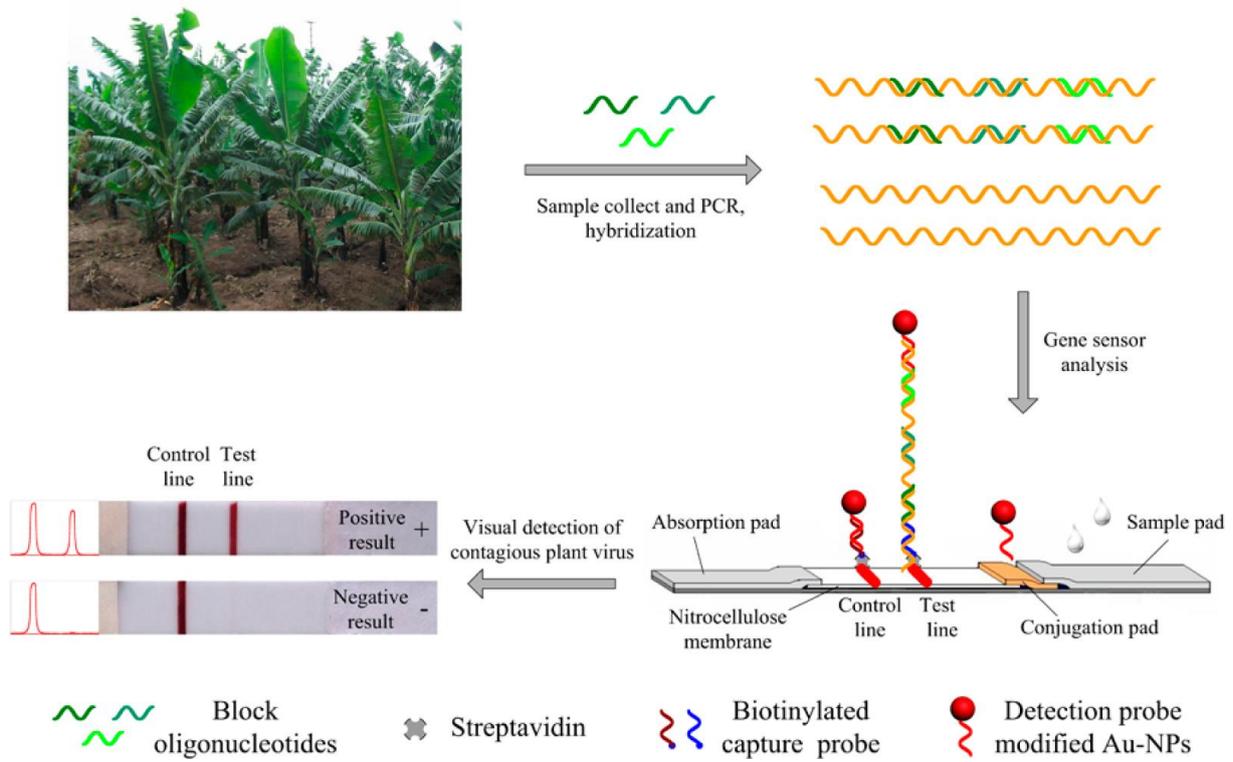


Figure 9. Exemple de biosenseur du *Nanoviridae Babuvirus* fonctionnant par brin d'ADN biotinylés par Wei et al.³⁰

Il est ainsi envisageable d'utiliser diverses méthodes d'immobilisation non covalente afin de lier un bio-récepteur à une surface. Celles-ci ne sont pas toujours très efficaces et peuvent poser divers problèmes car peu stables dans le temps, même si l'immobilisation par affinité biologique permet *a priori* de pallier ces diverses difficultés. En contrôlant l'orientation des biomolécules en surface et en utilisant des systèmes biologiques très affins, il est possible d'obtenir des édifices stables sans perte d'activité biologique, une condition *sine qua non* pour une application en biosenseur.

b- Immobilisation covalente

Au vu des instabilités constatées lors d'immobilisations non covalentes par adsorption ou encapsulation, il semble préférable de fixer le bio-récepteur de façon plus robuste en surface. Pour cela, il est possible d'utiliser des monocouches présentant des terminaisons réactives (amines, acides carboxyliques, époxydes, ...), ou de créer un matériau incorporant directement l'élément récepteur.

1- Par réticulation

La réticulation est une méthode d'immobilisation covalente proche de l'immobilisation non covalente par encapsulation. En effet, ces méthodes font toutes deux souvent appel à la création d'une matrice. Mais là où la microencapsulation ne lie pas le bio-récepteur à la matrice, l'immobilisation par réticulation permet d'accrocher de façon covalente la biomolécule au reste de l'édifice¹⁰. Il faut pour cela utiliser des composés possédant deux groupements fonctionnels (ou plus) capables de réagir avec des éléments différents, dans des conditions différentes. Un des avantages de cette technique est d'éviter les fuites de composés bioactifs en solution.

Ainsi Singh et al. ont utilisé l'immobilisation par réticulation afin de créer un biosenseur au cholestérol³¹. Ils ont en effet pu immobiliser trois enzymes, la cholestérol oxydase, la cholestérol esterase et la peroxydase sur des films de polyaniline en utilisant du glutaraldéhyde.

Néanmoins, cette méthode d'immobilisation présente le même désavantage que sa version non covalente, à savoir, un temps de diffusion des analytes au sein de la matrice assez long.

2- Par couplage à des monocouches auto-assemblées

Une des méthodes d'immobilisation covalente les plus utilisées consiste à accrocher le bio-récepteur d'intérêt sur une surface préalablement modifiée *via* la création d'une monocouche fonctionnelle. Pour cela, des SAMs terminées par des fonctions réactives comme des acides carboxyliques, des amines ou des époxydes, sont mises à profit afin d'immobiliser les biomolécules d'intérêt grâce à leurs propres groupements fonctionnels.

Les monocouches auto-assemblées sont, par définition, des couches monomoléculaires formées par chimisorption de composés ordonnés sur une surface solide (préalablement activée pour la plupart). Leur développement a permis de mettre en place la fonctionnalisation de beaucoup de surfaces (or, oxyde de silicium, oxydes métalliques), notamment grâce à la commercialisation de nombreux composés fonctionnels siliciés, sous forme d'alkoxysilanes.

Parmi ces composés commerciaux, le (3-aminopropyl)triméthoxysilane (APTMS) et le (3-aminopropyl)triéthoxysilane (APTES) sont très régulièrement utilisés afin de former des SAMs amines de façon simple et efficace. Néanmoins, après formation de la monocouche, il convient d'effectuer des modifications post-greffage de la surface afin d'y accrocher par la suite des éléments de reconnaissance biologique. Une surface d'APTMS a par exemple été utilisée par Hong et al. afin d'y immobiliser des cytochromes via un pont maléimide-succinimidyle³² (**Figure 10**).

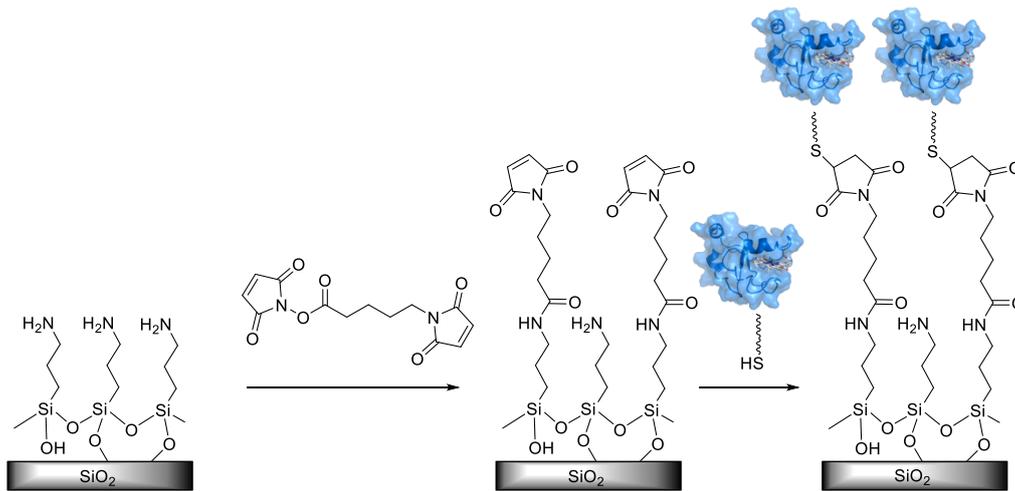


Figure 10. Immobilisation de cytochrome b5 sur une surface fonctionnalisée par APTMS par Hong et al.³²

Ehrhart et al. ont aussi développé un biosenseur en immobilisant sur une surface des organosilanes fonctionnalisés par un groupement amine. Ils ont ainsi pu comparer les surfaces modifiées par un organosilane long à celles modifiées par l'APTES, pour une application en bio-capteur. Les fonctions amines ont permis l'accroche d'un anticorps monoclonal de la molécule humaine d'adhésion cellulaire épithéliale (EpCAM), qui est surexprimée dans le cas des cancers du sein. Ils ont donc ainsi obtenu un capteur ciblant un marqueur circulant spécifique de la maladie qui est ensuite détecté par fluorescence. Durant cette étude, ils ont montré les limites de l'utilisation d'aminosilanes commerciaux courts qui, dû à leur faible capacité d'organisation, ne permettent pas d'obtenir des SAMs homogènes aux propriétés maîtrisées pour l'immobilisation de bio-récepteurs¹⁷.

En effet, les molécules d'APTES peuvent interagir avec la surface non seulement par leur partie siliciée, mais aussi par leur fonction amine, ce qui engendre inévitablement des défauts au sein de la monocouche^{33,34} (**Figure 11**).

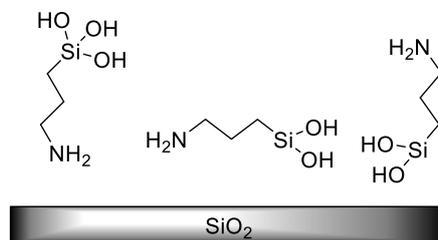


Figure 11. Défauts engendrés par l'orientation d'APTMS en surface

Des monocouches terminées par des fonctions époxydes sont aussi utilisées pour l'immobilisation de bio-récepteurs. En effet, la commercialisation de (3-glycidyloxypropyl)triméthoxysilane (GPTS) et de (3-glycidyloxypropyl)triéthoxysilane (GPTEs)

permet la modification rapide de surfaces d'oxyde de silicium, afin d'obtenir une SAM pouvant réagir directement avec les fonctions des biomolécules (amines ou autres) sans activation préalable³⁵. Mahajan et al. ont ainsi utilisé le GPTS pour fonctionnaliser une surface de verre afin d'y immobiliser des oligomères par formation d'un thioéther avec l'époxyde. Ils ont pu créer un biosenseur capable de détecter du matériel génétique de la *Neisseria Meningitis*, responsable de la méningite bactériale^{36,37} (**Figure 12**).

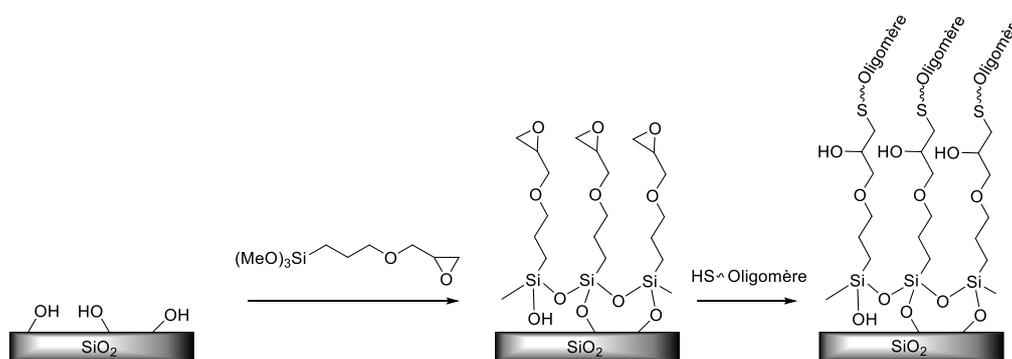


Figure 12. Immobilisation d'oligomères par Mahajan et al.³⁶

Enfin, l'utilisation d'autres fonctions pour l'immobilisation de bio-récepteur a pu aussi être développée, notamment avec la commercialisation de (3-mercaptopropyl)triméthoxysilane (MPTS), qui permet d'obtenir des monocouches auto-assemblées présentant des thiols. Ces thiols peuvent aussi être utilisés pour l'accroche de biomolécules via la réaction de type « click » thiol-maléimide. C'est ce type de système qui a permis à Perret et al. de développer une plateforme pour l'immobilisation de protéines, notamment la streptavidine et la cadherine³⁸.

Les méthodes d'immobilisation covalente, notamment sur SAM, permettent ainsi d'éviter les travers des méthodes d'immobilisation non spécifiques, en particulier les problèmes de stabilité dans les milieux analysés. Néanmoins, même si le développement et la commercialisation d'organosilanes fonctionnels a permis de faciliter l'accroche de bio-récepteurs, il reste important de développer et d'améliorer les agents de couplage afin de former des SAMs plus homogènes et performantes. En effet, les organosilanes commerciaux, bien souvent à chaîne courte, ne permettent pas de former des monocouches reproductibles et sans défauts, notamment à cause de problèmes d'orientation à la surface^{39,40}. Il est alors intéressant de se pencher sur le principe de l'élaboration des SAMs sur silice ainsi que sur les paramètres régissant leur formation.

C- Les Self-assembled monolayers (SAMs)

Bien que le concept de « Self-assembled Monolayers » à proprement parlé ne trouve pas sa définition avant le début des années 1980, sa genèse remonte au début du siècle dernier avec les travaux pionniers de Langmuir. En effet, dès 1917, il montre que quelques molécules au caractère amphiphile tendent à s'organiser en monocouche à la surface d'un liquide⁴¹. Ces travaux préliminaires ont ensuite mené au dépôt de ces monocouches sur des surfaces solides par immersion et/ou émergence de supports en solution : on parle dès lors de film de Langmuir-Blodgett, méthode qu'il développa au sein de General Electric durant les années 1930^{42,43}. Néanmoins, il s'avère que ces dépôts purement physiques sont peu stables, et ne permettent à l'époque qu'un développement partiel de leurs applications.

Quelques années plus tard, en 1946, Bigelow et al. montrent qu'il est possible d'adsorber sur une surface des molécules polaires dans un solvant apolaire et que celles-ci s'assemblent en une monocouche organisée^{44,45}. Bien que ce concept se rapproche de plus en plus des SAMs au sens moderne du terme, il faudra attendre le début des années 1980 et les travaux de Sagiv et al. pour voir la formation spontanée d'une monocouche d'octadécyltrichlorosilane (OTS) sur une surface par chimisorption avec création de liaisons covalentes entre le silane et la surface d'oxyde de silicium⁴⁶. Le terme de monocouches auto-assemblées apparaîtra trois ans plus tard, en 1983, dans un article du *New Scientist*, lors de la présentation d'un article coécrit par Sagiv et Netzer sur la formation de multicouches sur surface de SiO_2 ⁴⁷ (**Figure 13**).

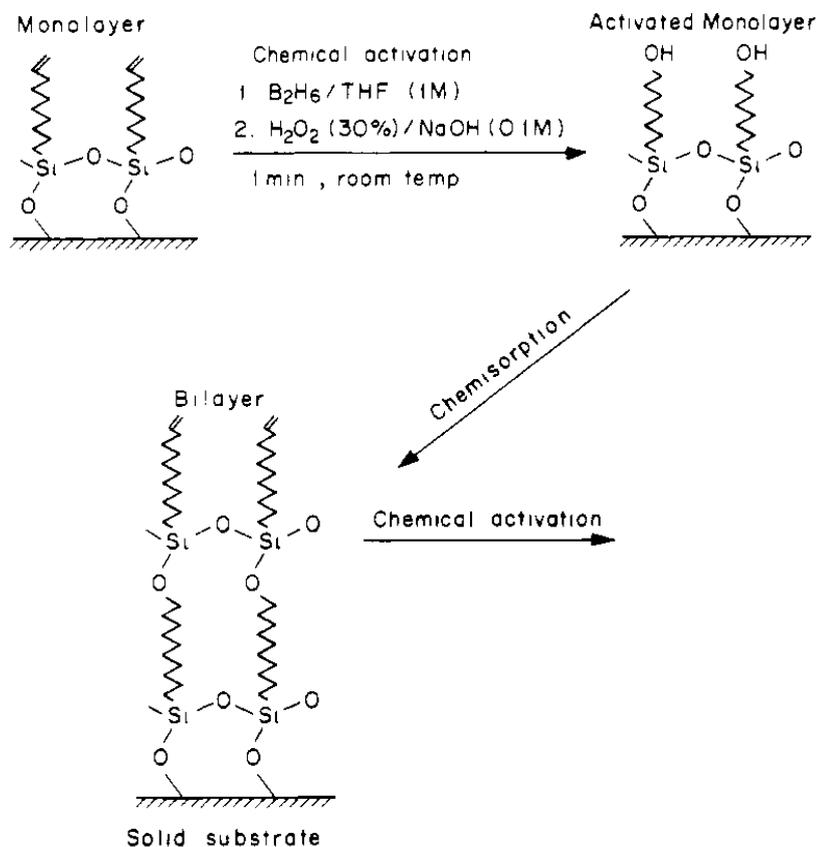


Figure 13. Première occurrence d'une SAM par Sagiv et Netzer⁴⁷

Une fois ces bases posées, les années 1980 ont permis un grand essor dans le développement des monocouches auto-assemblées, notamment grâce à l'évolution des différentes techniques d'analyses. En effet, c'est durant cette période que diverses méthodes de caractérisation, de grande importance à l'heure actuelle pour l'analyse des surfaces, ont été mises en place : particulièrement la microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscopy*, AFM) en 1986 et la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (*Phase Modulation Infrared Reflection Absorption Spectroscopy*, PM-IRRAS) en 1982. Dès lors, de nombreuses surfaces ont été étudiées, notamment pour des applications en détection de type biosenseurs.

En ce qui concerne les bio-capteurs, il existe à l'heure actuelle deux types de SAMs : les monocouches formées à partir de composés soufrés (thiols, sulfures, disulfures, ...) sur des surfaces métalliques (d'or principalement) et les monocouches issues du greffage covalent d'organosilanes sur des surfaces d'oxyde (de silicium ou d'aluminium).

L'intérêt de ces dernières est leur grande stabilité en milieu biologique, contrairement aux surfaces d'or fonctionnalisées. En effet, Flynn et al. ont montré qu'en milieu tamponné, une oxydation des thiolates liant les molécules à la surface entraînait la déstabilisation de l'édifice et sa désorption en quelques jours seulement⁴⁸. Ce constat est néanmoins à relativiser car il semble que la stabilité des monocouches, quelques soient leurs supports, dépende aussi fortement de la longueur de chaîne des agents de couplage. Effectivement, comme explicité par Seitz et al., une monocouche d'APTES semblerait moins stable dans le temps qu'une monocouche formées par amino-undecilényltriéthoxysilane (AUTES)⁴⁹. Les silanes possèdent cependant la capacité de former plusieurs liaisons covalentes avec la surface, ce qui n'est pas le cas des thiols, et pourrait donc expliquer leur plus grande stabilité en milieu biologique. De plus, l'interaction entre les organosilanes et la surface d'oxyde est covalente et bien caractérisée, alors que la liaison soufre-métal, peut-être plus faible, est un sujet encore controversé à l'heure actuelle⁵⁰ (**Figure 14**).

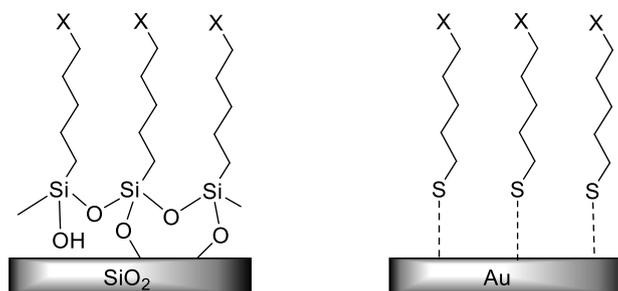


Figure 14. Monocouches auto-assemblées sur silice et sur or

a- Formation des SAMs sur SiO₂

La formation de nanofilms auto-organisés sur la surface de silice se fait *via* la réaction d'hydrolyse-condensation des composés siliciés. La réaction s'effectue entre les hydroxyles de surfaces (silanols) et la partie possédant un groupement silicié organique de la molécule : principalement trichlorosilane, triméthoxysilane et triéthoxysilane (**Figure 15**).

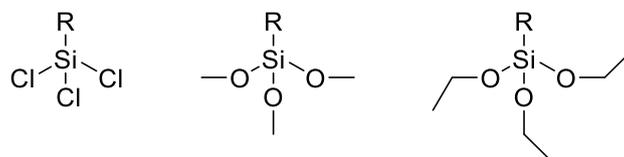


Figure 15. Précurseurs trichlorosilane (gauche), triméthoxysilane (centre) et triéthoxysilane (droite)

La réaction débute tout d'abord par l'hydrolyse des molécules proches de la surface activée, qui présente un certain taux d'hydratation. L'hydrolyse permet de générer des groupements trisilanols capables d'interagir par liaisons hydrogène avec les silanols de surface. Enfin, la condensation permet la formation de liaisons siloxanes entre les molécules et les silanols de surface⁴⁶ (**Figure 16**).

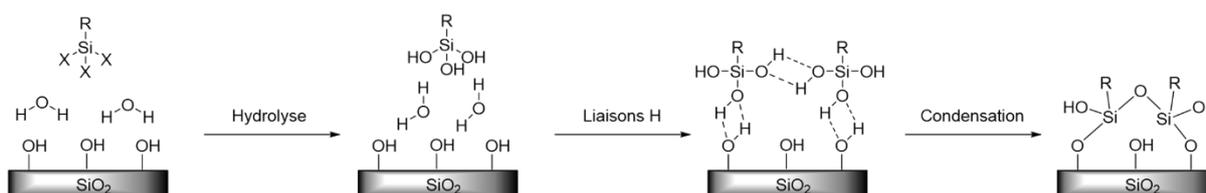


Figure 16. Processus de formation des monocouches auto-assemblées selon Savig et al.⁴⁶

Ce mécanisme est très général et ne prend pas en compte la capacité des molécules à former aussi un réseau entre elles avant de s'accrocher à la surface. Cette possibilité a été montrée par Silberzan et al. et tend à expliquer la formation potentielle d'édifices plus complexes et chaotiques que les monocouches attendues⁵¹ (**Figure 17**).

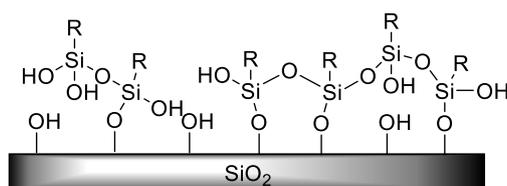


Figure 17. Modèle de monocouche selon Silberzan et al.⁵¹

Il est aussi intéressant de considérer la nature du groupement silyle. En effet, celui-ci influe grandement sur la rapidité du mécanisme d'hydrolyse-condensation. De ce fait, les trichlorosilanes réagissent bien plus vite que les triméthoxy- ou triéthoxysilanes. En effet, durant la première étape d'hydrolyse, il se forme dans le cas des dérivés chlorés, de l'acide chlorhydrique qui catalyse grandement la réaction. On note ainsi que les trichlorosilanes sont très réactifs, voire instables, et doivent rapidement être utilisés après leur génération, et ce, en milieu contrôlé pour éviter la formation de monocouches chaotiques.

En ce qui concerne les alcoxysilanes, ils sont beaucoup moins réactifs, et nécessitent même l'ajout d'un catalyseur dans le milieu. Le mécanisme étant plus rapide en milieu acide, un catalyseur de type acide organique est habituellement utilisé. Les alcoxysilanes présentent donc l'avantage d'être plus stables et donc stockables contrairement aux dérivés chlorés. Dû principalement à des effets stériques, il s'avère aussi que les dérivés triéthoxysilanes sont plus stables que les triméthoxysilanes.

Reste dorénavant une question essentielle sur le principe de formation est SAMs : comment la monocouche se développe-t-elle en surface ?

Deux théories sont ici possibles. La première, établie par Cohen et al. en 1986 via l'étude infrarouge de couches en croissance d'octadécyltrichlorosilane (OTS). Cette étude semble montrer que la SAM croît en îlots et non de façon homogène. Néanmoins, cette hypothèse se heurte à une autre théorie, corroborée par des mesures d'ellipsométrie et infrarouge qui tendent à montrer une croissance homogène mais chaotique de la monocouche⁵² (**Figure 18**).

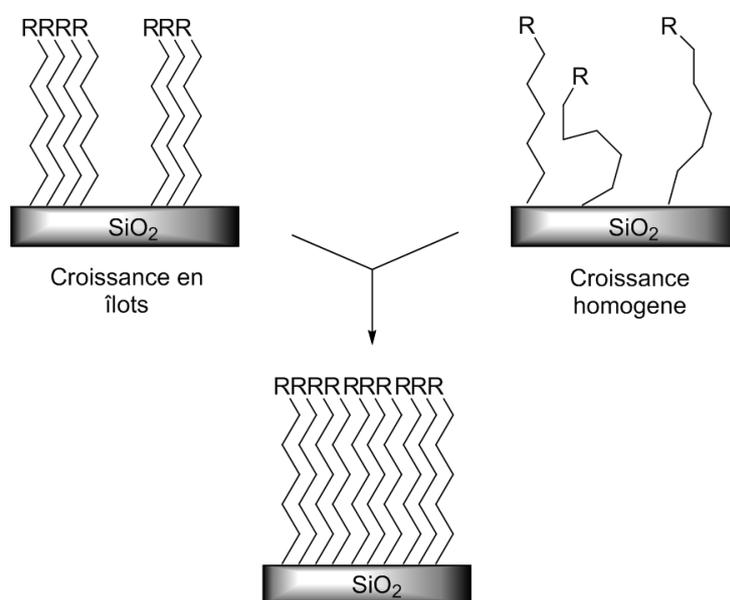


Figure 18. Deux modèles de croissance des SAMs : en îlots et homogène

Des mesures AFM ont aussi été menées par Bierbaum et al. en 1995 sur la croissance de monocouches d'OTS. Cette étude montre que celle-ci se ferait principalement par îlots dans les conditions de greffage observées⁵³ (**Figure 19**).

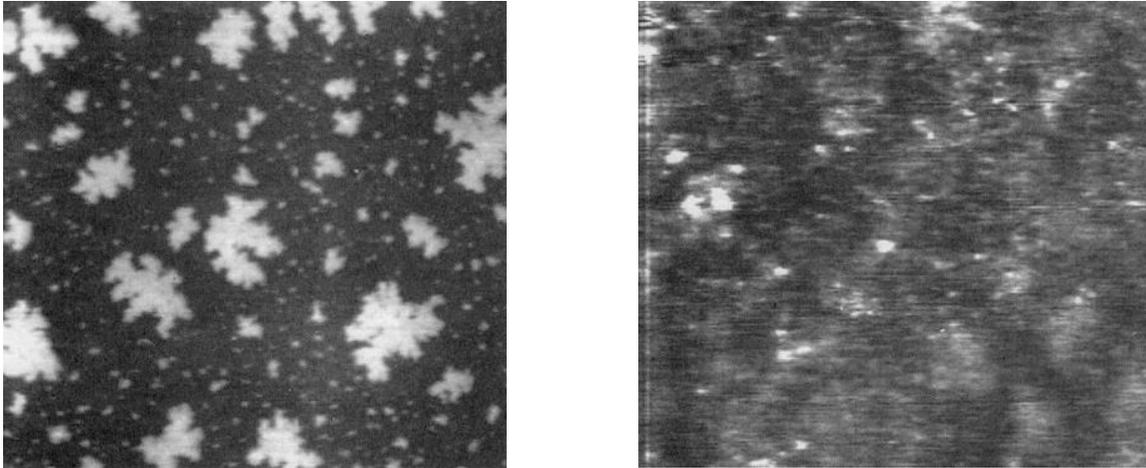


Figure 19. Image AFM par Bierbaum et al. de la croissance en îlots d'une monocouche d'OTS sur surface de silice ($5\mu\text{m}^2$) à 1min (droite) et 35min (gauche) d'immersion

b- Paramètres physiques influençant la formation des SAMs

1- Le solvant

Le choix du solvant joue un rôle important lors du greffage d'une monocouche. En effet, celui-ci doit non seulement être capable de solubiliser la molécule siliciée à greffer, mais aussi une quantité d'eau optimale au processus.

Comme présenté dans le processus plus haut et démontré dès 1983 par Sagiv et al., l'eau présente sur le substrat est nécessaire à l'hydrolyse-condensation de molécules d'OTS⁴⁷. La couche d'eau réagit ainsi avec les molécules d'OTS et permet la formation de la SAM. Sans celle-ci les molécules d'OTS semblent inertes vis-à-vis des silanols de surface⁵⁴. L'importance de l'hydratation de la surface a aussi été démontrée par Finklea et al. qui ont pu former une monocouche d'OTS sur une surface d'or. Celle-ci étant dépourvue d'hydroxyles de surface cela montre que les molécules s'auto-assemblent à l'approche de ce film d'eau puis réagissent entre elles pour former des siloxanes⁵⁵ (**Figure 20**).

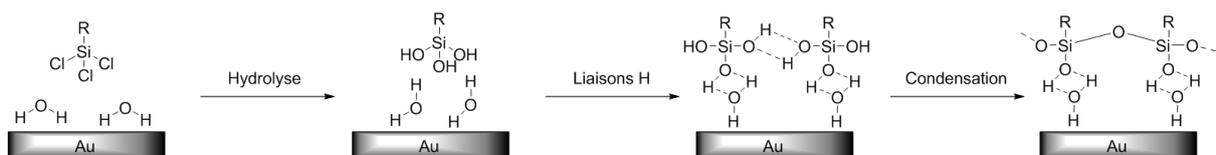


Figure 20. Formation de siloxanes sur surfaces d'or par Finklea et al.⁵⁵

Plusieurs études ont par la suite cherché à quantifier le taux d'hydratation nécessaire à la formation de monocouches denses et organisées⁵⁶. Il s'avère alors qu'une forte proportion d'eau dans le bain réactionnel tend à favoriser un greffage plus rapide mais aussi plus chaotique, avec l'apparition d'agrégats qui se forment en solution avant de s'adsorber en surface⁵⁷. Il est donc d'une importance capitale de considérer le solvant le mieux adapté au processus de greffage : un solvant capable de désorber une quantité significative d'eau de la surface des substrats permettra certes un greffage plus rapide et plus dense, mais favorisera aussi l'apparition d'agrégats pré-formés en solution⁵⁶. McGovern et al. suggèrent que des monocouches de meilleure qualité sont obtenues avec le toluène (ou le benzène), qui est capable de solubiliser la quantité d'eau optimale pour le greffage⁵⁶.

Le solvant joue aussi un rôle sur la compacité de la SAM en interagissant avec les molécules à greffer. En effet, un solvant à chaîne longue comme l'hexadécane a montré qu'il était capable de s'insérer favorablement avec les molécules d'OTS, favorisant leur auto-assemblage en surface ; alors que des solvants comme le pentane ont tendance à s'agréger sur la surface et à perturber l'auto-assemblage. Il peut alors être intéressant d'utiliser des cosolvants capables de favoriser un pré-assemblage des molécules en solution avant leur interaction avec la surface, comme présenté par Navarre et al.⁵⁸

2- La température

Dans les années 1940, les travaux préliminaires de Bigelow et al. ont permis de montrer qu'une température critique existait pour la formation de monocouches au-dessus de laquelle la formation de la SAM devient impossible⁴⁵. Silberzan et al. ont par la suite montré dans les années 1990 qu'un abaissement de la température de greffage favorisait la croissance des monocouches et la formation de SAM plutôt denses⁵¹.

Est apparu alors le concept de température critique de greffage (notée T_c) en dessous de laquelle le greffage est favorisé en SAM compactes⁵⁹. Cette température est intrinsèque à l'organosilane utilisé puisqu'elle dépend de sa longueur de chaîne, mais ne dépend pas du solvant considéré^{60,61}. Certaines études ont aussi mis en évidence une seconde température critique en dessous de laquelle il est possible d'observer une croissance par îlots ainsi qu'une troisième température de référence au-dessus de laquelle seule une croissance homogène est observée⁶²⁻⁶⁴.

En prenant l'exemple de l'OTS, il est alors possible de définir trois températures palières : en dessous de 16°C seule une croissance par îlots est possible, au-dessus de 40°C seule une croissance homogène est observée, et entre les deux, une croissance simultanée en îlots et homogène a lieu, avec une densité maximale observée en dessous de 28°C (**Figure 21**).

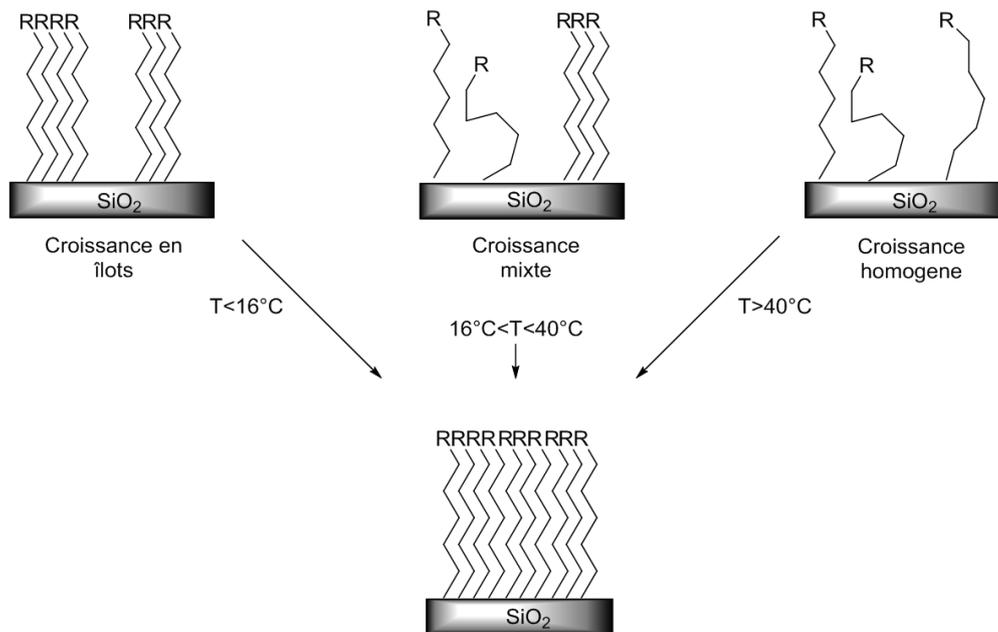


Figure 21. Influence de la température sur le type de croissance des SAM (exemple de l'OTS)

c- Paramètres structuraux influençant la formation des SAMs

1- La longueur de chaîne alkyle

La longueur de la chaîne alkyle des organosilanes utilisés lors du greffage joue un rôle important dans la formation de la monocouche. Il a été observé que pour des longueurs de chaînes alkyles avec un nombre de carbone supérieur à 30 ($n > 30$) la couche semble ordonnée dans sa partie basse mais désordonnée à son extrémité. En effet, la chaîne ayant plus de degrés de liberté, elle a tendance à se replier ou se désorganiser sur sa partie haute⁶⁵. La monocouche apparaît aussi comme totalement désordonnée lors de l'utilisation de chaînons très courts ($n < 3$) car les molécules ne sont pas assez longues pour faciliter les interactions faibles menant l'auto-assemblage de la SAM.

Enfin, Bierbaum et al. ont montré qu'il existe une longueur de chaîne optimale ($16 < n < 22$) pour laquelle toutes les liaisons sont de conformation trans et donc orientées perpendiculairement à la surface, favorisant la création de monocouches compactes et ordonnées⁶⁵. L'auto-assemblage des molécules est ici assuré par les interactions de van der Waals entre les groupements méthyles des chaînes carbonées proches les unes des autres⁶⁶.

2- Le groupement fonctionnel terminal

Le groupement fonctionnel terminal joue lui aussi un rôle important lors de la formation de la SAM. Si des organosilanes simples, terminés par des fonction vinyliques ou méthyles, sont capables de former des monocouches compactes et organisées, ce n'est pas toujours le cas pour des organosilanes plus « complexes »⁶⁷. En effet, toujours en vue d'une application

biocapteur, il est d'intérêt général d'obtenir des SAMs possédant une terminaison réactive envers les bio-récepteurs.

Une des fonctions les plus répandues pour la biofonctionnalisation des surfaces est la fonction acide carboxylique. Elle permet de facilement former une liaison amide avec notamment les résidus arginines et lysines de diverses chaînes peptidiques après activation de la fonction acide⁶⁸ (**Figure 22**).

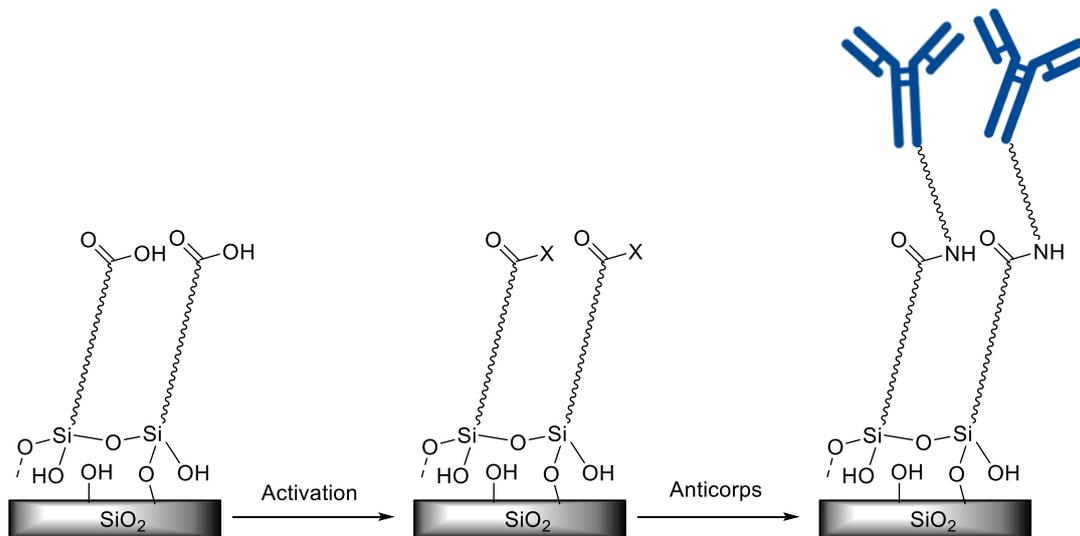


Figure 22. Exemple de SAM acide carboxylique pour l'immobilisation d'anticorps

Néanmoins, la formation d'une monocouche présentant cette fonction ne peut pas se faire directement : le greffage d'un organosilane terminé par une fonction acide carboxylique risquerait de se faire tête-bêche à cause de l'interaction par liaisons hydrogène entre le groupement carboxylique et les silanols de la surface. On peut alors créer des défauts dans la SAM et obtenir une couche désordonnée et non compacte.

Il faut de ce fait masquer ces fonctions terminales avant le greffage et les déprotéger par la suite pour immobiliser le bio-récepteur. Le groupement acide carboxylique peut ainsi être protégé avant hydrosilylation par un ester, notamment méthylique, comme montré par Ramin et al. (**Figure 23**)⁶⁹.

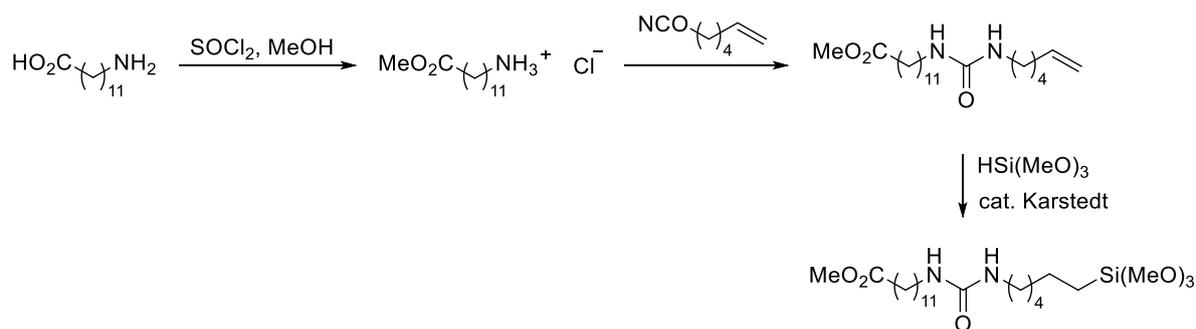


Figure 23. Protection d'acide carboxylique avant hydrosilylation par Ramin et al.⁶⁹

En revanche, la déprotection de l'ester peut, elle-même, être un enjeu pour l'intégrité de la surface car il a été observé que l'hydrolyse (basique ou acide) des esters pouvait endommager la monocouche.

Une façon intéressante de protéger les acides carboxyliques est d'utiliser des esters photolabiles pouvant être clivés sous irradiation UV (365 nm) afin de régénérer le groupement terminal carboxylique fonctionnel. Meillan et al. ont utilisé cette voie en protégeant un groupement acide carboxylique par un ester nitrobenzylique. Une monocouche compacte, homogène et de faible rugosité (inférieure à 1nm) a été obtenue. L'irradiation UV durant 30 minutes de la surface a permis de déprotéger les fonctions acides carboxyliques. Celle-ci a ensuite été activée via la chimie des carbodiimides pour obtenir un ester activé afin d'y immobiliser le virus de la mosaïque du tabac (TMV, *Virgaviridae Tobamovirus*)⁷⁰ (**Figure 24**).

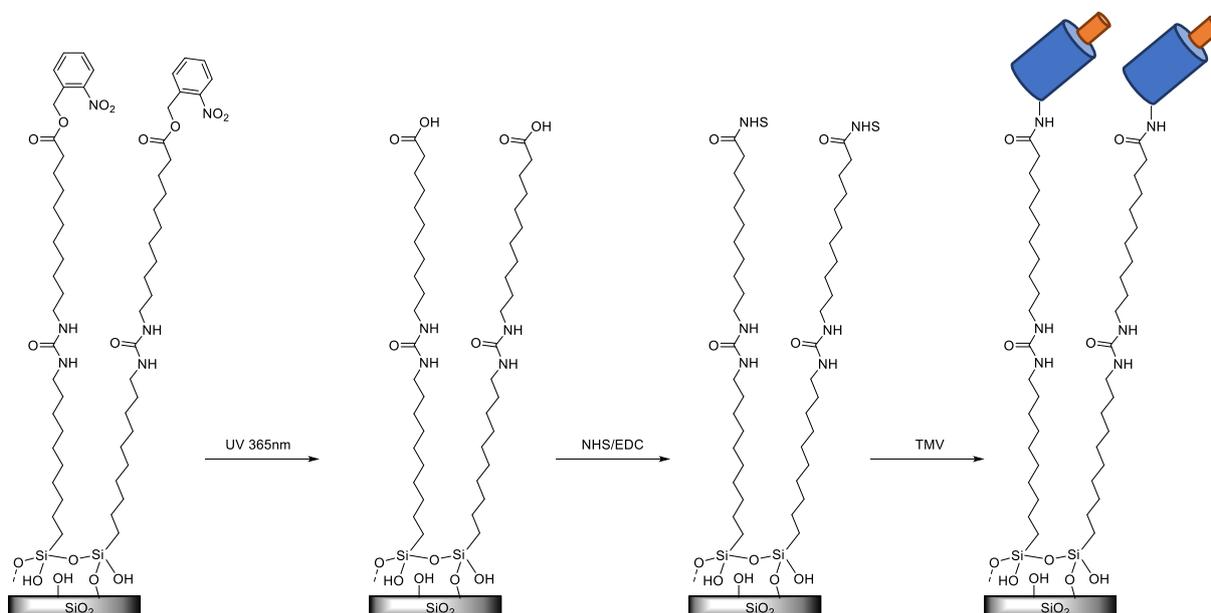


Figure 24. Immobilisation du TMV sur une SAM acide carboxylique après déprotection par Meillan et al.⁷⁰

L'utilisation de certains organosilanes possédant des groupements terminaux volumineux peut aussi engendrer des gênes stériques lors de la formation de la monocouche, et donc déstabiliser l'édifice et conduire à des défauts à la surface.

Il est aussi fréquent de rencontrer dans la littérature des SAMs amines utilisées afin d'y accrocher des éléments de détection comme des anticorps⁷¹. Là encore, les interactions entre les amines et les silanols de surface peuvent mener à des monocouches désordonnées, non compactes et hétérogènes⁶⁵. Dans une moindre mesure, d'autres groupements terminaux fonctionnels comme les époxydes ou les bromures, peuvent influencer la formation de la monocouche et la rendre moins compacte et moins ordonnée qu'avec des groupements méthyles terminaux⁷².

Il faut donc considérer les groupements fonctionnels comme un paramètre d'influence lors du greffage d'organosilanes. En effet, bien que nécessaire, l'introduction de fonctionnalités « complexes » (acides carboxyliques, amines, ...) peut provoquer des défauts dans l'organisation de la SAM. Il faut alors mettre au point des stratégies, comme la protection de ces groupements, ou tirer profit de l'hétérogénéité engendrée, afin d'obtenir des monocouches où la cohésion intermoléculaire est optimale.

3- Fonctions chimiques favorisant l'auto-assemblage et la cohésion des SAMs

i- Formation de liaisons hydrogène intermoléculaire

La formation de liaisons hydrogène entre les différentes molécules constituant la SAM participe à la stabilité et la cohésion de l'édifice. Lors de l'utilisation de précurseurs possédant de longues chaînes alkyles, ce sont les interactions de van der Waals qui participent à cette stabilisation. Mais il peut être intéressant d'introduire d'autres motifs chimiques au sein des molécules afin de favoriser ces interactions : liaisons amides, urées, carbamates, ...

Ces fonctions peuvent être introduites selon deux approches : soit la molécule à greffer contient déjà le motif d'intérêt (approche dite « bottom-up »), soit la fonction est créée par réaction entre une surface préalablement modifiée et une molécule réactive (approche « top-down » ou post-fonctionnalisation).

Cette dernière méthode, plus simple, a été développée en premier, notamment *via* la réaction entre l'APTES commercial greffé sur une surface et un dérivé d'acide carboxylique (acide, chlorure ou anhydride) afin de former une fonction amide⁷³ (**Figure 25**).

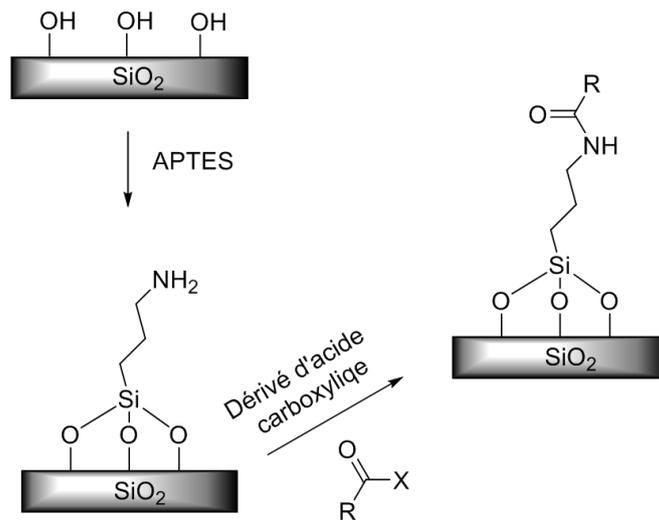


Figure 25. Formation d'amide sur surface fonctionnalisée par l'APTES

Ren et al. ont mené une étude fondamentale dans laquelle ils ont modifié une monocouche d'APTES par un acide gras, l'acide stéarique, afin de mettre en évidence la formation de liaisons hydrogène suite à la création de la fonction amide⁷⁴. Ils ont observé une diminution de la rugosité de la surface mais n'ont pas pu établir avec certitude la formation d'interactions intermoléculaires par spectroscopie infrarouge (**Figure 26**).

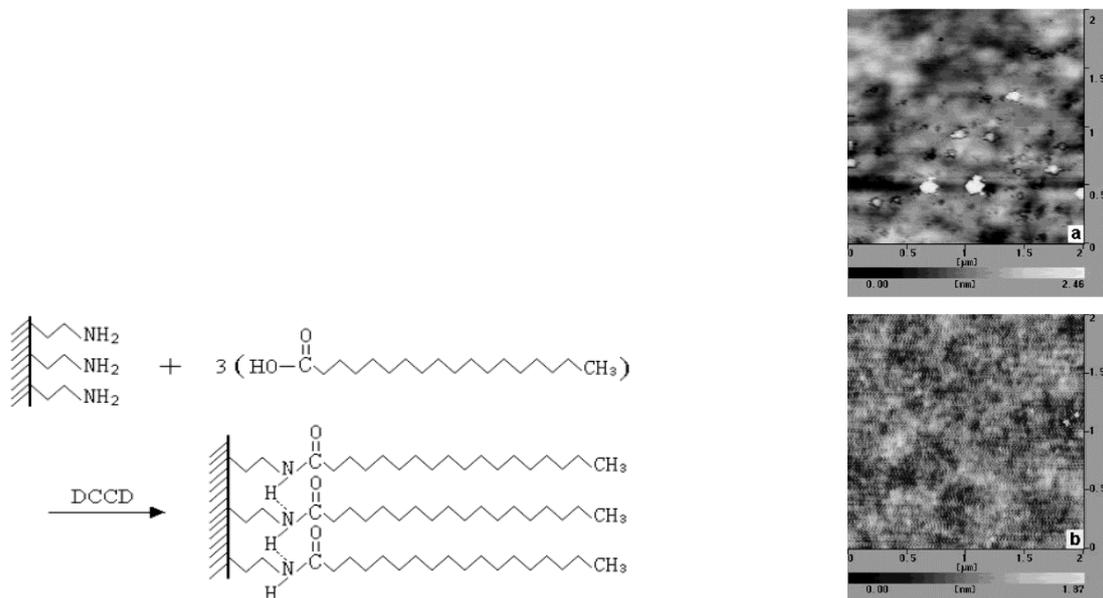


Figure 26. Modification par Ren et al. d'une monocouche d'APTES par de l'acide stéarique et observations AFM avant formation de l'amide (a) et après (b)⁷⁴

Pour apporter des éléments de réponse, certaines équipes comme Kim et al. ont décidé de fonctionnaliser directement des cristaux d'ATR⁷⁵ ou même de fixer des wafer de silicium

directement sur lesdits cristaux^{73,76}. L'apparition probable de liaisons hydrogène a été mise en évidence par l'observation des bandes amide I et amide II et à leur déplacement relatif sur le spectre infrarouge.

Des études ont aussi été menées sur des surface d'or afin de comprendre ce qu'il se passe sur les surfaces d'oxyde de silicium lors de la formation de monocouches. En effet, les surface d'or ont l'avantage de pouvoir directement être analysées par spectroscopie infrarouge d'absorption-réflexion (*InfraRed Reflexion-Adsorption Spectroscopy*, IRRAS). Il a ainsi été montré que les bandes caractéristiques amide I et II coïncident avec la formation de liaisons hydrogène intermoléculaires, et que la formation d'une fonction amide augmentait la stabilité de la monocouche⁷⁷.

Une autre fonction d'intérêt pour augmenter les capacités d'auto-assemblage des SAMs par liaisons hydrogène est la fonction urée. En effet, celle-ci présente l'avantage de ne pas former une seule, mais deux liaisons hydrogène potentielles, contrairement aux fonction amides et carbamates.

Des surfaces fonctionnalisées par un isocyanates ont été obtenues par greffage du 10-isocyanatodecyltrichlorosilane. Celles-ci ont ensuite été modifiées par réaction avec des nucléophiles, principalement des amines, afin d'obtenir des fonctions urée. Des études par spectroscopie infrarouge ont ensuite mis en évidence la formation de liaisons hydrogène au sein de ces monocouches⁷⁸ (**Figure 27**).

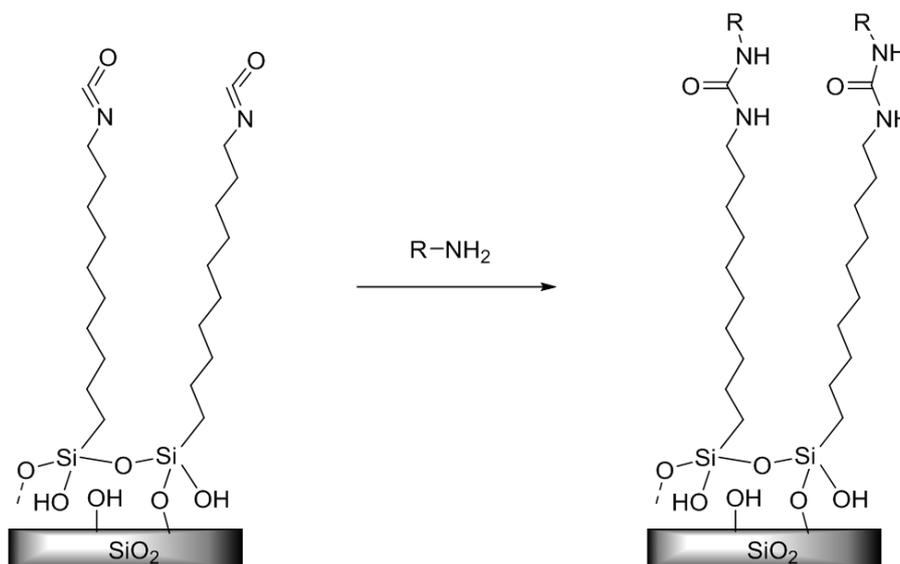


Figure 27. Réaction entre une monocouche terminée par un isocyanate et un dérivé amine afin de former une urée

En outre, le groupe C2M de l'Institut des Sciences Moléculaires (UMR 5255) développe depuis 2009 une nouvelle famille d'organosilanes incorporant directement la fonction urée. En effet, la synthèse de précurseurs à longue chaîne alkyle est parfois difficile : faible solubilité des

précurseurs, faible rendement, faible réactivité, purification fastidieuse... L'utilisation de fonctions urée est alors intéressante car elle permet une synthèse convergente facilitée tout en permettant l'auto-assemblage des molécules⁶⁹.

Cependant, l'introduction de ce motif urée a pour effet d'éloigner les chaînes alkyles les unes des autres. Or, les interactions faibles de type van der Waals entre les groupements méthyles des molécules, qui permettent l'assemblage, ne peuvent se faire qu'à faible distance. C'est ainsi que les liaisons hydrogène entre groupements urée, bien qu'éloignant les molécules entre elles, entrent en jeu et permettent de maintenir la cohésion de la monocouche⁷⁹.

Une technique d'analyse d'intérêt pour étudier ces surfaces est la PM-IRRAS. En effet, celle-ci peut être appliquée sur des surfaces d'or recouvertes d'une fine couche de silice (~20 nm). Il est alors possible d'obtenir des informations comparables à l'IRRAS et donc de déterminer les liaisons hydrogène intermoléculaires impliquées dans la cohésion de la monocouche⁷⁹.

ii- Utilisation du π -stacking

Afin de favoriser la cohésion et la stabilité de la monocouche il est aussi possible d'utiliser d'autres fonctions promouvant des interactions intermoléculaires fortes afin de favoriser l'auto-assemblage. En dehors des liaisons hydrogène, un autre phénomène favorisant l'organisation des molécules entre elles est le π -stacking, ou les interactions de type π - π .

Ces interactions au sein de monocouches a notamment été étudié par Tillman et al. et qui ont pu obtenir des organosilanes possédant des groupements phénoxyles intercalés dans leurs chaînes alkyle. La cohésion de la SAM semble renforcée pour des chaînes alkyles plutôt longues, mais diminuée pour les chaînes plutôt courtes⁸⁰.

d- Les SAMs mixtes

Une fois les différents paramètres physiques et chimiques pris en compte, il est possible d'élaborer différents types de monocouches : des SAMs mono-moléculaires et des SAMs mixtes.

Les SAMs mixtes sont obtenues en greffant plusieurs organosilanes ensemble afin d'ajuster les propriétés de la surface. Cela présente un intérêt majeur en biotechnologie et principalement pour le design de biosenseurs. En effet, via la création de monocouches mixtes, il est envisageable de « diluer » les sites actifs envers les bio-récepteurs afin de les espacer de façon optimale pour limiter les gênes stériques ou l'inhibition des biomolécules.

De plus, l'élaboration de SAMs mixtes permet d'obtenir des édifices complexes, pouvant aboutir à la formation de surface présentant des fonctionnalités multiples : il suffit de greffer trois molécules présentant des réactivités orthogonales pour obtenir par exemple une plateforme multi-fonctionnelle. Il est alors envisageable de créer des SAMs mixte pouvant même présenter des réactivités opposées et bio-orthogonales afin d'obtenir des plateformes chimio- ou bio-sensibles.

La formation de SAMs mixtes peut se faire selon deux approches différentes : la co-adsorption de deux (ou plus) molécules ou l'addition successive de molécules (**Figure 28**).

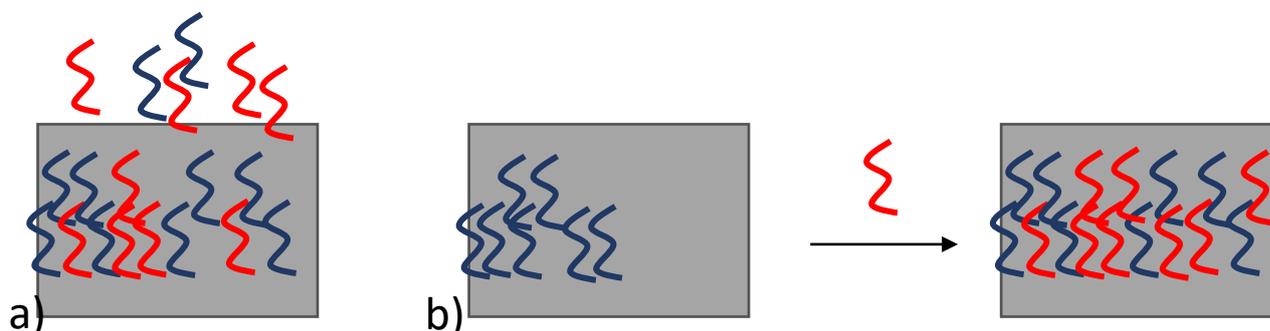


Figure 28. Formation de SAM mixte par co-adsorption (a) et par addition successive (b)

La première approche, la plus intuitive à mettre en œuvre, a été étudiée dès le début des années 1990. Il s'avère que lorsque les molécules utilisées ont des structures comparables et des réactivités similaires vis-à-vis de la surface, la proportion des deux molécules au sein de la monocouche va être très proche de celle de la solution de greffage⁸¹. Ce comportement cinétique a été mis en lumière par une étude de la formation de SAM mixte par des organosilanes possédant des groupes terminaux d'encombrements différents. Il a été alors observé que, plus la gêne stérique est importante, plus la molécule met du temps à se greffer par rapport à l'autre, et plus la composition de la SAM sera différente de celle de la solution⁸².

Dans ce cas, il est possible d'observer une adsorption préférentielle d'une des deux molécules dans la monocouche. C'est par exemple le cas lors de la formation de SAMs mixtes présentant des groupement terminaux amines et azotures : comme montré par Azam et al., toutes choses étant égales par ailleurs, la molécule amine va se greffer de façon plus rapide, et donc préférentielle⁸³. En effet, cette dernière interagit facilement avec les silanols de la surface par liaisons hydrogène.

En plus de l'adsorption préférentielle, la formation d'une SAM par co-adsorption peut entraîner une ségrégation de phase, et donc l'observation de nano-domaines. En effet, si les propriétés d'assemblage des molécules utilisées sont différentes, il peut y avoir une adsorption non homogène des molécules en surface, débouchant sur le regroupement des molécules de même type en nano-domaines. Ce phénomène a ainsi été observé par Meillan et al lors du greffage d'organosilanes présentant un motif urée et terminés par un groupement méthyle d'une part ou par un ester photolabile d'autre part⁸⁴.

Comme montré par Rahma et al., il est parfois possible d'orienter le greffage d'une SAM mixte vers un phénomène de ségrégation de phase ou bien vers la formation d'une couche homogène. En effet, en jouant sur les effets de solvant, il a été possible d'utiliser un mélange de chloroforme et de cyclohexane pour diluer un dendron de première génération sans former de nano-domaines⁸⁵ (**Figure 29**).

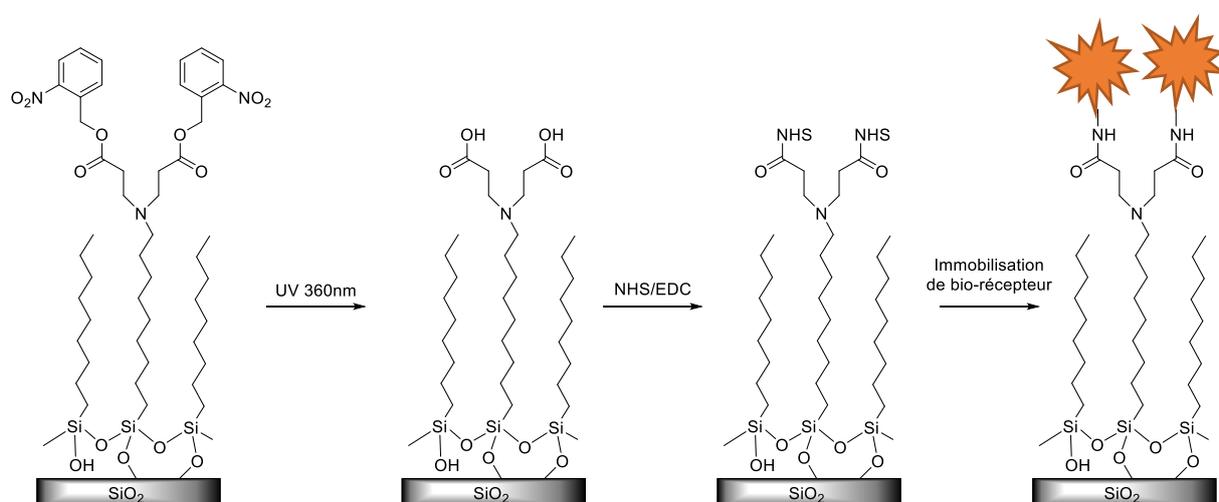


Figure 29. Fonctionnalisation hétérogène par dendrons de première génération protégés par un ester photolabile⁸⁵

Dans le cas de la formation de SAMs mixtes avec des molécules aux propriétés physico-chimiques différentes, il peut alors être intéressant d'opter pour l'addition successive des molécules sur la surface afin de former la monocouche. Grâce à cette approche, les proportions de chaque composant de la SAM sera maîtrisé, car ajoutés les uns après les autres.

Ces deux méthodes distinctes présentent chacune leurs avantages. La co-adsorption est à préférer si les molécules ont des propriétés proches car elle est plus simple à mettre en œuvre (processus « one-step »). Néanmoins, la maîtrise des phénomènes de ségrégation de phase, et des proportions respectives de chaque molécule au sein de la couche pousse parfois à utiliser l'addition successive. En effet, cette technique permet de maîtriser le greffage mixte de précurseurs possédant des groupements silyles différents bien qu'elle soit plus fastidieuse à mettre en œuvre (processus « multi-step »).

D- Résumé

Cette étude bibliographique a permis d'aborder la description des bio-capteurs ainsi que les différentes étapes d'importance durant leur conception, notamment l'immobilisation du bio-récepteur.

Différentes techniques d'immobilisation d'objets bioactifs ont été abordées, mais la plus intéressante semble être l'immobilisation covalente maîtrisée sur monocouches auto-assemblées.

Le principe de formation des SAMs a par la suite été décrit, ainsi que les différents paramètres influençant leurs conception : le taux d'humidité, la température, le solvant, la structure de l'agent de couplage, la formation de liaisons hydrogène, ...

Au vu des éléments présentés ici, nous avons décidé pour ces travaux de thèse, de nous orienter vers la synthèse d'agents de couplages contenant un motif urée, afin de tirer avantage de la formation de liaisons hydrogène lors de la formation de la SAM. Nous avons envisagé deux familles d'agents de couplages ; l'une contenant un groupement azoture afin d'introduire la biofonctionnalité par chimie « click » une fois la monocouche formée, et l'autre, possédant déjà une biomolécule, la biotine, afin d'introduire la biofonctionnalité directement durant la formation de la SAM.

Références

- (1) Otto, A. M. *Cancer Metab.* **2016**, 4 (1), 5.
- (2) Clark, L. C.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, 102 (1), 29.
- (3) Renneberg, R.; Pfeiffer, D.; Lisdat, F.; Wilson, G.; Wollenberger, U.; Ligler, F.; Turner, A. P. F. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2007**, 109 (November 2007), 1.
- (4) Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16 (1–2), 121.
- (5) Korotkaya, E. *Foods Raw Mater.* **2014**, 2 (2), 161.
- (6) Velusamy, V.; Arshak, K.; Korostynska, O.; Oliwa, K.; Adley, C. *Biotechnol. Adv.* **2010**, 28 (2), 232.
- (7) Lan, L.; Yao, Y.; Ping, J.; Ying, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 91 (December 2016), 504.
- (8) Khater, M.; de la Escosura-Muñiz, A.; Merkoçi, A. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 93 (September 2016), 72.
- (9) Mittal, S.; Kaur, H.; Gautam, N.; Mantha, A. K. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 88, 217.
- (10) Arya, S. K.; Chaubey, A.; Malhotra, B. D. *Fundam. A Proc Indian Natn Sci Acad* **2006**, 72 (4), 249.
- (11) Gaudin, V. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, 90, 363.
- (12) Pohanka, M.; Skládal, P. *J. Appl. Biomed.* **2008**, 6 (October 2016).
- (13) Liu, N.; Gao, Z.; Ma, H.; Su, P.; Ma, X.; Li, X.; Ou, G. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 41 (1), 710.
- (14) Arya, S. K.; Solanki, P. R.; Singh, R. P.; Pandey, M. K.; Datta, M.; Malhotra, B. D. *Talanta* **2006**, 69 (4), 918.
- (15) Ramanathan, K.; Jönsson, B. R.; Danielsson, B. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 427, 1.
- (16) Perumal, V.; Hashim, U. *J. Appl. Biomed.* **2014**, 12 (1), 1.
- (17) Ehrhart, J.-C.; Bennetau, B.; Renaud, L.; Madrange, J.-P.; Thomas, L.; Morisot, J.; Brosseau, A.; Allano, S.; Tauc, P.; Tran, P.-L. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24 (3), 467.
- (18) Isoda, T.; Urushibara, I.; Sato, M.; Uemura, H.; Sato, H.; Yamauchi, N. *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, 129 (2), 958.
- (19) Eggins, B. R. *Chemical Sensors and Biosensors*; 2002.
- (20) Yeh, C. H.; Chang, Y. H.; Lin, H. P.; Chang, T. C.; Lin, Y. C. *Sensors Actuators, B Chem.* **2012**, 161 (1), 1168.
- (21) Liu, Q.; Wu, C.; Cai, H.; Hu, N.; Zhou, J.; Wang, P. *Chem. Rev.* **2014**, 114 (12), 6423.
- (22) Bull, H. B. *Biochim. Biophys. Acta* **1956**, 19 (9), 464.

- (23) Ghosh, S.; Bull, H. B. *Biochim. Biophys. Acta* **1963**, 66 %6, 150.
- (24) Gray, J. J. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14 (1), 110.
- (25) Butler, J. E. *Methods* **2000**, 22 (1), 4.
- (26) Aydin, S. *Peptides* **2015**, 72, 4.
- (27) Bosmans, R. P. G.; Hendriksen, W. E.; Verheijden, M.; Eelkema, R.; Jonkheijm, P.; Vanesch, J. H.; Brunsveld, L. *Chem. - A Eur. J.* **2015**, 21 (50), 18466.
- (28) Richter, R. P.; Bérat, R.; Brisson, A. R. *Langmuir* **2006**, 22 (12), 3497.
- (29) Pavlickova, P.; Jensen, N. M.; Paul, H.; Schaeferling, M.; Giammasi, C.; Kruschina, M.; Du, W. D.; Theisen, M.; Ibba, M.; Ortigao, F.; Kambhampati, D. *J. Proteome Res.* **2002**, 1 (3), 227.
- (30) Wei, J.; Liu, H.; Liu, F.; Zhu, M.; Zhou, X.; Xing, D. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6 (24), 22577.
- (31) Singh, S.; Solanki, P. R.; Pandey, M. K.; Malhotra, B. D. *Sensors Actuators, B Chem.* **2006**, 115 (1), 534.
- (32) Hong, H. G.; Jiang, M.; Sligar, S. G.; Bohn, P. W. *Langmuir* **1994**, 10 (1), 153.
- (33) Watts, B.; Thomsen, L.; Fabien, J. R.; Dastoor, P. C. *Langmuir* **2002**, 18 (1), 148.
- (34) White, L. D.; Tripp, C. P. *J. Colloid Interface Sci.* **2000**, 232 (2), 400.
- (35) Piehler, J.; Brecht, A.; Valiokas, R.; Liedberg, B.; Gauglitz, G. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15 (9–10), 473.
- (36) Mahajan, S.; Sethi, D.; Seth, S.; Kumar, A.; Kumar, P.; Gupta, K. C. *Bioconjug. Chem.* **2009**, 20 (9), 1703.
- (37) Sethi, D.; Kumar, A.; Gupta, K. C.; Kumar, P. *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19 (11), 2136.
- (38) Perret, E.; Leung, A.; Morel, A.; Feracci, H.; Nassoy, P. *Langmuir* **2002**, 18 (3), 846.
- (39) Halliwell, C.; Cass, A. *Anal. Chem.* **2001**, 73 (11), 2476.
- (40) Pfeifer, S.; Zarafshani, Z.; Badi, N.; Lutz, J.-F. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131 (26), 9195.
- (41) Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1917**, 39 (11), 1848.
- (42) Blodgett, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1934**, 56, 495.
- (43) Blodgett, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1935**, 57 (6), 1007.
- (44) Bigelow, W. C.; Pickett, D. L.; Zisman, W. a. *J. Colloid Sci.* **1946**, 1 (6), 513.
- (45) Bigelow, W. C.; Glass, E.; Zisman, W. *J. Colloid Sci.* **1947**, 1, 563.
- (46) Sagiv, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102 (1), 92.
- (47) Netzer, L.; Sagiv, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105 (17), 674.
- (48) Flynn, N. T.; Tran, T. N. T.; Cima, M. J.; Langer, R. *Langmuir* **2003**, 19 (26), 10909.

- (49) Seitz, O.; Fernandes, P. G.; Tian, R.; Karnik, N.; Wen, H.-C.; Stiegler, H.; Chapman, R. a.; Vogel, E. M.; Chabal, Y. J. *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 4384.
- (50) Pensa, E.; Corte, E.; Fonticelli, M. H.; Benítez, G.; Rubert, A.; Salvarezza, R. C. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (8), 1183.
- (51) Silberzan, P.; Léger, L.; Ausserré, D.; Benattar, J. J. *Langmuir* **1991**, *7* (8), 1647.
- (52) Mathauer, K.; Frank, C. W. *Langmuir* **1993**, *9* (12), 3446.
- (53) Bierbaum, K.; Grunze, M.; Baski, A. A.; Chi, L. F.; Schrepp, W.; Fuchs, H. **1995**, No. 10, 2143.
- (54) Tripp, C.; Hair, M. *Langmuir* **1992**, *8* (4), 1120.
- (55) Finklea, H. O.; Robinson, L. R.; Blackburn, A.; Richter, B.; Allara, D.; Bright, T. *Langmuir* **1986**, *2* (2), 239.
- (56) McGovern, M. E.; Kallury, K. M. R.; Thompson, M. *Langmuir* **1994**, *10* (10), 3607.
- (57) Vallant, T.; Brunner, H.; Mayer, U.; Hoffmann, H.; Leitner, T.; Resch, R.; Friedbacher, G. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (37), 7190.
- (58) Navarre, S.; Choplin, F.; Bousbaa, J.; Bennetau, B.; Nony, L.; Aime, J. **2001**, No. 18, 1.
- (59) Parikh, A. N.; Allara, D. L.; Azouz, I. B.; Rondelez, F. *J. Phys. Chem.* **1994**, *98*, 7577.
- (60) Brzoska, J. B.; Shahidzadeh, N.; Rondelez, F. *Nature* **1992**, *360* (6406), 719.
- (61) Brzoska, J. B.; Azouz, I. Ben; Rondelez, F. *Langmuir* **1994**, *10* (11), 4367.
- (62) Davidovits, J. V.; Pho, V.; Silberzan, P.; Goldmann, M. *Surf. Sci.* **1996**, *352–354* (95), 369.
- (63) Goldmann, M.; Davidovits, J. V.; Silberzan, P. *Thin Solid Films* **1998**, *327–329*, 166.
- (64) Carraro, C.; Yauw, O. W.; Sung, M. M.; Maboudian, R. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (23), 4441.
- (65) Bierbaum, K.; Kinzler, M.; Wöll, C.; Grunze, M. *Langmuir* **1995**, *11* (12), 512.
- (66) Dinh, D. H.; Vellutini, L.; Bennetau, B.; Dejous, C.; Rebière, D.; Pascal, E.; Moynet, D.; Belin, C.; Desbat, B.; Labrugère, C.; Pillot, J.-P. *Langmuir* **2009**, *25* (10), 5526.
- (67) Heid, S.; Effenberger, F.; Bierbaum, K.; Grunze, M. **1996**, No. 21, 2118.
- (68) Hudalla, G. a.; Murphy, W. L. *Langmuir* **2010**, *26* (9), 6449.
- (69) Ramin, M. a.; Le Bourdon, G.; Daugey, N.; Bennetau, B.; Vellutini, L.; Buffeteau, T. *Langmuir* **2011**, *27* (10), 6076.
- (70) Meillan, M.; Ramin, M. a.; Buffeteau, T.; Marsaudon, S.; Odorico, M.; Chen, S. W.; Pellequer, J.-L.; Degueil, M.; Heuzé, K.; Vellutini, L.; Bennetau, B. *RSC Adv.* **2014**, *4* (23), 11927.
- (71) Jonkheijm, P.; Weinrich, D.; Schröder, H.; Niemeyer, C. M.; Waldmann, H. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47* (50), 9618.

- (72) Vallant, T.; Kattner, J.; Brunner, H.; Mayer, U.; Hoffmann, H. **1999**, No. 11, 5339.
- (73) Kim, J.; Cho, J.; Seidler, P. M.; Kurland, N. E.; Yadavalli, V. K. *Langmuir* **2010**, *26* (4), 2599.
- (74) Ren, S.; Yang, S.; Zhao, Y. **2003**, No. 14, 2763.
- (75) Brittain, W. J.; Siewierski, L. M.; Petrash, S.; Foster, M. D. *Am. Chem. Soc. Polym. Prepr. Div. Polym. Chem.* **1998**, *39* (2), 264.
- (76) Song, S.; Zhou, J.; Qu, M.; Yang, S.; Zhang, J. *Langmuir* **2008**, *24* (1), 105.
- (77) Tam-Chang, S.-W.; Biebuyck, H. A.; Whitesides, G. M.; Jeon, N.; Nuzzo, R. G. *Langmuir* **1995**, *11* (11), 4371.
- (78) Ardès-Guisot, N.; Durand, J. O.; Granier, M.; Perzyna, A.; Coffinier, Y.; Grandidier, B.; Wallart, X.; Stievenard, D. *Langmuir* **2005**, *21* (21), 9406.
- (79) Ramin, M. a; Le Bourdon, G.; Heuzé, K.; Degueil, M.; Belin, C.; Buffeteau, T.; Bennetau, B.; Vellutini, L. *Langmuir* **2012**, *28* (51), 17672.
- (80) Tillman, N.; Ulman, A.; Schildkraut, J. S.; Penner, T. L. *Chem. Soc* **1988**, *1* (6), 136.
- (81) Martin, P.; Marsaudon, S.; Thomas, L.; Desbat, B.; Aimé, J. P.; Bennetau, B. *Langmuir* **2005**, *21* (15), 6934.
- (82) Offord, D. A.; Griffin, J. H. *Langmuir* **1993**, *9* (11), 3015.
- (83) Azam, M. S.; Fenwick, S. L.; Gibbs-Davis, J. M. *Langmuir* **2011**, *27* (2), 741.
- (84) Meillan, M. Immobilisation de biomolécules sur des monocouches auto-assemblées et élaboration de sondes AFM à nanotubes de carbone fonctionnalisés pour des mesures d'interactions ligand-récepteur, Université de Bordeaux, 2014.
- (85) Rahma, H.; Buffeteau, T.; Belin, C.; Le Bourdon, G.; Degueil, M.; Bennetau, B.; Vellutini, L.; Heuzé, K. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2013**, *5* (15), 6843.

CHAPITRE II : ***SYNTHESE DE SAMs AZOTURE***

Comme vu dans le chapitre précédent, la création d'une monocouche auto-assemblée pour la création de bio-capteurs repose sur plusieurs critères.

Il est tout d'abord important que la SAM formée puisse immobiliser les biomolécules d'intérêt sans les détériorer. Pour se faire, il faut concevoir l'agent de couplage de façon à ce qu'il conserve la bioactivité et la biodisponibilité de la molécule à immobiliser.

Il faut aussi créer des monocouches orientant favorablement les bio-récepteurs en surface. Comme vu durant l'étude bibliographique, l'utilisation de précurseurs contenant un motif urée favorise la cohésion de la couche, mais les groupements fonctionnels terminaux classiques ne permettent pas l'immobilisation contrôlée des biomolécules. Il faut alors introduire un système, chimique, biochimique, ou combinant les deux, de manière à favoriser l'accroche orientée des bio-récepteurs.

De plus, il faut que la SAM soit stable en milieu biologique ou assimilé (milieu tampon, fluides organiques, ...). C'est pour cela qu'il semble préférable de considérer le greffage d'organosilanes sur surfaces de silice plutôt que le greffage de thiols sur lames d'or (instables en milieu biologique)¹.

Pour toutes ces raisons précédemment évoquées, il a alors été envisagé de synthétiser des agents de couplage siliciés contenant un motif urée (pour favoriser la cohésion de la SAM et faciliter la synthèse) ainsi qu'une fonction azoture terminale permettant l'immobilisation orientée de molécules par une réaction de chimie « click ». La molécule considérée pour cette chimie « click » est une biotine-alcyne. Il est alors envisageable, après accroche de la biotine, d'utiliser un système streptavidine-biotine pour immobiliser par la suite (par affinité biologique) un bio-récepteur d'intérêt (**Figure 30**).

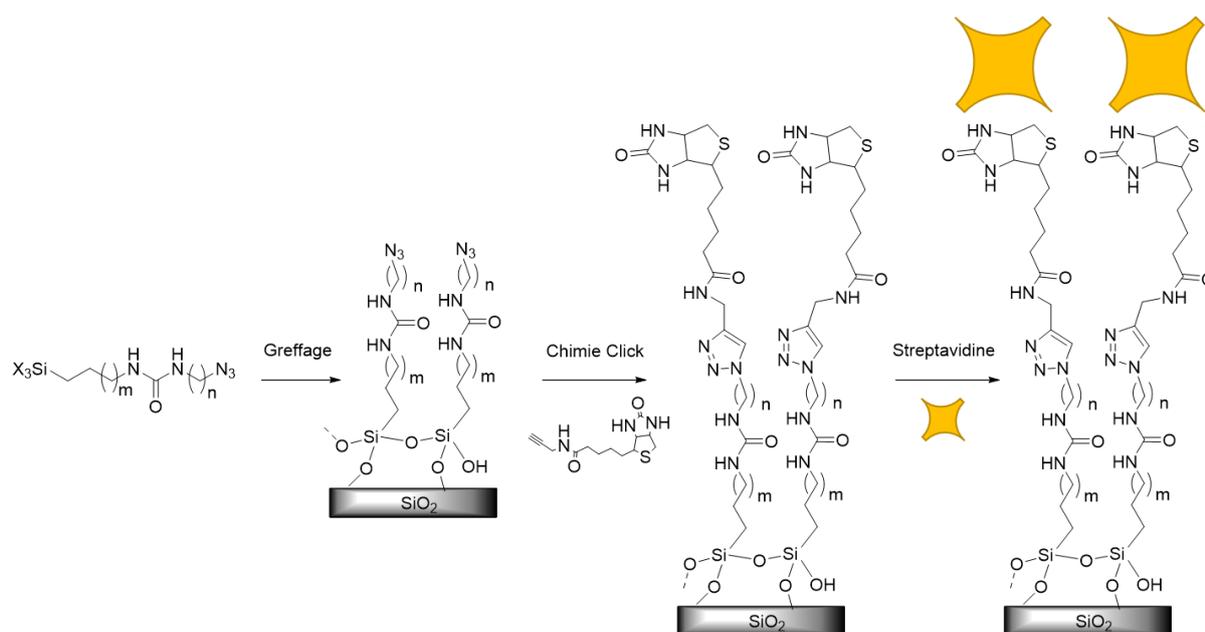


Figure 30. Démarche envisagée pour la création de plateforme versatile pour biosenseurs

A- Les azotures

a- Chimie des azotures

Les azotures sont des intermédiaires très importants en chimie organique et notamment en synthèse. Ils sont utilisés comme précurseurs pour la synthèse d'amines, d'amide, de pyridines ou encore de triazoles *via* une réaction de chimie « click ». Depuis la découverte des premiers azotures organiques, les azotures phényliques, par Peter Griëß en 1864^{2,3} de nombreuses réactions impliquant des azotures ont été développées, mettant à profit à la fois leur grande stabilité ainsi que leur bonne réactivité vis-à-vis de nombreux produits. En effet, les azotures organiques peuvent réagir avec des composés aussi bien électrophiles que nucléophiles, afin d'obtenir une grande variété de produits, comme des amines (primaires, secondaire ou tertiaires), des imides, des isocyanates, ...⁴.

Néanmoins, les azotures sont principalement utilisés à l'heure actuelle pour leur implication dans la réaction de chimie dite « click » de cycloaddition d'alcyne-azoture catalysée au cuivre (*Copper catalyzed Alkyne-Azide Cycloaddition*, CuAAC). Cette réaction, bioorthogonale, appelée aussi cycloaddition de Huisgens, est devenue l'un des exemples les plus connus de chimie « click », et connaît un intérêt grandissant dans divers domaines comme la biochimie, la chimie organique ou encore la chimie des polymères et des biomatériaux.

Le terme de chimie « click » (ou parfois chimie « clic » en français) est à l'origine un terme générique définissant l'ensemble des réactions « one-step » répondant aux conditions de Sharpless définies en 2001⁵ :

- Haut rendement chimique
- Economique en atomes
- Facile à mettre en œuvre
- Propre
- Insensible aux milieux aqueux et riches en oxygène

La plupart des réactions répondant à ces critères sont des réactions biocompatibles et biomimétiques telles que les réactions thiol-ènes, la réaction de Diels-Alder (et rétro-Diels-Alder), certaines réactions de substitution nucléophile (principalement de type S_N2) ou encore certaines réactions d'addition sur les doubles liaisons carbone-carbone (**Figure 31**).



Figure 31. Exemples de réaction de chimie « click » : une réaction Thiol-ène (gauche) et de Diels-Alder (droite).

Mais force est de constater que la cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens est devenu depuis une quinzaine d'années le porte étendard de la chimie « click »⁶. Elle met en jeu un acétylène

terminal ainsi qu'un azoture (1,3-dipôle). Elle est parfois appelée cycloaddition [3+2] en référence au nombre d'atomes apportés par chaque espèce à la formation du cycle triazole.

Avant le développement de la catalyse au cuivre (CuAAC), cette réaction pouvait être mise en œuvre dans des conditions thermodynamiques « dures », en exposant les composés à de très hautes températures pendant de longues périodes (jusqu'à 48 heures)⁷. Cette réaction thermique était non spécifique, et donnait lieu à deux régioisomères possibles (le produit 1,4 et le produit 1,5). Afin d'orienter la réaction vers l'un ou l'autre des isomères, il était possible de jouer sur les groupements voisins de l'alcyne ou de l'azoture. En effet, la présence de groupements attracteurs d'électrons sur l'acétylène favorise l'obtention de l'isomère 1,4 alors que la présence de groupements électroattracteurs sur l'azoture favorise le produit 1,5⁷.

Un moment charnière pour la réaction de Huisgens fut la découverte de sa catalyse au cuivre (I) qui permet à la fois d'augmenter considérablement la vitesse de réaction (d'un facteur 10^7 à 10^8), mais aussi de promouvoir la régiospécificité du processus en obtenant exclusivement l'isomère 1,4 (**Figure 32**).

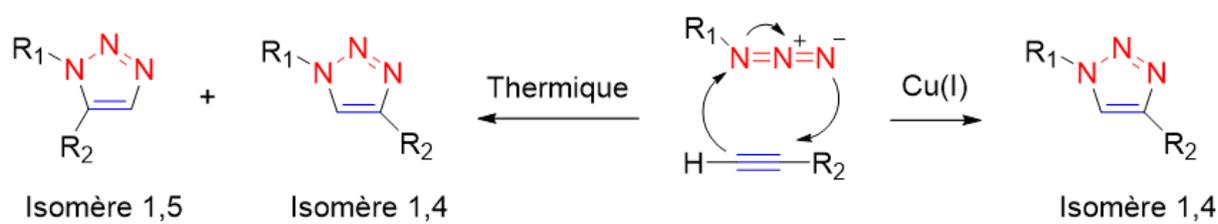


Figure 32. Cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgens avec les deux isomères obtenus lors d'une réaction thermique (gauche) et l'isomère 1,4 obtenue lors de la CuAAC régiosélective

Cette découverte s'est faite simultanément par Meldal et al. en 2002, alors qu'ils travaillaient sur la synthèse de triazoles sur supports solides⁸, ainsi que par Sharpless et al. lors de leurs travaux sur la chimie « click ». Sharpless a mis en évidence la faisabilité de la CuAAC en milieu aqueux ainsi que l'utilisation d'une source *in situ* de cuivre (I) en utilisant de l'ascorbate de sodium et du sulfate de cuivre⁹. Il s'agit encore à l'heure actuelle des conditions classiques de la cycloaddition d'alcyne-azoture catalysée au cuivre, notamment pour son utilisation avec des biomolécules.

Le mécanisme lié à cette catalyse au cuivre (I) reste cependant toujours sujet à débat. En effet, Sharpless a tout d'abord proposé un mécanisme par étape impliquant la formation d'un intermédiaire mononucléaire Cu-acétylure alors que Fokin et al. ont proposé un mécanisme dinucléaire impliquant deux atomes de cuivre (**Figure 33**)¹⁰. Différents groupes travaillent actuellement à la résolution de ce mécanisme, en utilisant diverses techniques de modélisation ainsi que différents ligands afin d'observer leurs effets sur le cycle catalytique¹⁰.

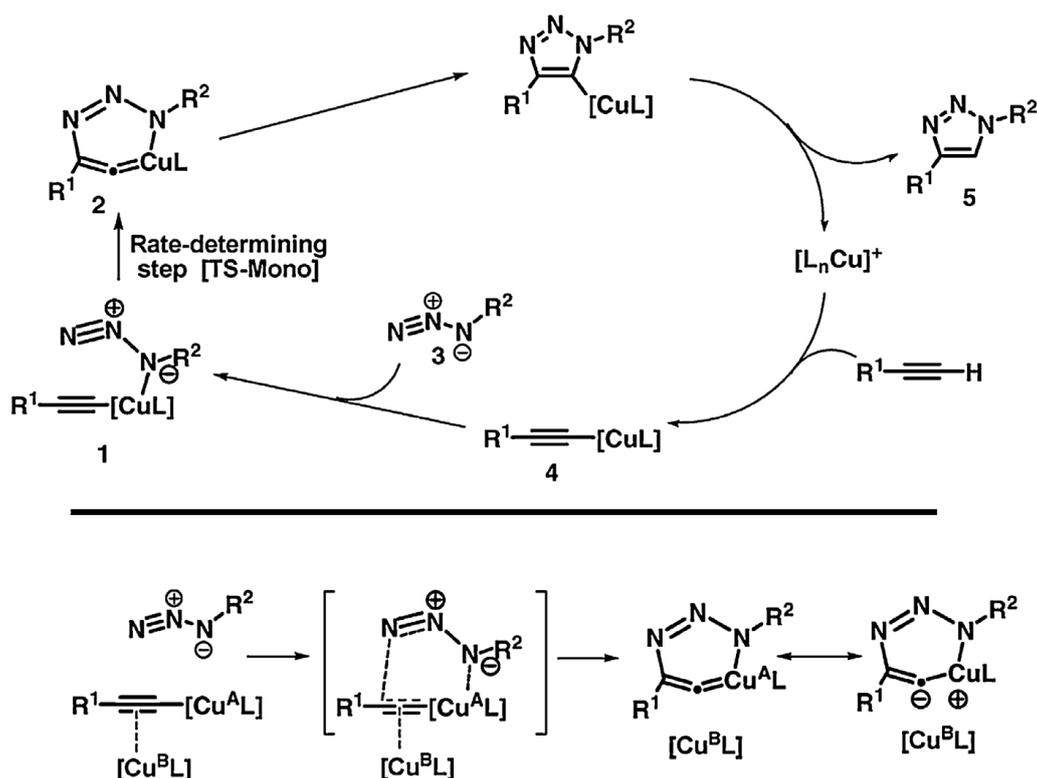


Figure 33. Mécanismes réactionnels proposés pour la CuAAC : mécanisme mononucléaire proposé par Sharpless (haut) et dinucléaire proposé par Fokin (bas)¹⁰

b- Surfaces modifiées par des azotures

La régiosélectivité et l'efficacité d'une telle réaction en font ainsi une technique d'intérêt pour la modification de surfaces. En effet, la CuAAC ne formant qu'un seul isomère, celle-ci tend d'autant plus à promouvoir l'orientation favorable de biomolécules en surface. De plus, combiné à des approches mettant en jeu des systèmes basés sur l'affinité biologique, comme les systèmes biotine-streptavidine, on peut espérer orienter de façon contrôlée les bio-récepteurs immobilisés sur le substrat. Le développement de surfaces de silice ou d'or modifiées par des azotures présente de ce fait un intérêt grandissant pour la création de matériaux fonctionnels comme les biosenseurs, les matériaux mésoporeux ou bien encore les nanoparticules^{11,12}.

En se concentrant sur la modification de surfaces planes, on peut dès lors distinguer deux approches : le greffage d'organosilanes (notre présent sujet) et l'adsorption de thiol sur lames d'or. En ce qui concerne les surfaces d'or, l'utilisation de thiols terminés par un groupement N_3 a largement été documentée¹³⁻¹⁵. Radhakrishnan et al. ont par exemple déposé un précurseur disulfure fonctionnalisé par un azoture d'aryle afin d'obtenir une SAM sur surface d'or. La réactivité des N_3 présents sur la monocouche a été démontrée par leur réduction photocatalytique en présence de quantum dots en solution aqueuse¹⁶.

D'autre part, en ce qui concerne l'utilisation d'organosilanes pour la formation de SAMs N_3 , deux voies sont envisageables. Tout d'abord, la voie classique, consiste à introduire l'azoture après fonctionnalisation de la surface de SiO_2 . Cette technique, facile à mettre en œuvre,

repose principalement sur l'utilisation d'azoture de sodium (NaN_3) sur une surface préalablement modifiée par des bromures^{17,18}. Il s'agit d'une technique de post-fonctionnalisation (approche « top-down »), largement utilisée, mais qui comporte des risques. En effet, comme toute chimie interfaciale, celle-ci peut introduire des défauts et des hétérogénéités sur la SAM (**Figure 34**).

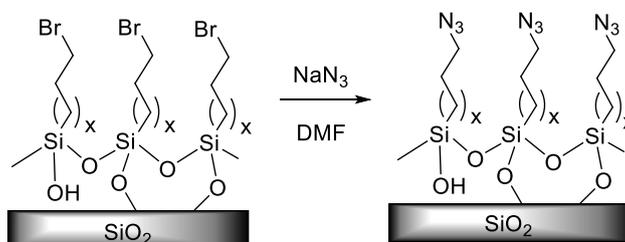


Figure 34. Formation de SAM N_3 par post-fonctionnalisation d'une SAM Br^{17,18}

Afin de pallier ces problèmes, une seconde voie consiste à utiliser des agents de couplage azoture silylés pour la modification directe (approche « bottom-up ») de surfaces d'oxyde de silicium. Diverses stratégies ont été décrites dans la littérature pour obtenir de telles molécules. Classiquement, des dérivés halogénés (ou mésylés) sont impliqués dans une réaction d'hydrosilylation afin d'obtenir les groupements silylés organiques réactifs nécessaires au greffage. S'ensuit alors une réaction de substitution nucléophile en utilisant de l'azoture de sodium afin d'obtenir le composé désiré¹⁹.

D'autres synthèses convergentes ont aussi été développées afin d'obtenir ce type de molécules. Il est par exemple possible d'utiliser des précurseurs isocyanates silylés, et de les faire réagir avec des azotures organiques possédant un groupement hydroxyle afin d'obtenir un carbamate. (**Figure 35**).

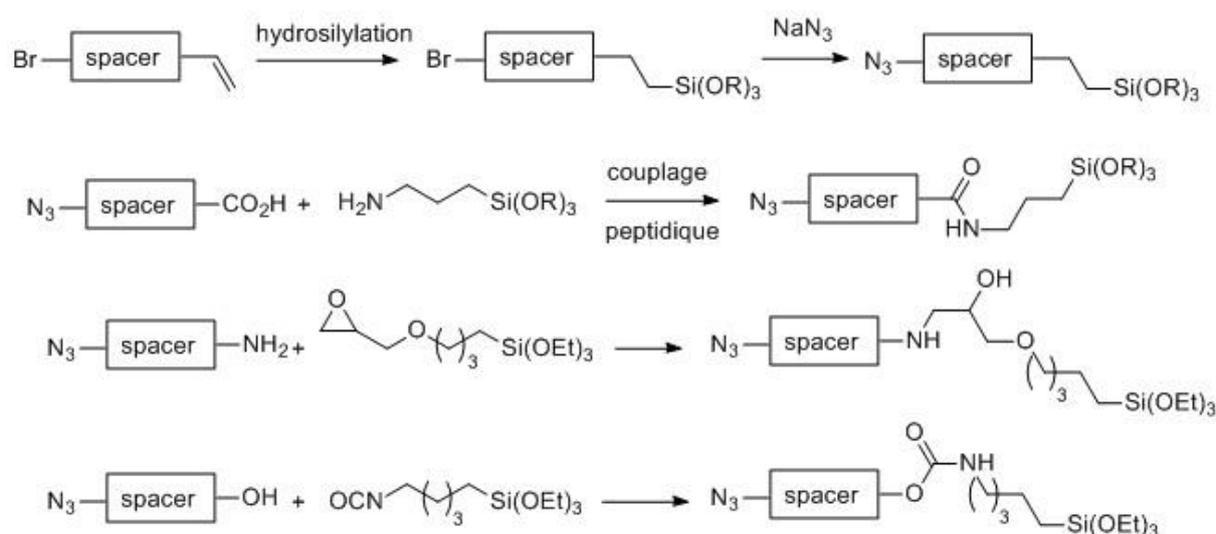


Figure 35. Méthodes documentées pour obtenir un organosilane possédant un azoture

Néanmoins, à cause de la faible stabilité des alcoxysilanes, il est préférable de considérer une voie de synthèse introduisant le groupement silylé réactif en dernier. Il est alors envisageable d'obtenir de meilleurs rendements tout en évitant des purifications pouvant rapidement devenir fastidieuses.

La méthode la plus couramment utilisée pour introduire un groupement silylé est la réaction d'hydrosilylation employant le catalyseur de Karstedt sur les doubles liaisons carbone-carbone. Après une étude bibliographique approfondie, il est apparu qu'aucune équipe de recherche n'a, à notre connaissance, développé de méthodes afin d'introduire le groupement silylé par hydrosilylation d'un dérivé azoture.

Notre travail s'est alors porté sur la synthèse d'agent de couplage silylé présentant un groupement azoture terminal, et dont l'alkoxysilane a été introduit lors de la dernière étape, par hydrosilylation.

B- Synthèse d'agents de couplage comportant un motif urée et une fonction azoture

Pour fonctionnaliser des surfaces de SiO₂ et leur donner une activité bioorthogonale permettant d'orienter favorablement des bio-récepteurs sur le dessus de la SAM, notre choix s'est porté sur la synthèse d'agents de couplage possédant à la fois un motif urée et une fonction azoture terminale.

La nouveauté de ce travail consiste en la synthèse totale de l'agent de couplage silicié pour donner la fonctionnalité à la surface en une seule étape de greffage (approche « bottom-up » sans post-fonctionnalisation). De plus, nous avons voulu explorer une nouvelle méthode de synthèse d'agent de couplage de type azoture, en introduisant le groupement silicié lors d'une étape finale d'hydrosilylation. A notre connaissance, cette méthode n'a jamais été rapportée dans la littérature, et si elle se montre efficace, pourrait rendre la synthèse de tels agents beaucoup moins fastidieuse.

La molécule considérée doit ainsi posséder les caractéristiques suivantes :

- La présence d'un motif urée pour assurer un auto-assemblage par liaisons hydrogène intermoléculaires
- Un groupement alcoxysilane terminal stable introduit en dernier pour un greffage thermodynamique facilité
- Un groupement azoture pour donner l'activité bioorthogonale à la surface (**Figure 36**)

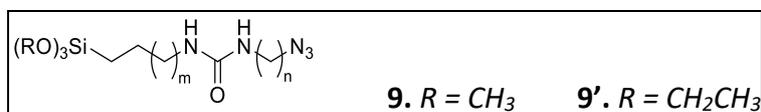


Figure 36. Structure générale des agents de couplage siliciés considérés

La stratégie de synthèse pour obtenir une telle molécule terminée par un groupement triméthoxysilane est la suivante (**Figure 37**) :

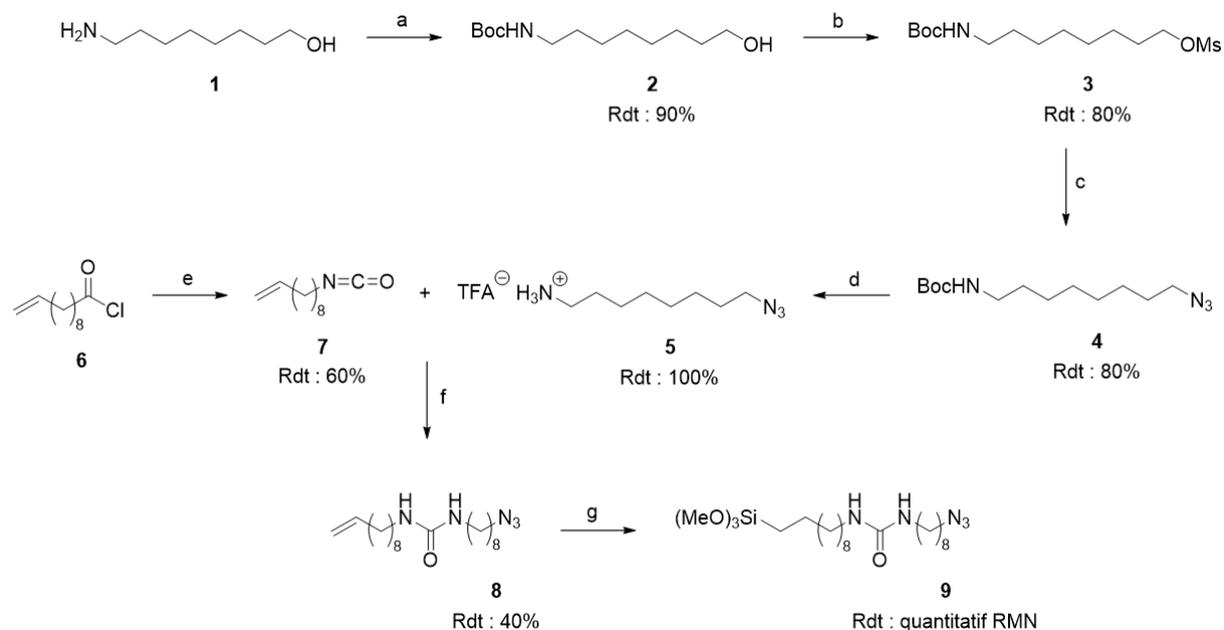


Figure 37. Réactifs et conditions : a- Boc₂O (1.2 eq.), CH₂Cl₂, 0°C puis TA, 12h ; b- TEA (1.5 eq.), MsCl (1.1 eq.), CH₂Cl₂, 12h ; c- NaN₃ (3 eq.), DMF anhydre, 36h ; d- TFA (12 eq.), CH₂Cl₂, 0°C puis TA, 12h ; e- NaN₃ (3 eq.), toluène, 12h à TA puis 20h à 75°C ; f- TEA (1.5 eq.), 10-isocyanatodéc-1-ène (1.1 eq.), DMF, 12h ; g- HSi(MeO)₃ (5 eq.), cat. Karstedt (0.025 eq. en Pt), CHCl₃, 60°C, 3h

Après une protection de l'amine par un groupement Boc, l'hydroxyle est activé par du chlorure de mésyle avant d'être engagé dans une substitution par NaN₃. L'amine est par la suite déprotégée afin de réagir avec l'isocyanate pour obtenir le précurseur éthylénique grâce à la formation du motif urée. Enfin, lors de la dernière étape, le groupement alcoxysilane est introduit sur la double liaison carbone-carbone par une réaction d'hydrosilylation catalytique.

a- Synthèse du 10-isocyanatodéc-1-ène 7

La méthode conventionnelle pour obtenir un isocyanate est d'effectuer un réarrangement de Curtius à partir d'un azoture d'acyle. Afin d'obtenir ce dernier, le chlorure de 10-undécénoyle **6** est mis en présence d'azoture de sodium en milieu anhydre. L'isocyanate **7** est ensuite obtenu par décomposition thermique de l'azoture d'acyle, puis par réarrangement sigmatropique suprafacial [1,2] de l'intermédiaire nitrène²⁰ (**Figure 38**).

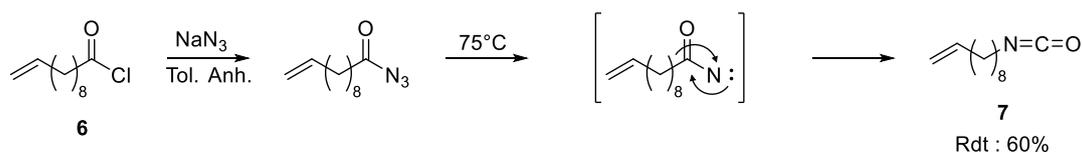


Figure 38. Synthèse de l'isocyanate **7** par réarrangement de Curtius

b- Synthèse du 8-azido-1-octylamine à partir du 8-amino-1-octanol

1- Protection de la fonction amine et activation du groupement hydroxyle

Afin d'activer le groupement hydroxyle en méthanesulfonate, il convient tout d'abord de protéger l'amine primaire qui pourrait autrement réagir avec le chlorure de mésyle pour former un méthanesulfonamide stable (**Figure 39**).

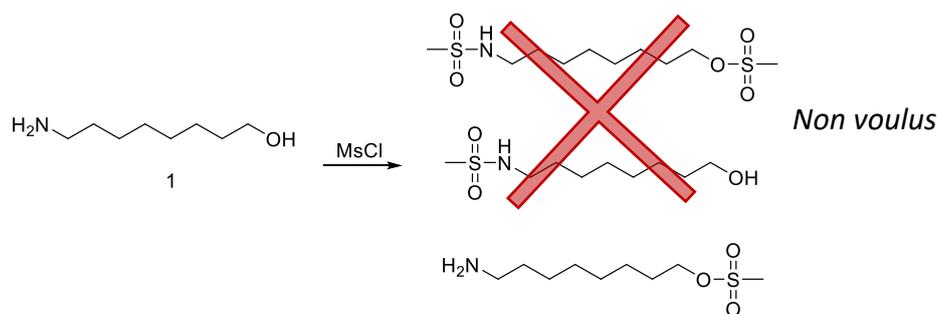


Figure 39. Produits pouvant être obtenus suite à la réaction du chlorure de mésyle sur le 8-amino-1-octanol **1**

i- Protection de l'amine par un groupement Boc

Le 8-amino-1-alcool **1** peut être protégé sélectivement sur l'amine par un groupement Boc. Cette réaction s'effectue par ajout de di-*tert*-butyle dicarbonate à une solution de 8-amino-1-alcool **1** dans le dichlorométhane. Elle est quasi quantitative et peut être suivie par le dégagement de CO₂ au cours de la réaction (**Figure 40**).

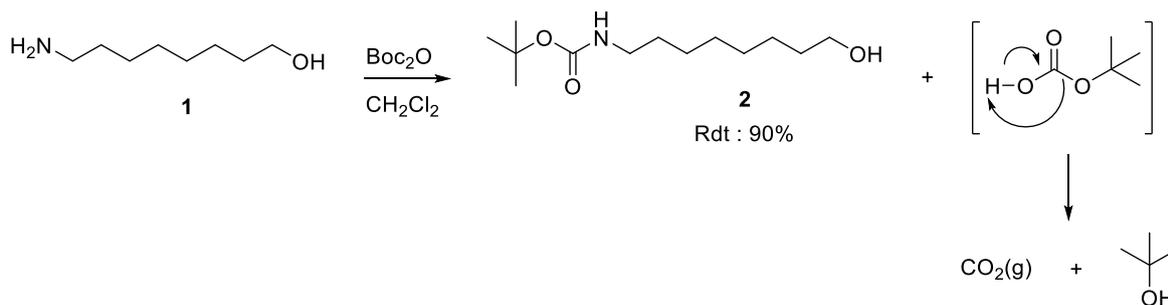


Figure 40. Protection de l'amine en présence de Boc₂O

ii- Activation du groupement hydroxyle en méthanesulfonate

Afin de substituer le groupement hydroxyle par un azoture, il convient au préalable de l'activer. Maintenant que l'amine primaire est protégée par un groupement *tert*-butyle, le chlorure de mésyle ne peut que réagir sur l'alcool primaire. Il est néanmoins important de noter que le groupement Boc est aisément clivé en milieu acide. Or, la réaction entre l'alcool

et le chlorure de méthanesulfonyle produit un dégagement gazeux d'acide chlorhydrique. Il faut donc introduire au préalable dans le milieu réactionnel de la triéthylamine (ou tout autre base faible) afin de quencher le dégagement de HCl et préserver la protection Boc de l'amine (**Figure 41**).

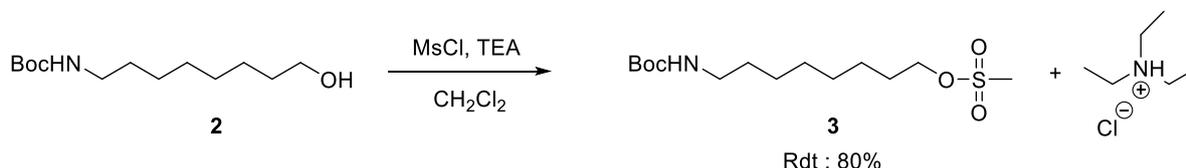


Figure 41. Activation du groupement hydroxyle en présence de chlorure de mésyle et de triéthylamine

2- Obtention de l'azoture de 4 par substitution nucleophile

Le groupement mésylate étant un bon groupement nucléofuge, cette étape consiste à faire réagir le composé **3** avec de l'azoture de sodium NaN_3 . Cette substitution s'effectue en milieu anhydre afin de ne pas hydrolyser le mésylate.

3- Déprotection de la fonction amine et obtention du sel de 8-azido-1-octylammonium 5

Cette étape consiste à déprotéger la fonction amine de l'azoture **4** avant sa réaction avec le 10-isocyanatodéc-1-ène **7**. La déprotection du groupement Boc s'effectue en milieu acide, classiquement en présence d'acide trifluoroacétique (*trifluoroacetic acid*, TFA). Cette réaction peut être conduite en milieu dilué ou en présence de TFA pur. Afin de ne pas endommager la molécule à ce stade de la synthèse, nous avons opté pour une déprotection avec du TFA dilué dans du dichlorométhane. La réaction peut être suivie par le dégagement de CO_2 engendré par la déprotection et le réarrangement du *tert*-butanol produit. Le 8-azido-1-octylammonium **5** est obtenu sous forme de sel de trifluoroacétate d'ammonium après élimination de l'excès de TFA par distillation azeotropique au toluène.

c- Couplage avec le 10-isocyanato-déc-1-ène 7

Le couplage entre le sel de 8-azido-1-octylammonium **5** et le 10-isocyanatodéc-1-ène **7** peut être réalisé en milieu anhydre après ajout d'une base faible afin de rendre l'amine nucléophile. Le produit obtenu est tout d'abord précipité dans le pentane puis lavé au pentane afin d'éliminer les restes d'isocyanate n'ayant pas réagi. Le composé **8** est ensuite obtenu après purification sur colonne de silice (**Figure 42**).

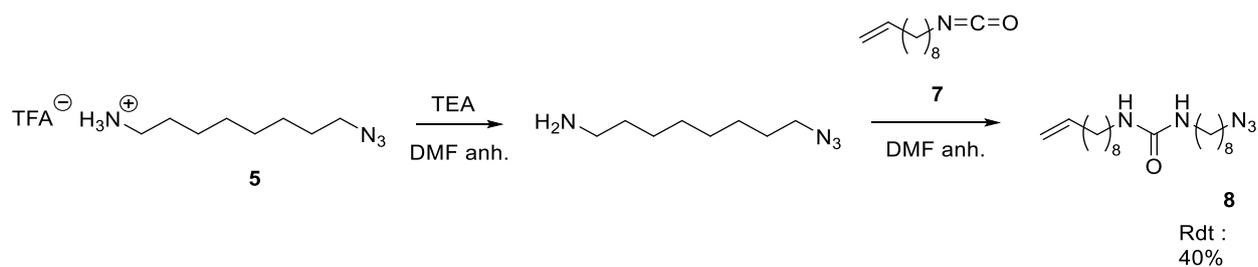


Figure 42. Couplage entre l'amine et l'isocyanate après déprotonation du sel d'ammonium

d- Hydrosilylation du précurseur urée-azoture insaturé **8**

1- Hydrosilylation catalytique des oléfines terminales

Une méthode classique pour former des organosilanes terminaux de type $RCH_2CH_2SiX_3$ est d'utiliser la réaction d'hydrosilylation²¹. Celle-ci met en jeu un composé éthylénique (terminal dans notre cas) et un trichloro- ou trialkoxysilane dans une réaction catalysée au platine. Elle est couramment utilisée en chimie organique car elle est normalement compatible avec un grand nombre de groupements fonctionnels (époxydes, urées, carbamates, ...). Le catalyseur de Karstedt est le plus souvent utilisé : c'est un complexe de platine (0) chélaté par du divinyltétraméthylsiloxane (**Figure 43**).

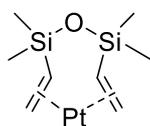


Figure 43. Catalyseur de Karstedt

Comme beaucoup de réactions catalytiques, son mécanisme détaillé fait l'objet de nombreuses recherches afin d'identifier les espèces mises en jeu et créées lors du cycle catalytique. Actuellement, le mécanisme classique de Chalk-Harrod semble le plus couramment plébiscité²² (**Figure 44**).

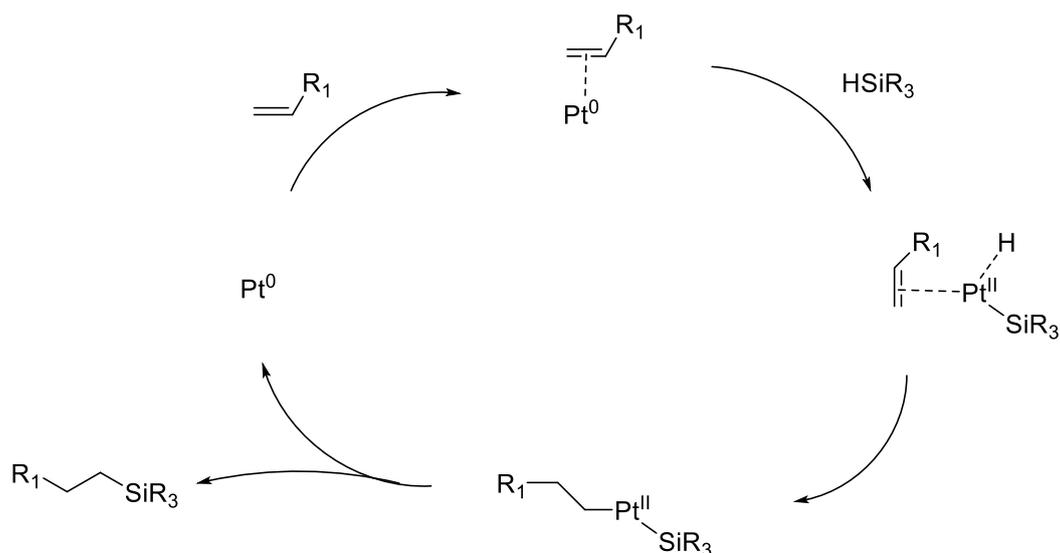


Figure 44. Cycle catalytique de la réaction d'hydrosilylation selon Chalk et Harrod²²

Durant ce mécanisme, il y a tout d'abord coordination entre l'oléfine terminale et le platine (0) avant addition oxydante de HSiR_3 . Dans ce complexe de Pt^{II} , l'oléfine migre entre le platine et l'atome d'hydrogène en formant une liaison R-Pt^{II} , avant l'élimination réductrice formant l'organosilane final et régénérant le catalyseur sous sa forme Pt^0 .

Il existe une autre version de ce mécanisme appelée mécanisme de Chalk-Harrod modifié dans lequel l'oléfine peut migrer entre la liaison Pt-SiR_3 ²² (**Figure 45**).

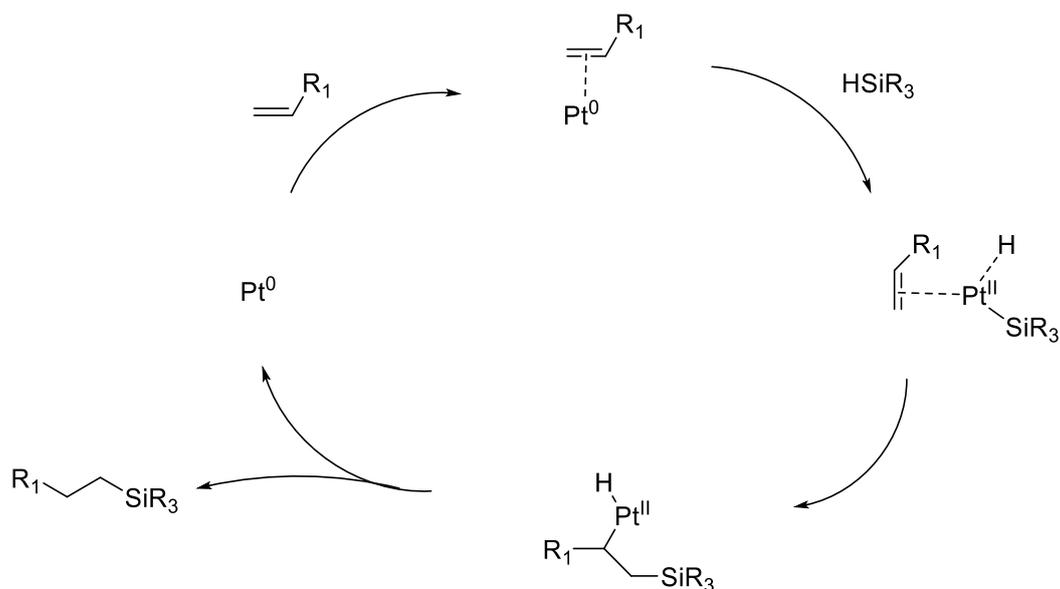


Figure 45. Mécanisme de Chalk et Harrod modifié²²

En considérant les oléfines terminales, il est donc possible d'obtenir deux isomères suite à l'hydrosilylation. Néanmoins, le catalyseur de Karstedt présente l'avantage de former principalement l'isomère β , correspondant à l'addition en bout de chaîne du groupement silane (**Figure 46**).

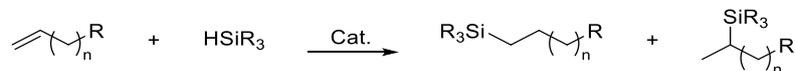


Figure 46. Les deux isomères obtenus dans le cadre des oléfines terminales : l'isomère β (gauche) et l'isomère α (droite)

2- Hydrosilylation d'oléfine modèle

i- Synthèse du 11-azido-undéc-1-ène **11**

Bien que la réaction d'hydrosilylation catalytique soit réputée compatible avec beaucoup de groupements fonctionnels, il convient tout d'abord de vérifier l'intégrité des groupements azotures terminaux lors de ce processus. En effet, comme à notre connaissance aucune réaction d'hydrosilylation n'a été conduite sur des oléfines terminales comportant un azoture, il est judicieux de tester cette réaction sur une oléfine modèle afin de ne pas engager le précurseur azoture-urée **8** (**Figure 47**).

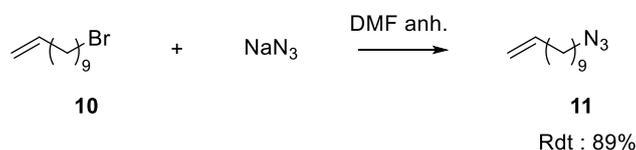


Figure 47. Synthèse du 8-azido-undéc-1-ène **11** à partir du 8-bromo-undéc-1-ène **10**

Pour obtenir le 11-azido-undéc-1-ène **11**, le 11-bromo-undéc-1-ène **10** est engagé dans une réaction de substitution avec de l'azoture de sodium NaN_3 . Cette molécule, simple, se présente comme un modèle idéal pour étudier l'hydrosilylation des azotures éthyléniques. En effet, elle ne possède que les deux fonctions terminales d'intérêt et est donc facile à analyser. L'obtention de la molécule est ainsi dans un premier temps vérifiée par RMN ^1H (**Figure 48**).

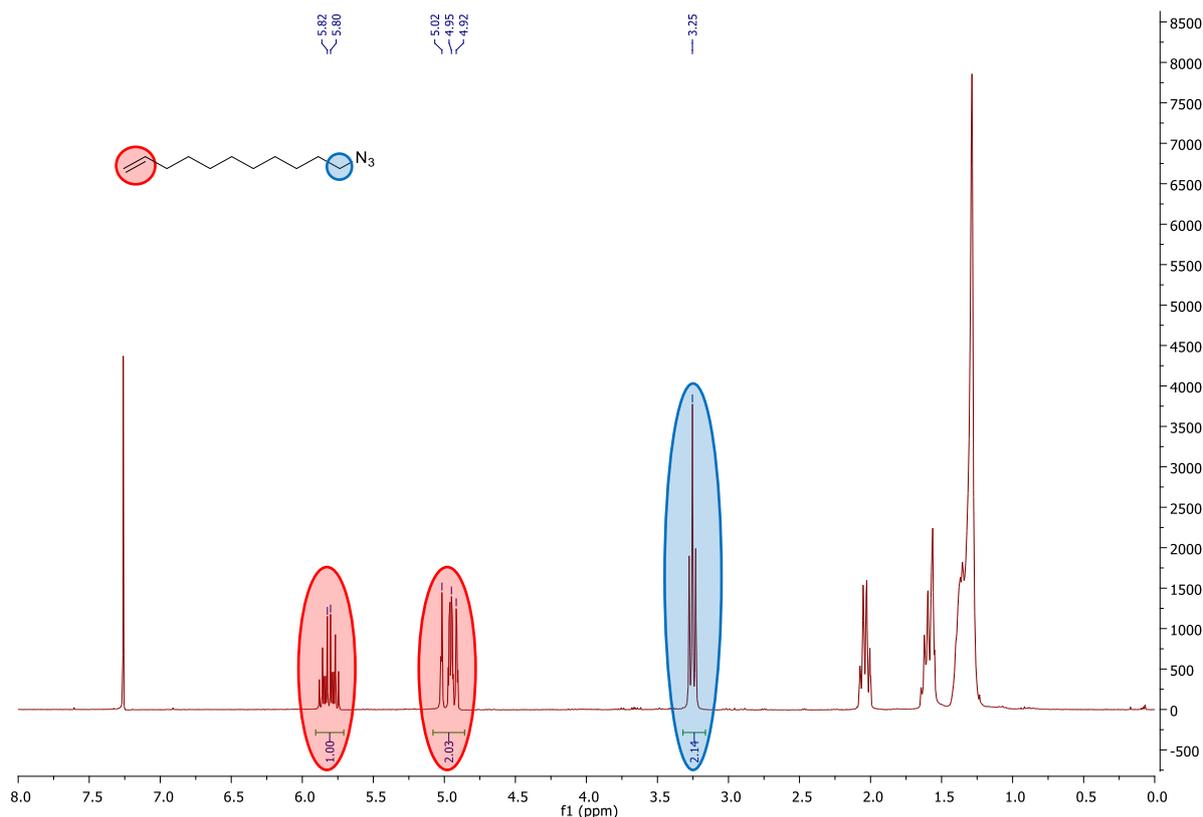


Figure 48. Spectre RMN ^1H du 11-azido-undéc-1-ène **11**

On retrouve sur le spectre RMN ^1H les trois signaux qui caractérisent les deux fonctions terminales. Tout d'abord les deux signaux correspondant à la double liaison carbone-carbone situés à 5.81 et 4.95 ppm (notés en rouge) prouvent la présence du groupement terminal éthylénique. La présence de l'azoture à l'opposé de la chaîne carbonée ne peut cependant être vérifiée que de façon indirecte. On retrouve ainsi le signal du CH_2 lié à l'azoture à 3.25 ppm (noté en bleu) et intégrant pour deux protons. Le reste du spectre, ainsi que le spectre ^{13}C et la présence des deux carbones éthyléniques, finissent de confirmer l'obtention de la molécule.

Afin de vérifier l'intégrité de l'azoture, nous avons décidé de l'analyser par une technique complémentaire permettant la visualisation directe du « N_3 » : l'infrarouge en mode ATR (**Figure 49**).

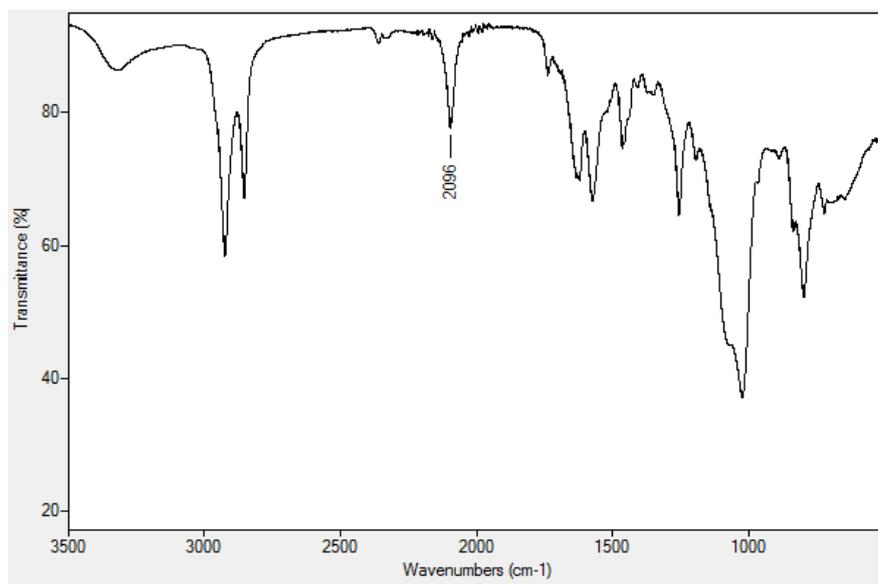


Figure 49. Spectre infrarouge ATR du 11-azido-undéc-1-ène **11**

On note clairement la bande à 2096 cm^{-1} , fine, prouvant sans équivoque la présence de l'azoture terminal sur la molécule.

ii- Hydrosilylation de la molécule modèle **11**

Pour son hydrosilylation, la molécule modèle **11** a tout d'abord été solubilisée dans le chloroforme anhydre fraîchement distillé. Le milieu est maintenu sous atmosphère inerte (sous argon) afin d'éviter l'hydrolyse prématurée de l'organosilane. Le précurseur silylé est obtenu après ajout d'un excès de triméthoxysilane (5 eq.) et du catalyseur de Karstedt (0.025 eq. en Pt^0). La réaction est conduite en schlenk scellé sous argon durant 3h à 60°C .

Ces conditions de réaction tiennent compte de la solubilité du produit **11** dans un solvant adapté à l'hydrosilylation ainsi que des précédents travaux effectués dans le groupe C2M^{23,24} (**Figure 50**).

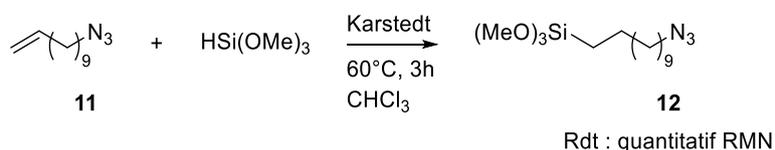


Figure 50. Hydrosilylation du 11-azido-undéc-1-ène **11**

L'obtention du composé 11-azidoundécyltriméthoxysilane **12** dans ces conditions est tout d'abord vérifiée par RMN du proton. Comme précisé précédemment, le spectre du précurseur éthylénique présente trois signaux d'intérêt. Afin de montrer que la réaction s'est déroulée

sans endommager l'azoture terminal il faut alors montrer la disparition des pics éthyléniques à 5.81 et 4.95 ppm (notés en rouge) et la conservation du signal du CH₂ en α de l'azoture (noté en bleu) (Figure 51).

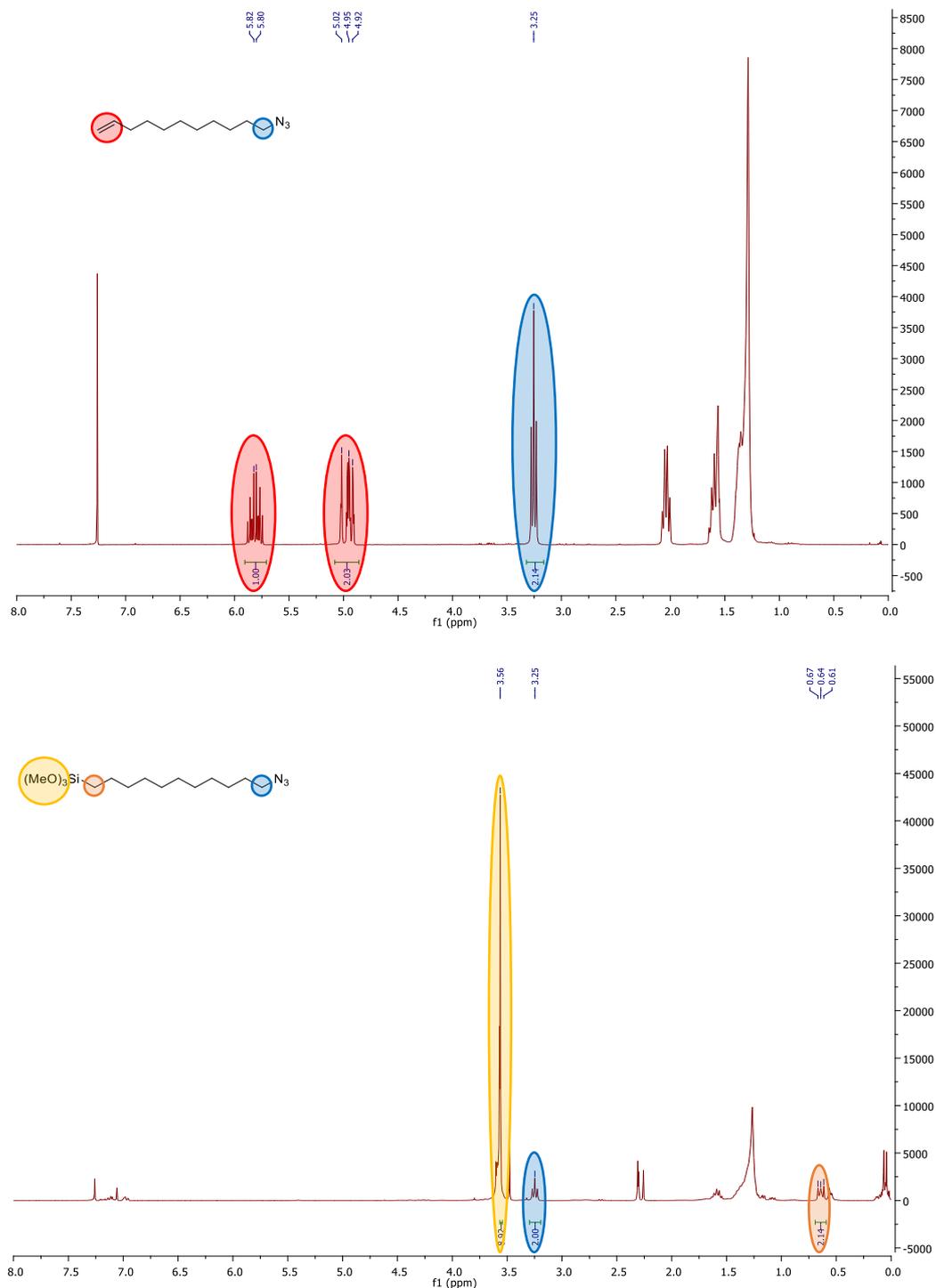


Figure 51. Comparatif des spectres RMN ¹H des composés **11** (en haut) et **12** (en bas)

La disparition des deux pics éthyléniques est clairement visible sur le spectre ^1H après hydrosilylation, ainsi que la conservation du pic du CH_2 lié à l'azoture à 3.25 ppm (noté en **bleu**). Il y a donc bien disparition de la double liaison carbone-carbone, au profit de l'apparition de nouveaux pics, à 0.64 ppm, correspondant au signal très blindé du CH_2 lié à l'atome de silicium (notés en **orange**). Enfin, le groupement triméthoxysilyle apparaît clairement *via* le pic correspondant aux CH_3 à 3.56 ppm (noté en **jaune**).

Cette analyse du spectre ^1H est confirmée par le spectre ^{13}C , et il semble donc que le produit **12** ait été obtenu après hydrosilylation.

Pour confirmer directement la conservation du groupement azoture terminal, le composé hydrosilylé **12** a aussi été analysé par infrarouge (**Figure 52**).

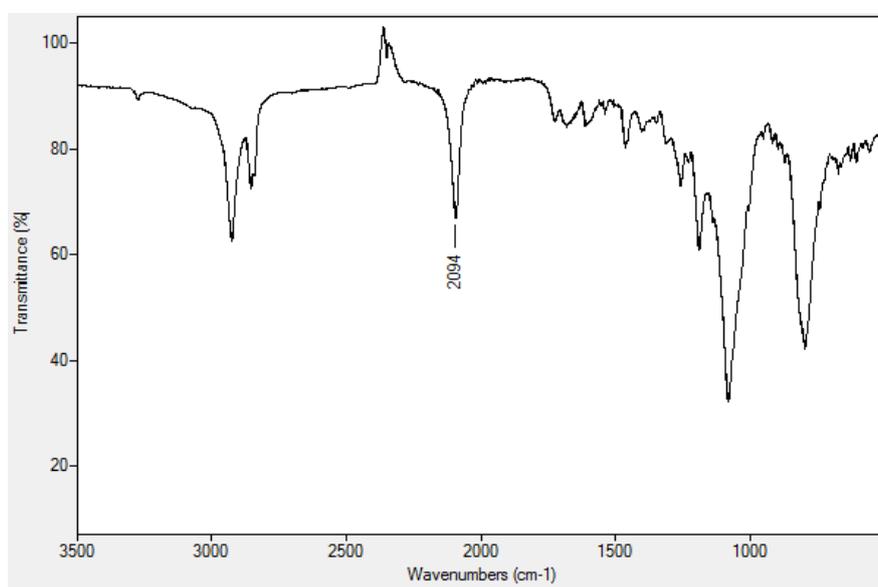


Figure 52. Spectre infrarouge ATR du composé 11-azidoundécyltriméthoxysilane **12**

Sur le spectre ci-dessus, on note clairement la conservation de la bande à 2096 cm^{-1} , correspondant au groupement « N_3 ».

A l'issue de cette expérience, on est donc en mesure d'affirmer que la réaction d'hydrosilylation catalytique peut être transposée aux précurseurs insaturés contenant un azoture. A notre connaissance, ceci est la première description d'une telle réaction, et les différentes techniques d'analyses nous permettent d'affirmer que l'azoture n'est pas endommagé durant le processus.

3- Hydrosilylation de l'azoture-urée insaturée **8**

Au vu des précédents résultats, l'hydrosilylation du précurseur éthylénique **8** a été réalisée dans les mêmes conditions que celle de la molécule modèle **11** : 5 équivalents de triméthoxysilane pour 0.025 équivalent de catalyseur en platine (**Figure 53**) (cf. page 57).

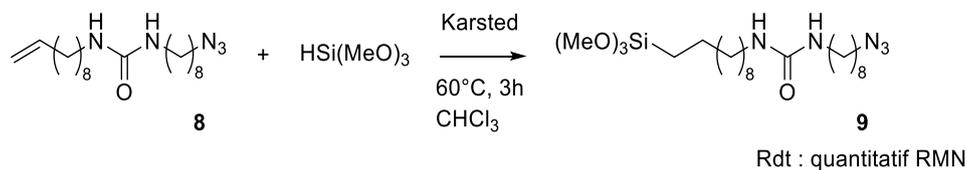
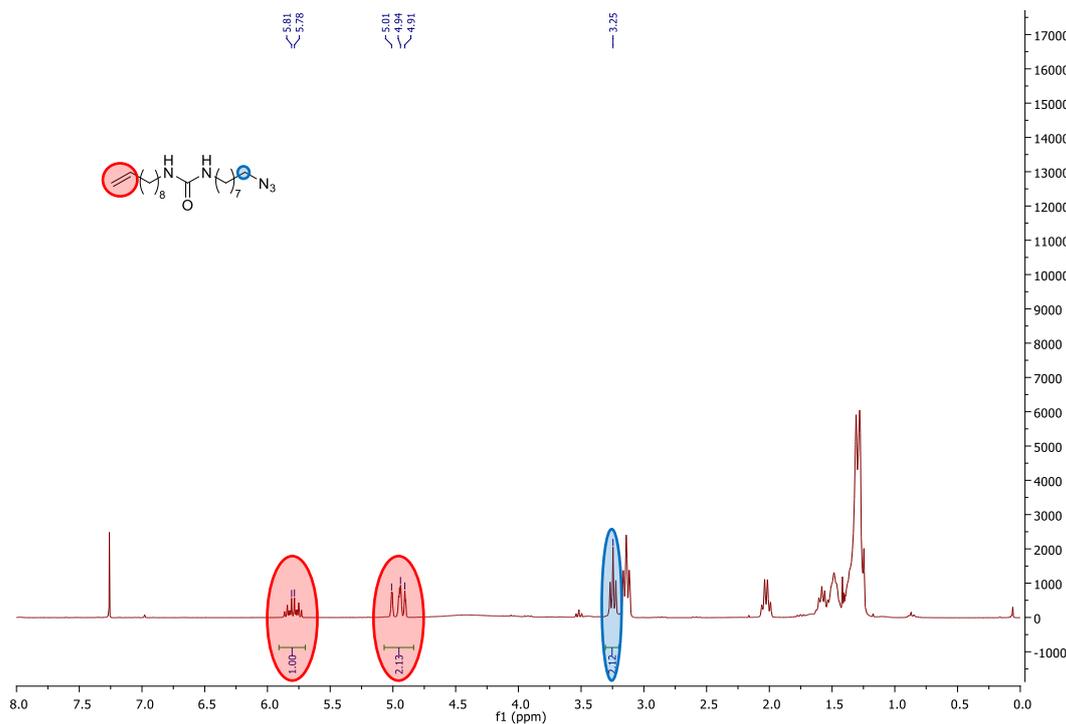


Figure 53. Hydrosilylation du précurseur éthylénique **8**

Le composé hydrosilylé **9** est obtenu et analysé par RMN ^1H , ^{13}C et infrarouge. Comme pour l'oléfine modèle **11**, les signaux importants à comparer en RMN ^1H avant et après réaction sont les signaux correspondant au groupement éthylénique, au CH_2 lié à l'azoture, au CH_2 lié au silicium ainsi qu'aux CH_3 du triméthoxysilane (**Figure 54**).



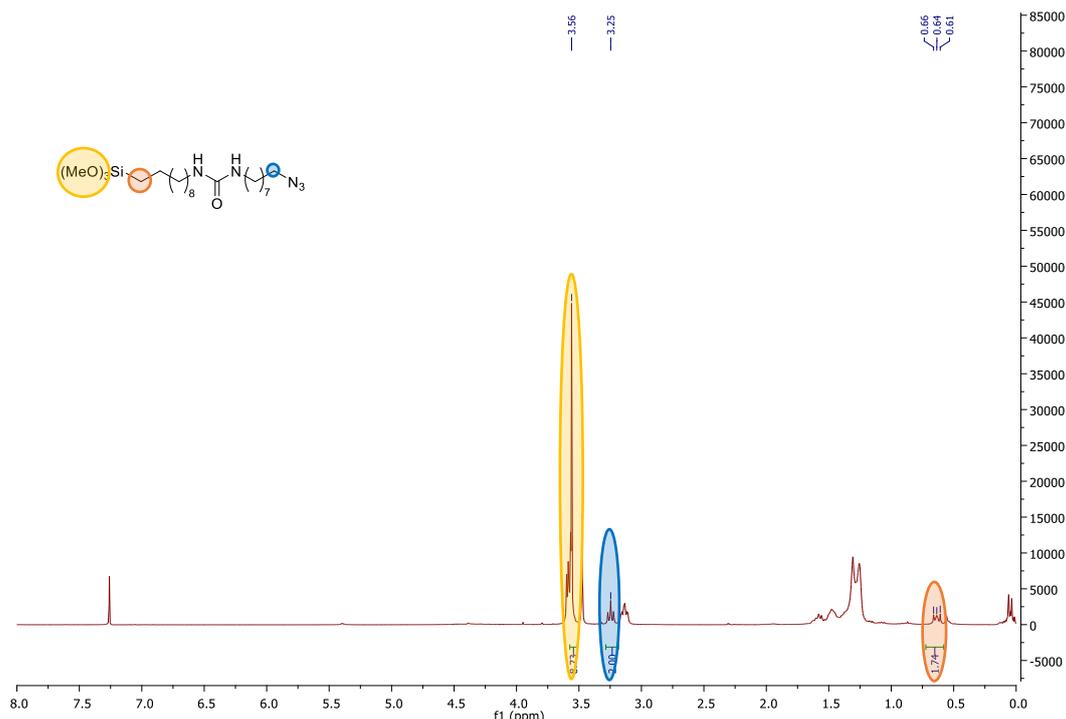


Figure 54. Comparatif des spectres RMN ^1H des composés **8** (en haut) et **9** (en bas)

Sur la comparaison des spectres ci-dessus, il y a donc bien disparition des pics éthylénique à 5.81 et 4.94 ppm (notés en **rouge**), conservation du pic correspondant au CH_2 lié à l'azoture à 3.25 ppm (noté en **bleu**) et apparition des pics correspondant au CH_2 lié au silicium ainsi que de ceux du groupe triméthoxysilyle (respectivement à 0.64 et 3.56 ppm, notés en **orange** et en **jaune**). La réaction d'hydrosilylation a donc permis d'obtenir l'agent de couplage **9**.

L'analyse du spectre ^{13}C , ainsi que du spectre infrarouge (**Figure 55**) ci-dessous montre que l'azoture de la molécule **9** est bien présent et non endommagé par le processus.

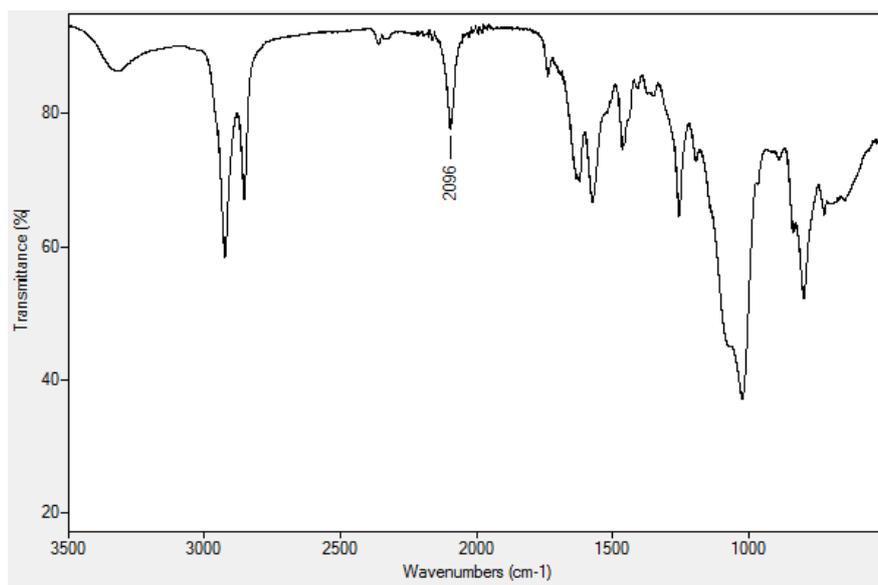


Figure 55. Spectre infrarouge ATR du composé **9**

Nous avons donc montré, en utilisant une molécule modèle **11** et le précurseur éthylénique **8** possédant une urée, que la réaction d'hydrosilylation catalysée au Pt^0 pouvait être transcrite aux dérivés contenant un azoture. Non seulement cette réaction ne détériore pas le groupement N_3 présent, mais semble applicable à beaucoup de dérivés quelle que soit leur structure. En effet, au sein du laboratoire, nous avons appliqué cette réaction à différents composés en suivant les mêmes conditions de réaction. Cela nous a permis de constater que des substrats contenant des chaîons éthylène-glycol ou bien encore des cycles aromatiques pouvaient être hydrosilylés sans problèmes (**Figure 56**).

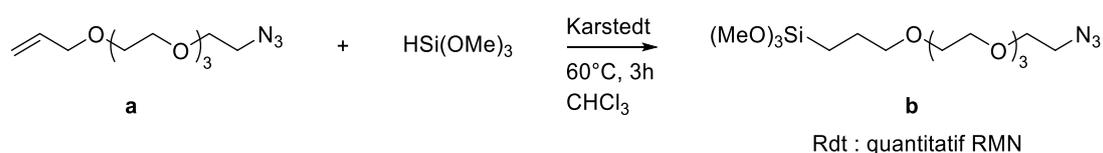


Figure 56. Hydrosilylation du composé **a** avec du triméthoxysilane

Ainsi, nous avons employé ces conditions de synthèse sur un composé de type azido-undécène-tri-éthylène-glycol, afin d'obtenir un agent de couplage azidoundécyltri(éthylène-glycol)-triméthoxysilane **b**.

Nous avons aussi voulu vérifier que la faisabilité de cette réaction n'était pas dépendante du groupement alcoxysilane utilisé. Ainsi, à partir du composé **8** nous avons synthétisé le produit **9'** qui résulte de l'hydrosilylation avec du triéthoxysilane (**Figure 57**).

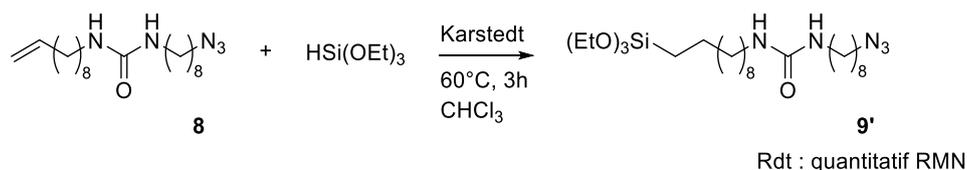


Figure 57. Hydrosilylation du composé **8** avec du triéthoxysilane

Cette réaction s'effectue dans les mêmes conditions que pour l'obtention du composé **9**. Le produit **9'** est par la suite caractérisé par RMN ^1H et ^{13}C , ainsi que par infrarouge. On observe bien sur le spectre ^1H la disparition des pics éthyléniques ainsi que la conservation du signal correspondant au CH_2 lié à l'azoture. Le spectre infrarouge ATR quant à lui montre une bande à 2100 cm^{-1} correspondant au groupement N_3 . La réaction d'hydrosilylation des dérivés azoture-éthyléniques est donc bien indépendante du substrat et de l'alkoxysilane utilisé.

*A l'issue de ce travail de synthèse, nous avons donc pu obtenir l'agent de couplage ciblé, ainsi qu'un agent de couplage modèle simplifié ne possédant pas de motif urée sur la chaîne carbonée. Cette molécule peut alors aussi être employée comme modèle lors de la préparation de SAM sur SiO_2 avant d'utiliser l'agent de couplage **9**. Nous avons aussi démontré que la réaction d'hydrosilylation catalytique pouvait être employée sur des précurseurs éthyléniques contenant un azoture. Cela permet d'obtenir des organosilanes fonctionnels de façon bien moins fastidieuse que ce qui a été décrit jusqu'à présent dans la littérature.*

C- Synthèse et caractérisation de SAMs 100% urée-azoture

a- Substrats de greffage

Afin d'effectuer le greffage des molécules précédemment obtenues, il convient d'utiliser des surfaces de SiO₂ adaptées aux techniques d'analyses à effectuer : analyses par infrarouge en mode PM-IRRAS et par AFM. Deux types de surface seront donc utilisés pour les deux analyses différentes.

Pour la microscopie à force atomique (*Atomic Force Microscope*, AFM), les substrats utilisés sont des wafers de silicium, prédécoupés et mesurant 1 cm de côté. Ces wafers seront analysés par un microscope de la marque *Bruker* et présentent une très faible rugosité (0,2 nm). Ceci présente l'avantage de pouvoir procéder à des mesures très précises du changement de l'état de surface suite aux greffages.

Pour les analyses par infrarouge en mode PM-IRRAS, nous utiliserons des surfaces de silice de 5 cm de côté qu'il faut couper avant le greffage pour obtenir des substrats de 2.5 cm de côtés adaptés au spectromètre. Il s'agit de miroirs d'or recouverts d'une couche de 20 nm de SiO₂. Ces miroirs d'or permettent une analyse en réflexion dont la fenêtre (1300-4000 cm⁻¹) est bien plus grande qu'en transmission. Cela permet aussi d'analyser efficacement la surface modifiée par une monocouche sans perdre de signal comme cela pourrait se produire en transmission (dû à l'épaisseur des substrats) (**Figure 58**).



Figure 58. Substrat pour analyse PM-IRRAS (gauche) et wafer de silicium pour AFM (droite)

En l'état, ces deux types de substrats ne permettent pas un greffage direct des organosilanes. Pour permettre l'accroche des molécules *via* le mécanisme d'hydrolyse condensation présenté par Sagiv et al. il convient tout d'abord d'activer les surfaces afin de générer des groupements silanols²⁵. L'activation des surfaces permet en outre un « nettoyage » complet du substrat, en enlevant toute pollution organique résiduelle. La méthode la plus courante pour cette étape consiste à tremper les lames dans une solution très corrosive, le mélange dit « piranha », composé d'acide sulfurique et de peroxyde d'hydrogène. Néanmoins, cette méthode, en plus d'être dangereuse pour l'utilisateur, peut endommager par érosion les surfaces et introduire des défauts sur les substrats. C'est pour cela qu'au sein du groupe C2M,

nous avons décidé d'utiliser une méthode plus « douce » et facile à mettre en œuvre : le traitement UV/Ozone. Ce traitement consiste à exposer les lames à un rayonnement UV ($\lambda = 185\text{-}254\text{ nm}$) ce qui va avoir pour effet de générer l'ozone *in situ*. En effet, le rayonnement ultra-violet réagit avec la couche d'air située entre les lampes et les substrats, ce qui a pour effet de produire des molécules de « O₃ » directement à l'affleurement des surfaces (**Figure 59**).

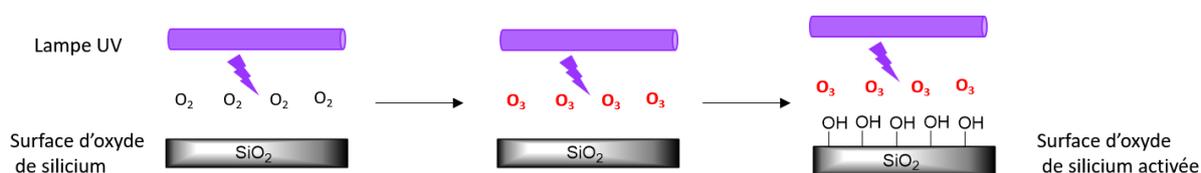


Figure 59. Activation des substrats par traitement UV/O₃

Une fois les lames lavées et activées de la sorte, celles-ci sont directement engagées dans le processus de greffage afin d'éviter une pollution de la surface à l'air ambiant.

b- Synthèse et caractérisation de la SAM-alkyle-N₃

1- Greffage du 11-azidoundécyltriméthoxysilane **12**

Afin de ne pas engager directement l'agent de couplage azoture **9**, nous avons décidé dans un premier temps d'utiliser le 11-azidoundécyltriméthoxysilane **12** afin d'étudier le greffage « bottom-up » (une seule étape, sans post-fonctionnalisation). Notre but est ici de voir si de tels agents de couplage peuvent être greffés selon le procédé précédemment mis au point au sein du laboratoire²³.

Le greffage est réalisé à 20°C, dans du chloroforme anhydre fraîchement distillé. Contrairement aux agents de couplage trichlorosiliciés, les triméthoxysilanes ont besoin d'un catalyseur acide pour activer l'hydrolyse²⁶. C'est pourquoi nous ajoutons de l'acide trichloroacétique (TCA) à la solution de greffage. En effet, lors de précédentes études il s'avère que c'est ce catalyseur à 10% molaire qui permet d'obtenir les meilleures SAMs²⁶. La concentration en agent de couplage silicié **12** dans le bain de greffage est de $2.5 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Ces conditions ont été choisies en prenant en compte la solubilité du composé et les travaux effectués au laboratoire pour obtenir des monocouches de qualité. Ne connaissant pas la dynamique de greffage de ce composé, et en se basant sur les travaux de Meillan et al. nous avons décidé d'effectuer plusieurs greffages de cette molécule avec un temps de réaction de 16h²⁴.

Il est important de noter que cette molécule, obtenue par substitution par NaN₃ sur le 11-bromoundécyltriméthoxysilane, a déjà été greffée par d'autres groupes de recherche. Ces greffages sur oxyde de silicium sont néanmoins très différents de ce que nous effectuons au sein du laboratoire. En effet, dans la littérature, les conditions habituellement employées pour

ce composé sont plutôt « dures » : processus dans le toluène entre 65°C et 100°C, forte concentration du triméthoxysilane en solution, forte concentration en catalyseur, ...²⁷⁻³¹. L'absence d'étude de l'état de surface ainsi que la mise en œuvre de telles conditions rend la comparaison entre les substrats obtenus dans la littérature et nos propres résultats très difficile.

Les substrats obtenus sont tout d'abord analysés par PM-IRRAS, en collaboration avec Thierry Buffeteau du groupe GSM de l'ISM. Cette technique étant une technique de type infrarouge, elle permet d'obtenir des informations sur les groupements fonctionnels présents en surface. La largeur et la position de certaines bandes permettent aussi de donner des informations sur l'ordre au sein de la monocouche et l'intensité des bandes observées est directement liée à la quantité de matière organique accrochée sur l'oxyde de silicium.

Le spectre obtenu pour la SAM-alkyle-N₃-100% est le suivant (**Figure 60**) :

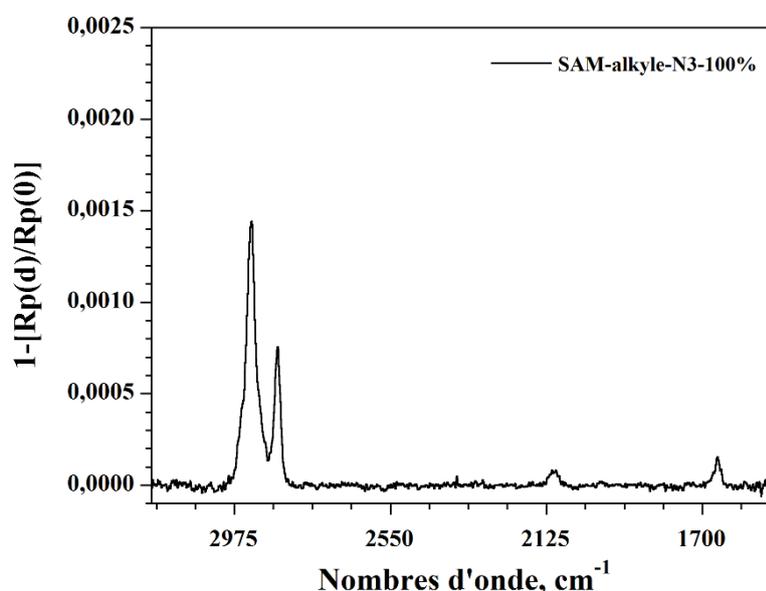


Figure 60. Spectre PM-IRRAS de la SAM-alkyle-N₃-100%

La **Figure 60**, présentant le spectre PM-IRRAS du composé **12**, montre tout d'abord les bandes caractéristiques des groupements CH₂ de la chaîne carbonée. On retrouve en effet les bandes de vibration d'élongation asymétriques et symétriques des CH₂ à respectivement 2929 cm⁻¹ ν (as) et 2858 cm⁻¹ ν (s). La position des bandes indique que la chaîne alkyle est plutôt désordonnée. En effet, il a été montré dans la littérature qu'un nombre d'onde élevé pour les bandes CH₂ asymétriques et symétriques (respectivement 2930 cm⁻¹ et 2856 cm⁻¹) témoigne d'un certain désordre de la chaîne alkyle³². Ceci s'explique par la petite taille de la chaîne alkyle ($n < 16$ atomes) qui ne permet pas la formation optimale d'interactions de van der Waals intermoléculaires. Ces bandes attestent aussi directement de la quantité de matière en

surface, et leur présence nous montre que des molécules du bain de greffage ont bien été déposées sur le substrat durant le processus.

Le 11-azidoundécyltriméthoxysilane **12** ne possédant qu'une chaîne alkyle et un azoture terminal, le spectre PM-IRRAS devrait ne révéler que les bandes associées à ces groupements. Le spectre infrarouge du composé **12** avant greffage montrant clairement la bande de l'azoture à 2100 cm^{-1} (*cf. page 59*), cette bande caractéristique devrait se retrouver au sein du spectre obtenu pour la SAM-alkyle- N_3 -100%. Or, à 2100 cm^{-1} , la bande attendue n'est quasiment pas observable sur le spectre PM-IRRAS. Cette bande, qui devrait être intense, possède la même intensité que la petite bande à 1657 cm^{-1} correspondant à de la pollution sur l'échantillon.

A ce stade des analyses, nous avons considéré plusieurs hypothèses. Nous avons tout d'abord envisagé un problème de reproductibilité, et avons donc répété l'expérience de greffage plusieurs fois tout en croisant les opérateurs. Néanmoins, tous les substrats obtenus et analysés présentent des spectres identiques : bandes CH_2 attestant d'un dépôt de matière, mais très faible intensité de la bande de l'azoture. Nous avons donc ensuite pensé à un problème d'état de surface : une SAM incomplète justifierait la faible intensité de la bande des azotures (*Figure 61*).

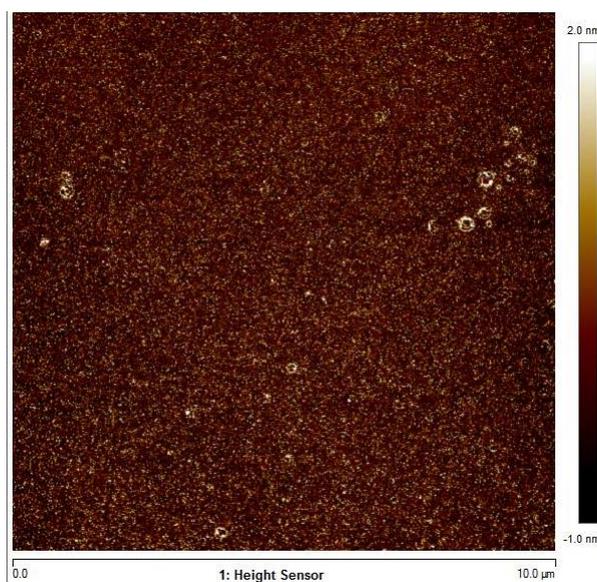


Figure 61. Image AFM de hauteur ($10\ \mu\text{m}^2$) de la SAM-alkyle- N_3 -100%

L'analyse de l'état de surface par AFM montre (*Figure 61*) une surface plutôt homogène et de faible rugosité (0.45 nm), ce qui écarte un potentiel problème de couverture des substrats.

La deuxième hypothèse envisagée est la stabilité du groupement N_3 lors du processus de greffage. Nous savons grâce aux analyses RMN et infrarouge effectuées sur le composé **12** que celui-ci est stable et supporte plutôt bien les conditions d'analyse, sans montrer de signes de

dégradation du groupement azoture. Nous avons alors décidé de vérifier si le groupement N_3 était sensible aux conditions de greffage.

Nous avons ainsi exposé le précurseur **11**, le 11-azido-undéc-1-ène, aux conditions de greffage. En utilisant ainsi le précurseur éthylénique, cela permet de vérifier l'intégrité de l'azoture sans que la molécule ne se greffe à la surface. Il est alors possible d'introduire la molécule **11** dans le bain de greffage contenant les substrats activés et le catalyseur, et d'analyser par la suite la solution de greffage. Que ce soit le spectre RMN 1H ou le spectre infrarouge enregistré après concentration de la solution de greffage, aucun des deux ne présente de disparition ou de dégradation du groupement « N_3 ».

Par conséquent, nous pouvons raisonnablement en conclure qu'il n'y a pas de dégradation des azotures pendant le processus de greffage.

La troisième hypothèse serait une orientation défavorable des N_3 au regard des règles de sélection en PM-IRRAS. En effet, lors de l'analyse par PM-IRRAS, les règles de sélection font qu'il est impossible d'observer les bandes d'élongation de fonctions parallèles à la surface, même si celles-ci sont bien présentes sur le substrat.

De cette façon, nous pouvons penser que l'orientation des azotures se fait de telle sorte qu'ils soient plutôt parallèles à la surface. Si l'orientation peut ainsi expliquer l'extinction de la bande à 2100 cm^{-1} , il est plus difficile d'expliquer l'orientation en elle-même. En effet, pour qu'aucune bande de vibration ne soit observé dans la région concernée en PM-IRRAS, il faut que tous les azotures soient orientés de la même façon. Ceci semble peu probable lors du processus de greffage : statistiquement au moins quelques groupements devraient être orientés de façon à pouvoir être observés. L'hypothèse que nous pouvons émettre alors est que les groupement azotures interagissent entre eux lors du processus de greffage, de telle sorte qu'ils s'orientent plutôt parallèlement à la surface.

En effet, les azotures étant des dipôles, nous supposons que ceux-ci peuvent s'engager dans une interaction dipôle-dipôle entre molécules voisines. Les groupements s'agencent préférentiellement de façon antiparallèle ce qui annule le moment dipolaire total, comme envisagé sur le schéma ci-dessous (**Figure 62**).



Figure 62. Processus envisagé du greffage du 11-azidoundécyltriméthoxysilane

Cette représentation permet d'expliquer l'intensité très faible de la bande de vibration des azotures.

2- Formation d'une SAM-N₃ par post-fonctionnalisation

L'hypothèse que nous émettons peut être corroborée par les résultats obtenus lors de la méthode classique de formation de SAMs à azoture terminal. En effet, dans la littérature, lorsque des monocouches sur oxyde de silicium sont formées par post-fonctionnalisation, la SAM bromure est obtenu avant la substitution par NaN₃¹⁷. De ce fait, lors de l'introduction de l'azoture, les molécules étant déjà greffées à la surface, celles-ci ne peuvent plus s'orienter défavorablement à l'approche du substrat par interaction dipôle-dipôle. Ainsi, la réaction de substitution par azoture de sodium s'effectue « normalement », et aucune extinction de la bande à 2100 cm⁻¹ n'est observée en infrarouge¹⁸.

Afin d'avoir une surface de référence, nous avons décidé de synthétiser la SAM-alkyle-Br/N₃ par cette méthode déjà documentée^{17,18}.

Pour obtenir l'agent de couplage triméthoxysilane **13**, le 11-bromo-undéc-1-ène **10** est hydrosilylé dans les mêmes conditions que le 11-azido-undéc-1-ène **11** (**Figure 63**).

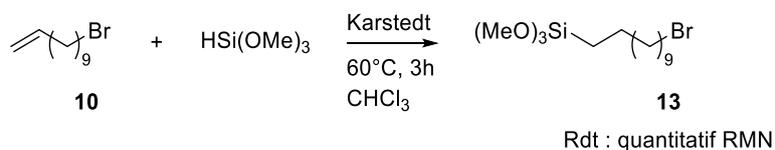


Figure 63. Synthèses du 11-bromoundécyltriméthoxysilane **13** à partir du réactif **10**

L'obtention du composé **13** est vérifié par RMN ¹H : on note clairement la disparation des pics éthyléniques initialement présents à 5.81 et 4.95 ppm, ainsi que l'apparition du signal à 0.64 ppm correspondant au CH₂ lié à l'atome de silicium.

Le greffage de l'agent de couplage **13** s'effectue ensuite dans le chloroforme anhydre fraîchement distillé à 20°C durant 16h. La concentration en organosilane dans le réacteur est identique à celle des greffages précédents.

Les substrats obtenus pour la SAM-alkyle-Br-100% sont analysés en PM-IRRAS et en AFM (**Figure 64 & Figure 65**).

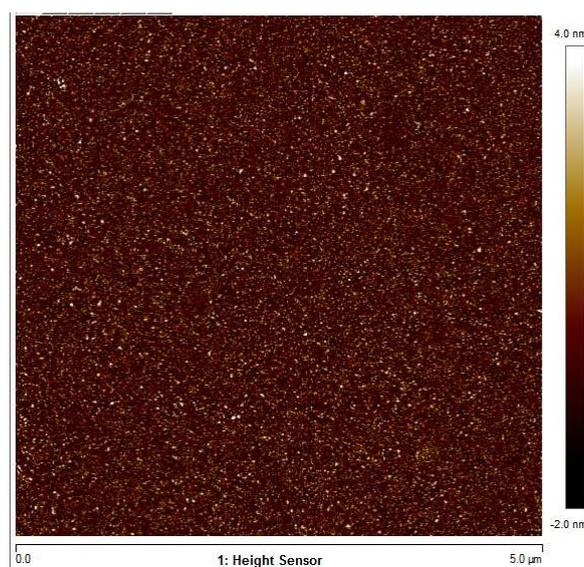


Figure 64. Image AFM de hauteur ($5 \mu\text{m}^2$) de la SAM-alkyle-Br-100%

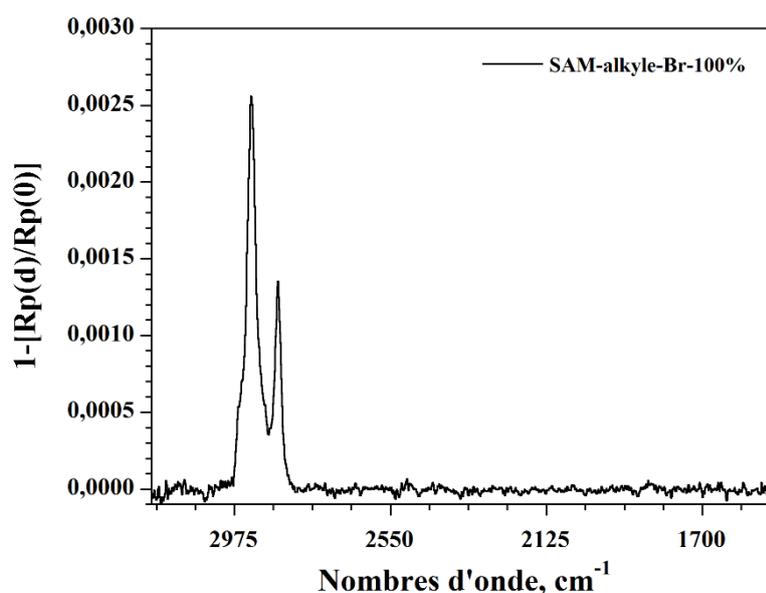


Figure 65. Spectre PM-IRRAS de la SAM-alkyle-Br-100%

On retrouve sur le spectre ci-dessus les bandes de vibration d'élongation asymétriques et symétriques des CH_2 à respectivement 2929 cm^{-1} (as) et 2856 cm^{-1} (s), ce qui atteste du greffage du bromure. Leur intensité nous permet aussi de penser que la quantité d'agent de couplage déposé à la surface correspond bien à la formation d'une monocouche. En effet, leurs intensité est compatible avec ce qui a précédemment été caractérisé comme une monocouche²⁴.

De plus, la position de ces bandes correspond plutôt à un système désordonné. En effet, comme démontré dans la littérature un nombre d'onde élevé pour les bandes CH_2

asymétriques et symétriques (respectivement 2930 cm^{-1} et 2856 cm^{-1}) témoigne d'un certain désordre de la chaîne alkyle³².

La densité de la SAM semble aussi plus élevée que dans le cas de la SAM-alkyle- N_3 -100%. En effet, les intensités des bandes CH_2 sont environ 50% plus élevées pour la SAM-alkyle-Br-100%, ce qui signifie qu'il y a plus de matière en surface. Or, comme l'image AFM (**Figure 64**), présente une surface homogène sans agrégats et de faible rugosité (0.82 nm), on peut donc en déduire que cette différence d'intensité est bien due à une plus grande densité de la SAM et non à des défauts de surface.

Afin d'obtenir la SAM-alkyle-Br/ N_3 , les SAM-Br sont ensuite engagées dans une réaction de substitution interfaciale par NaN_3 . Les surfaces sont placées dans un réacteur contenant une solution saturée en azoture de sodium dans le DMF anhydre. Le processus se déroule à température ambiante durant 48h.

A l'issue de cette réaction, les lames sont lavées puis à nouveau analysées en PM-IRRAS (**Figure 66**).

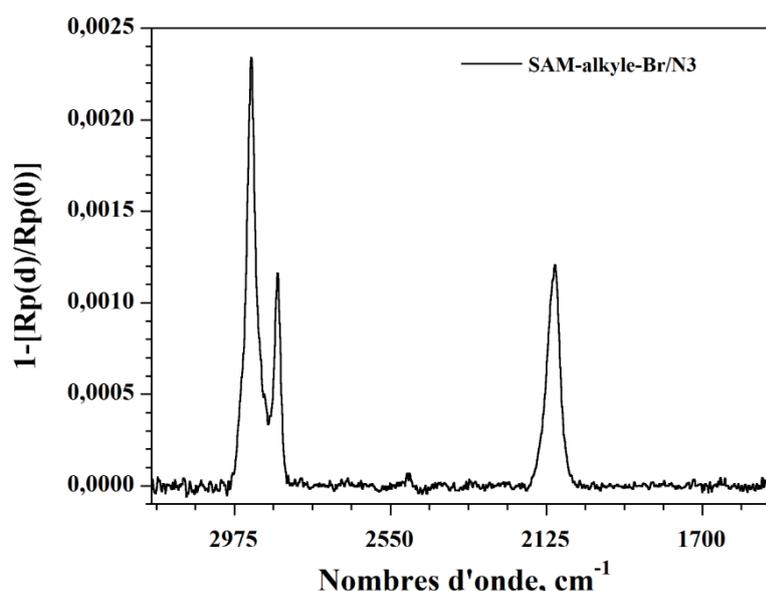


Figure 66. Spectre PM-IRRAS de la SAM-alkyle-Br/ N_3

Sur le spectre PM-IRRAS, on note cette fois-ci clairement l'apparition de la bande de l'azoture attendue à 2103 cm^{-1} . On remarque ici encore une différence au niveau des intensités des bandes CH_2 entre cette SAM obtenue par post-fonctionnalisation et la SAM obtenue par une approche « bottom-up ». Cela indique la formation d'une SAM plus dense dans le cas présent. L'approche post-fonctionnalisation permet ainsi d'obtenir des SAMs terminées par des azotures, avec une orientation non parallèle à la surface des groupements.

L'observation en PM-IRRAS, ainsi que les différences de protocoles entre les deux processus, tend à corroborer notre hypothèse d'une interaction dipôle-dipôle intermoléculaire orientant les azotures lors d'une approche « bottom-up ».

Grâce à cette expérience, nous obtenons une surface modifiée par une SAM-N₃ pouvant servir de référence aux prochains greffages.

*Nous venons ainsi de voir qu'il y a deux façons de concevoir une SAM-alkyle-N₃. La première voie utilise l'agent de couplage azoture **12** entièrement synthétisé. La SAM qui en résulte montre en PM-IRRAS de très faibles intensités pour la bande N₃ attendue à 2100 cm⁻¹. L'analyse de l'état de surface en AFM indique que la SAM est plutôt homogène avec une faible rugosité (0.45 nm). Il est également important de noter que le groupement N₃ est stable dans les conditions utilisées pour le processus de greffage.*

La seconde méthode utilise la post-fonctionnalisation qui est très développée dans la littérature. Cette voie se fait en deux étapes avec l'élaboration d'une SAM-Br puis sa modification par substitution par NaN₃. L'analyse PM-IRRAS révèle des intensités de la bande N₃ bien plus importantes que pour la première voie.

Cette différence notable d'intensité observée en PM-IRRAS selon la méthode utilisée pourrait être due à l'orientation de l'azoture. Avec la première méthode, une orientation plutôt parallèle à la surface semble privilégiée, tandis qu'une orientation verticale est observée pour la post-fonctionnalisation.

De plus, la SAM-Br possède des intensités en CH₂ plus importantes que celles de la SAM-alkyle-N₃, ce qui pourrait indiquer une densité plus grande de la SAM-Br. Les chaînes alkyles ont donc moins de mobilité, réduisant ainsi les possibilités d'orientation des N₃, en particulier parallèlement à la surface.

c- Synthèse de la SAM-urée-N₃-100%

Compte tenu des observations précédentes, nous avons considéré qu'il pouvait être intéressant d'examiner l'utilisation d'organosilanes possédant une fonction urée dans la chaîne alkyle.

En effet, la présence de la fonction urée écarte les molécules les unes des autres dans la SAM, ce qui pourrait réduire l'interaction dipôle-dipôle entre N₃ adjacents. Dans ces conditions, la contrainte apportée par cette interaction diminuant, cela pourrait permettre une plus grande variété d'orientation des N₃ à la surface du substrat.

Le greffage de l'agent de couplage **9** est réalisé dans le chloroforme anhydre à 20°C. Les conditions de greffage sont identiques à ce qui a été précédemment exposé. En se basant sur les précédentes observations effectuées sur les agents de couplage de type urée faites au sein du groupe C2M, nous décidons d'étudier un temps de greffage entre 12h et 16h. Après analyse, il s'avère que le temps de référence pour le greffage du composé **9** sera arrêté à 12h.

Cette cinétique est conforme à celle observée dans les études précédentes sur le greffage de précurseurs à motif urée²⁴.

1- Caractérisation par PM-IRRAS

Le spectre PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-100% obtenu après greffage de l'agent de couplage **9** est présenté ci-dessous (**Figure 67**).

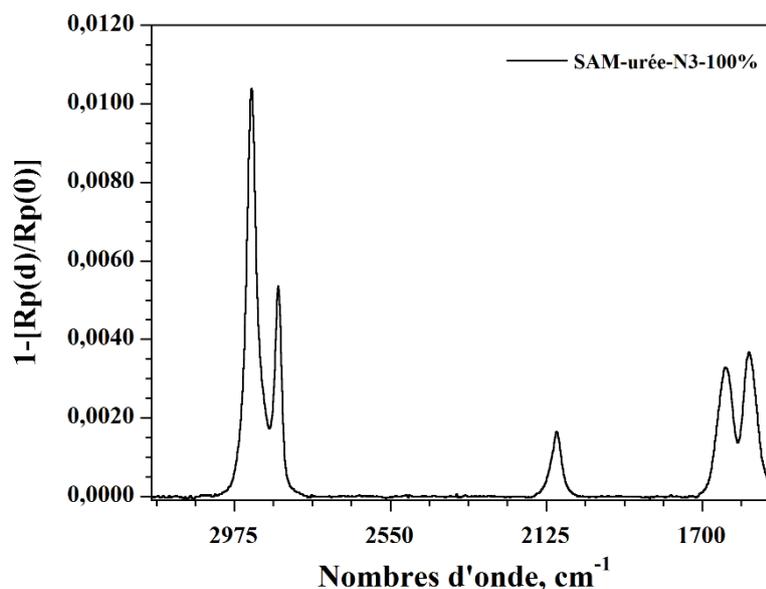


Figure 67. Spectre PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-100%

On retrouve sur ce spectre les bandes correspondant aux CH₂ ainsi que deux nouvelles bandes d'intérêt. Tout d'abord, les bandes d'élongation d'amide (amide I) et de déformation d'amide (amide II) sont respectivement visibles à 1639 et 1572 cm⁻¹. Celles-ci correspondent au motif urée présent dans la chaîne de l'agent de couplage **9** (**Figure 68**). De plus, la bande caractéristique observée à 2097 cm⁻¹ atteste bien de la présence du groupement azoture en surface. Ces observations confirment bien la formation de la SAM-urée-N₃-100%.

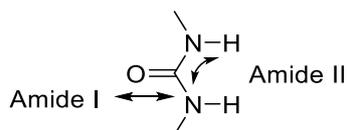


Figure 68. Vibration d'élongation (amide I) et de déformation (amide II) de la fonction urée

2- Caractérisation par AFM

Les wafers de silicium introduits dans le bain de greffage sont analysés par AFM (**Figure 69**).

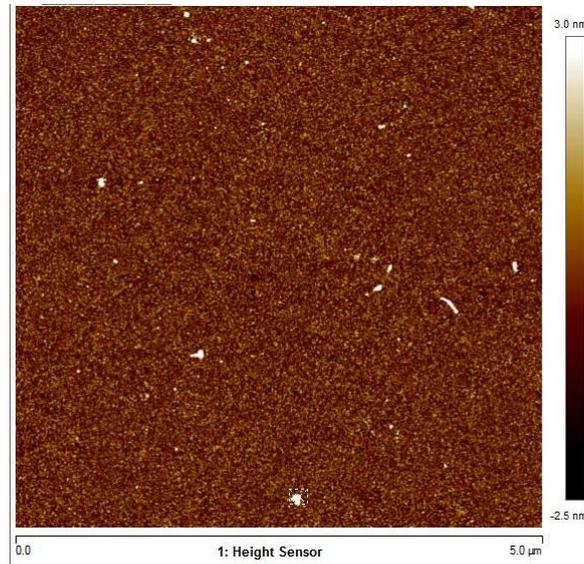


Figure 69. Image AFM de hauteur ($5 \mu\text{m}^2$) de SAM-urée- N_3 -100%

Les images de hauteur montrent une rugosité moyenne sur toute la surface de 1.4 nm ainsi que des échantillons relativement homogènes, sans agrégats.

Un profil d'adhésion révèle aussi une zone différente sur l'image d'un wafer à 16h de greffage (**Figure 70**).

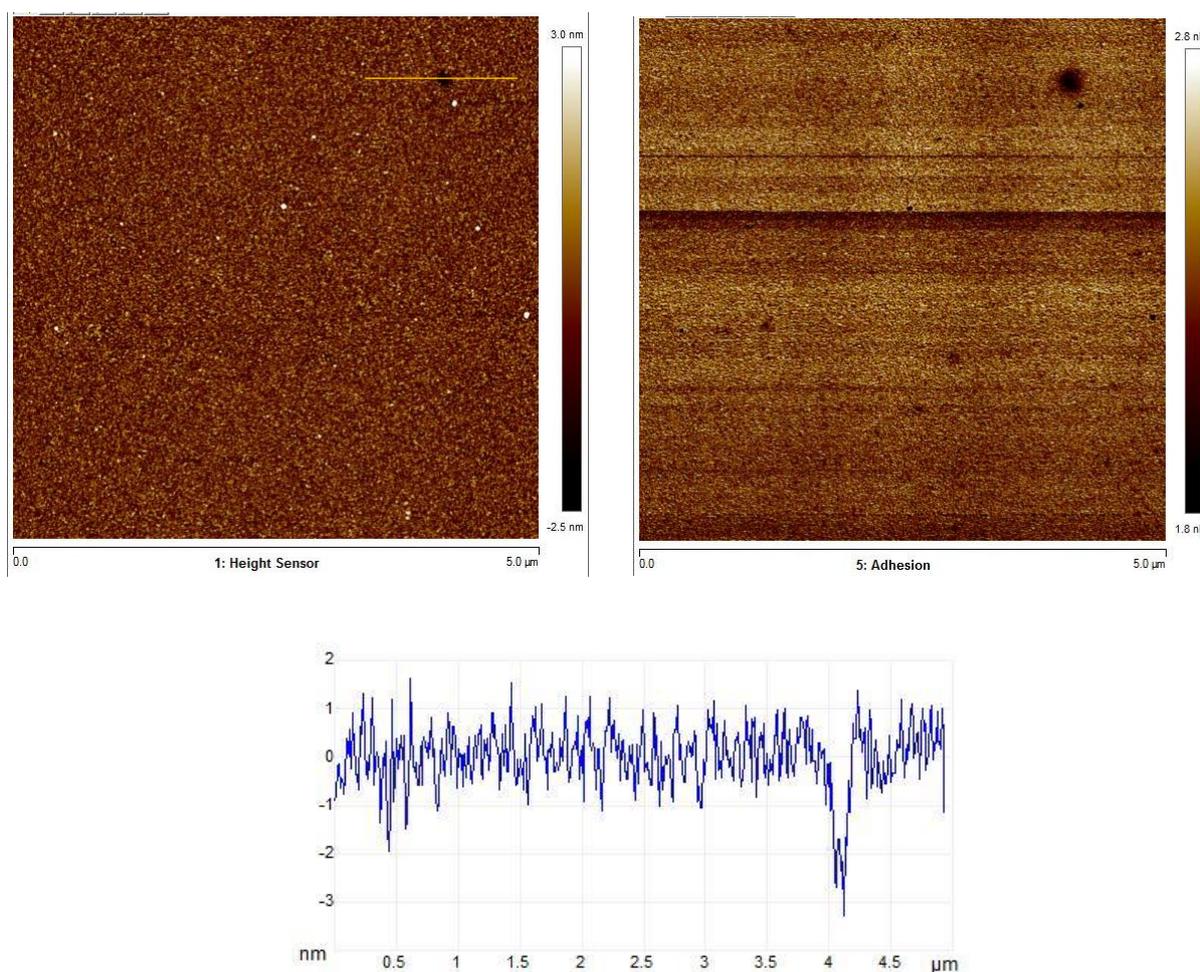


Figure 70. Images AFM de hauteur (haut, gauche) et d'adhésion (haut, droite) de la SAM-urée- N_3 -100% ($5 \mu m^2$) et profil de hauteur de la zone marquée (bas) pour un wafer à 16h de greffage

L'image d'adhésion peut donner des informations sur l'homogénéité du greffage. L'analyse de l'échantillon pour 16h de greffage révèle la présence d'une tache sombre sur le coin supérieur droit de l'image. Cette tache est aussi présente sur le profil d'adhésion, ce qui indique une différence de matière entre l'intérieur de la tache et le reste du wafer. Le profil de hauteur à ce niveau montre que cela correspond à un trou d'une profondeur d'environ 2 nm. Or cette profondeur correspond à la taille moyenne de la molécule. On peut donc en conclure que la couche formée est bien une couche mono-moléculaire.

3- Comparaison des SAM-urée- N_3 -100% et SAM-alkyle-Br/ N_3

Le spectre PM-IRRAS de la SAM-urée- N_3 -100% est par la suite comparé à celui obtenu avec la SAM-alkyle-Br/ N_3 (**Figure 71**).

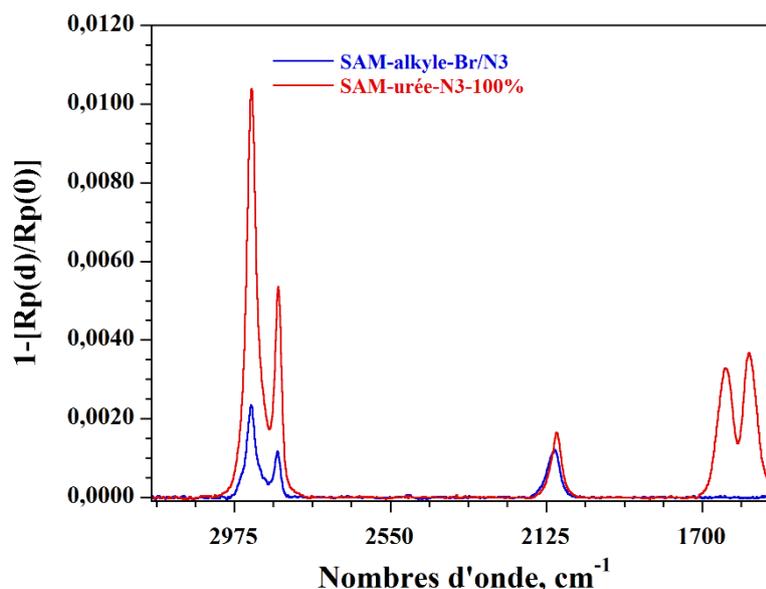


Figure 71. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-100% et de la SAM-alkyle-Br/N₃

La différence d'intensité au niveau des ν_{CH_2} pourrait être due à deux facteurs :

- La différence de longueur de chaîne carbonée entre les deux molécules (11 carbones pour la molécule **13** et 18 carbones pour la molécule **9**).
- La différence d'orientation des molécules. En effet, dans la SAM-alkyle-B/N₃ les molécules semblent plutôt orientées perpendiculairement à la surface, conduisant à des dipôles CH₂ plutôt parallèles au substrat, diminuant d'autant l'intensité des ν_{CH_2} . Par contre, dans la SAM-urée, les chaînes alkyles ont un plus grand degré de liberté à cause de l'écartement apporté par le motif urée, ce qui empêche une orientation privilégiée des dipôles CH₂.

De plus, les deux SAMs présentent des intensités similaires pour la bande du groupement azoture. L'utilisation d'un agent de couplage possédant une urée semble donc plus avantageux comparé à un organosilane avec uniquement une chaîne alkyle pour avoir une surface fonctionnelle avec des N₃. La fonction urée a pour effet d'écarter les molécules, ce qui est favorable à une meilleure visibilité des azotures en PM-IRRAS. En effet, dans la SAM-urée il y a peut-être moins d'interactions dipôle-dipôle, ce qui permet une plus grande variété d'orientation des N₃ en surface.

Enfin, l'intensité des bandes amides est cohérente avec la formation d'une monocouche, comme observé lors des travaux précédents au sein du groupe C2M.

Grâce à cette étude nous voyons donc que l'utilisation d'un agent de couplage possédant un motif urée et azoture permet d'obtenir une SAM homogène. Ces monocouches obtenues de façon « bottom-up » révèlent un azoture en surface directement observable par PM-IRRAS ce

qui n'est pas le cas pour leurs homologues alkyles. Cela tend à prouver l'hypothèse émise suite à l'étude de la molécule modèle 11-azidoundécyltriméthoxysilane. En effet, l'explication la plus avancée quant à l'extinction de la bande à 2100 cm^{-1} en PM-IRRAS est de considérer un problème d'orientation. L'interaction entre les groupements azoture envisagée pourrait justifier cette observation, et les analyses menées en PM-IRRAS sur la SAM-urée- N_3 -100% corroborent cette idée. La capacité de l'urée à écarter les molécules entre elles permet ainsi de réduire les interactions défavorables et donc d'observer les azotures.

*Suite à ces observations, il est alors intéressant d'envisager la synthèse de SAMs mixtes intégrant l'agent de couplage **9** afin d'observer l'effet de la dilution sur les groupements azoture terminaux.*

D- Synthèse et caractérisation de SAMs mixtes.**a- SAMs-urée mixtes azoture/méthyle 50% et 25%**

Afin de minimiser les interactions entre groupements azoture il nous a semblé intéressant de synthétiser des SAMs-urée mixtes pour éloigner les groupes terminaux les uns des autres. De plus, pour une application des surfaces dans le domaine des biotechnologies, il est aussi important de diminuer la densité des objets biologiques en surface. Pour cela, il faut donc ici diminuer la densité de la fonction d'accroche. La synthèse de SAMs mixtes peut permettre d'atteindre ces deux objectifs, en diluant à la surface le silane contenant le groupement fonctionnel avec un autre agent de couplage inerte.

Pour évaluer l'effet de la dilution sur la composition de la SAM, nous avons choisi de mélanger l'organosilane **9** avec un organosilane contenant un motif urée, mais terminé par un groupement méthyle non réactif. Différents mélanges de proportions différentes ont été étudiés :

- 50% d'organosilane **9** et 50% d'organosilane méthyle (SAM-urée-N₃-50%)
- 25% d'organosilane **9** et 75% d'organosilane méthyle (SAM-urée-N₃-25%)

L'organosilane méthyle inerte est une molécule qui a été synthétisé par Mathieu Meillan lors de ses travaux de thèse²⁴ (**Figure 72**).

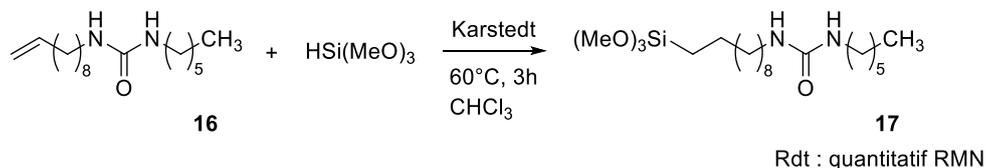


Figure 72. Synthèse de l'organosilane **17** à partir du précurseur **16**

Ces SAMs sont synthétisées par co-adsorption des deux organosilanes. Ceux-ci sont obtenus par hydrosilylation du mélange correspondant des précurseurs éthyléniques **9** et **16**. La proportion des produits silylés attendue est la même que celle des deux précurseurs au sein du mélange (rendement quantitatif en RMN) (**Figure 73**).

Les conditions expérimentales du greffage sont les mêmes que précédemment : greffage à 20°C avec une concentration en agents de couplage totale de $2.5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ et un taux en catalyseur acide de 10% molaire. Le temps de référence de ces expériences est de 12h de greffage.

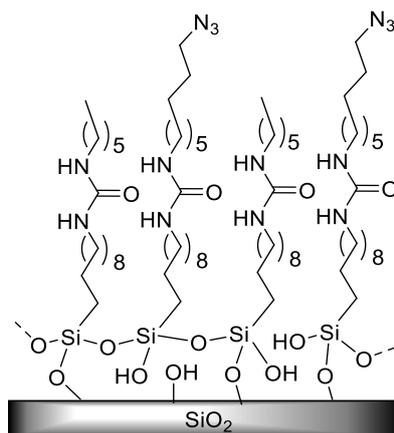


Figure 73. Représentation schématique d'une SAM-urée mixte

Une fois le greffage effectué, les substrats sont analysés en PM-IRRAS et en AFM.

1- Etude comparative des SAMs en PM-IRRAS

Les conditions d'analyse PM-IRRAS restant les mêmes, nous pouvons comparer les spectres de la SAM-urée-N₃-100% et des SAM-urée-N₃-50% et SAM-urée-N₃-25% (**Figure 74**).

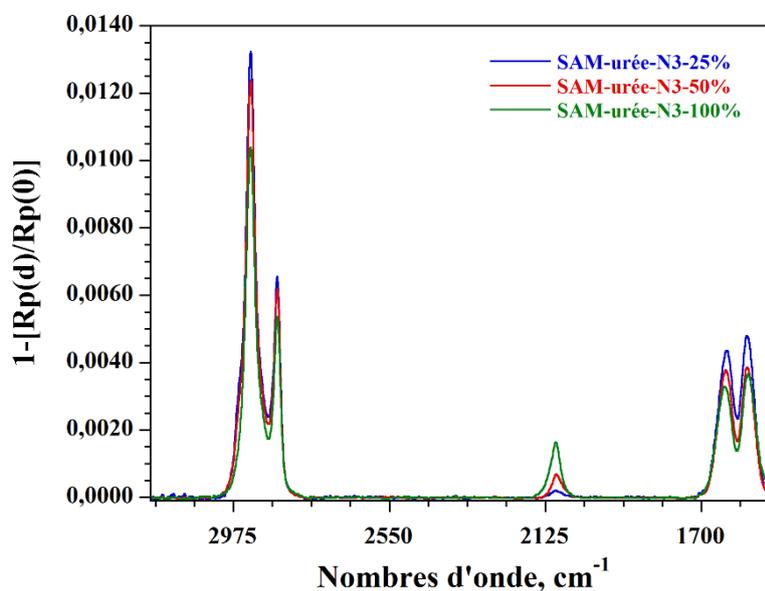


Figure 74. Comparaison des spectres PM-IRRAS des SAM-urée-N₃-100%, SAM-urée-N₃-50% et SAM-urée-N₃-25%

Sur le spectre ci-dessus, nous pouvons tout d'abord voir que la taille de la bande N₃ correspond directement au facteur de dilution entre les SAMs. Cela nous permet d'affirmer que par co-

adsorption, la proportion des organosilanes **9** et **17** du bain de greffage est respectée sur le substrat. La synthèse d'une SAM mixte permet donc de diluer l'azoture, tout en conservant un même taux de couverture de la surface. La bande N_3 reste donc visible mais moins intense. Cela peut ainsi avoir un intérêt pour la chimie « click » à venir en espaçant les groupements qui seront par la suite reliés à des molécules biologiques.

L'étude des bandes CH_2 permet aussi de constater qu'elles ont toute la même position, quel que soit le type de greffage. Les SAMs étudiées sont ainsi plutôt désordonnées car les bandes s'approchent des valeurs de références pour des chaînes alkyles complètement désorganisées. En effet, les bandes CH_2 (as) sont toutes situées à 2928 cm^{-1} , et les bandes CH_2 (s) à 2856 cm^{-1} .

En ce qui concerne les bandes amide I et II, un petit décalage entre les SAMs est observé. Pour la SAM-urée- N_3 -100%, celles-ci se situent respectivement à 1637 cm^{-1} et 1573 cm^{-1} , alors que pour la SAM-urée- N_3 -50%, elles sont à 1634 cm^{-1} et 1576 cm^{-1} . Enfin, les bandes amides sont à 1631 cm^{-1} et 1577 cm^{-1} pour la SAM- N_3 -azoture-25%. Si l'on calcule le gap entre les bandes amide I et II pour les différentes SAMs, on obtient les valeurs suivantes : Δ (SAM-urée-100%) = 64, Δ (SAM-urée-50%) = 58, Δ (SAM-urée-25%) = 54.

Cette valeur est directement liée aux liaisons hydrogènes formées entre les fonction urées : plus la valeur de Δ est faible, plus les motifs urée sont liés entre eux. On en conclue ainsi que plus la SAM est diluée, plus les urées forment de liaisons hydrogènes.

En comparant les spectres nous pouvons noter une intensité légèrement supérieure pour les bandes amide I et II de la SAM la plus diluée. Ceci ne semble pas corrélé à un taux de matière plus important car les bandes CH_2 sont identiques pour toutes les SAMs. On peut supposer que cette différence est principalement due à une orientation un peu plus favorable du motif urée pour la SAM-urée- N_3 -25%.

2- Caractérisation par AFM des deux SAMs mixtes

Les substrats modifiés par la SAM-urée- N_3 -50% et la SAM-urée- N_3 -25% ont été caractérisés par AFM (**Figure 75 & Figure 76**).

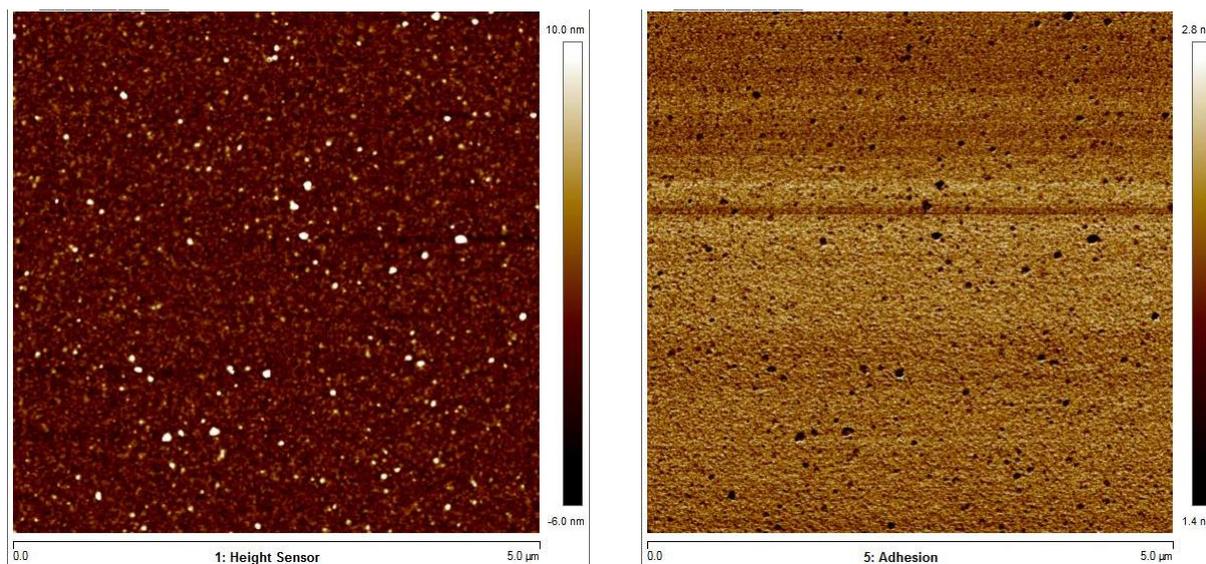


Figure 75. Images AFM de hauteur (gauche) et d'adhésion (droite) de la SAM-urée-N₃-50% (5 μm²)

Les images de hauteur sur la **Figure 75** présentent une rugosité de 1.64 nm en moyenne. On note aussi la présence de quelques agrégats à la surface, ou de poussières, qui sont clairement visibles sur le profil d'adhésion. De plus, cette forte rugosité ne semble pas avoir d'influence réelle sur le taux de matière en surface : les bandes CH₂ en PM-IRRAS sont les mêmes que pour la SAM-urée-N₃-100%.

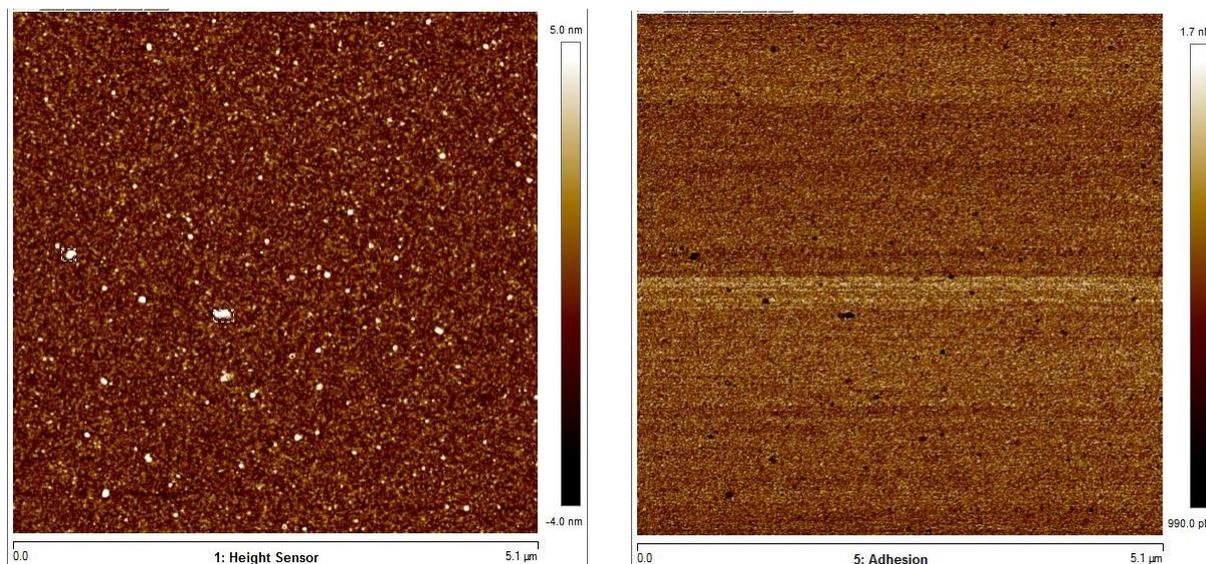


Figure 76. Images de hauteur (gauche) et d'adhésion (droite) de la SAM-urée-N₃-25% (5 μm²)

Malgré une rugosité de 1.1 nm et la présence de quelques agrégats notamment observables sur le profil d'adhésion, la SAM étudiée présente un état de surface plus homogène que la SAM-urée-N₃-50% précédemment étudiée.

b- SAM-urée libre-N₃-50%

Afin d'étudier la dilution du précurseur azoture **9**, nous avons aussi envisagé une approche originale de co-adsorption. En effet, lors d'un greffage par co-adsorption classique, deux organosilanes sont greffés de façon covalente en même temps sur le substrat.

Pour étudier l'effet du motif urée sur la dilution et l'observation des azotures en s'affranchissant de la chimie du silicium, il a ainsi été envisagé de diluer l'organosilane **9** avec la di-butyle-urée **20** non silylée (**Figure 77**).

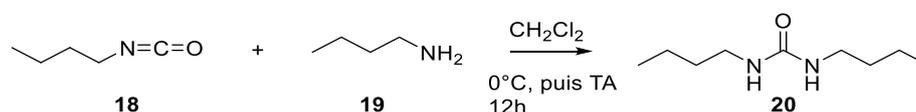


Figure 77. Synthèse de la di-butyle-urée **20** à partir des produits commerciaux **18** et **19**

Cette molécule, dont la seule fonctionnalité est le motif urée, ne possède aucune oléfine terminale et ne sera donc pas hydrosilylée. Lors de la formation de la SAM, elle ne s'accrochera donc pas au substrat, mais interagira avec le précurseur **9** seulement par liaisons hydrogène intermoléculaires (**Figure 78**).

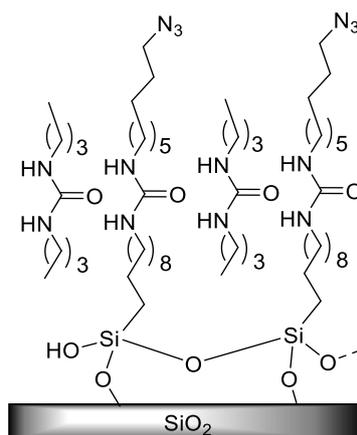


Figure 78. Structure envisagée de la SAM-urée libre-N₃-50% avec la molécule **20** intercalée dans la monocouche

La synthèse de la SAM-urée libre-N₃-50% s'effectue dans les mêmes conditions que celle de la SAM-urée-N₃-50% ; c'est-à-dire avec une concentration totale de $2.5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ en molécules dans le bain de greffage. Il y a donc un nombre total de motifs urée identique mais une concentration en silane deux fois moins importante que pour la SAM-urée-N₃-50%.

1- Caractérisation par PM-IRRAS

Le spectre obtenu pour la SAM-urée libre-N₃-50% est comparé avec celui obtenu pour la SAM-urée-N₃-50% (**Figure 79**).

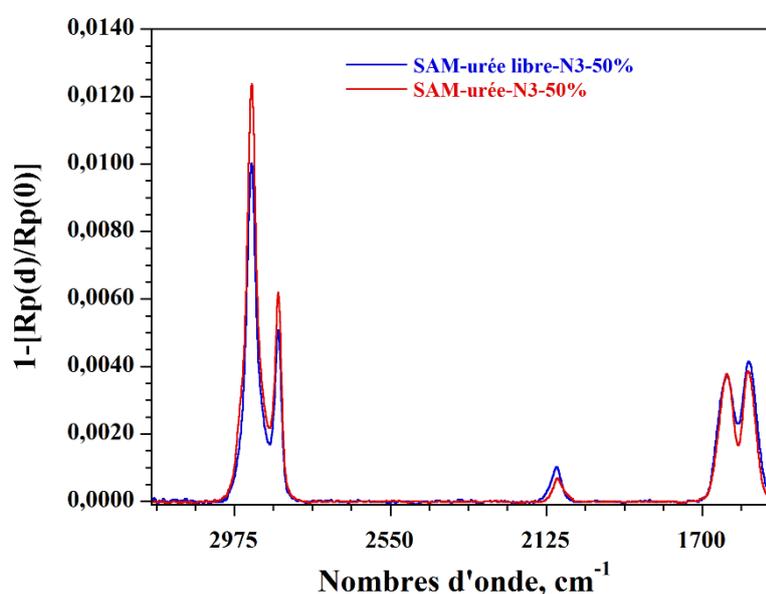


Figure 79. Comparaison des spectres PM-IRRAS des SAM-urée-N₃-50% et SAM-urée libre-N₃-50%

Dans un premier temps, la comparaison des deux spectres révèle une différence d'intensité entre les bandes CH₂, plus importante dans le cas de la SAM-urée-N₃-50%. Cela montre que la SAM utilisant l'urée libre contient moins de matière. Cette observation s'explique par l'emploi même de la molécule **20**. En effet, celle-ci contient moins de CH₂ que la molécule **17** utilisée dans la SAM-urée-N₃-50%. Il est donc cohérent d'obtenir une monocouche avec moins de matière. De plus, la di-butyle-urée n'étant pas un organosilane, celle-ci ne peut pas s'accrocher à la surface. On peut donc aussi envisager qu'une partie de cette molécule est désorbée du substrat lors des lavages post-greffage. Il est donc cohérent d'observer une différence des bandes CH₂ entre les deux SAMs.

Les nombres d'onde des bandes CH₂ asymétriques et symétriques montrent que les deux monocouches présentent un désordre identique de leur chaîne alkyle.

L'intensité de la bande azoture à 2097 cm^{-1} est 30% plus importante dans le cas de la SAM-urée libre- N_3 -50%. Ceci peut être dû à une incorporation légèrement supérieure du silane au sein de la SAM ou à une orientation des azotures de surface un peu plus favorable pour l'observation en PM-IRRAS.

On note enfin que la SAM-urée libre- N_3 -50% présente des bandes amide I et II aussi intenses que la SAM-urée- N_3 -50%. Cela prouve que la SAM contient autant d'urée linéaire dans les deux cas, et montre ainsi que la di-butyle-urée est bien incorporée au sein de la monocouche.

2- Caractérisation par AFM

Les substrats modifiés par la SAM-urée libre- N_3 -50% sont caractérisés par AFM (**Figure 80**).

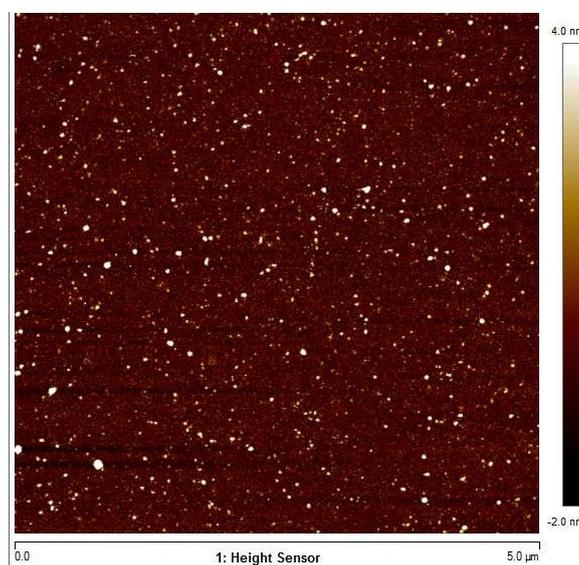


Figure 80. Image AFM de hauteur ($5\ \mu\text{m}^2$) de la SAM-urée libre- N_3 -50%

On note sur la SAM la présence de nombreux mais très petits agrégats, assez semblable à ce qui a pu être observé avec la SAM-urée- N_3 -50%. Néanmoins, la SAM paraît dense et homogène, avec une faible rugosité, inférieure au nanomètre (0,79 nm).

Ces différentes synthèses de SAMs mixtes nous ont permis de montrer que l'organosilane 9 pouvait être greffé en quantité variable à la surface. Le processus en co-adsorption respecte les ratios introduits dans le bain de greffage. Cela est clairement visible lors de l'étude de la bande azoture en PM-IRRAS : celle-ci respecte le facteur de dilution propre à chaque SAM. Enfin, l'utilisation d'une molécule urée non greffable nous a permis de diluer l'azoture en surface de la même façon que pour un greffage en co-adsorption classique. Nous avons donc créé des plateformes caractérisées en PM-IRRAS et en AFM présentant diverses proportions d'azoture en surface, prêtes à être engagées en chimie « click » avec un dérivé biotine.

E- Bio-fonctionnalisation des SAMs azoture par chimie « click »

a- Mise au point de la chimie click sur les surfaces « azoture »

Afin de rendre les plateformes précédemment obtenues bio-fonctionnelles, il convient de les engager dans une réaction de chimie « click » avec un dérivé biotine possédant un groupement alcyne terminal. Néanmoins, avant d'engager directement les substrats de type SAM-urée- N_3 , nous avons décidé de mettre au point la réaction sur les substrats obtenus par post-fonctionnalisation. De plus, la biotine-alcyne ne possédant pas de groupements spécifiques en dehors d'une urée cyclique, il a été convenu de synthétiser une molécule sonde pour la « click ». Celle-ci doit être aisément visible en PM-IRRAS, et ne pas avoir de bande en commun avec les substrats modifiés.

1- Synthèse de la molécule sonde 4-(4-nitrophenoxy)-but-1-yne **23**

Nous avons envisagé la synthèse d'une molécule possédant un groupement nitro-benzène pour obtenir une « sonde » efficace pour la PM-IRRAS. En effet, les groupements nitro possèdent deux bandes en PM-IRRAS en dehors des bandes caractéristiques des SAMs que nous avons synthétisées : $\nu_{NO_2}(as) = 1570-1500 \text{ cm}^{-1}$ et $\nu_{NO_2}(s) = 1370-1300 \text{ cm}^{-1}$.

La molécule **23** est obtenu après réaction de Mitsunobu entre le 4-nitrophénol **21** et le 3-butynes-1-ol **22** (**Figure 81**).

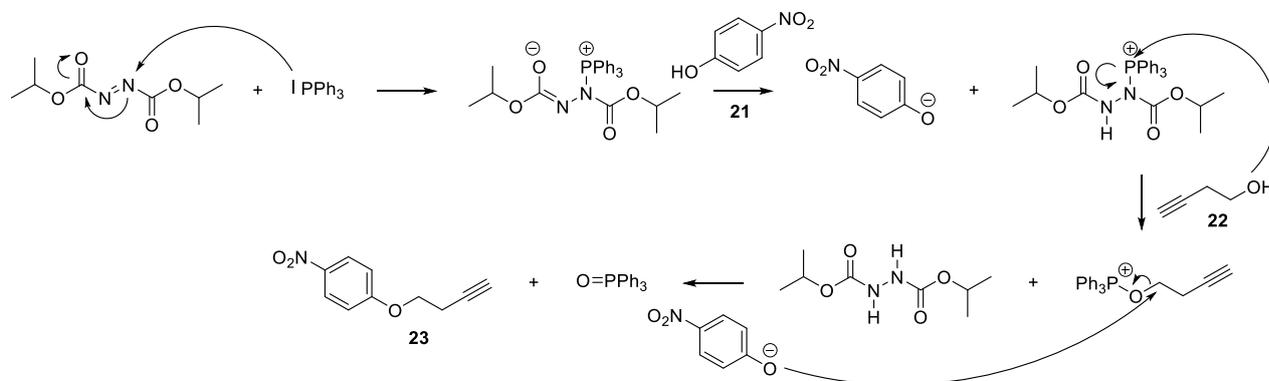


Figure 81. Mécanisme réactionnel de la réaction de Mitsunobu pour la synthèse de la sonde 4-(4-nitrophenoxy)-but-1-yne **23**

Dans le mécanisme ci-dessus le diisopropyle azidocarboxylate (DIAD) réagit tout d'abord avec la triphénylphosphine pour former l'intermédiaire actif qui déprotone le nitrophénol. L'oxyphosphonium est ensuite formé et réagit avec le nitrophénolate pour obtenir le 4-(4-nitrophenoxy)-but-1-yne **23**.

Cette réaction de Mitsunobu est conduite de façon classique, c'est-à-dire sous atmosphère inerte, à 0°C et en ajoutant dans l'ordre, les composés **21** et **22**, puis la triphénylphosphine, puis le DIAD.

2- Mise au point des conditions pour la chimie « click » de surface

Une fois la molécule **23** obtenue, nous pouvons maintenant trouver les conditions optimales pour la chimie click de surface. Afin de rendre les analyses plus simples, nous avons décidé de commencer l'étude de cette réaction avec la SAM-alkyle-Br/N₃.

La chimie click pouvant être mise en œuvre dans une grande variété de conditions, nous nous sommes arrêtés sur un choix de solvant classique : le DMF et le mélange DMSO/H₂O. Ce mélange de solvants a notamment été décrit par Sharpless et al. lors de leurs études sur la chimie « click »⁹. Classiquement, nous avons opté pour une génération *in situ* du cuivre (I) à partir du sulfate de cuivre pentahydrate et d'ascorbate de sodium. La proportion dans le milieu de ces composés est de 10% en CuSO₄·5H₂O et 40% en AscNa (pourcentages molaires par rapport à l'alcyne introduit).

Les substrats à engager sont placés dans des boîtes de Petri individuelles. Après plusieurs essais, nous avons convenu qu'un volume total de 8 mL de solution était optimal pour recouvrir efficacement toute la surface durant le processus de click. Les surfaces sont ainsi dans un premier temps recouvertes du solvant choisi (DMF ou DMSO), puis le composé alcyne est introduit (dans 0.25 mL de DMSO). La solution aqueuse de sulfate de cuivre puis, en dernier, la solution aqueuse d'ascorbate de sodium sont ajoutées (**Figure 82**).

Les boîtes de Petri contenant les substrats recouverts du mélange réactionnel sont ensuite placées sur un agitateur orbitalaire durant une nuit à température ambiante.

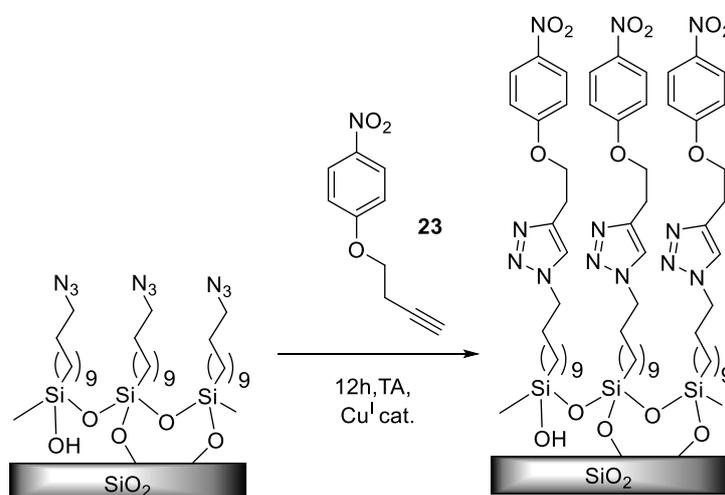


Figure 82. Représentation de la réaction de click de la molécule **23** sur la SAM-alkyle-Br/N₃

i- Essais dans le DMF

La première condition de réaction étudiée utilise le DMF comme solvant principal. Si la click de l'alcyne **23** sur les substrats se déroule sans problème dans ces conditions, cela peut être intéressant car le DMF permet de solubiliser un grand nombre de composés et en particulier un grand nombre de molécules biologiques.

Après réaction, les substrats sont lavés et analysés en PM-IRRAS (**Figure 83**). Le processus de lavage a dû par ailleurs être optimisé afin de ne pas avoir d'ascorbate de sodium résiduel en surface lors de l'analyse en infrarouge. En effet, le cuivre ne présente pas de problème mais les bandes C=O de l'ascorbate pourraient gêner l'analyse.

Nous avons donc décidé de laver les substrats aux ultrasons, dans un premier temps avec le solvant de click utilisé, puis successivement avec de l'eau, de l'éthanol et enfin avec du chloroforme. De cette façon nous éliminons toute trace d'alcyne non réagité et d'ascorbate.

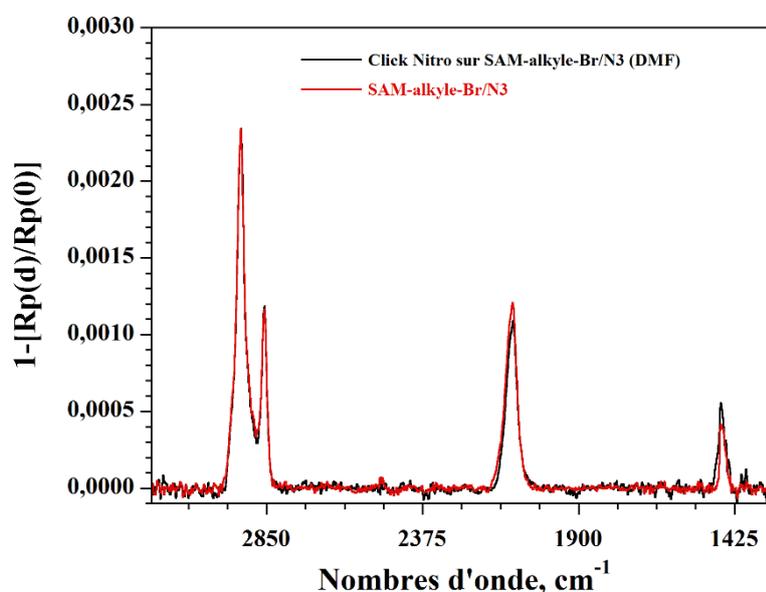


Figure 83. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-alkyle-Br/N₃ avant et après réaction avec la sonde nitro dans le DMF

Comme nous pouvons le voir sur le spectre ci-dessus, la réaction dans le DMF ne semble pas avoir fonctionné. En effet, la bande de l'azoture à 2103 cm⁻¹ reste inchangée et on n'observe pas l'apparition des signaux spécifiques du groupement nitro.

L'intensité des bandes CH₂ à 2929 cm⁻¹ et 2856 cm⁻¹ restant identiques après réaction, on peut en déduire que la monocouche n'a pas été endommagée durant le processus.

ii- Essais dans le mélange DMSO/H₂O

Comme la réaction ne se produit pas dans le DMF, nous avons opté pour le mélange classique DMSO/H₂O. Afin de conserver la solubilité de tous les composés, nous utilisons un mélange à 20% volumique de DMSO.

Après réaction, les substrats sont lavés et analysés en PM-IRRAS (**Figure 84**).

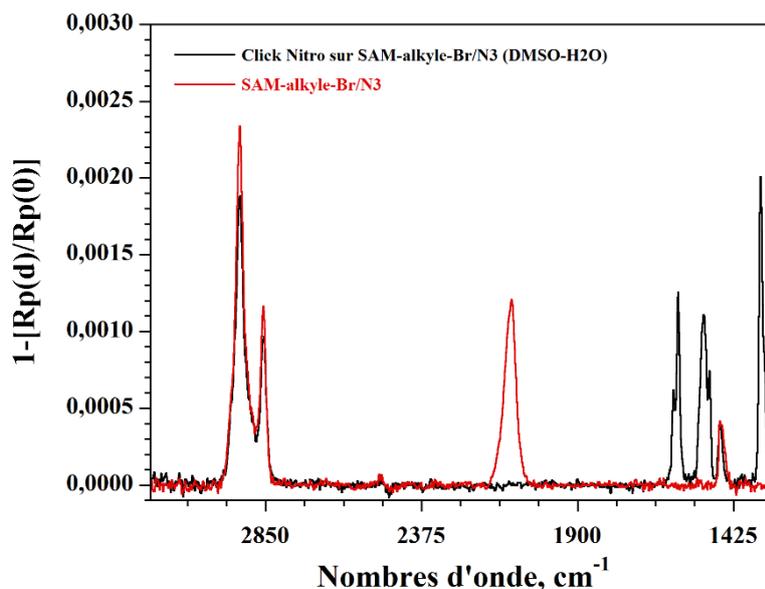


Figure 84. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-alkyle-Br/N₃ avant et après réaction avec la sonde nitro dans le DMSO/H₂O

Cette fois-ci nous pouvons clairement observer que la réaction de chimie click entre les azotures de surface et le composé **23** est un succès.

En effet, après réaction, la bande azoture à 2103 cm⁻¹ disparaît totalement au profit de l'apparition des bandes spécifiques du groupement nitro de la molécule **23** : $\nu_{\text{NO}_2(\text{as})} = 1517 \text{ cm}^{-1}$ et $\nu_{\text{NO}_2(\text{s})} = 1342 \text{ cm}^{-1}$.

De plus, on note l'apparition de la bande d'élongation caractéristique des doubles liaisons du cycle aromatique à 1595 cm⁻¹, attestant de la présence de la molécule sonde à la surface.

3- Application à la SAM-urée-N₃-100%

Maintenant que les conditions optimales pour la chimie click sont établies, nous pouvons la mettre en œuvre sur la SAM-urée-N₃-100%. Nous utilisons ici toujours le 4-(4-nitrophenoxy)-but-1-yne **23**, qui présente l'avantage de ne pas interférer en PM-IRRAS avec les signaux déjà présents de la SAM-urée (**Figure 85**).

En effet, si nous « clickons » directement la biotine-alcyne sur cette monocouche, les seuls signaux observables à la suite du processus seraient la disparition de la bande de l'azoture, la molécule n'apportant que des signaux amide déjà présents sur la surface. Or, afin de vérifier l'intégrité de la SAM et la réactivité des N_3 de surface, il faut prouver que la disparition de la bande caractéristique à 2100 cm^{-1} témoigne de la formation du triazole et non pas d'une quelconque dégradation. Le moyen le plus direct est donc d'utiliser la sonde **23** qui, si elle est présente en surface, révélera les bandes caractéristiques des groupes nitros.

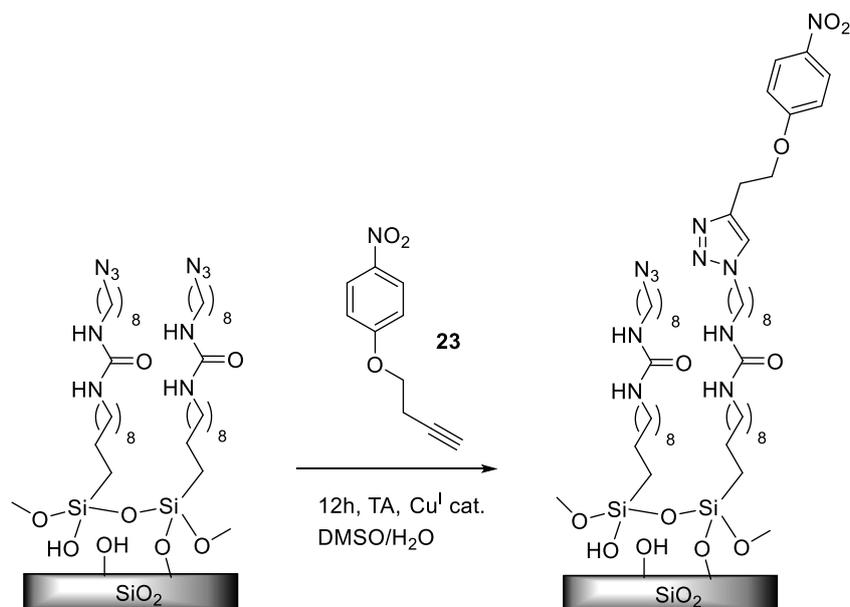


Figure 85. Représentation de la réaction de click de la molécule **23** sur la SAM-urée- N_3 -100%

La réaction de chimie click se fait comme explicité précédemment, dans le mélange $DMSO/H_2O$, et les substrats sont analysés par PM-IRRAS après lavage (**Figure 86**).

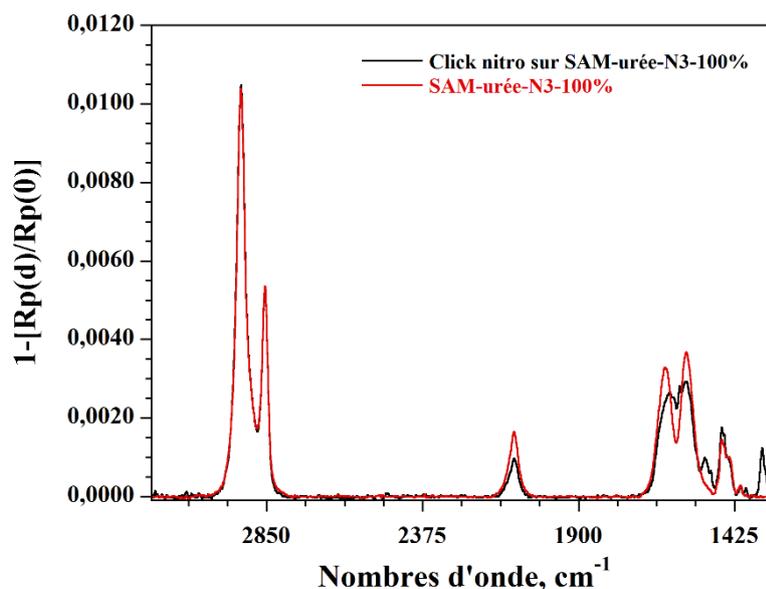


Figure 86. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-100% avant et après réaction avec la sonde nitro dans le DMSO/H₂O

Sur le spectre ci-dessus on note la disparition partielle de la bande azoture à 2097 cm⁻¹. Ceci atteste de la réaction des azotures avec la sonde alcyne **23**. Néanmoins, force est de constater que tous les N₃ de surface n'ont pas réagi. Afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un problème de mise œuvre de la réaction, nous avons répété le processus sur le substrat déjà cliqué afin de voir si la bande azoture continue à évoluer. Après plusieurs tests, il s'avère que nous avons atteint la saturation en surface. Nous pouvons donc supposer que seulement 50% des azotures visibles en PM-IRRAS sur la SAM-urée-N₃-100% sont disponibles pour la réaction de chimie « click ».

D'autre part, on note clairement l'apparition des bandes spécifiques du groupement nitro à 1517 cm⁻¹ et 1342 cm⁻¹ ce qui montre bien que la diminution de la bande à 2097 cm⁻¹ est bien due à la formation du triazole et non à une dégradation des azotures.

Enfin, le signal dans la région des amide I et II est légèrement modifié après réaction. Ceci témoigne de l'apparition de la bande $\nu_{C=C}$ correspondant à l'aromatique à 1595 cm⁻¹.

Nous pouvons donc affirmer que les substrats modifiés par la SAM-urée-N₃-100% sont bien réactifs dans les conditions établis. Ils peuvent ainsi être modifiés par chimie « click » et rendu bio-actifs par réaction avec la biotine-alcyne.

b- Click de la biotine-alcyne

1- Mise au point sur la SAM-alkyle-Br/N₃

Afin de vérifier le comportement de la biotine-alcyne disponible dans le commerce, nous avons décidé dans un premier temps de la tester sur les SAMs obtenues par la méthode de post-fonctionnalisation (**Figure 87**).

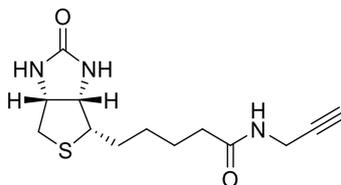


Figure 87. Structure de la biotine-alcyne

Les conditions de réaction sont les mêmes que celles explicitées précédemment. Les substrats obtenus sont lavés et caractérisés en PM-IRRAS (**Figure 88**).

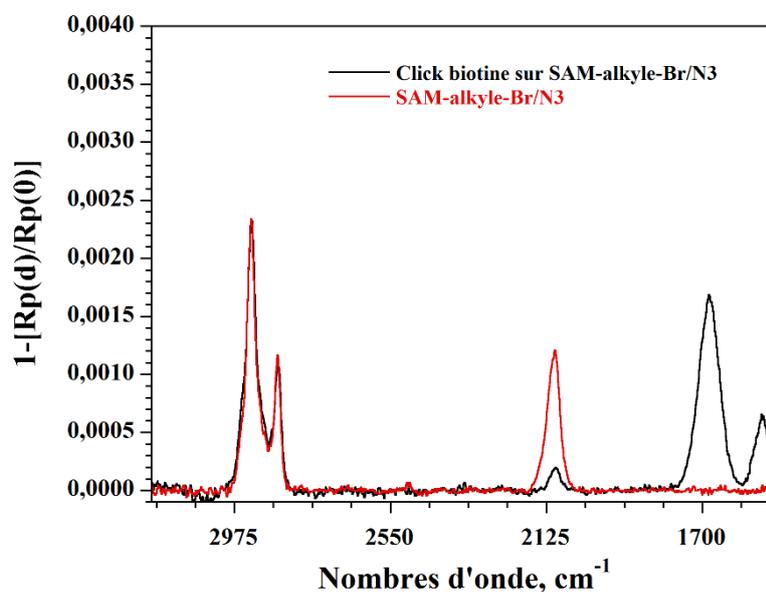


Figure 88. Comparaison des spectre PM-IRRAS de la SAM-alkyle-Br/N₃ avant et après réaction

Sur le spectre ci-dessus on note la quasi disparition de la bande de l'azoture (20% non réagit) à 2103 cm⁻¹, attestant de l'accroche de la biotine par la formation du cycle triazole. Les bandes CH₂, de même intensité et de même nombre d'onde montrent que le processus n'endommage pas la surface.

L'ajout de la biotine sur la surface se caractérise aussi par l'apparition des bandes amide I et amide II de l'urée cyclique de la molécule. Celles-ci se situent à 1682 cm^{-1} et 1536 cm^{-1} , ce qui diffère des bandes amide I et II observées précédemment pour une urée linéaire (respectivement à 1639 cm^{-1} et 1572 cm^{-1}).

Nous sommes donc capables, dans les conditions mises au point avec la sonde nitro **23**, d'accrocher la biotine-alcyne *via* la formation d'un triazole en surface. Nous pouvons alors étendre ce processus aux surfaces de type SAM-urée afin de les rendre bio-fonctionnelles.

2- Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée-N₃-100%

La click de la biotine-alcyne est conduite sur la SAM-urée-N₃-100% dans les mêmes conditions que sur la SAM-alkyle-Br/N₃ (**Figure 89**).

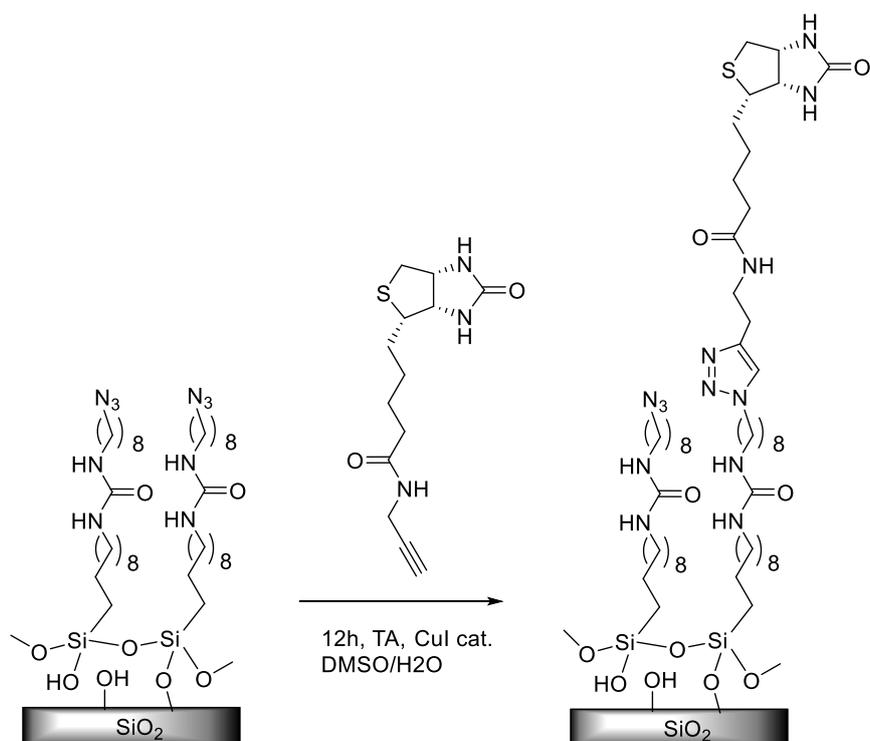


Figure 89. Représentation de la réaction de click de la biotin-alcyne sur la SAM-urée-N₃-100%

Les substrats obtenus sont lavés et caractérisés par PM-IRRAS (**Figure 90**).

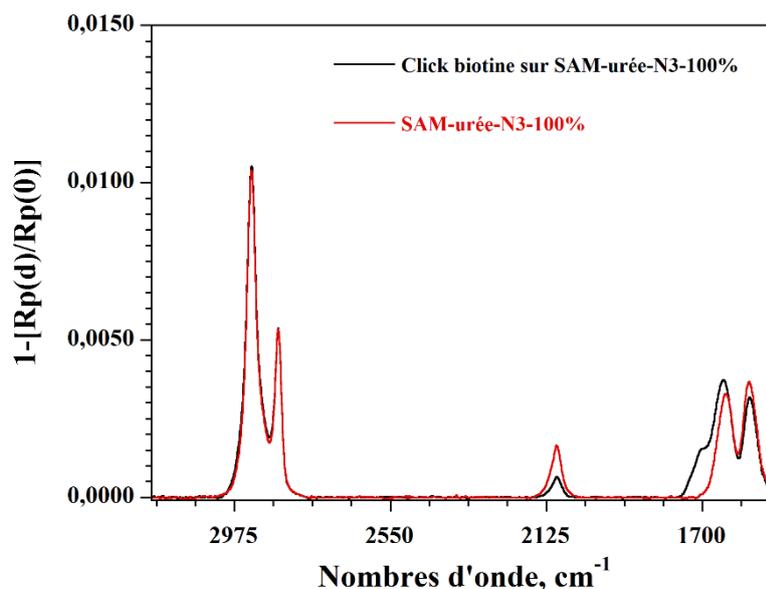


Figure 90. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-100% avant et après réaction

La **Figure 90** permet de comparer les spectres avant et après la réaction de chimie click. Sur ces spectres nous pouvons constater que l'observation faite lors de la click de la sonde nitro **23** est toujours valable : seul 50% des azotures visibles en PM-IRRAS semblent disponibles pour la réaction de chimie click. La bande azoture à 2097 cm⁻¹ ne disparaît pas complètement lors de la réaction. On en déduit donc que l'on atteint une saturation en biotine clickée sur la SAM-urée-N₃-100%.

L'étude des bandes CH₂ à 2928 cm⁻¹ et 2856 cm⁻¹ montre que le processus n'endommage pas la surface (intensité identique avant et après click), et le nombre d'onde de ces bandes montre que la surface clickée est plutôt désordonnée, comme la surface initiale.

L'accroche de la biotine en surface est visible par l'apparition de la bande amide I de l'urée cyclique de la molécule à 1704 cm⁻¹. L'apparition de cette nouvelle bande est concomitante à la disparition des N₃ et montre bien que la diminution de la bande azoture est due à la formation du triazole et non à une quelconque dégradation. La bande amide II n'est pas visible sur le spectre car elle se trouve dans le massif des bandes amide de l'urée linéaire de la SAM. On observe également qu'il n'y a pas de dégradation de la SAM au cours de la réaction car l'intensité des bandes $\nu_{\text{CH}_2(\text{as})}$ et $\nu_{\text{CH}_2(\text{s})}$ sont similaires avant et après la click.

Le niveau de consommation des N₃ est similaire pour la sonde nitro **23** et la biotine-alcyne. Ces deux molécules sont proches en taille et génèrent donc le même encombrement à la surface. Ceci peut expliquer la consommation similaire et incomplète des azotures lors de la click de ces deux molécules.

Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait réduire le nombre de N₃ disponibles à la surface afin de voir quand se produit la saturation.

Pour cela, nous allons utiliser les SAMs mixtes précédemment obtenues afin de diluer le silane fonctionnel N_3 et voir son effet sur la réaction de chimie click.

3- Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée- N_3 -50% et la SAM-urée- N_3 -25%

Nous avons effectué le processus de click de la biotine-alcyne commerciale sur les différentes SAMs mixtes obtenues de façon « classique » (**Figure 91**). Les substrats ont été lavés puis caractérisés en PM-IRRAS de la même manière que précédemment.

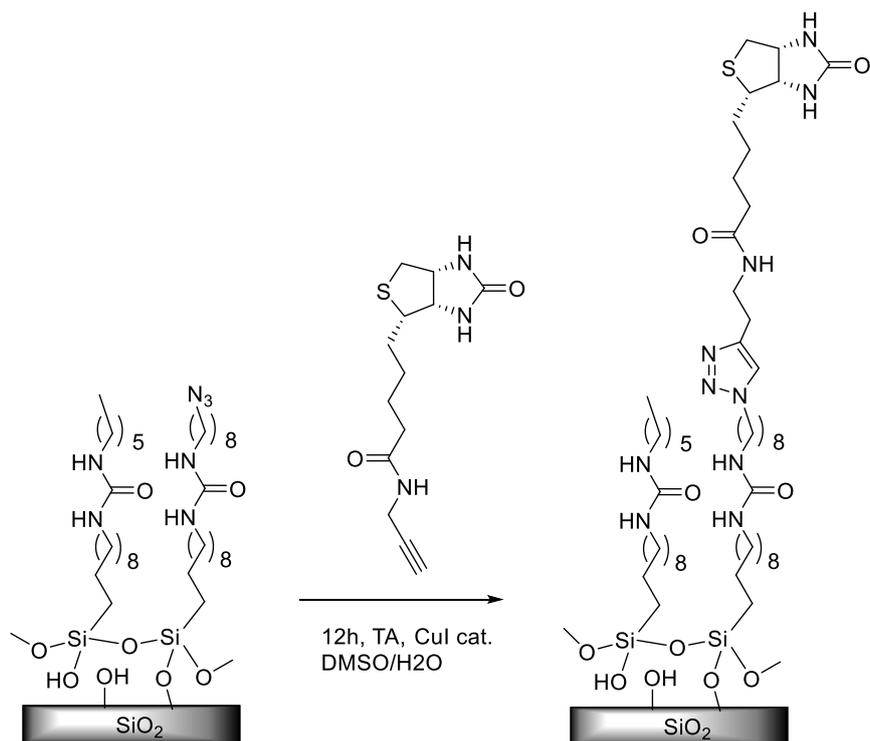


Figure 91. Représentation de la réaction de click de la biotine-alcyne sur une SAM-urée mixte

i- Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée- N_3 -50%

Le spectre PM-IRRAS de la SAM-urée- N_3 -50% après click est présenté ci-dessous (**Figure 92**).

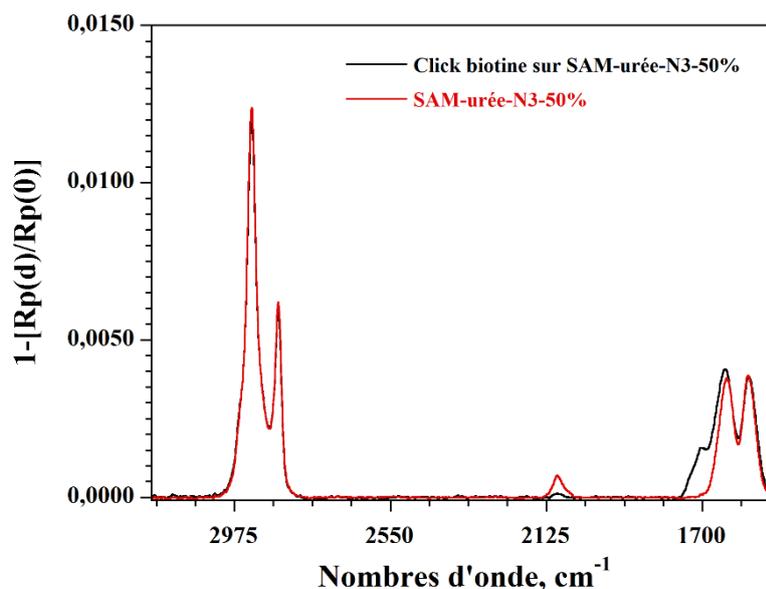


Figure 92. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-50% avant et après réaction

On note sur la comparaison des spectres ci-dessus la disparition quasi-totale de la bande azoture à 2097 cm⁻¹. Contrairement à la SAM-urée-N₃-100%, il semble que cette fois-ci la totalité des groupements N₃ observés en PM-IRRAS soient disponible pour la réaction.

Dans la région des amides, on observe clairement les bandes amide I et II de l'urée linéaire, inchangées par rapport à la SAM de départ. L'accroche de la biotine s'observe par l'apparition de la bande amide I de l'urée cyclique sous la forme d'un épaulement à 1704 cm⁻¹. Il est intéressant de relever que l'intensité de la bande amide I de la biotine est similaire pour la SAM-urée 100% et 50%. Cette observation semble montrer qu'il y a, dans les deux cas, saturation en biotine de la surface. La SAM-urée-N₃-50% est donc suffisante puisque la grande majorité des N₃ est accessible au processus de chimie click. Ce résultat est cohérent avec une consommation à 50% des azoture pour la SAM-urée 100%, conduisant à la même quantité de biotine en surface. Comme il reste des N₃ n'ayant pas réagi même dans le cas de la SAM-urée 50%, il serait alors intéressant de réduire encore la quantité d'azotures disponibles en surface.

Enfin, la bande amide II reste quasiment invisible, confondue avec la bande amide II de l'urée linéaire.

ii- Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée-N₃-25%

Le spectre PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-25% après click est présenté ci-dessous (**Figure 93**).

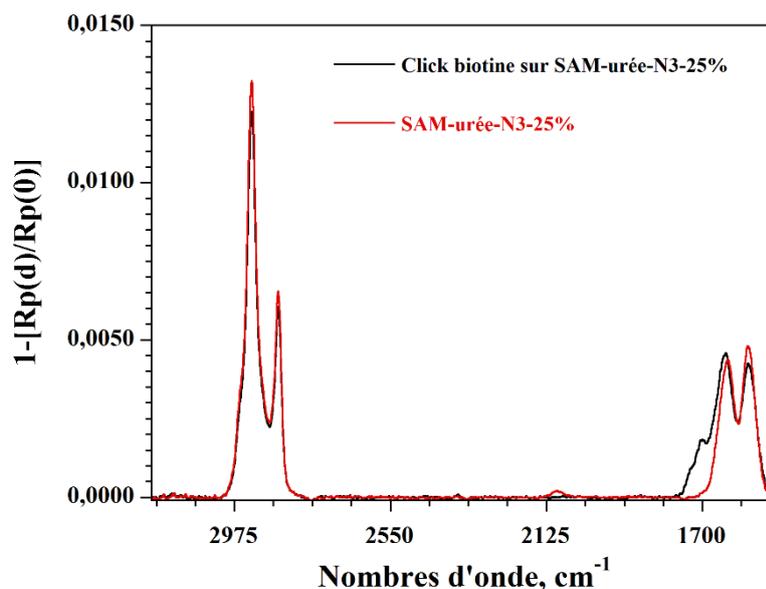


Figure 93. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-25% avant et après réaction

Sur la comparaison des spectres ci-dessus, on observe la disparition totale de la bande azoture à 2097 cm⁻¹. Cette observation est difficile car l'intensité de la bande concernée est très faible. La preuve que la réaction click fonctionne se situe donc plutôt du côté des bandes amide.

En effet, dans la région des bandes amide, on note la conservation des signaux amide I et II correspondant à l'urée linéaire (respectivement à 1631 cm⁻¹ et à 1577 cm⁻¹), ainsi que l'apparition d'un épaulement. Ce signal à 1704 cm⁻¹ correspond à la bande amide I de l'urée cyclique de la biotine. Nous pouvons ainsi confirmer l'accroche de la biotine sur la SAM.

Avec la SAM-urée 25%, il y a une consommation totale des N₃ accessibles à la surface du substrat, avec l'apparition d'une bande amide I de la biotine dont l'intensité est comparable aux SAM-urée 100% et 50%. Par conséquent, 25% de N₃ disponibles à la surface est suffisant pour atteindre la saturation en biotine après chimie click.

De plus, il est intéressant de noter que, comme pour la SAM-urée-N₃-50%, la bande amide I de la biotine est mieux définie que pour la SAM-urée-N₃-100%. Ceci est probablement dû à un effet d'orientation : le nombre d'azoture initialement présents en surface étant plus faible, les gênes stériques engendrées par la biotine sont plus faibles. Celle-ci possède donc plus de degrés de liberté et peut donc s'orienter plus favorablement en surface.

4- Click de la biotine-alcyne sur la SAM-urée libre-N₃-50%

Le protocole étant applicable aux SAMs mixtes « classiques », nous avons décidé de cliquer la biotine-alcyne à la SAM-urée libre-N₃-50%.

Les substrats obtenus sont lavés et caractérisés par PM-IRRAS (**Figure 94**).

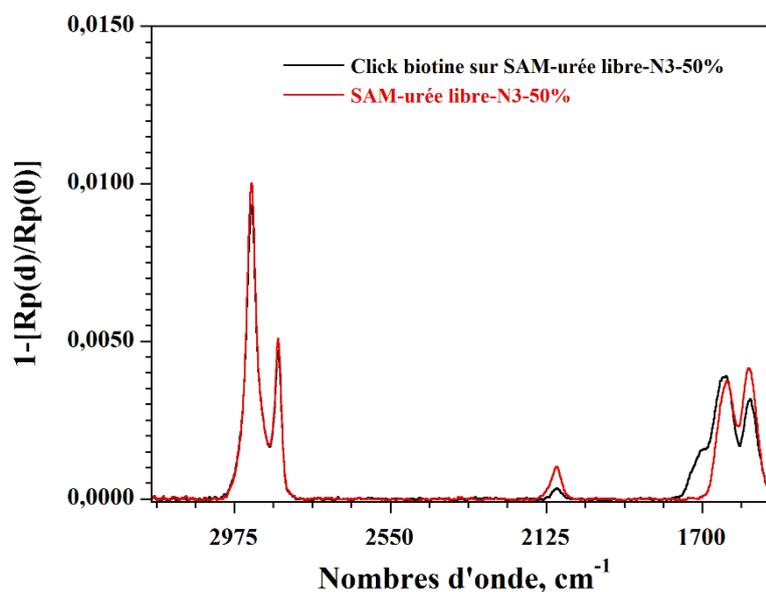


Figure 94. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée libre-N₃-50% avant et après réaction

Après la réaction, environ 70% des N₃ disponibles ont été consommés. Cependant, l'intensité de la bande amide I de l'urée cyclique de la biotine à 1704 cm⁻¹ reste similaire aux SAM-urée 100%, 50% et 25%. Cette consommation partielle des azotures peut être due à l'incorporation légèrement plus importante (environ 30%) du silane dans la SAM-urée libre-N₃-50% par rapport à la SAM-urée-N₃-50%.

Les bandes amide I et II de l'urée linéaire restent inchangées. Cela montre que la diminution de la bande azoture à 2097 cm⁻¹ est bien le résultat de la formation du triazole et que la SAM-urée libre-N₃-50% a bien pu être biofonctionnalisée.

*Nous avons donc pu voir dans cette partie que les différentes surfaces fonctionnalisées par des azotures visibles en PM-IRRAS peuvent être engagées avec succès dans une réaction de chimie click. Les conditions de cette réaction ont pu être mises au point grâce à l'utilisation d'une molécule sonde **23** facilement identifiable en PM-IRRAS, ainsi qu'à l'utilisation de la surface de référence obtenue par post-fonctionnalisation.*

Ces conditions ont pu être mise en œuvre pour la click d'un dérivé biotine-alcyne sur les différentes surfaces de type SAM-urée, afin de les rendre bio-fonctionnelles. Il est important de noter que, quel que soit le type de SAM-urée employée, nous pouvons observer une saturation en biotine clickée en surface. Cette observation a pu être réalisée en comparant les intensités de la bande amide I de la biotine dans le cas des SAM-urée 100%, 50%, et 25%, mais aussi dans le cas de la SAM-urée libre, qui restent constante. Cela témoigne d'un taux maximal en biotine pouvant être accroché en surface par la méthode de chimie click. Le seuil nécessaire

et suffisant en N_3 de surface pour effectuer la réaction de chimie click avec la biotine-alcyne de façon optimale est donc de 25%.

F- Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons dans un premier temps décrit la synthèse de nouveaux agents de couplage siliciés contenant un motif urée et un azoture terminal. Nous avons montré l'obtention de tels agents de couplage en étudiant la réaction d'hydrosilylation catalytique et en prouvant qu'elle pouvait être transposée aux précurseurs insaturés contenant un azoture sans endommager ce groupement. Cela constitue, à notre connaissance, la première description d'une telle méthode, qui permet ainsi de synthétiser des organosilanes fonctionnels de façon moins fastidieuse que dans la littérature.

La mise au point des conditions de greffage de ces agents de couplage a ensuite été étudiée en utilisant un organosilane simplifié. Néanmoins, les résultats obtenus ont été surprenants : la SAM ne présente en PM-IRRAS que de très faibles intensités pour la bande N_3 . Ce résultat est d'autant plus surprenant que la méthode classique d'obtention des SAM azoture (post-fonctionnalisation de SAM-Br) présente des intensités en PM-IRRAS bien plus importantes. A ce stade de l'étude, nous avons émis l'hypothèse que le greffage direct de l'organosilane **12** engendre une orientation spécifique des azotures, parallèlement à la surface, rendant leur observation impossible.

Compte tenu de ces résultats, nous avons par la suite étudié le greffage de l'agent de couplage **9**, contenant un motif urée et un azoture terminal. Nous pensons alors que l'utilisation de la fonction urée pourrait écarter les molécules, et ainsi diminuer l'interaction dipôle-dipôle entre groupements azotures responsables de l'orientation privilégiée de ces derniers. Cette étude nous a permis de montrer que l'utilisation d'un agent de couplage possédant un motif urée et une fonction azoture permet d'obtenir une SAM homogène. De plus, nous avons pu observer la bande azoture en PM-IRRAS, ce qui tend à prouver notre hypothèse émise lors de la formation d'une SAM alkyle contenant un azoture : l'orientation des N_3 est responsable de l'extinction de la bande à 2100 cm^{-1} . Ceci pourrait être dû à l'interaction dipôle-dipôle entre azotures, qui s'appaireillent de façon parallèle à la surface.

Par la suite, nous avons étudié la formation de SAMs mixtes intégrant l'agent de couplage **9**, afin d'observer l'effet de la dilution sur les groupement azotures terminaux. Nous avons montré que l'agent de couplage contenant la fonction azoture pouvait être greffé en quantité variable, et que le processus de co-adsorption respecte bien les ratios introduits dans le bain de greffage. L'étude en PM-IRRAS de la bande à 2100 cm^{-1} nous a permis de constater que celle-ci respecte le facteur de dilution propre à chaque SAM. Cette étude nous a permis d'utiliser une nouvelle méthode de dilution d'un organosilane, afin d'obtenir une SAM mixte originale. Nous avons en effet synthétisé une SAM mixte diluée par une urée libre non greffable, ce qui a permis de diluer l'azoture de la même façon que lors d'un greffage en co-adsorption classique.

Enfin, nous avons mis au point des conditions de chimie click afin de biofonctionnaliser les différentes surfaces obtenues par une biotine-alcyne. Nous avons alors observé que, quel que soit le type de SAM employé, un effet de saturation en biotine clickée en surface était présent. Le seuil nécessaire en N_3 de surface pour effectuer la click de la biotine-alcyne de façon optimale a été déterminé à 25%.

A l'issue de cette partie nous avons ainsi obtenu différentes SAM possédant un azoture de surface, qui ont par la suite été biofonctionnalisées par chimie click. Cette biofonctionnalisation fait intervenir une biotine, qui est une molécule bioactive spécifique de l'avidine très utilisée en biochimie.

Références

- (1) Flynn, N. T.; Tran, T. N. T.; Cima, M. J.; Langer, R. *Langmuir* **2003**, *19* (26), 10909.
- (2) Bräse, S.; Gil, C.; Knepper, K.; Zimmermann, V. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, *44* (33), 5188.
- (3) Griess, P. *Philos. Trans. R. Soc. London* **1864**, *154* (0), 667.
- (4) Huang, D.; Yan, G. *Adv. Synth. Catal.* **2017**, *359* (10), 1600.
- (5) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004.
- (6) Evans, R. A. *Aust. J. Chem.* **2007**, *60* (6), 384.
- (7) Padwa, A. *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, 2nd ed.; Wiley, Ed.; 1984.
- (8) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057.
- (9) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41* (14), 2596.
- (10) Wang, C.; Ikhlef, D.; Kahlal, S.; Saillard, J. Y.; Astruc, D. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *316*, 1.
- (11) Ilyas, S.; Ilyas, M.; Van Der Hoorn, R. a L.; Mathur, S. *ACS Nano* **2013**, *7* (11), 9655.
- (12) Cernat, A.; Tertiş, M.; Cristea, C.; Săndulescu, R. *Int. J. Electrochem. Sci* **2015**, *10*, 6324.
- (13) Hudalla, G. a.; Murphy, W. L. *Langmuir* **2010**, *26* (9), 6449.
- (14) Decréau, R. a; Collman, J. P.; Hosseini, A. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1291.
- (15) Gallardo, I. F.; Webb, L. J. *Langmuir* **2012**, *28* (7), 3510.
- (16) Radhakrishnan, C.; Lo, M. K. F.; Warriar, M. V.; Garcia-Garibay, M. A.; Monbouquette, H. G. *Langmuir* **2006**, *22* (14), 5018.
- (17) Balachander, N.; Sukenik, C. N. *Langmuir* **1990**, *6* (11), 1621.
- (18) Rozkiewicz, D. I.; Jańczewski, D.; Verboom, W.; Ravoo, B. J.; Reinhoudt, D. N. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, *45* (32), 5292.
- (19) Pichon, B. P.; Wong Chi Man, M.; Bied, C.; Moreau, J. J. E. *J. Organomet. Chem.* **2006**, *691* (6), 1126.
- (20) Ramin, M. a; Le Bourdon, G.; Heuzé, K.; Degueil, M.; Belin, C.; Buffeteau, T.; Bennetau, B.; Vellutini, L. *Langmuir* **2012**, *28* (51), 17672.
- (21) Marciniak, B.; Maciejewski, H.; Pietraszuk, C.; Pawluc, P. *Hydrosilylation. A comprehensive Review on Recent Advances*, Springer.; Marciniak, B., Ed.; 2009.
- (22) Sakaki, S.; Mizoe, N.; Sugimoto, M. *Organometallics* **1998**, *17* (12), 2510.
- (23) Meillan, M.; Ramin, M. a; Buffeteau, T.; Marsaudon, S.; Odorico, M.; Chen, S. W.; Pellequer, J.-L.; Degueil, M.; Heuzé, K.; Vellutini, L.; Bennetau, B. *RSC Adv.* **2014**, *4* (23), 11927.

- (24) Meillan, M. Immobilisation de biomolécules sur des monocouches auto-assemblées et élaboration de sondes AFM à nanotubes de carbone fonctionnalisés pour des mesures d'interactions ligand-récepteur, Université de Bordeaux, 2014.
- (25) Sagiv, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (1), 92.
- (26) Dinh, D. H.; Vellutini, L.; Bennetau, B.; Dejous, C.; Rebière, D.; Pascal, E.; Moynet, D.; Belin, C.; Desbat, B.; Labrugère, C.; Pillot, J.-P. *Langmuir* **2009**, *25* (10), 5526.
- (27) Mirshafiee, V.; Mahmoudi, M.; Lou, K.; Cheng, J.; Kraft, M. L. *Chem. Commun.* **2013**, *49* (25), 2557.
- (28) Carroll, G. T.; London, G.; Landaluce, T. F.; Rudolf, P.; Feringa, B. L. *ACS Nano* **2011**, *5* (1), 622.
- (29) Palomaki, P. K. B.; Krawicz, A.; Dinolfo, P. H. *Langmuir* **2011**, *27* (8), 4613.
- (30) Pookpanratana, S.; Savchenko, I.; Natoli, S. N.; Cummings, S. P.; Richter, L. J.; Robertson, J. W. F.; Richter, C. A.; Ren, T.; Hacker, C. A. *Langmuir* **2014**, *30* (34), 10280.
- (31) Topka, M. R.; Dinolfo, P. H. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7* (15), 8053.
- (32) MacPhail, R. A.; Strauss, H. L.; Snyder, R. G.; Elliger, C. A. *J. Phys. Chem.* **1982**, *86* (3), 5145.

CHAPITRE III :
SYNTHESE DE SAMs BIOTINE

A- La biotine

a- Généralités et historique

La biotine, aussi appelée vitamine B8 (en France), vitamine B7 (dans les pays anglo-saxons), vitamine H (en Allemagne) ou bien encore coenzyme R, est une vitamine hydrosoluble importante qui participe à de nombreux processus et cycles métaboliques. Ses différentes appellations témoignent de l'histoire de sa découverte et de son importance majeure en biologie et en biochimie expérimentale.

La genèse de sa découverte remonte plus ou moins au début des années 1920¹. En effet, à cette époque, de nombreux travaux commencèrent à suggérer que la « vitamine hydrosoluble B » (ou plus communément, la vitamine B), bien loin de n'être qu'une seule molécule, étaient un cocktail d'au moins deux principes actifs. C'est ainsi que les appellations vitamine B1 et vitamine B2 furent données aux deux principaux facteurs extraits de la levure, protégeant respectivement de la polyneuropathie et de la pellagre. Bien que la vitamine B1 s'est avérée n'être qu'une seule substance (la thiamine), la vitamine B2, elle, s'est avérée être un mélange de plusieurs molécules. Parmi ces molécules qui composèrent la vitamine B2, on compte actuellement des cofacteurs tels que la niacine (vitamine B3), l'acide pantothénique (vitamine B5), et la biotine (vitamine B8) (**Figure 95**).

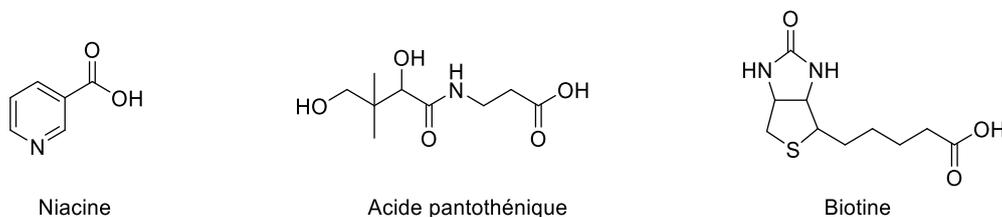


Figure 95. Exemple de trois vitamines B : La niacine, l'acide pantothénique et la biotine

En biologie, il a été découvert que la biotine participe, entre autres, en tant que cofacteur dans la gluconéogenèse, la biosynthèse d'acides gras, et le catabolisme d'acides aminés. Malgré cette importance capitale de la biotine pour virtuellement tous les êtres vivants, sa découverte fut plus longue que pour les autres vitamines B. En effet, contrairement à la niacine par exemple, les carences naturelles en biotine ont toujours été très rares à observer. C'est ainsi que son rôle primordial dans le métabolisme fut d'abord découvert *via* des expériences de laboratoire sur des microorganismes et sur des rats. Chez l'homme, les rares carences en biotine furent observées sur de jeunes nourrissons, souffrant de diarrhées aiguës et empêchant ainsi l'absorption de la biotine du lait maternel. De nos jours, une carence en vitamine B8 peut être observée chez les patients atteints de déficience en biotinidase (ces personnes sont dans l'incapacité de réutiliser et de recycler la biotine), chez les jeunes enfants mal nourris dans les pays en développement, ou encore chez les personnes dont le régime alimentaire n'est pas adapté (consommation excessive de large quantité d'œufs crus).

La mise en évidence du rôle et de l'importance de la biotine vient principalement d'expériences effectuées sur de jeunes rats. En effet, en 1927, Margaret Averil Boas, biochimiste à l'Institut de Lister de Londres, étudiait l'effet d'un régime alimentaire à base d'œufs crus sur le modèle murin. Elle se rendit compte que les rats ne mangeant que des blancs d'œufs crus développaient divers symptômes sévères comme de l'eczéma ou encore une posture difforme, entraînant la mort en quelques semaines. Boas découvrit aussi que les rats atteints par ces symptômes retrouvaient rapidement un état normal lors de l'ingestion de foie cru ou de levure. Quelques années plus tard, en 1937, Paul György de la Western Reserve University de Cleveland, découvrit qu'une substance pure, la vitamine H (de l'allemand « Haut », voulant dire « peau »), pouvait guérir les rats atteints par la « maladie du blanc d'œuf ».

Parallèlement, en 1936, Fritz Kögl de l'université d'Utrecht aux Pays-Bas réussit à extraire et à purifier une substance contenue dans le jaune d'œuf, qu'il appela « biotine ». Ce nom fût donné à la molécule car Fritz pensait qu'elle était un composant important du « Bios » décrit par Eugene Wielder comme un complexe essentiel pour la croissance de microorganismes. La même molécule prit le nom de coenzyme R, car Allison et al. ont montré qu'elle était indispensable à la croissance d'une bactérie, le *Rhizobium*.

Toutes les pièces du puzzle se sont mises en place quand, en 1940, Esmond Snell de l'université du Texas d'Austin, isolât du blanc d'œuf la molécule responsable des troubles observés par Boas sur les rats. Après plusieurs tests *in-vitro*, il se rendit compte que l'effet de cette molécule pouvait être contrecarré par de grandes quantités de biotine. Suivant les travaux de Boas, il a ensuite été découvert que la levure et le foie possèdent tous deux un fort taux de biotine, ce qui permit de guérir les rats atteints de la « maladie du blanc d'œuf ». Snell et György nommèrent cette molécule responsable des carences en biotine l'avidine, car celle-ci est *avide* en biotine.

En 1942, Virgil Preston Sydenstricker étudiait l'effet d'une carence en biotine sur l'humain en nourrissant un groupe de patients avec de larges quantités de blanc d'œufs crus. Les divers symptômes observés chez l'homme furent cohérents avec ceux décrits sur les rats, et témoignèrent de l'importance d'un certain taux de biotine dans divers cycles métaboliques. Il devint alors évident pour la communauté scientifique que la biotine, la vitamine H, et la coenzyme R n'étaient qu'une seule et même molécule, pouvant être fortement inhibée par un régime riche en avidine. La consommation en œufs cuits apparût comme sans danger car l'avidine n'est pas stable thermiquement, et est dégradée durant le processus de cuisson ; contrairement à la biotine contenue dans le jaune d'œuf.

La première structure de la vitamine B8 fût rapportée par Du Vigneaud et al. en 1942, grâce notamment à l'étude des produits de dégradation de la biotine. Cette structure a par la suite été confirmée en 1956 par Traub et al. après étude d'un cristal de biotine naturelle par diffraction des rayons X (**Figure 96**). Son rôle précis comme cofacteur enzymatique dans les réactions de carboxylation a été découvert en 1959 par le biochimiste et futur prix Nobel, Feodor « Fitzi » Lynen².

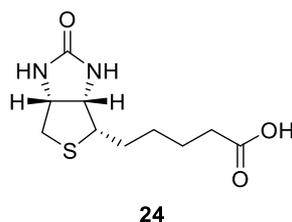


Figure 96. Structure énantiomérique de la D(+)-biotine

b- Utilisation en biochimie

La forte interaction entre la biotine et l'avidine (ou bien ses dérivés, comme la streptavidine), poussa les scientifiques à considérer la molécule comme un outil potentiellement intéressant en biochimie. En effet, l'affinité entre la vitamine B8 et l'avidine étant la plus forte interaction non covalente observée dans la nature ($K_D = 10^{-15}$ à 10^{-16} mol.L⁻¹), il a très vite été envisagé d'utiliser la biotine comme marqueur en biochimie pour des méthodes de détection et/ou de purification (**Figure 97**).



Figure 97. Structure résolue de l'avidine complexant 4 biotines, par Livnah et al., disponible sur la Protein Data Bank (PDB), code PDB : 2AVI³

Dès 1949, cet intérêt croissant pour la molécule poussa les scientifiques à considérer une méthode de synthèse totale afin d'obtenir la biotine, qui reste très peu présente dans les sources naturelles. C'est ainsi que Goldberg et Sternbach développèrent une méthode multi-étape pour obtenir le produit énantiomériquement pur (**Figure 98**).

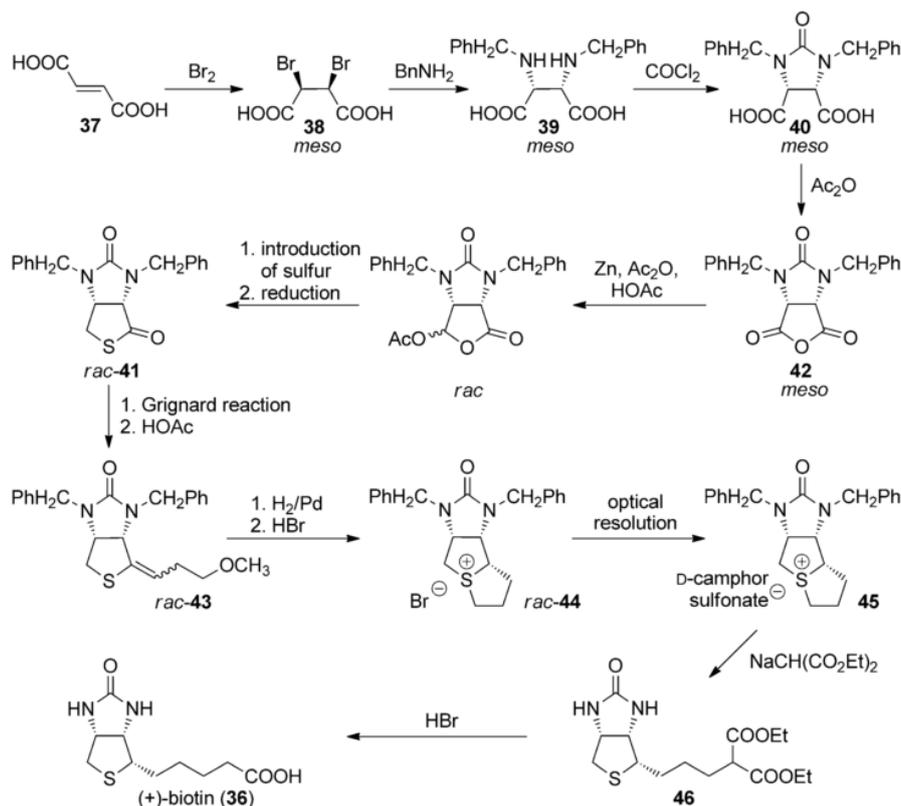


Figure 98. Stratégie de Goldberg-Sternbach, comme présentée par Eggersdorfer et al.⁴ (Schéma issu de la publication, numérotation des molécules indépendante du présent manuscrit)

La synthèse employée de nos jours par les industriels utilise en grande partie les principales étapes développées par Goldberg et Sternbach, notamment les différentes méthodes introduisant les centres stéréogéniques.

La disponibilité d'une molécule à la fois simple dans sa structure et au fort potentiel d'interaction avec une protéine identifiée permet de développer différentes techniques couramment utilisées en biochimie. La principale utilisation de la biotine est comme marqueur pour les tests biochimiques (comme ELISA par exemple), *via* le processus de biotinylation. Cette méthode consiste à conjuguer la vitamine B8 à une cible d'intérêt, comme une protéine, *via* la réaction entre l'acide carboxylique de la biotine et les amines libres des biomolécules. Les composés ainsi marqués peuvent donc interagir fortement avec l'avidine ou ses analogues. On dispose alors d'un moyen simple et efficace pour détecter, immobiliser, ou isoler des composés marqués en utilisant cette forte interaction (**Figure 99**).

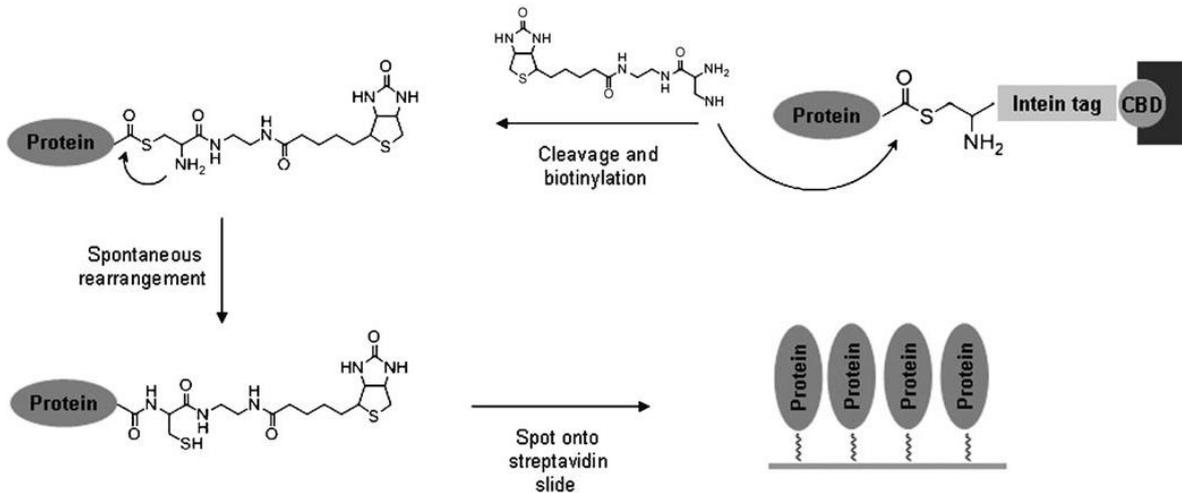


Figure 99. Exemple de biotinylation d'une protéine par Jonkheijm et al. en vue de son immobilisation sur une surface de streptavidine

Il est aussi important de noter que la petite taille de la biotine est un avantage considérable pour son utilisation comme marqueur. En effet, couplée à un anticorps par exemple, celle-ci ne va pas dénaturer la biomolécule, ni diminuer sa bioactivité. C'est ainsi qu'il est envisageable d'utiliser des systèmes de type « sandwich » impliquant une biotine immobilisée sur un support, de la streptavidine, et une biomolécule active biotinylée, pour créer une surface biologiquement active. Cette technique est utilisée dans certains tests ELISA pour immobiliser les anticorps ou antigènes d'intérêt (**Figure 100**).

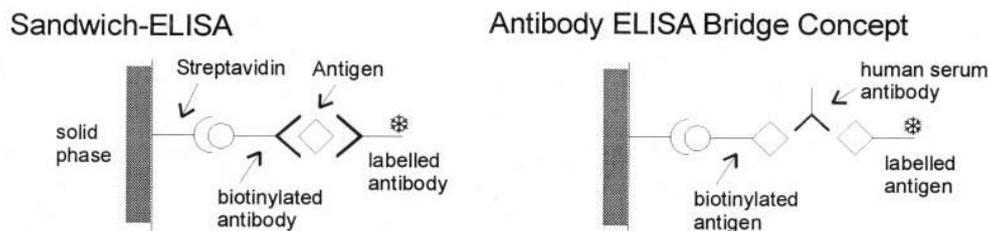


Figure 100. Exemple de tests ELISA utilisant des systèmes biotine-streptavidine pour l'immobilisation d'anticorps (par Hartmut Schettters)⁵

La streptavidine peut, toujours selon ce système, être liée à des nanoparticules magnétiques afin d'extraire des composés biotinylés d'un milieu complexe par exemple.

La versatilité d'un tel système biotine-avidine (ou biotine-analogue) en fait une méthode de choix, versatile et re-modelable à façon, pour une grande variété d'utilisation en biochimie, et notamment pour le développement de bio-capteurs.

c- Utilisation de la biotine pour des système biosenseurs

Comme présenté précédemment, il suffit d'immobiliser correctement la vitamine B8 sur une surface pour pouvoir tirer profit du système « sandwich » formé avec l'avidine ou ses analogues pour la confection de bio-capteurs.

Il est ainsi possible d'incorporer la biotine sur des SAMs afin d'en faire des systèmes de bio-détection. Comme montré dans le chapitre précédent, obtenir des surfaces modifiées par la vitamine B8 peut passer par différente méthodes : utilisation de la chimie click (*cf. chapitre II*), adsorption de thiols biotinylés sur surfaces d'or, couplage de la biotine sur des SAMs de type amines, ...

Une méthode directe pour obtenir une SAM biofonctionnalisée par la biotine consiste à adsorber directement un dérivé de type mercapto-biotine sur une surface d'or. Cette technique a par exemple été employée par Pérez-Luna et al., qui ont pu immobiliser deux molécules complexes, le 11- et 12-mercaptoundecanoïc-(8-biotinoyl- amido-3,6-dioxaoctyl) amide⁶. Ils ont ainsi pu créer une surface capable d'interagir spécifiquement avec de la streptavidine. Wang et al. ont aussi montré qu'il était possible de créer un biosenseur en immobilisant des nanoparticules d'or sur une surface de silice, puis en les fonctionnalisant avec de la biotine. Cette fonctionnalisation s'effectue après avoir modifié les nanoparticules par de la cystéamine, qui sont alors capables de réagir avec l'acide carboxylique de la biotine⁷. Ce système peut ensuite être utilisé comme bio-capteur pouvant détecter l'interaction biotine-streptavidine directement dans le sang humain (*Figure 101*).

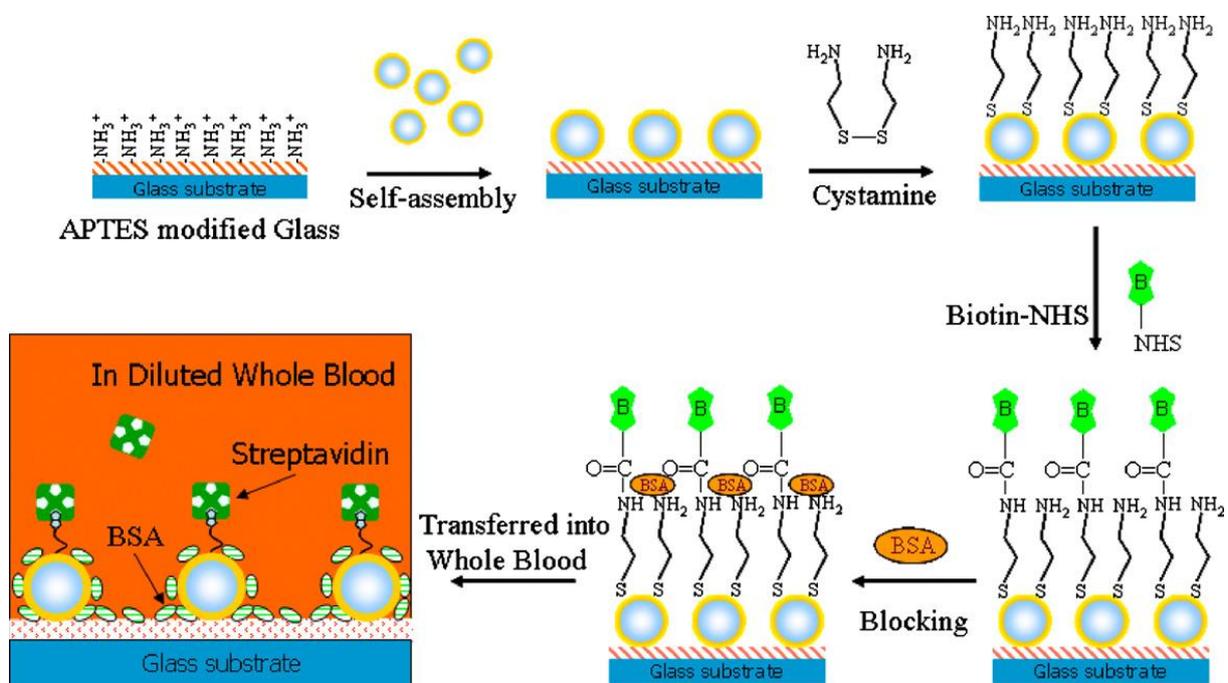


Figure 101. Représentation schématique de la conception du biosenseur à streptavidine par Wang et al.⁷

En ce qui concerne les surfaces de type SiO_2 , la plupart des travaux rapportés dans la littérature décrivent la création de bio-capteurs par immobilisation de la biotine sur des surfaces modifiées par des SAMs amines (approche de type post-fonctionnalisation). Par exemple, Rios et al. ont ainsi fonctionnalisé une surface de SiO_2 , préalablement modifiée par de l'APTMS, avec une SAM mixte contenant de la biotine et une molécule perfluorée⁸. Ils ont ensuite utilisé cette surface comme détecteur de streptavidine, en mesurant le changement d'angle de contact lors de l'interaction entre les deux molécules (**Figure 102**).

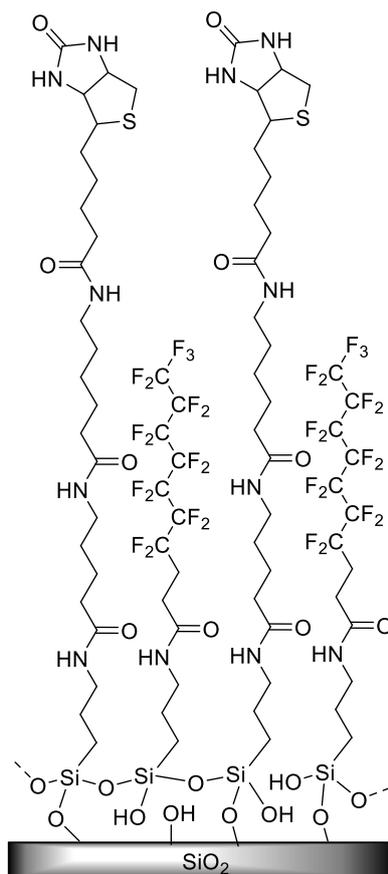


Figure 102. Exemple de SAM mixte biotine-perfluorée (20% en biotine) par Rios et al. pour la confection d'un bio-capteur à streptavidine⁸

Une autre façon d'introduire la biotine au sein de SAMs sur oxyde de silicium et d'utiliser une réaction de type thiol-ène. Cette chimie de type click permet de rapidement attacher une mercapto-biotine sur une surface modifiée par des maléimides par exemple. Ainsi, Seto et al. ont tout d'abord modifié un substrat par de l'APTMS, qu'ils ont ensuite fait réagir avec du *N*-succinimidyl-3-maleimidopropionate (SMP)⁹. La surface de silice ainsi fonctionnalisée par un maléimide a ensuite été biofonctionnalisée par l'ajout d'une biotine possédant un thiol. La réaction thiol-ène permet ainsi d'introduire la vitamine B8 au sein de la SAM. Ils ont de ce fait obtenu une plateforme de détection de la streptavidine en utilisant une microbalance à cristaux de quartz (QCM) comme transducteur (**Figure 103**).

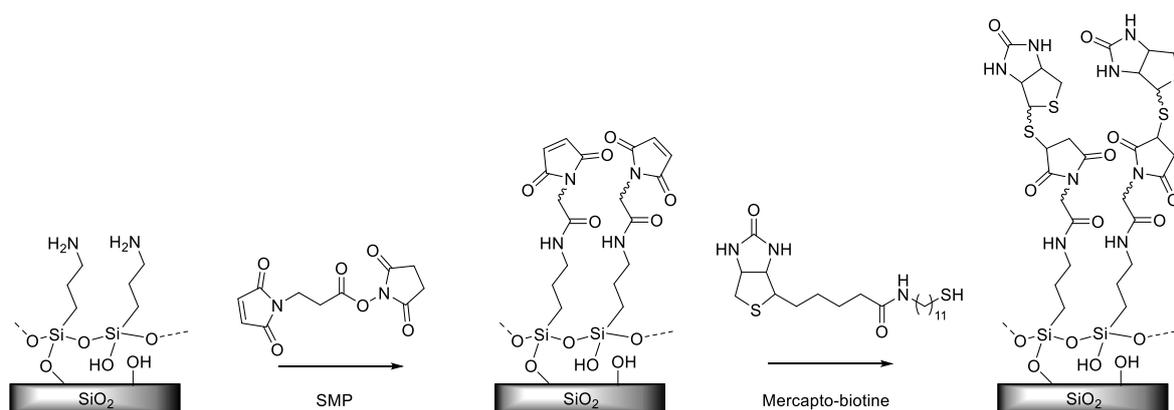


Figure 103. SAM biotinylée pour la détection de streptavidine via microbalance à cristaux de quartz par Seto et al.⁹

Néanmoins, il est intéressant de noter que ces méthodes de biotinylation de surfaces, quelles que soient leurs applications finales, font toutes appel à des méthodes de post-fonctionnalisation. Comme il a été vu précédemment, la chimie à l'interface solide-liquide, loin d'être optimale, peut engendrer des défauts sur les surfaces, pouvant limiter l'efficacité des bio-capteurs.

Il est donc intéressant de considérer, comme pour les SAMs azotures, une approche « bottom-up » dans laquelle la biofonctionnalité est donnée au substrat en une seule étape de greffage. Dans le chapitre précédent, nous avons montré qu'il était possible de donner une activité chimique bioorthogonale et spécifique en une seule étape, mais la biofonctionnalisation s'est faite ensuite par chimie click, et donc par post-fonctionnalisation. Nous avons donc décidé d'explorer un processus et une voie de synthèse permettant de tirer parti du système biotine-streptavidine tout en évitant les réactions chimiques post-greffage.

B- Synthèse d'agents de couplage contenant un motif urée et une biotine terminale

Pour des raisons de clarté, la stéréochimie de la biotine n'est pas explicitée par la suite.

Afin de directement biofonctionnaliser des substrats de SiO₂, et de leur donner une activité permettant d'orienter favorablement les bio-récepteurs en surface, nous avons décidé de synthétiser des agents de couplage incorporant une partie biotine. Ainsi, la bioactivité est donnée grâce au processus de greffage, en une seule étape, sans passer par des étapes de post-fonctionnalisation.

Là où les molécules siliciées présentées dans le précédent chapitre avaient pour but de donner une chimioactivité bioorthogonale à la surface, celles envisagées ici ont pour nouveauté d'incorporer directement une biomolécule. Nous espérons ici éviter tout problème ou défaut sur le substrat qu'une chimie interfaciale peut engendrer. Nous voulons aussi comparer cette méthode à celle de la chimie click afin de voir laquelle présente une meilleure bioactivité finale. A notre connaissance, il n'a pas encore été rapporté de méthodes dans la littérature permettant de biofonctionnaliser une surface en un processus « one-step ». Si cette méthode s'avère efficace, tout comme la synthèse d'agent de couplage azotures, celle-ci pourrait rendre la biofonctionnalisation de substrats de SiO₂ beaucoup moins complexe.

Les molécules considérées doivent ainsi posséder les caractéristiques suivantes :

- La présence d'un motif urée pour assurer un auto-assemblage intermoléculaire par liaisons hydrogène
- Un groupement alcoxysilane stable introduit lors d'une étape d'hydrosilylation finale
- Une biotine terminale pour introduire la bioactivité
- Une structure similaire à l'agent de couplage **9** afin de comparer leur bioactivité (**Figure 104**)

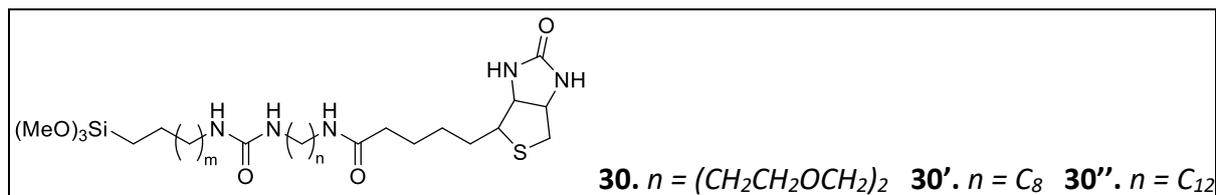


Figure 104. Structure générale des agents de couplage siliciés considérés

La stratégie de synthèse pour obtenir une telle molécule bioactive terminée par un groupement triméthoxysilane est la suivante (**Figure 105**) :

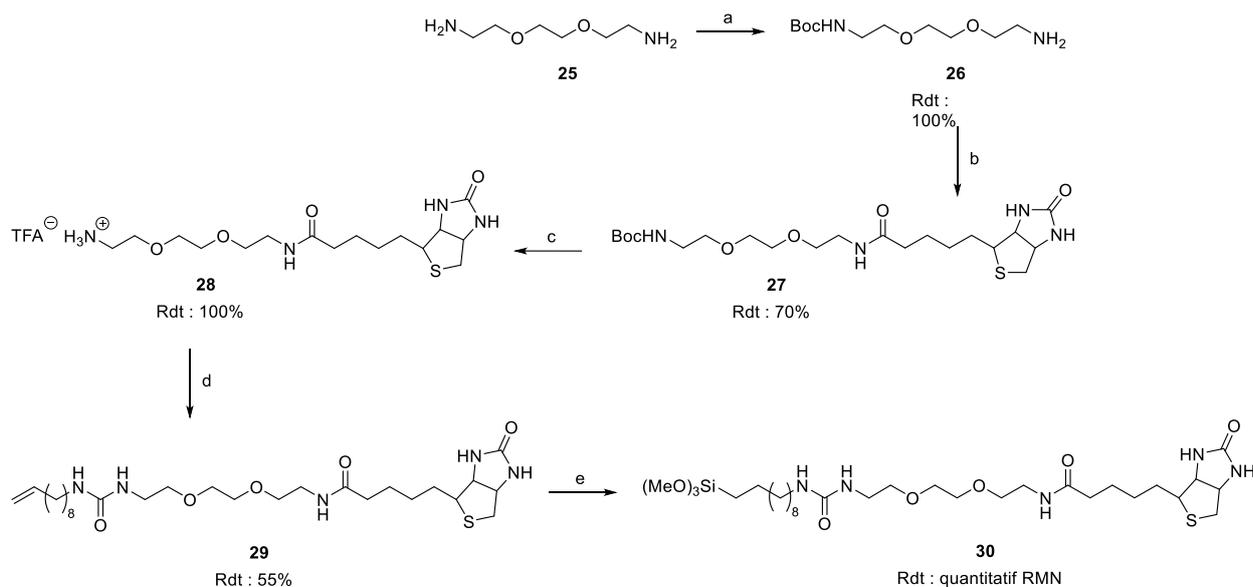


Figure 105. Réactifs et conditions : a- BOC₂O (1 eq.), CH₂Cl₂, 0°C puis TA, 12h ; b- biotine (1eq.), NHS (1.2 eq.), DCC (1.2 eq.), DMF, 12h ; c- TFA (52 eq.), 0°C puis TA, 2h ; d- TEA (1.5 eq.), 10-isocyanatodéc-1-ène (1.1 eq.), DMF, 12h ; e- HSi(MeO)₃ (5 eq.), cat. Karstedt (0.025 eq. en Pt), CHCl₃, 60°C, 3h

Après une mono-protection de la diamine par un groupement Boc, celle-ci est couplée à la biotine par la formation d'une fonction amide. L'amine est par la suite déprotégée afin de réagir avec l'isocyanate pour obtenir le précurseur éthylénique grâce à la formation de l'urée. Enfin, lors d'une dernière étape, le groupement alcoxysilane est introduit sur la double liaison par une hydrosilylation catalytique.

La synthèse du précurseur est explicitée à partir de la 1,8-diamino-3,6-dioxaoctane **25**, pour l'obtention du composé **30**. La synthèse des composés **30'** et **30''** se fait selon les mêmes étapes à partir des diamines **25'** et **25''** (**Figure 106**).

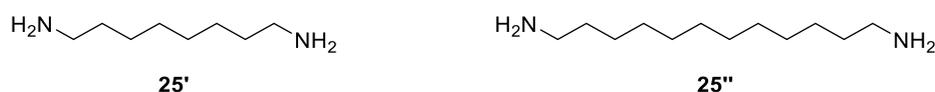


Figure 106. 1,8-diamino-octane **25'** et 1,12-diaminododécane **25''** servant respectivement à la synthèse de **30'** et de **30''**

a- Synthèse du sel de 1-biotine-3,6-dioxaoctane-8-ammonium **28**

1- Mono-protection de la fonction amine et couplage avec la biotine

Afin de coupler la biotine sur un seul groupement du 1,8-diamino-3,6-dioxaoctane **25**, il convient tout d'abord de protéger une des deux amines primaires de la molécule. En effet, sans cette protection préalable, le produit majoritairement obtenu serait le produit di-biotinylé et non mono-biotinylé (**Figure 107**).

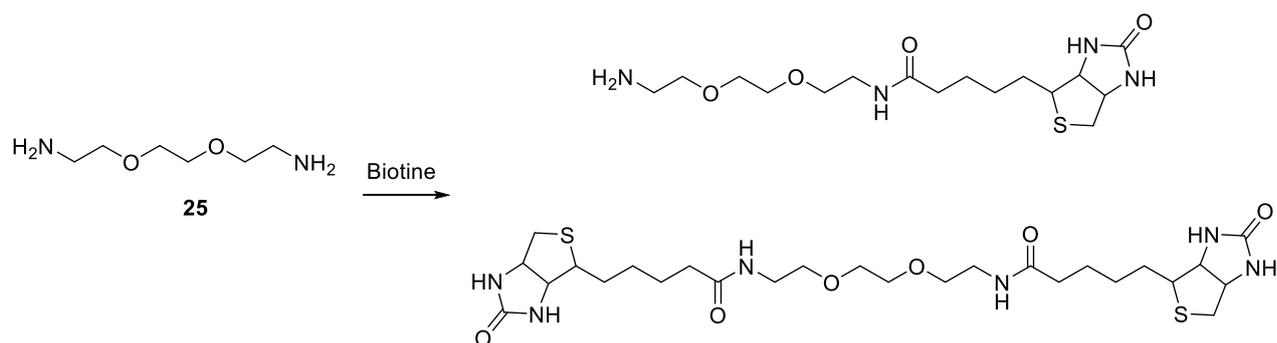


Figure 107. Produits pouvant être obtenus suite à la réaction entre la biotine activée et le 1,8-diamino-3,6-dioxaoctane **25**

i- Protection de l'amine par un groupement Boc

Le 1,8-diamino-3,6-dioxaoctane **25** peut être protégé sélectivement sur un seul groupement amine primaire par un groupement Boc. Cette réaction s'effectue par ajout de di-*tert*-dibutyle dicarbonate à une solution de **25**. La réaction doit se dérouler dans des conditions particulières, défavorables à la formation du produit di-protégé. C'est pourquoi une solution très diluée de di-*tert*-dibutyle dicarbonate est lentement ajoutée au composé **25** en large excès, à une température de 0°C afin de favoriser la mono-protection (**Figure 108**).

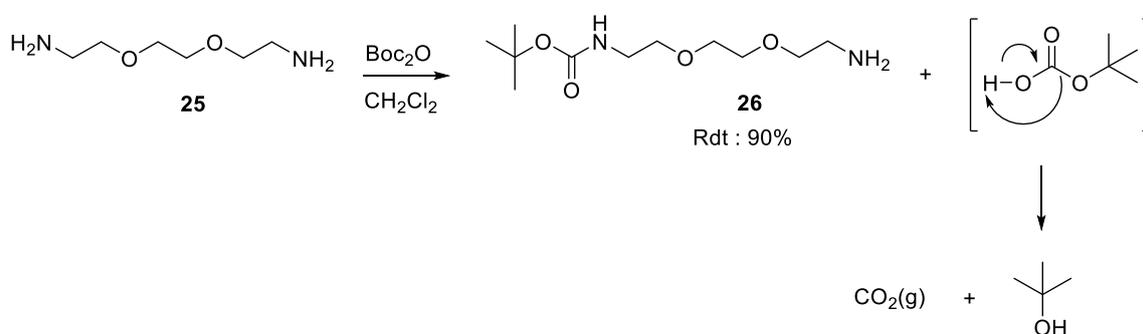
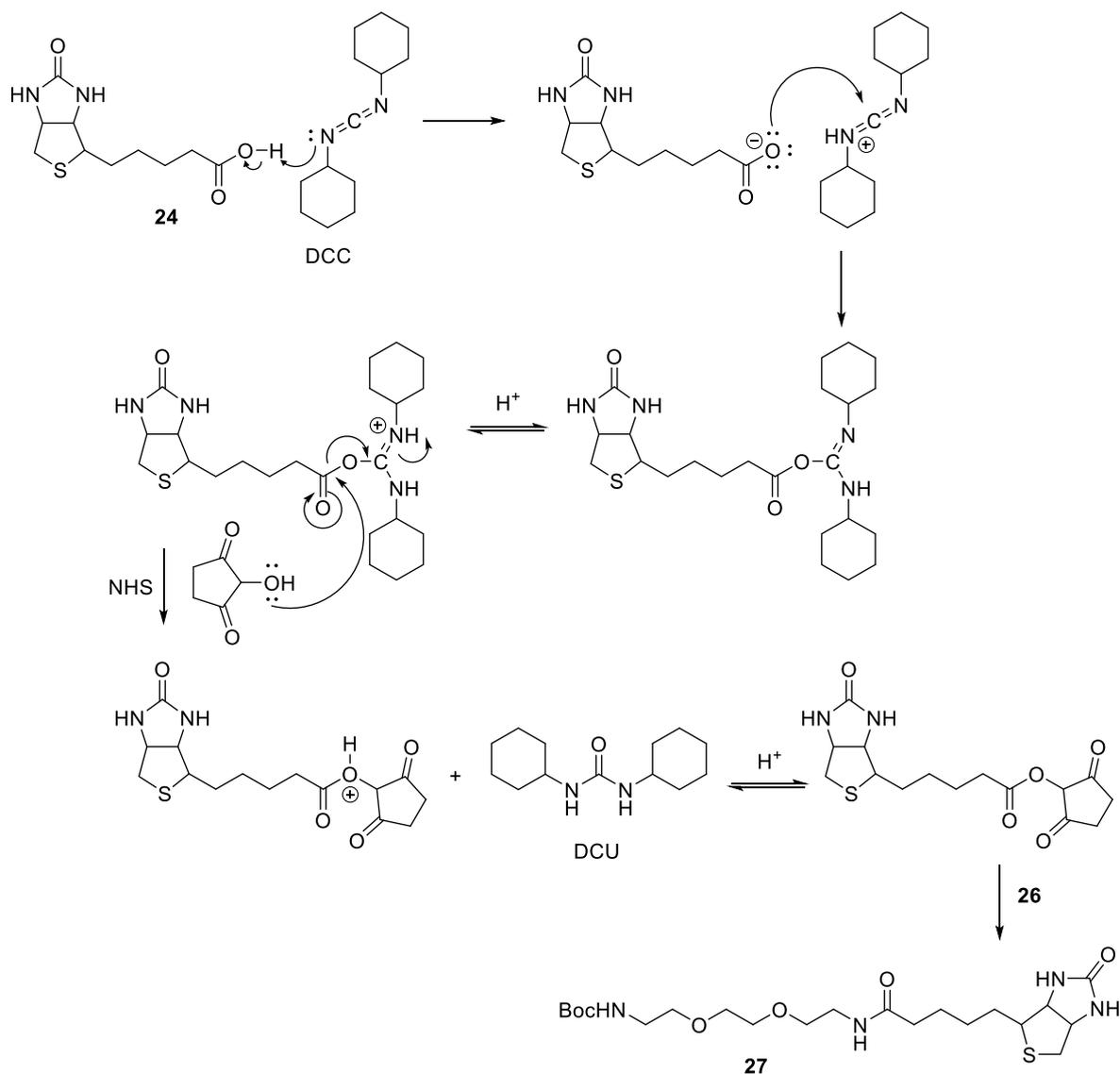


Figure 108. Mono-protection de **25** en présence de Boc₂O

ii- Couplage entre la molécule **26** et la biotine

Cette étape consiste à lier la molécule mono-protégée **26** à la biotine sous la forme d'un ester activé. Cette réaction utilise la chimie des carbodiimides. La biotine est tout d'abord activée sous atmosphère inerte par le *N*-hydroxysuccinimide et le *N,N'*-dicyclohexylcarboxydiimide avant d'être filtrée (pour éliminer la formation de dicyclohexylurée, DCU) pour réagir avec l'amine **26** (**Figure 109**).



2- Déprotection de la fonction amine et obtention du sel de 1-biotine-3,6-dioxaoctane-8-ammonium **28**

Cette étape consiste à déprotéger la fonction amine du composé biotinylé **27** avant sa réaction avec le 10-isocyanatodéc-1-ène **7**. Cette étape a été conduite dans deux conditions différentes, soit dans le TFA pur soit en milieu dilué dans le dichlorométhane. Les deux méthodes permettent d'obtenir un produit facilement isolable, mais l'utilisation de TFA pur pouvant s'avérer dangereuse, nous y préférons l'emploi d'un milieu dilué. Comme explicité dans le chapitre précédent, la réaction peut être suivie par dégagement du CO₂, produit secondaire du processus (**Figure 110**).

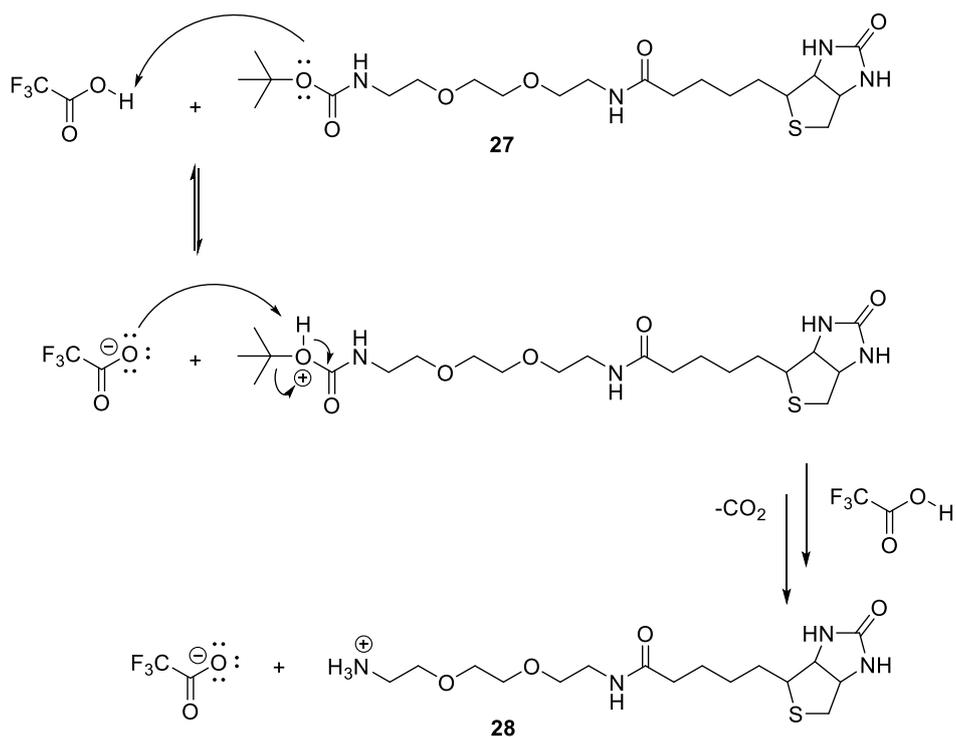


Figure 110. Mécanisme réactionnel de la déprotection du groupement Boc de **27** par le TFA

b- Synthèse du précurseur éthylénique **29**

L'ajout d'une base faible comme la triéthylamine est nécessaire afin de rendre l'amine du sel d'ammonium **28** nucléophile. La réaction est réalisée en milieu anhydre avec un léger excès d'isocyanate **7**. Le précurseur éthylénique **30** est obtenu après précipitation et lavage dans le pentane afin d'éliminer les restes d'isocyanate (**Figure 111**).

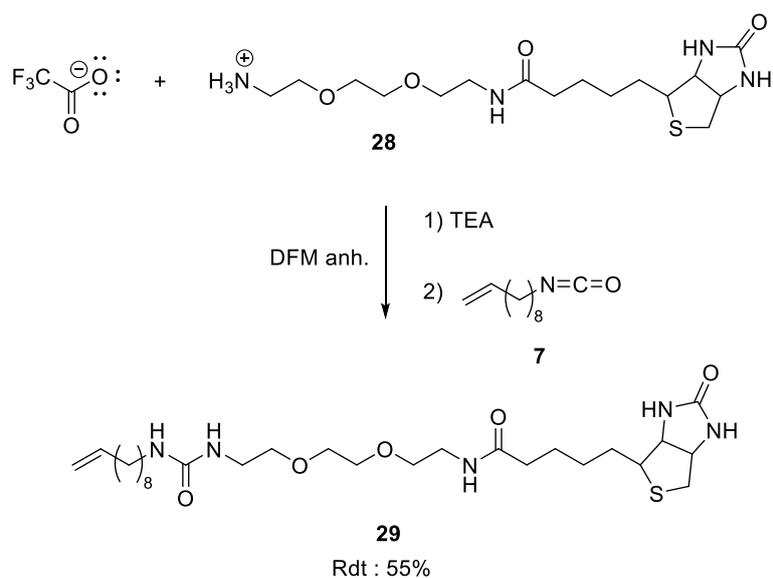
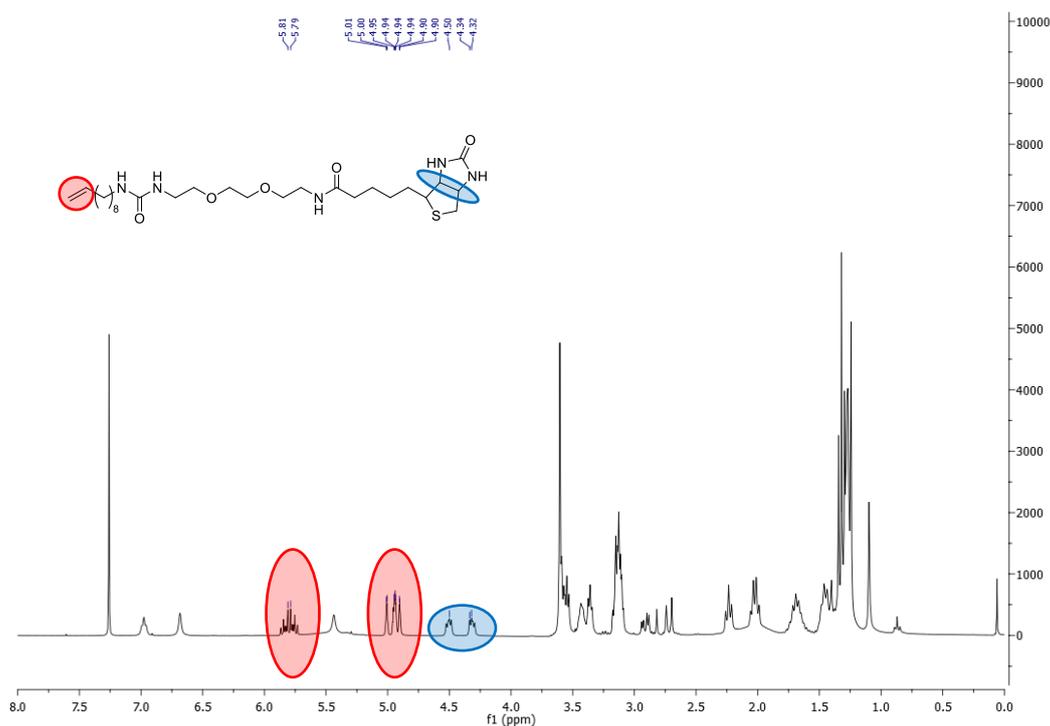


Figure 111. Synthèse du précurseur éthylénique **29**

c- Hydrosilylation du précurseur urée-biotine **29**

Au vu des résultats présentés dans le chapitre précédent, l'hydrosilylation du précurseur éthylénique **29** a été conduite dans les mêmes conditions que celle de l'azoture-urée **8**. Nous utilisons donc 5 équivalents de triméthoxysilane pour 0.025 équivalent de catalyseur en platine, dans le chloroforme fraîchement distillé, à 60°C, pour trois heures (*cf. page 60*).

Le composé hydrosilylé **30** est obtenu et analysée par RMN ^1H . Les signaux importants à comparer restent ceux correspondant au groupement éthylénique, mais aussi ceux appartenant à la partie biotine de la molécule (*Figure 112*).



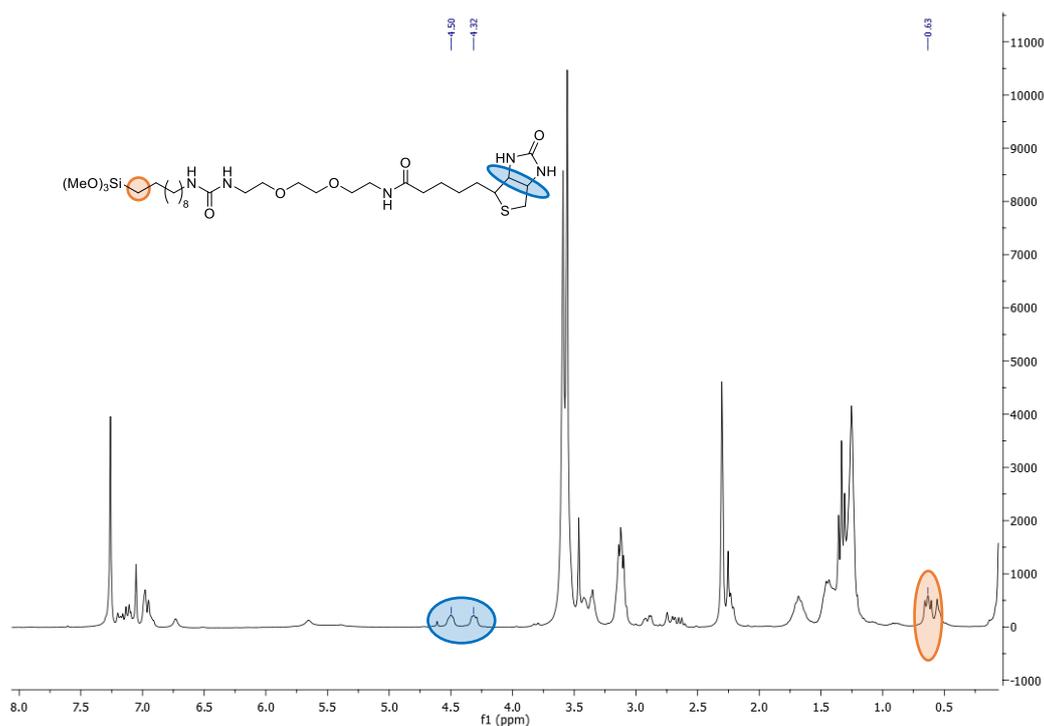


Figure 112. Comparatif des spectres RMN ^1H des composés **29** (en haut) et **30** (en bas)

Sur la comparaison des spectres ci-dessus, on note bien la disparition des pics éthyléniques à 5.80 et 4.95 ppm (notés en rouge), ainsi que l'apparition du pic correspondant au CH_2 lié au silicium à 0.63 ppm (noté en orange). Les pics de la biotine (notés en bleu) sont tous conservés après hydrosilylation.

A l'issue de ce travail de synthèse nous avons donc obtenu un nouveau type d'agents de couplage biotinylés possédant un chaînon de type PEG. Nous avons démontré la faisabilité de la réaction d'hydrosilylation sur de tels composés en vérifiant en RMN ^1H la conservation des signaux attribués à la biotine. L'obtention de tels organosilanes fonctionnels nous permet d'envisager la biofonctionnalisation de substrats de SiO_2 en une seule étape de greffage.

C- Synthèse et caractérisation de la SAM-urée-PEG-biotine-100%

Les précurseurs biotinylés obtenus permettent d'envisager une approche purement « bottom-up » pour la biofonctionnalisation de surfaces. En effet, la fonctionnalisation de surface, en utilisant la biotine par exemple, se fait classiquement en plusieurs étapes de chimie interfaciale à la surface des substrats. Cette approche, dite « top-down », bien que facile à mettre en œuvre, présente le désavantage de créer des inhomogénéités dans la monocouche ou des défauts de fonctionnalisation. Afin de pallier ce problème, l'utilisation de molécules bioactives silylées pourrait être une voie envisageable.

Le greffage de l'agent de couplage **30** est réalisé dans le chloroforme anhydre fraîchement distillé, à une température de 20°C. Les conditions de greffage sont identiques à ce qui a été précédemment exposé, à savoir : un taux en TCA de 10% molaire, une concentration totale en agent de couplage **30** de $2.5 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹ dans le bain de greffage, et l'utilisation de deux types de surfaces de SiO₂ (pour les analyses AFM et PM-IRRAS) préalablement activées. Au vu de nos précédents résultats et des travaux effectués au sein du groupe C2M, nous avons décidé de greffer la molécule **30** sur un temps de 12h, tout en regardant par la suite l'évolution du greffage pour des incréments horaires plus importants (**Figure 113**).

Les substrats obtenus après lavage sont analysés à la fois en PM-IRRAS et en AFM.

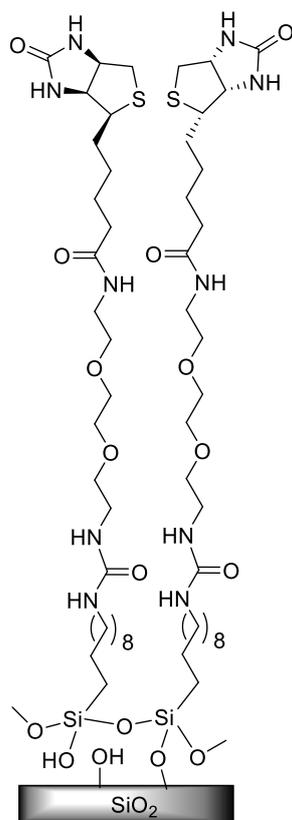


Figure 113. Représentation schématique de la SAM-urée-PEG-biotine-100%

a- Caractérisation de la SAM-urée-PEG-biotine-100% obtenue à 12h de greffage

1- Caractérisation par PM-IRRAS

Le spectre de la SAM-urée-PEG-biotine-100% obtenu après 12 h de greffage de l'agent de couplage **30** est présenté ci-dessous (**Figure 114**).

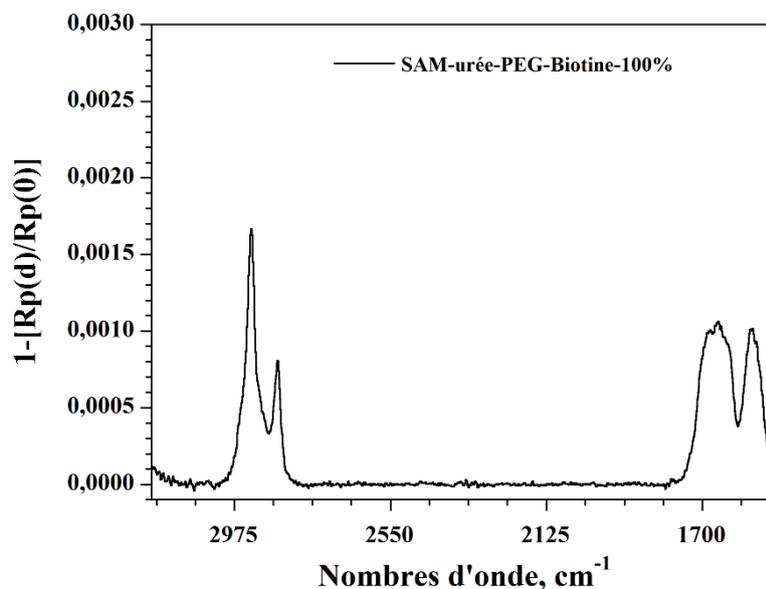


Figure 114. Spectre PM-IRRAS de la SAM-urée-PEG-biotine-100%

On note sur le spectre ci-dessus la présence de deux types de bandes caractéristiques : les bandes CH_2 et les bandes amide.

Les bandes CH_2 de type symétriques et asymétriques se trouvent respectivement à 2929 cm^{-1} et 2858 cm^{-1} . Cela témoigne d'un système plutôt désordonné dans sa partie haute, car la position de ces bandes se rapproche des valeurs limites de 2930 cm^{-1} et 2856 cm^{-1} .

L'intensité des bandes CH_2 nous indique aussi que ce système possède moins de matière que les SAM-urée-azoture présentées dans le **chapitre II**. Cela peut s'expliquer par la présence de la biotine au sein du précurseur éthylénique. En effet, dans le cas des SAMs azoture, on voyait rapidement après click une saturation en biotine de la surface ; sûrement dû à des effets stériques. Ces effets diminuant l'incorporation de la biotine au sein de la SAM *via* click se retrouvent ici et permettent d'expliquer la différence de matière entre cette monocouche et la SAM-urée- N_3 -100% (**Figure 115**).

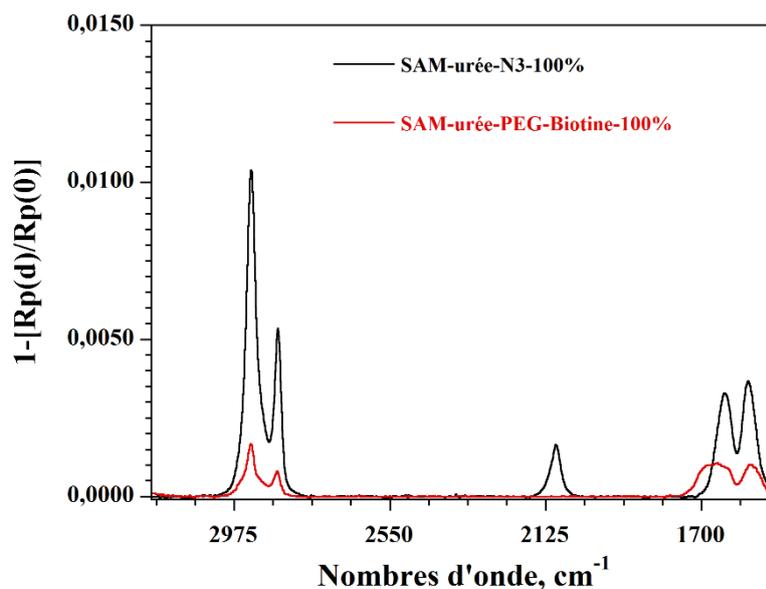


Figure 115. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-N₃-100% et de la SAM-urée-PEG-biotine-100%

Les bandes amide I et amide II, situées à 1660 cm⁻¹ et 1566 cm⁻¹, sont aussi plus larges que dans le cas des azotures. Ceci s'explique par la présence d'un plus grand nombre de motifs urée/amide au sein de la monocouche. En effet, l'agent de couplage **9** ne possède qu'un seul motif urée, ce qui donne, en comparaison avec l'agent de couplage **30**, des bandes moins larges et mieux définies. Ainsi, dans le cas de la SAM obtenue avec l'agent de couplage biotinylé **30**, les signaux amide I et II correspondent non pas à un motif urée linéaire, mais à un motif urée cyclique (celui de la biotine), une fonction amide (liant la biotine au chaînon PEG), et un motif urée linéaire. Ces trois contributions participent à l'élargissement des bandes.

Il est aussi intéressant de comparer le spectre obtenu avec la SAM-urée-PEG-biotine-100% et le spectre de la click de la biotine sur la SAM-urée-N₃-100% (**Figure 116**).

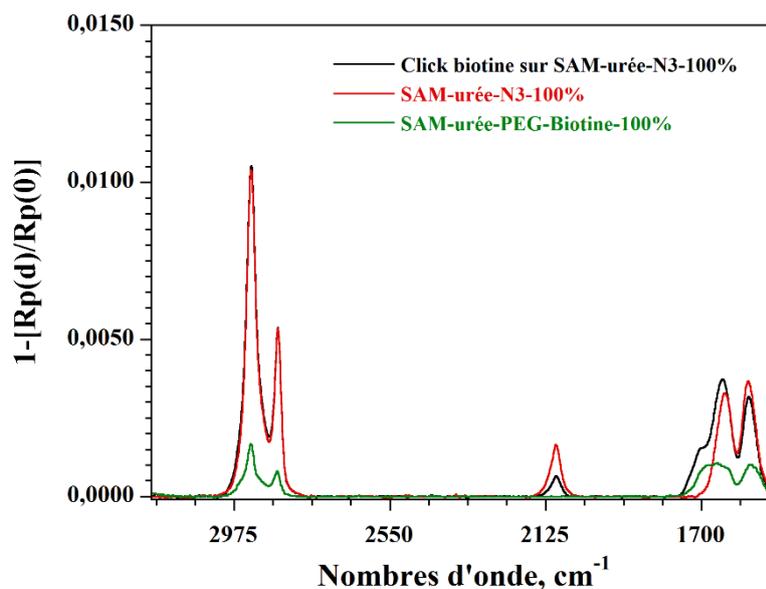


Figure 116. Comparaison des spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-PEG-biotine-100% et de la SAM-urée-N₃-100% avant et après chimie click

Sur la **Figure 116** ci-dessus, nous pouvons observer que la large bande amide I de la SAM-urée-PEG-biotine-100% correspond bien aux composantes de la biotine et de l'urée linéaire. En effet, on remarque un étalement de la bande vers 1700 cm⁻¹ qui correspond clairement à la bande à 1704 cm⁻¹ observée après click de la biotine sur la SAM-azoture. De plus, la partie de la bande se situant vers 1650-1645 cm⁻¹ semble bien correspondre à la composante de l'urée linéaire visible à 1639 cm⁻¹ sur le spectre de la SAM-urée-N₃-100%.

Néanmoins, force est de constater que la bande correspondant à la biotine est bien plus visible et mieux définie lors de l'emploi de la chimie click. Cela pourrait être dû à un phénomène d'orientation des molécules différent selon le processus utilisé. Dans le cas de la chimie click, l'orientation de la biotine est ainsi bien plus spécifique que l'approche « bottom-up » avec le greffage du composé **30**. En effet, dans le cas d'un ajout de la biotine en post-fonctionnalisation, celle-ci possède plus de degrés de liberté, car elle est « au-dessus » de la SAM, alors que dans le cas d'une approche « bottom-up », celle-ci est directement incluse au sein de la SAM, et subit donc plus de contraintes stériques.

2- Caractérisation par AFM

Les wafers de silicium introduits dans le bain de greffage sont analysés par AFM (**Figure 117**).

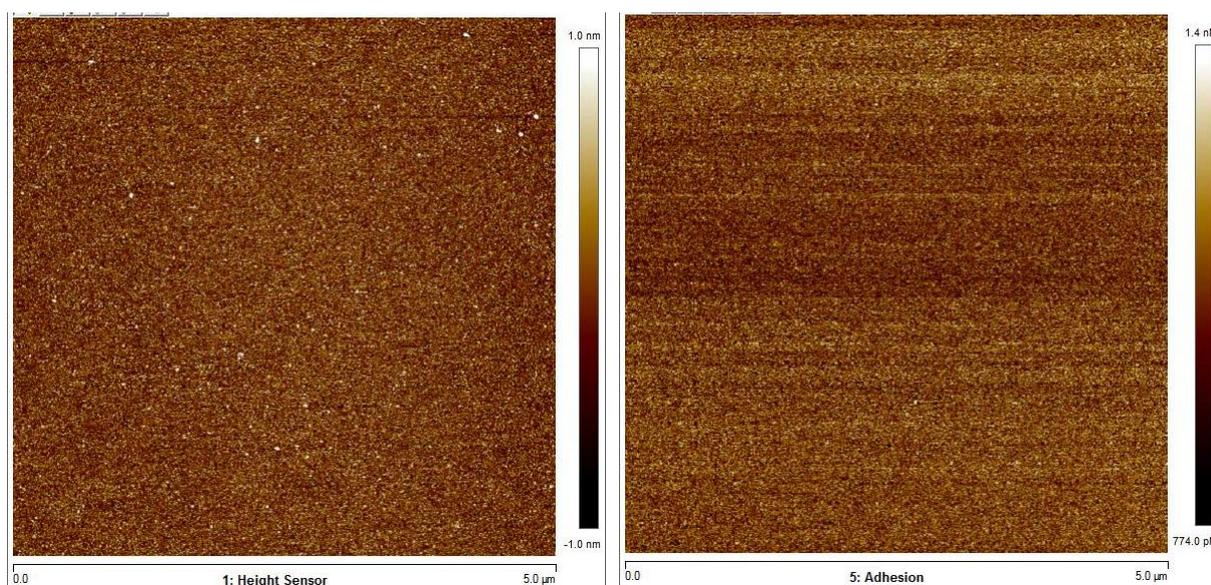


Figure 117. Images AFM de hauteur (gauche) et d'adhésion (droite) de la SAM-urée-PEG-biotine-100%

Les images de hauteur montrent une rugosité moyenne inférieure au nanomètre (0,6 nm), ce qui témoigne d'un système homogène et sans agrégats, visible sur le profil d'adhésion.

*Nous avons donc pu obtenir à l'issue de ce travail de greffage, des SAMs biofonctionnelles résultant d'une approche totalement « bottom-up ». L'étude des bandes amides en PM-IRRAS nous permet d'affirmer que la molécule **30** est bien présente en surface, et la comparaison avec les résultats du chapitre précédent nous permet de penser que la bande amide I présente bien une composante attribuable à la biotine.*

b- Comparaison entre différents temps de greffage pour la SAM-urée-PEG-biotine-100%

Nous avons voulu étudier l'effet du temps de greffage sur le processus de confection de la SAM. Pour ce faire, nous avons réalisés des batchs pour différentes durées : 12h à 16h avec un incrément horaire d'une heure, puis 24h et 48h.

1- Etude de la formation de la SAM-urée-PEG-biotine-100% de 12h à 16h

Les spectres PM-IRRAS de la SAM-urée-PEG-biotine-100% obtenus pour des greffages allant de 12h à 16h sont présentés ci-dessous (**Figure 118**).

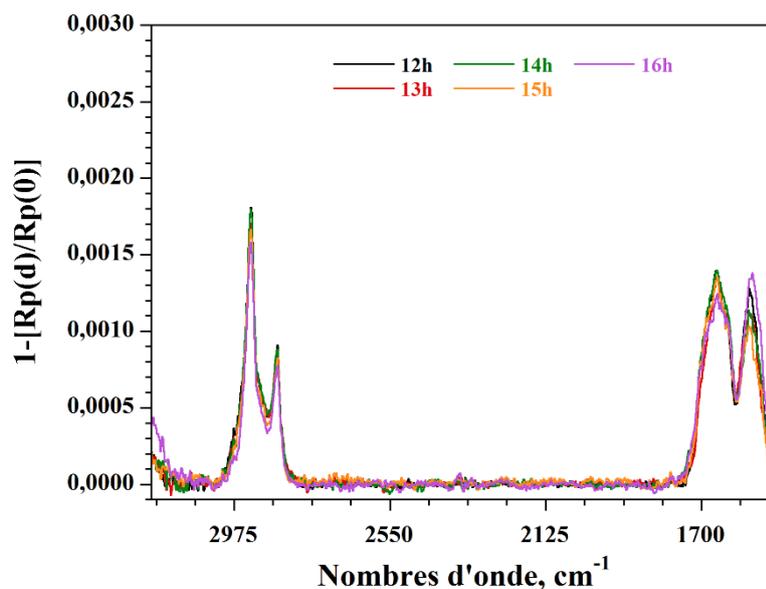


Figure 118. Superposition des spectres PM-IRRAS obtenu pour la SAM-urée-PEG-biotine-100% à différents incréments horaires

Sur la **Figure 118** ci-dessus, nous pouvons voir que sur la fenêtre de 12h à 16h de greffage, l'incrément horaire ne semble pas avoir d'influence sur la formation de la SAM. On n'observe quasiment aucune variation, ni au niveau des bandes CH_2 ni au niveau des bandes amide. Cette observation est valable, à l'erreur d'échantillonnage près, quel que soit le batch étudié. De plus, l'état de surface ne semble pas évoluer non plus entre 12h et 16h de greffage, avec une monocouche homogène et de faible rugosité (<1nm). Ces observations confirment donc que la monocouche est bien réalisée dès 12h de greffage.

2- Etude de la formation de la SAM-urée-PEG-biotine-100% à 24h et 48h

Nous avons poussé les temps de greffage au-delà de 16h, à 24h et 48h, afin de voir si une immersion prolongée dans le bain avait une influence sur la formation de la monocouche. Les spectres PM-IRRAS obtenus sont présentés ci-dessous (**Figure 119**).

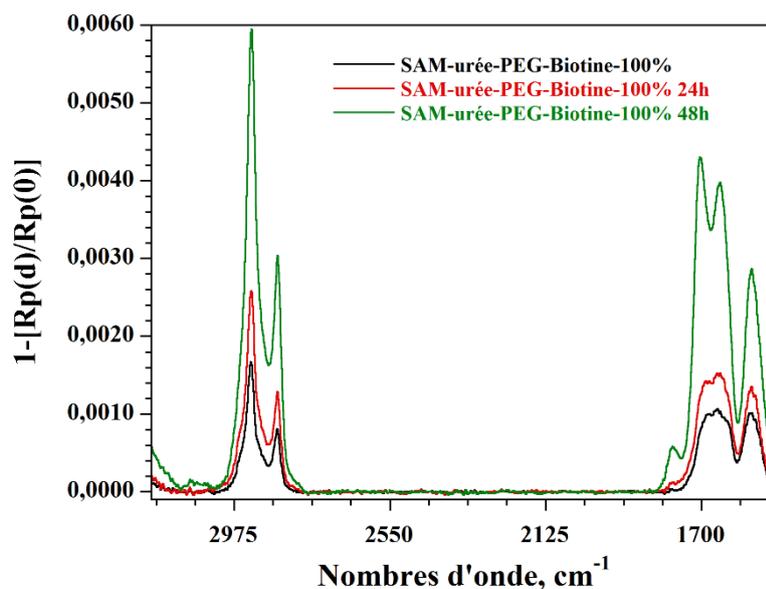


Figure 119. Comparaison des SAM-urée-PEG-biotine à 12h, 24h et 48h de greffage

Comme on peut le voir sur la comparaison des spectres ci-dessous, l'augmentation du temps de greffage à 24h puis à 48h impacte grandement sur les signaux observés en PM-IRRAS. A 24h tout d'abord, on note que l'intensité des bandes CH_2 et amide augmente par rapport à un greffage à 12h : on augmente donc le taux de matière en surface. Cette observation est d'autant plus flagrante sur la SAM à 48h qui présente des intensités très élevées. Il est intéressant de noter que pour cette SAM les signaux amides sont mieux définis que pour des temps de greffages plus courts. En effet, on voit clairement la décomposition du signal en ses différentes composantes, ainsi qu'une bande au pied des amides, à 1780 cm^{-1} , qui pourrait correspondre à une orientation particulière des biotines en surface. En effet, cette bande est bien plus haute que celle attendu pour la biotine, même dans le cas d'une orientation très favorable. En étudiant l'état de surface, on peut supposer que cet effet soit le résultat d'une orientation particulière en surface.

Cette augmentation du taux de matière se traduit par un état de surface plus rugueux qu'à 12h de greffage (**Figure 120**).

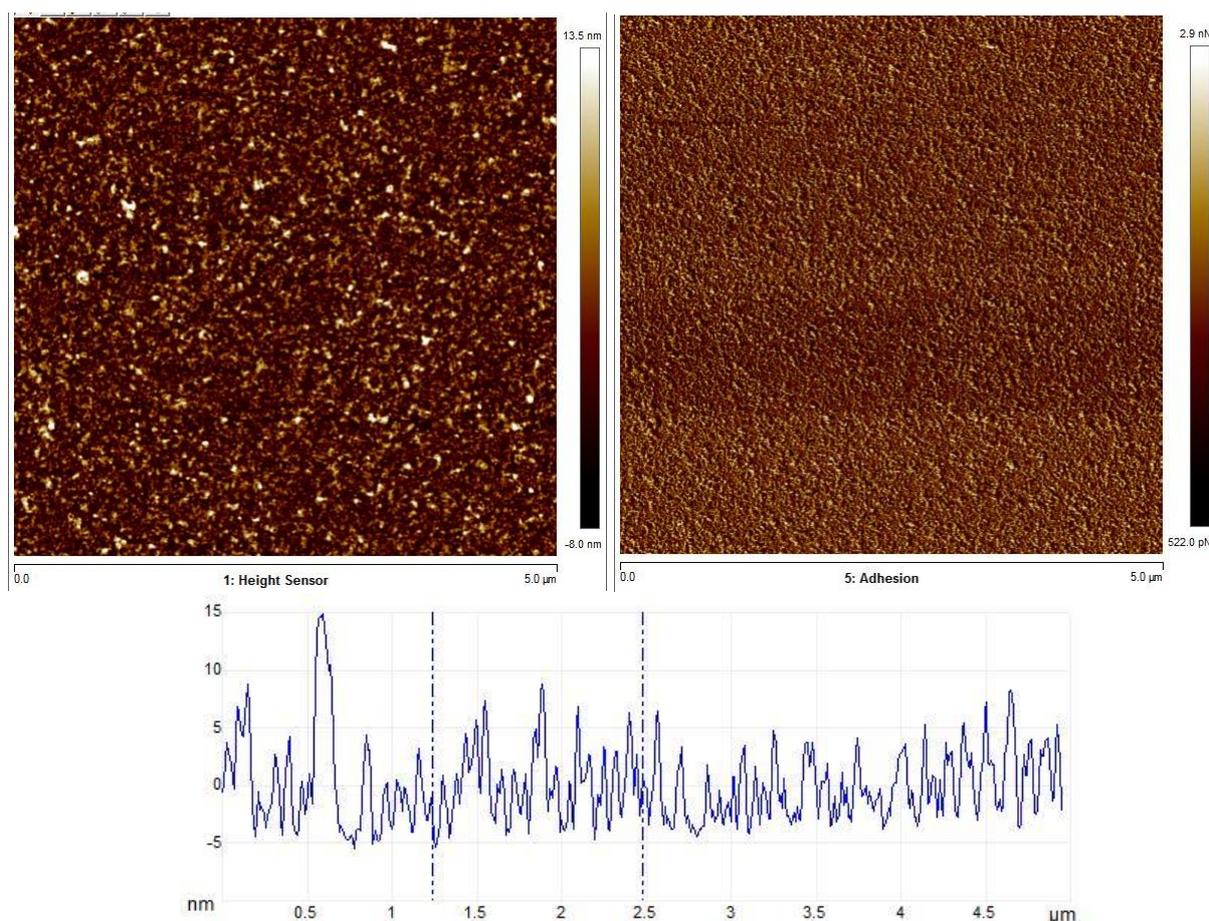


Figure 120. Images AFM de hauteur (haut, gauche) et d'adhésion (haut, droite) de la SAM-urée-PEG-biotine-100% ($5 \mu\text{m}^2$) et profil de hauteur de la zone marquée (bas) pour un wafer à 48h de greffage

Comme on peut le voir sur les images ci-dessus, la rugosité des substrats à 48h augmente beaucoup, passant de 0,6 nm à 12h à plus de 2 nm après 48h. L'étude du profil d'adhésion montre que les points hauts sur le profil de hauteur sont de même nature que le reste de la surface ce qui suggère que l'augmentation du temps d'immersion favorise l'apparition d'agrégats.

A l'issue de cette étude, nous pouvons affirmer que le meilleur temps de greffage pour la formation de SAM-urée-PEG-biotine est de 12h. En effet, l'analyse PM-IRRAS montre une saturation à 12h au niveau des intensités des bandes CH₂. Ces observations semblent inquer que la monocouche est complète pour une plage de greffage entre 12h et 16h. De plus, il n'y a pas d'évolution significative des intensités des bandes CH₂, ce qui démontre la stabilité de la solution de greffage pour cette plage horaire. Par contre, il y a une dégradation importante de l'état de surface à partir de 24h d'immersion, avec l'apparition d'agrégats en surface ainsi que l'augmentation nette de la rugosité des substrats.

*Des greffages ont aussi été tentés avec l'agent de couplage **30'** dans les mêmes conditions que pour l'agent de couplage **30**. Néanmoins, par manque d'optimisation du processus, on a observé une dégradation de la solution de greffage durant la nuit, ce qui n'a pas permis d'obtenir des surfaces exploitables. De plus, par manque de temps, l'optimisation de l'hydrosilylation du composé **30''** n'a pas pu être conduite, la molécule présentant de grands problèmes de solubilité et d'analyse.*

D- Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons dans un premier temps vu l'importance de la biotine en biologie, et son utilisation courante en biochimie *via* son interaction avec la streptavidine, notamment pour la biofonctionnalisation de surface et la création de bio-capteurs.

Dans une seconde partie nous avons mis au point et décrit la synthèse d'un nouvel agent de couplage silicié contenant un chaînon PEG et une partie biotine. L'utilisation de telles molécules peut ensuite être envisagée pour donner la biofonctionnalité à un substrat en une seule étape de greffage.

Nous avons enfin formé une SAM à partir de l'agent de couplage biotinylé **30** dans des conditions similaires à celles utilisées pour les SAM-azoture. Nous avons vu que la formation de la monocouche semble complète à 12h de greffage, et que celle-ci n'évolue que très peu entre 12h et 16h. Nous avons aussi étudié l'impact de temps de greffage plus longs sur la dégradation de la monocouche : à partir de 24h d'immersion nous observons la dégradation générale de l'état de surface de la SAM, avec l'apparition d'agrégats et l'augmentation drastique de la rugosité.

A l'issue de cette partie nous avons ainsi obtenue une SAM dont la biotine est directement incorporée au sein de la monocouche grâce au processus de greffage. Cette surface pourra par la suite être comparée aux surfaces obtenues dans le **chapitre II**, dont la biofonctionnalité est introduite par l'addition d'une biotine-alcyne « par-dessus » la SAM déjà formée.

Références

- (1) Lanska, D. J. *Ann. Nutr. Metab.* **2012**, *61* (3), 246.
- (2) Lane, M. D. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279* (38), 39187.
- (3) Livnah, O.; Bayer, E. a; Wilchek, M.; Sussman, J. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90* (11), 5076.
- (4) Eggersdorfer, M.; Laudert, D.; Létinois, U.; McClymont, T.; Medlock, J.; Netscher, T.; Bonrath, W. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2012**, *51* (52), 12960.
- (5) Schettters, H. *Biomol. Eng.* **1999**, *16* (1–4), 73.
- (6) Pérez-Luna, V. J. ... **1999**, No. 12, 6469.
- (7) Wang, Y.; Qian, W.; Tan, Y.; Ding, S. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1166.
- (8) Rios, F.; Smirnov, S. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2009**, *1* (4), 768.
- (9) Seto, H.; Yamashita, C.; Kamba, S.; Kondo, T.; Hasegawa, M.; Matsuno, M.; Ogawa, Y.; Hoshino, Y.; Miura, Y. *Langmuir* **2013**, *29* (30), 9457.

CHAPITRE IV :
TESTS D'ACTIVITE
BIOLOGIQUE

L'immobilisation d'une biomolécule sur une surface est une des étapes clés lors de la confection d'un biocapteur. Dans les deux chapitres précédents, nous avons vu qu'il était possible de créer des SAMs de façon « bottom-up » de sorte à donner une bioactivité ou une chimioactivité spécifique à un substrat. Dans le cas de la SAM-urée-PEG-biotine-100%, tout d'abord, nous avons montré qu'il était faisable de biofonctionnaliser un substrat en une seule étape de greffage *via* l'utilisation d'un agent de couplage biotinylé. Pour ce qui est des différentes SAM-azoture (alkyle ou urée, 100% ou mixte), nous avons montré que la fonctionnalisation de substrats par des azotures pouvait se faire en une seule étape, et que la biofonctionnalisation de la surface se faisait par la suite grâce à l'utilisation d'une biotine-alcyne engagée dans une réaction de chimie click.

Dans les deux cas, nous avons pu obtenir des substrats possédant un résidu biotine à leur extrémité, et cette biomolécule permet à elle seule de leur donner une bioactivité spécifique. Les analyses PM-IRRAS nous ont montré que la biotine était bien présente en surface quelle que soit la méthode employée, ce qui nous permet d'affirmer qu'à l'issue de ces deux précédentes études, nous avons bien créé des surfaces de silice biofonctionnelles.

Il convient maintenant de vérifier que ces substrats peuvent être employés comme plateforme versatile pour une application en bio-capteurs. En effet, la biotine seule ne permet d'avoir une bioactivité spécifique qu'envers son antagoniste : l'avidine (et ses dérivés). Il faut alors s'assurer que les surfaces présentent bien cette propriété et que l'utilisation d'un système « sandwich » biotine-streptavidine-biotine se fasse de façon spécifique sans perte d'activité.

A- Mise au point d'un test biochimique sur les substrats biotinylés

Afin de tester la bioactivité des différents substrats, il convient de définir une procédure standard pouvant être appliquée à tout type de surface fonctionnalisée avec la biotine. Il faut aussi que ce test puisse être mis facilement en œuvre au sein du laboratoire et ne repose pas seulement sur des analyses spectrométriques des surfaces. En effet, si de la streptavidine, par exemple, interagit spécifiquement avec la surface, une analyse en PM-IRRAS ne signale que la présence de la protéine sur la SAM. Nous n'aurions pas, par ce biais, accès à des estimations du taux de recouvrement, ou encore à des informations sur l'intégrité de la protéine une fois liée à la SAM par la biotine.

C'est en prenant tous ces critères en compte que nous avons décidé de mettre au point un test de type biochimique, mettant en jeu une réaction enzymatique, afin de déterminer la bioactivité des SAMs précédemment synthétisés.

a- Définition du système

Afin de détecter la bioactivité des substrats biofonctionnalisés, nous avons dans un premier temps besoin d'avidine ou d'un de ses dérivés. En effet, comme expliqué dans le chapitre précédent, la biotine présente l'avantage de se lier de façon très forte à sa protéine

antagoniste : l'avidine. Cette propriété est valable pour tous les analogues de l'avidine, dont le principal est la streptavidine. La différence majeure entre ces deux protéines tétramériques capables de se lier à la biotine est leur structure primaire. En effet, seulement 30% de leur séquence d'acides aminés est identique. Néanmoins, les deux molécules sont capables d'interagir avec la biotine de façon quasi-équivalente car celles-ci possèdent des structures secondaire, tertiaire et quaternaire presque similaires. Elles présentent ainsi quatre sites de liaison à la biotine et leur affinité pour cette dernière est à peu près la même ($K_D = 10^{-14}$ mol.L⁻¹ pour la streptavidine contre $K_D = 10^{-15}$ à 10^{-16} mol.L⁻¹ pour l'avidine).

L'emploi de la streptavidine en biochimie est préféré car celle-ci possède une meilleure capacité de liaison à la biotine, même si cette dernière est liée à une autre molécule (l'avidine est très sensible à l'environnement autour du résidu biotine). L'avidine présente aussi plusieurs « inconvénients » pour une utilisation courante en biochimie : elle a tendance à s'agréger, possède une pseudo-activité catalytique, et est chargée positivement. Enfin, la streptavidine présente l'énorme avantage d'être elle beaucoup moins sujette aux adhésions non-spécifiques, ce qui sera très important par la suite (**Figure 121**).

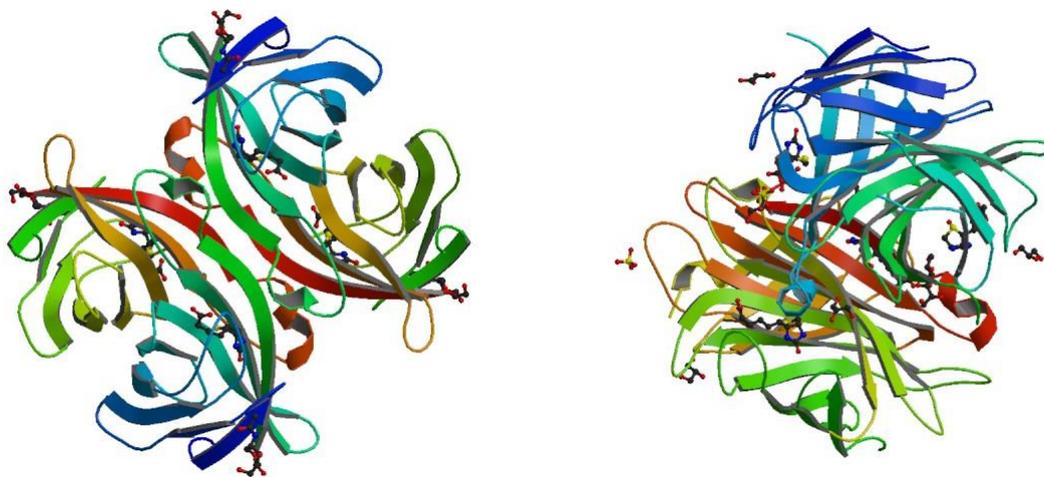


Figure 121. Structure de l'avidine complexant 4 biotines (gauche) et structure de la streptavidine complexant 4 biotines (droite), disponibles sur la *Protein Data Bank*, codes PDB : 2AVI et 3WYP

Dans le cadre de notre étude, l'utilisation de la streptavidine est double : elle permet de mettre en place un système de type « sandwich » pour lier des bio-récepteurs biotinylés à la surface, mais elle permet aussi de la passiver. En effet, nos surfaces étant biotinylées, il suffit de les incuber avec de la streptavidine pour les rendre complètement inertes vis-à-vis des biomolécules présentes dans un milieu, sauf si elles sont elles-mêmes biotinylées. Ce processus s'appelle la passivation et permet d'envisager la confection d'une plateforme versatile : une fois les surfaces biotinylées passivées, il suffit de les incuber avec un bio-récepteur d'intérêt biotinylé pour modifier leur propriété de bio-détection à façon.

Cependant, l'utilisation d'une streptavidine classique, bien que donnant les propriétés suscitées aux surfaces, ne permet pas de juger directement de leur bioactivité. C'est pourquoi nous avons opté pour l'emploi d'une streptavidine modifiée par une enzyme : la HRP (Peroxydase du raifort, *HorseRadish Peroxydase*) (**Figure 122**).

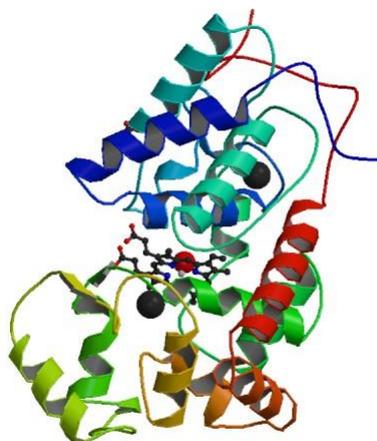


Figure 122. Structure de la HRP par Berglund et al., disponible sur la PDB, code PDB : 1HCH

Il s'agit d'une hémoprotéine d'environ 44 kDa très utilisée en biochimie qui permet notamment de catalyser les réactions d'oxydoréduction de substrats spécifiques (**Figure 123**). L'intérêt d'une telle molécule est qu'elle catalyse la transformation de substrats chromogènes en composés colorés, en présence de peroxyde d'hydrogène. Ces réactions peuvent facilement être suivies par spectrophotométrie, et sont équivalentes à un dosage colorimétrique.

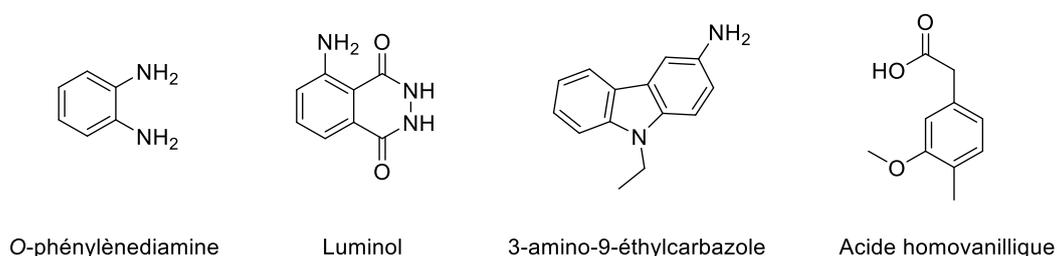


Figure 123. Exemples de substrats pouvant subir une réaction d'oxydoréduction catalysée à la HRP

L'un des substrats utilisé lors de dosage enzymatique de la HRP par voie colorimétrique est l'*o*-phénylènediamine (OPD). L'OPD s'oxyde en présence d'H₂O₂ et de HRP en 2,3-diaminophénazyne. Ce composé brun possède une absorbance à 450 nm, qui est décalée vers 492 nm en milieu acide. L'utilisation d'un milieu acide permet, en plus de changer la couleur

de la 2,3-diaminophénazyne, de quencher la réaction catalytique entre l'OPD et la HRP, pour des dosages plus précis (**Figure 124**).

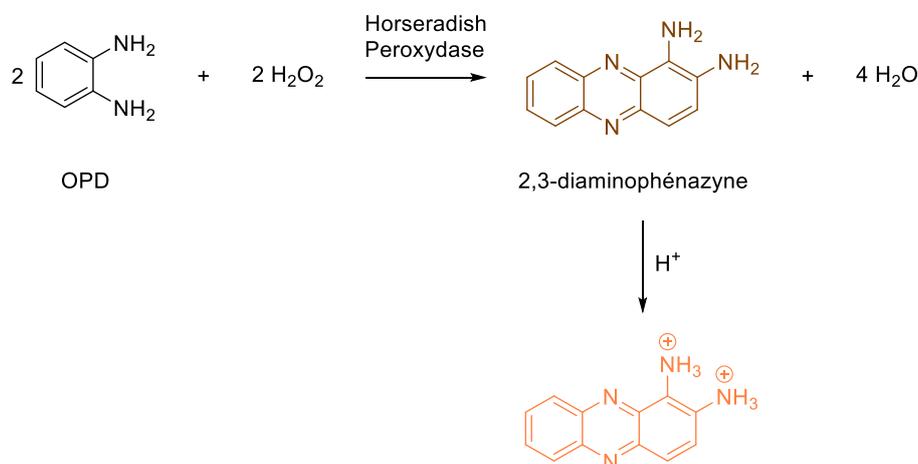


Figure 124. Obtention de la 2,3-diaminophénazyne à partir d'OPD en présence de peroxydase

L'utilisation de streptavidine conjuguée à la HRP (notée streptavidine-HRP) puis de l'OPD sur les substrats biotinylés permettrait donc de révéler leur bioactivité par activité enzymatique évaluée par colorimétrie.

Le principe est donc d'incuber les surfaces biotinylées avec de la streptavidine-HRP puis de les exposer à une solution de peroxyde d'hydrogène et d'*o*-phénylènediamine afin d'observer, ou non, un changement de couleur en solution. Si le changement de couleur se produit, cela signifie que les substrats présentent bien des biotines en surface, que celles-ci sont bien accessibles pour la streptavidine-HRP, et que les surfaces ne perturbent pas l'activité biologique des composés (la HRP retenant son activité catalytique). Ce simple test pourrait donc permettre de vérifier tous les aspects de la bioactivité des différentes SAMs synthétisées précédemment (**Figure 125**).

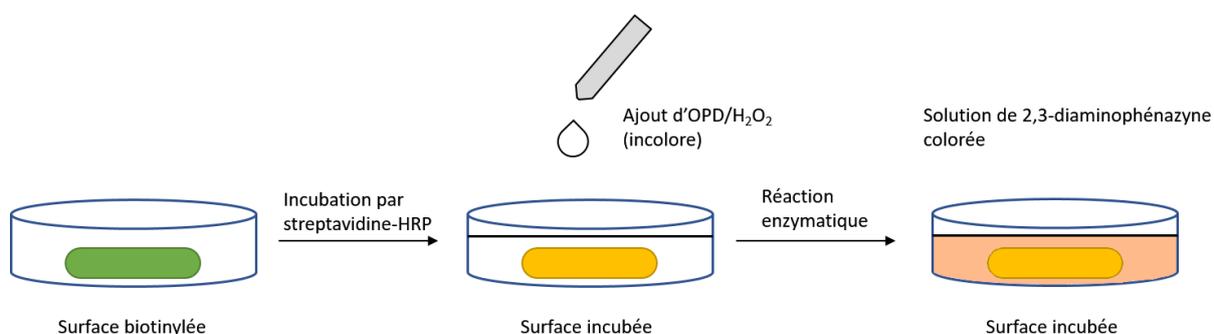


Figure 125. Principe du protocole de test

b- Calculs

Afin de mettre au point ce processus de test, nous devons d'abord estimer le taux de recouvrement maximal théorique de nos surfaces par la streptavidine-HRP. Pour la suite de la mise au point du protocole, nous ne considérons que les substrats pour les analyses PM-IRRAS. En effet, ceux-ci faisant 2.5 cm de côté, ils permettront d'obtenir des solutions colorées plus intenses et donc plus facilement mesurables par spectrométrie que les wafers de silicium utilisés en AFM (de 1 cm²).

Il nous faut donc dans un premier temps calculer combien de streptavidine-HRP nous pouvons mettre au maximum sur les surfaces de PM-IRRAS. Pour ce faire, nous allons passer par une première estimation : nous considérons la taille de la streptavidine-HRP équivalente à celle de la streptavidine. Cette approximation nous permet d'une part, de faciliter les calculs, et d'autre part, d'être sûrs de prendre en compte toutes les protéines. En effet, nous ne savons pas la position exacte de la HRP sur la streptavidine. De ce fait, il est plus juste de minimiser la taille du conjugué afin de ne pas présupposer de l'encombrement stérique introduit par la HRP. De cette façon nous sommes sûrs de calculer le maximum théorique de streptavidine-HRP immobilisables en surface quelle que soit la forme ou la façon dont le bioconjugué interagit avec la SAM.

Afin d'effectuer ces calculs, nous devons donc appréhender la taille de la streptavidine. A cette fin, la structure cristallographique de la protéine naturelle a été utilisée afin d'estimer la largeur, la longueur, et la hauteur de la molécule ramenée à un cube. La structure utilisée (code PDB : 3WYP), correspondant à la streptavidine naturelle complexée à 4 biotines, a été visualisé par le logiciel PyMol et sa taille a été estimée à environ 53x53x56 Å. Son empreinte sur la surface a ainsi été ramenée à 53 Å² afin d'estimer la couverture maximale par la protéine (**Figure 126**).

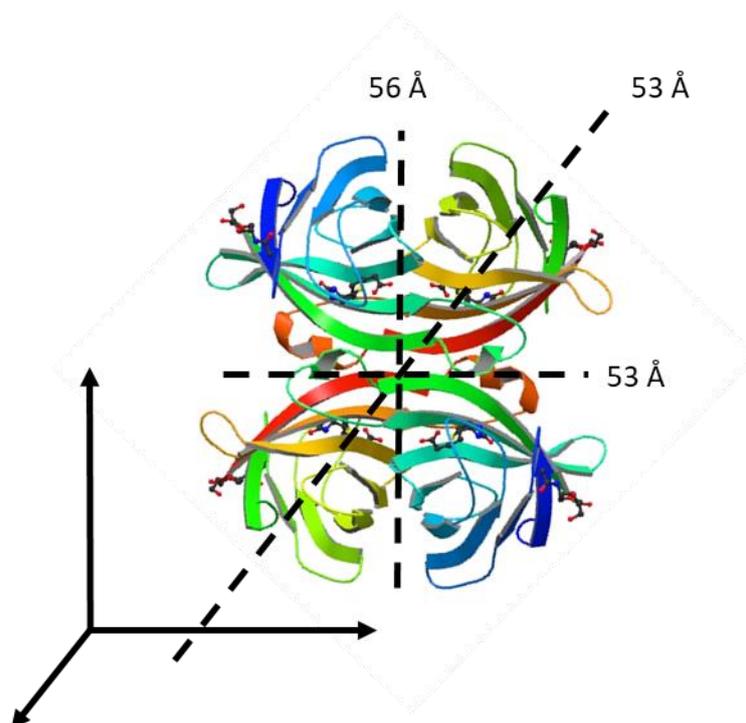


Figure 126. Estimation de la taille de la streptavidine

Les substrats font 2.5 cm de côté, soit $6.25 \cdot 10^{-4} \text{ m}^2$, et la streptavidine-HRP est assimilée à 53 \AA^2 , soit $2.809 \cdot 10^{-17} \text{ m}^2$.

Le nombre de protéine maximal par lame est donc $N = \frac{6.25 \cdot 10^{-4}}{2.809 \cdot 10^{-17}} = 2.225 \cdot 10^{13}$ molécules.

Ceci équivaut donc à $n = \frac{2.225 \cdot 10^{13}}{Na} = 3.7070 \cdot 10^{-11}$ mol de streptavidine-HRP au maximum par lame de PM-IRRAS biotinylée de 2.5 cm^2 , Na étant la constante d'Avogadro.

Une fois ce taux de recouvrement maximal calculé, nous avons pu mettre au point le protocole de test. Pour des raisons pratiques, nous avons décidé d'effectuer toutes les étapes dans des boites de Petri mises en agitation sur un agitateur orbitaire. Ces boites de Petri permettent de tester une surface à la fois, en la recouvrant de 6 mL de solution (quantité optimale de liquide afin de mouiller la lame).

Le processus de test afin d'évaluer directement le nombre de streptavidine-HRP pouvant être immobilisées sur le substrat est le suivant :

- Incuber la surface à tester dans une solution de streptavidine-HRP dans le PBS à $1.24 \cdot 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ durant une heure à 37°C
- Récupérer la surface incubée et la laver abondamment à l'eau distillé tout en gardant la solution d'incubation

- La surface incubée est plongée dans 6 mL de solution d'OPD/H₂O₂ dans le PBS à 25 mM en OPD et 12.5 mM en H₂O₂
- Effectuer la révélation pendant 30 min à TA dans l'obscurité puis quencher la solution devenue brune par 1 mL de solution d'acide chlorhydrique à 3M
- L'absorbance de la solution est mesurée à 492 nm en observant un facteur de dilution (150 μ L dilué à 3 mL) (**Figure 127**)

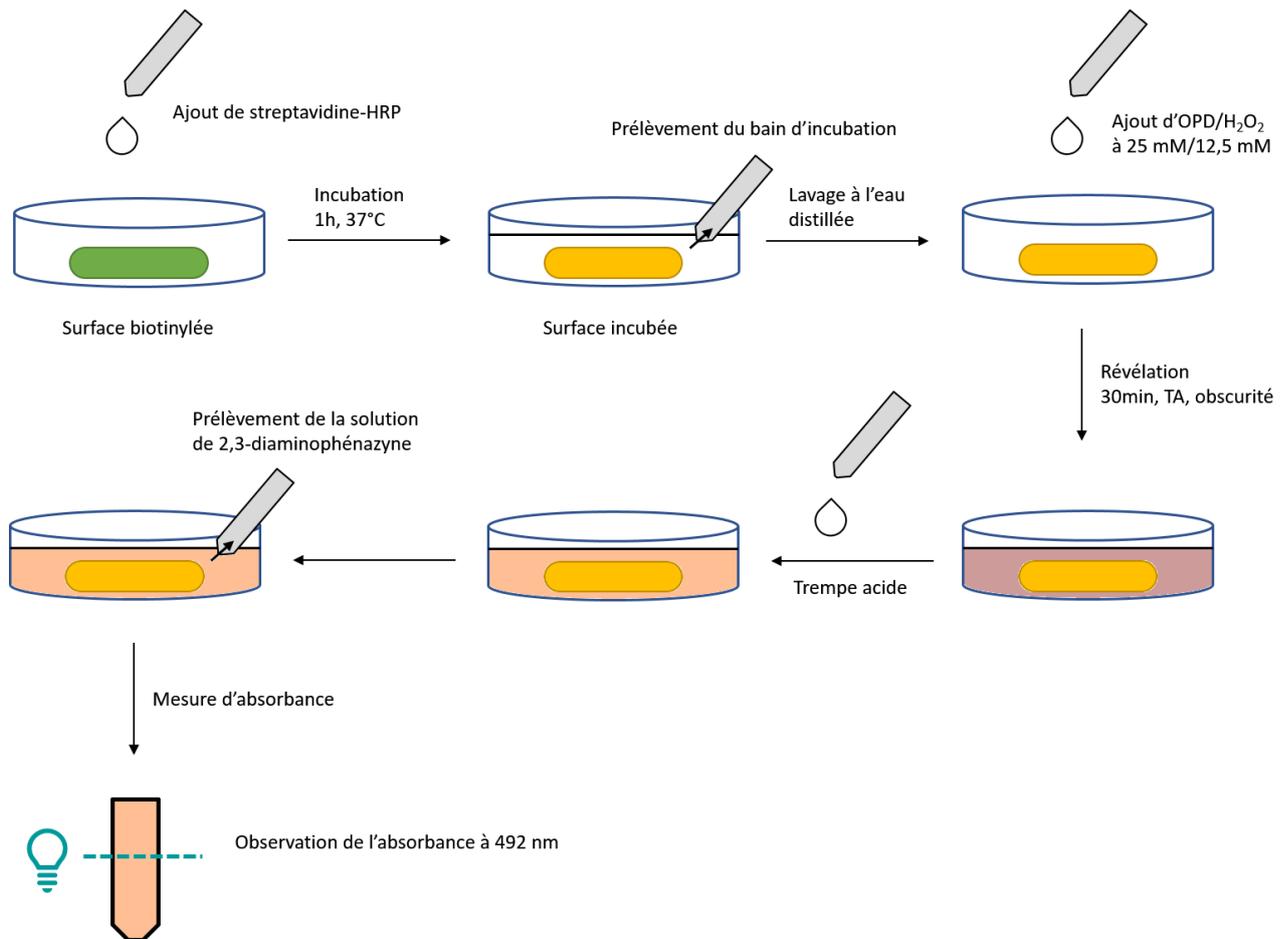


Figure 127. Principe du test direct de bioactivité

En effectuant cette procédure, nous sommes capables d'évaluer la bioactivité directe des surfaces biotinyllées. Néanmoins, due à la nature interfaciale des réactions mises en jeu, cette méthode est susceptible de donner un résultat plutôt qualitatif que quantitatif, car il est possible de perdre l'activité catalytique lors de l'immobilisation sur la surface.

C'est pour cela qu'un second test, indirect, a été mis au point afin de calculer le taux de recouvrement en streptavidine-HRP des substrats. Il s'agit de tester la solution d'incubation qui n'a pas été jetée durant les tests. En effet, ce bain contenant 6 ml d'une solution de streptavidine-HRP à $1.24.10^{-8}$ mol.L⁻¹ peut être dosée en retour afin de savoir combien de

streptavidine-HRP reste en solution. De cette façon, et par simple soustraction, nous espérons pouvoir remonter au nombre de streptavidine-HRP liées au substrat durant l'incubation.

Le processus de ce test indirect est le suivant :

- 2.9 mL de solution d'incubation sont prélevés puis versés dans une nouvelle boîte de Petri
- 3.1 mL de solution d'OPD/H₂O₂ à 0.4 mM en OPD et 0.2 mM en H₂O₂ sont ajoutés
- La révélation s'effectue durant 45 sec. à TA, puis la solution devenue brune est quenchée par 1 mL de solution d'acide chlorhydrique à 3M
- L'absorbance de la solution est directement mesurée à 492 nm (**Figure 128**)

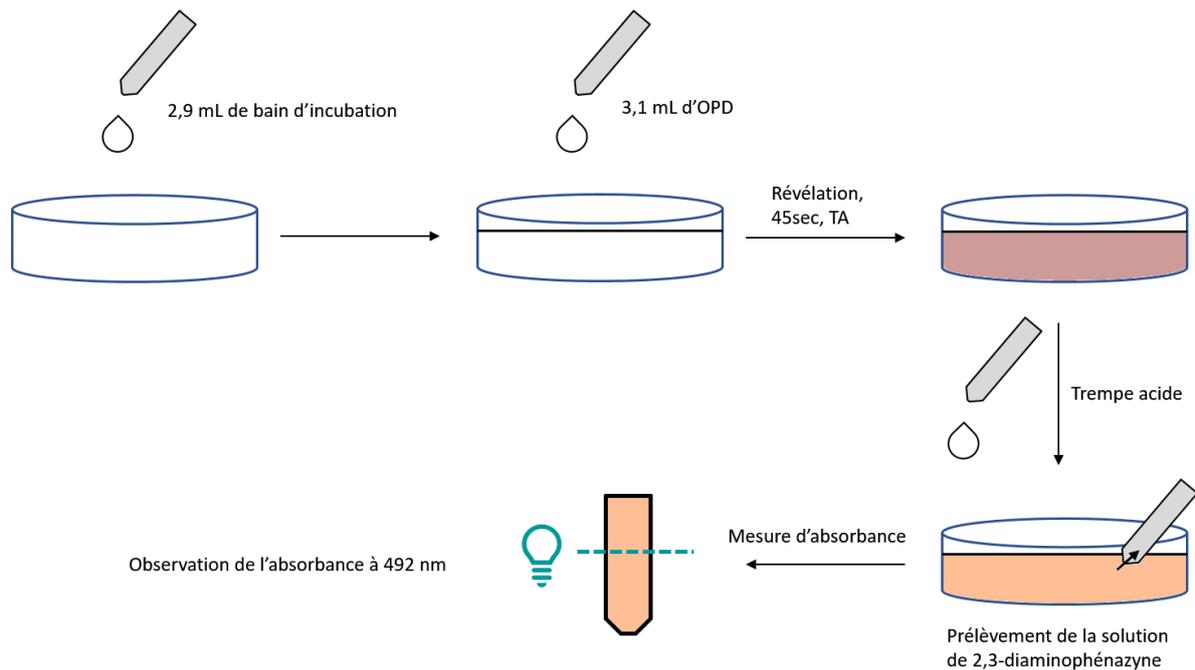


Figure 128. Principe du test indirect de bioactivité

Avec la mise au point de ces deux tests, nous sommes donc dans la capacité d'évaluer, de deux façons différentes, la bioactivité des surfaces biotinylées ; et donc d'évaluer le taux de recouvrement moyen de chaque surface. A l'issue de ces tests, nous pourrions calculer, en moyenne, quel pourcentage d'un substrat est recouvert par la streptavidine-HRP.

Néanmoins, pour pouvoir remonter à ce taux de recouvrement, nous devons tout d'abord établir des courbes de calibration en solution reliant l'absorbance mesurée durant les deux tests, direct et indirect, au taux de recouvrement moyen.

c- Blancs et courbes de calibration

Afin d'effectuer les tests décrits ci-dessus, il convient tout d'abord de mettre au point des courbes étalons afin de lier l'absorbance mesurée à 492 nm au nombre de moles de streptavidine-HRP présent en surface, ou restant dans la solution d'incubation.

Il faut aussi s'assurer que l'activité enzymatique, c'est-à-dire le changement de couleur des solutions d'OPD/H₂O₂, ne soit due qu'à l'adsorption spécifique de la streptavidine-HRP en surface. Pour cela il est nécessaire d'effectuer une série d'expériences de référence, afin de s'assurer qu'aucune activité enzymatique n'est observée lorsque le bioconjugué n'est pas lié de façon spécifique à la SAM.

1- Courbes de calibration

Grâce aux calculs précédents (*cf. page 138*), nous connaissons le nombre maximal de conjugués streptavidine-HRP qui peuvent être immobilisés de façon spécifique à la surface. Ce nombre de moles, $3.7070 \cdot 10^{-11}$ mol, représente un taux de recouvrement de 100% de la SAM en bioconjugués.

Afin d'établir les courbes de calibration respectives pour les deux types de test, nous avons effectué la réaction en solution entre une quantité de streptavidine-HRP donnée et une solution d'OPD/H₂O₂ à la concentration correspondante. L'absorbance de chaque solution a ensuite été mesurée afin d'établir une courbe de référence.

i- Courbe de calibration pour le test direct

Pour une concentration de la solution de streptavidine-HRP considérée ($1.24 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹), le nombre de moles de bioconjugué représentant 100% de recouvrement ($3.7070 \cdot 10^{-11}$ mol) est contenu dans 2.9 mL. Afin d'établir la courbe de calibration pour ce système, nous avons effectué la réaction enzymatique avec ce volume de solution de bioconjugué et 3.1 mL d'une solution en OPD à 50 mM. Ainsi, nous avons un volume total de 6 mL de milieu avec une concentration en OPD à 25 mM. Ce système est donc en tout point équivalent au système utilisé sur les surfaces incubées, et donne l'absorbance équivalente d'une surface recouverte à 100% par la streptavidine-HRP.

Nous avons par la suite effectué la mesure d'absorbance pour plusieurs points représentant différents pourcentages de recouvrement, afin d'obtenir la courbe de calibration ci-dessous (*Figure 129*).

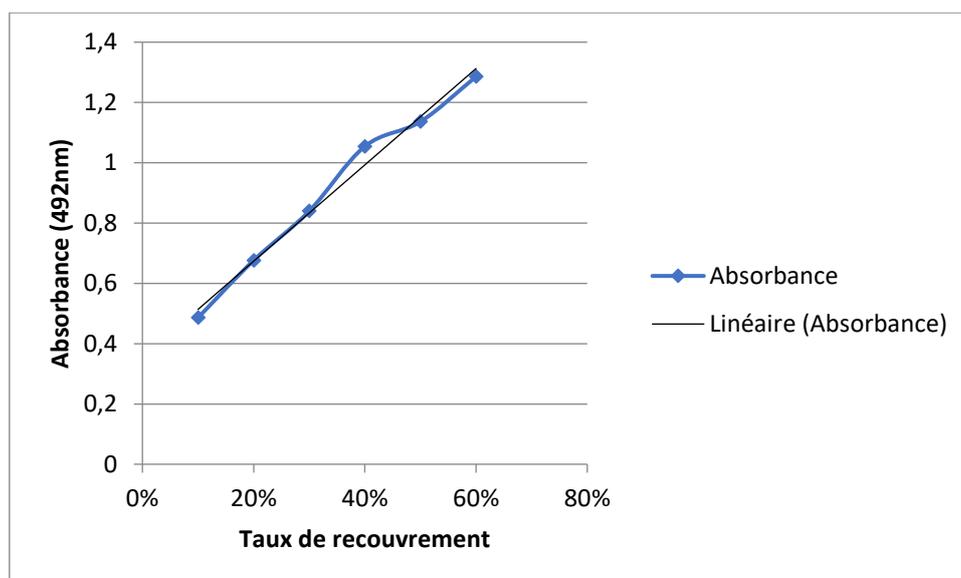


Figure 129. Courbe de calibration pour le test de bioactivité direct

Cette courbe nous permet de relier l'absorbance mesurée à l'issue du test direct sur les surfaces au taux de recouvrement en streptavidine-HRP de la SAM. Il convient de noter que le domaine de linéarité de la courbe se situe entre 10% et 60% de recouvrement. Cela semble correct au vu des expériences à réaliser. Nous espérons ainsi recouvrir plus de 10% de la surface avec le bioconjugué.

ii- Courbe de calibration pour le test indirect

La même démarche a été effectuée pour la mise au point de la courbe de calibration correspondant au titrage de la solution d'incubation. La solution de streptavidine-HRP étant inchangée, il suffit de mesurer l'absorbance pour 2.9 mL ($3.7070 \cdot 10^{-11}$ mol) de solution afin d'avoir le point correspondant à 100% de streptavidine-HRP restant dans le bain d'incubation. En répétant cette démarche à différentes concentrations, nous avons obtenu la courbe présentée ci-dessus (**Figure 130**).

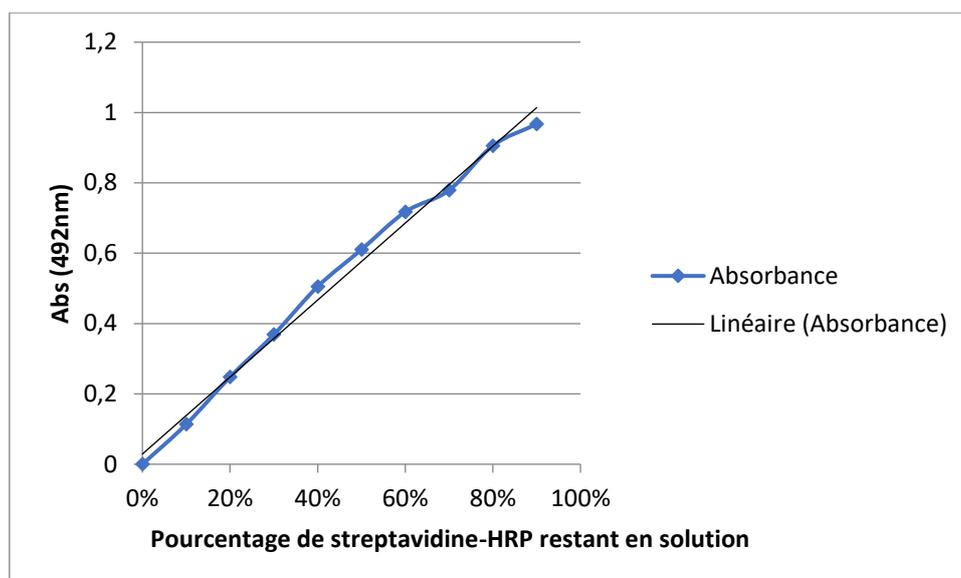


Figure 130. Courbe de calibration pour le test de bioactivité indirect

Cette courbe représente l'exact opposé de la courbe précédente : si 80% de streptavidine-HRP reste en solution, cela signifie que seulement 20% de la surface testée est recouverte de streptavidine-HRP.

Avec ces deux courbes de calibration, nous sommes ainsi en mesure de relier l'absorbance mesurée lors des tests décrits précédemment à, soit, le taux de recouvrement de la surface par le bioconjugué, soit l'équivalent en pourcentage de bioconjugué restant en solution. Si les deux approches concordent, les deux mesures devraient être complémentaires : si le test direct donne un taux de recouvrement de 20%, le test indirect devrait donner un pourcentage de bioconjugué restant en solution de 80%.

2- Expériences de référence

Avant d'effectuer les tests sur les surfaces biotinylées, nous devons nous assurer que tout ce qui est observé en changement de couleur n'est dû qu'à la présence de la streptavidine-HRP immobilisée de façon spécifique sur la SAM. C'est pour cela que différents blancs ont été considérés.

Il faut tout d'abord s'assurer que la streptavidine-HRP ne se lie à la surface que si celle-ci est biotinylée. Pour vérifier cet aspect, nous avons incubé avec le bioconjugué des surfaces de SiO₂ et des surfaces modifiées par des SAM-azoture, puis les avons révélées avec une solution d'OPD/H₂O₂ (**Figure 131**)

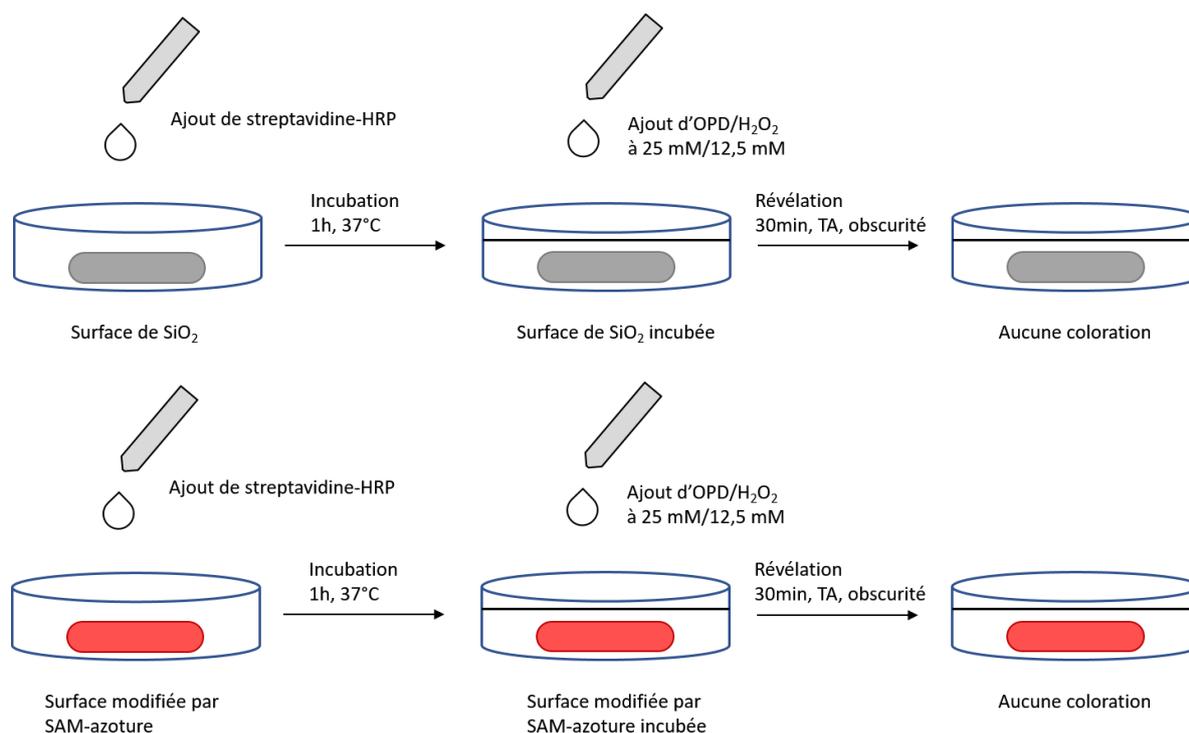


Figure 131. Expériences de référence pour l'adhésion non spécifique de streptavidine-HRP sur surface de silice ou modifiée aux azotures

L'absence de coloration de la solution d'OPD dans les deux cas présentés ci-dessus nous indique que l'adsorption non-spécifique de la streptavidine-HRP est très faible, voire inexistante. Ceci est dû à l'emploi même de la streptavidine en lieu et place de l'avidine. En effet celle-ci présente l'avantage de peu se lier aux surfaces, contrairement à l'avidine, et de ne pas du tout s'adsorber sur les surfaces de silice¹. On peut en conclure que le bioconjugué streptavidine-HRP garde cette propriété, d'où l'absence d'activité catalytique.

Il faut par la suite s'assurer que les surfaces non incubées n'ont pas d'effet sur la solution d'OPD/H₂O₂. En d'autres termes, il faut vérifier si les surfaces nues, ou les surfaces modifiées par des SAMs, présentent des propriétés d'oxydoréduction vis-à-vis de l'*o*-phénylènediamine. Pour ce faire, trois types de surfaces ont été immergées dans une solution d'OPD/H₂O₂ (à 25 mM en OPD), afin de voir leur effet sur la couleur de la solution (**Figure 132**).

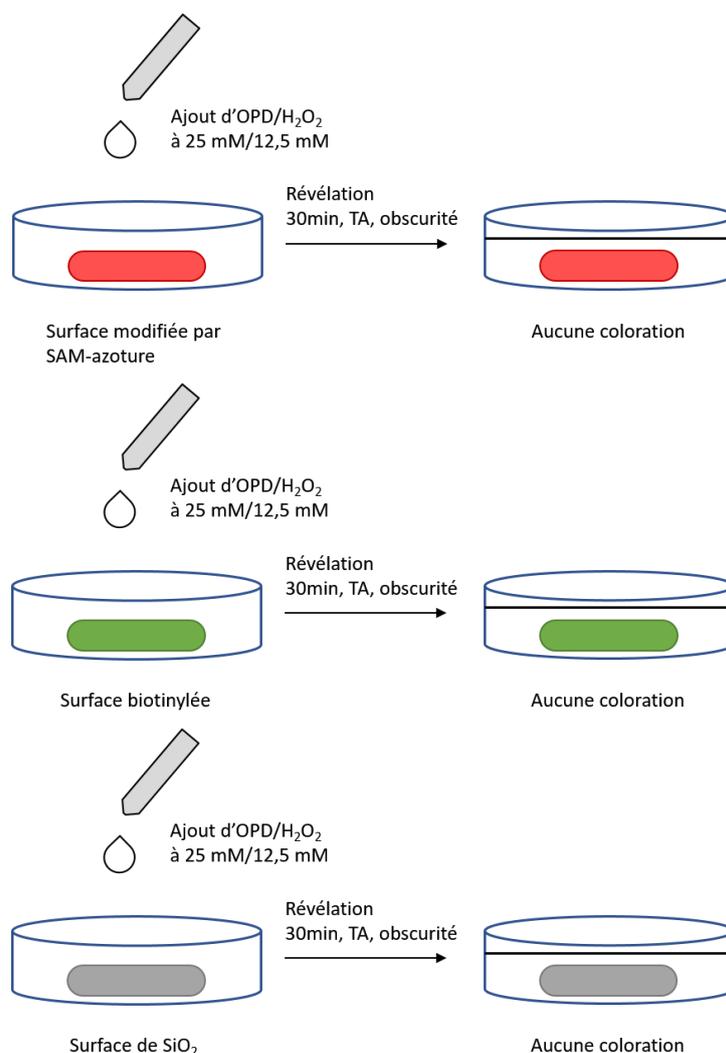


Figure 132 Expériences de référence sur l'effet des substrats sur la solution d'OPD.

Les différentes expériences ci-dessus ne montrent aucune coloration de la solution d'OPD. Cela signifie que les différentes surfaces, modifiées ou non, n'ont aucune propriété d'oxydoréduction.

Ainsi, si un changement de couleur est observé lors des tests biochimiques, cela est entièrement dû à l'activité catalytique de la streptavidine-HRP, et non à l'effet des surfaces.

Nous avons aussi vérifié que la solution d'OPD était stable sur une plage horaire bien plus longue que les présentes expériences, afin de s'assurer que l'oxydation naturelle de la molécule n'interfère pas dans les présents tests.

A l'issue de ces expériences de référence, et après la mise au point des courbes de calibration, nous sommes maintenant en mesure d'appliquer les tests de bioactivité direct et indirect aux surfaces biotinylées.

Les blancs effectués nous permettent d'affirmer que les changements de couleur observés ne sont dus qu'à l'activité enzymatique de la streptavidine-HRP, et l'emploi des courbes de calibration va nous permettre d'estimer le taux de recouvrement de nos surfaces en streptavidine-HRP. Ce simple test mis au point avec les équipements du laboratoire sera capable de montrer si les surfaces biotinylées présentent bien des biotines accessibles en surfaces pour lier la streptavidine-HRP, et si celles-ci ne diminuent pas l'activité de la HRP. En d'autres termes, ce test nous permettra aussi d'évaluer la biocompatibilité des substrats modifiés par les différentes SAMs, ce qui est une condition sine qua non pour une application en tant que plateforme sensible.

B- Application du test enzymatique aux surfaces biotinylées

Le système présenté ci-dessus permet d'évaluer et de comparer la biocompatibilité et la bioactivité des différentes surfaces biotinylées. Il permet, de façon plus ou moins qualitative, d'observer la biodisponibilité des biotines en surface, la spécificité des interactions biotine-streptavidine et la biofonctionnalisation générale des substrats.

Les différentes SAMs biotinylées obtenues précédemment, que ce soit les SAM-urée-PEG-biotine directement biotinylées, ou les SAM-urée-N₃ biotinylées par chimie click une fois la monocouche formée, ont été testées *via* ce protocole biochimique afin de comparer leur efficacité. Il s'agit aussi de pouvoir comparer les deux approches : dans l'une, la biotine fait partie intégrante de la SAM, dans l'autre, elle est ajoutée « par-dessus », ce qui lui donne plus de degrés de liberté (*cf. chapitre III*).

a- Tests sur les SAMs azoture après biofonctionnalisation par chimie click

Les différentes monocouches de type azoture modifiées par la biotine ont été incubées puis évaluées selon le protocole établi : un premier test d'activité direct puis un test indirect en retour.

Afin de se doter d'une référence à laquelle comparer les SAM-urée-N₃, nous avons tout d'abord testé la SAM-alkyle-Br/N₃ après biofonctionnalisation par chimie click puis l'avons comparée aux SAMs contenant un motif urée.

1- Test de la SAM-alkyle-Br/N₃ biofonctionnalisée

La SAM-alkyle-Br/N₃ biotinylée obtenue par réaction d'un composé biotine-alcyne sur les azotures de surface (*cf. chapitre II*) est tout d'abord incubée avec la streptavidine-HRP (**Figure 133**).

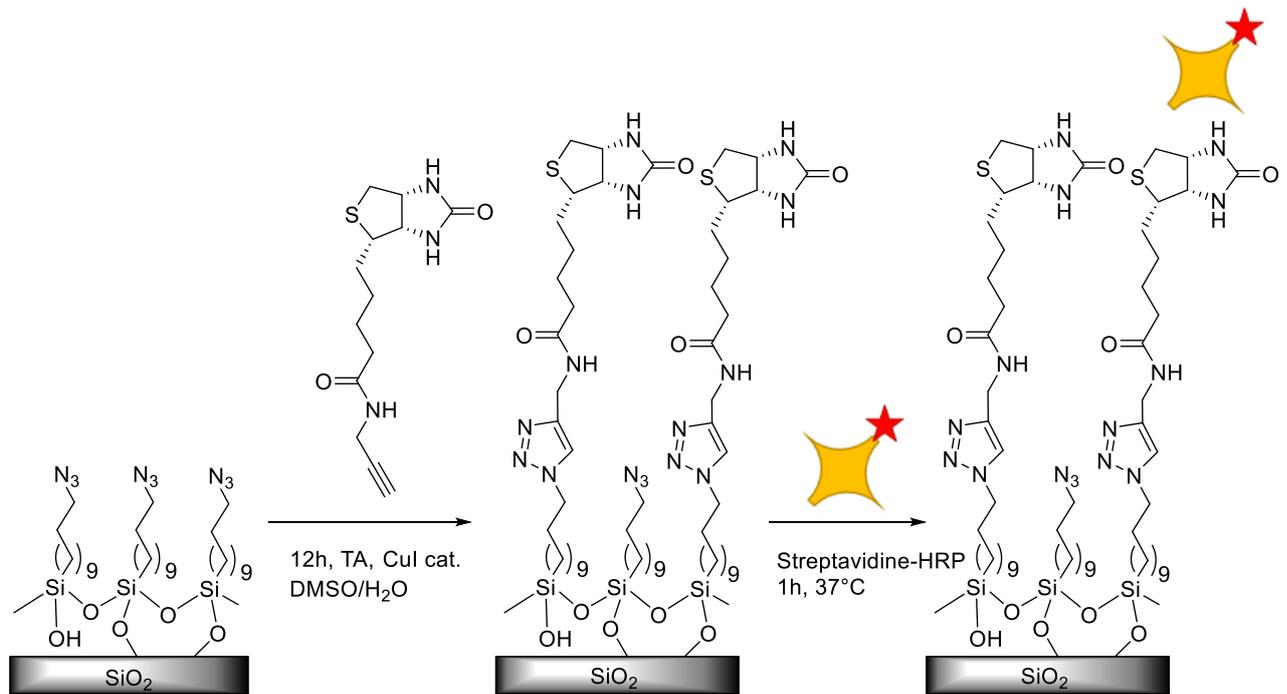
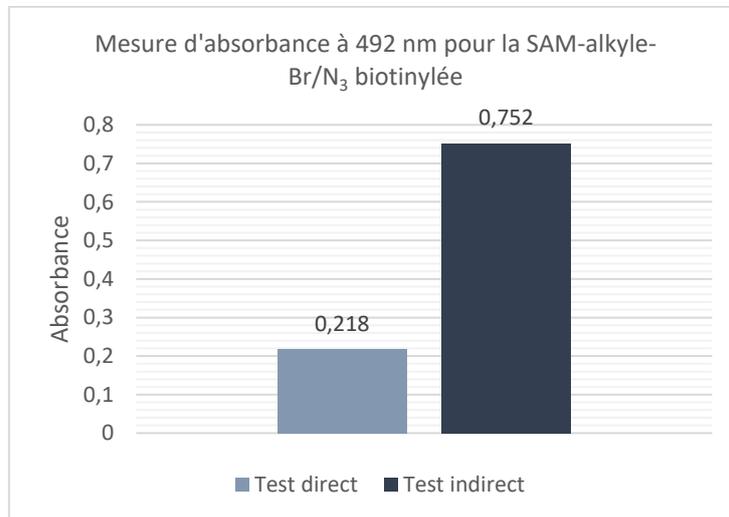
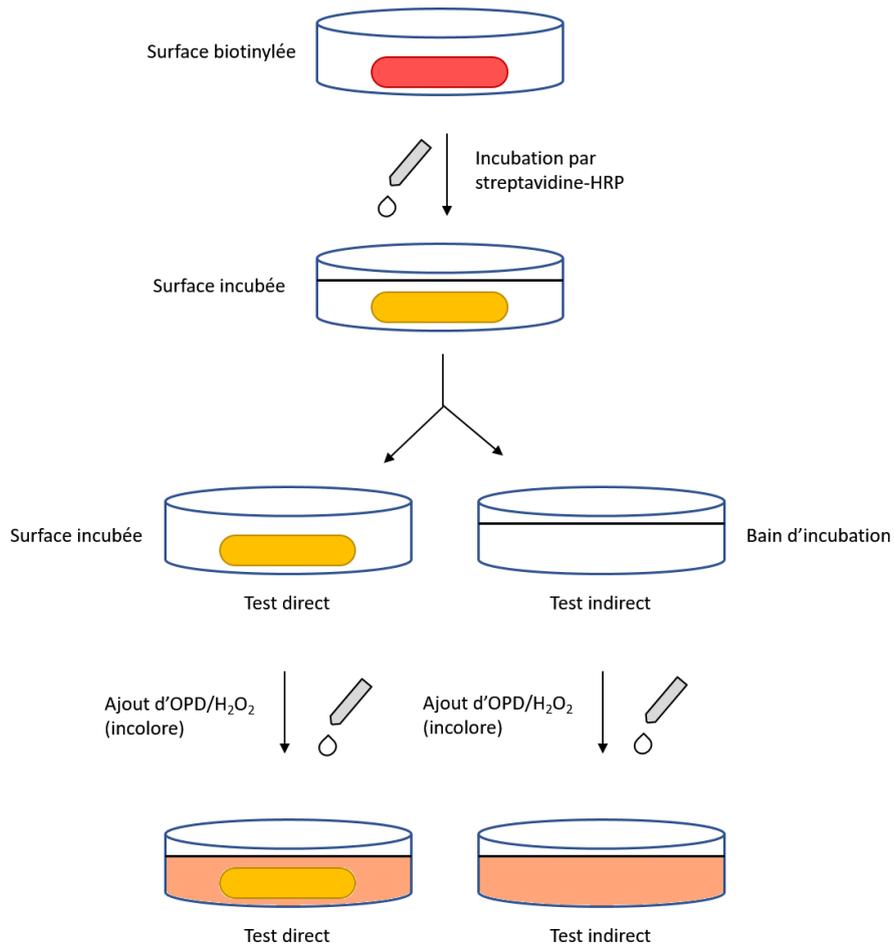


Figure 133. Processus complet de biofonctionnalisation de la SAM-alkyle-Br/N₃

Une fois cette incubation effectuée et la surface lavée abondamment à l'eau distillée, l'absorbance de la solution d'OPD à l'issue des protocoles direct et indirect est mesurée (**Figure 134**).



Type de SAM biotinylée	Abs (Indirect)	Taux de recouvrement	Abs (Direct)	Taux de recouvrement actif	Delta = pourcentage inactif
SAM-alkyle-Br/N ₃	0.752	34%	0.218	<10%	24%

Figure 134. Récapitulatif des méthodes directe et indirect (haut) et valeurs d'absorbance pour les deux tests pour la SAM-alkyle-Br/N₃ biotinylée (bas)

Sur le graphique ci-dessus, nous pouvons voir que l'absorbance mesurée à l'issue d'une révélation directe du substrat par OPD est assez peu élevée. Si l'on se reporte à la courbe de calibration obtenue pour ce type de test (**Figure 129**), le taux de recouvrement du substrat en streptavidine-HRP est inférieur à 10%.

Cette valeur semble très faible, notamment comparée à la mesure effectuée *via* le test indirect. En effet, en prenant en compte le taux de streptavidine-HRP toujours présent dans le bain d'incubation, nous remontons cette fois-ci à un taux de fonctionnalisation d'environ 34% de la surface (il reste environ 66% de streptavidine-HRP dans le bain, ce qui équivaut à un taux de couverture de 34% de la surface du substrat par le bioconjugué).

Cet écart entre les deux mesures peut tout d'abord s'expliquer par la différence entre la réaction en solution (dosage du bain d'incubation), et la réaction interfaciale, moins favorable (dosage des substrats). En effet, les deux courbes de calibration obtenues plus haut sont toutes les deux faites en solution. Cela n'est pas un problème pour le test indirect, car lui-même est effectué en solution, mais pour le dosage directement effectué sur la lame, la dynamique est différente.

En revanche, cette approche directe permet tout de même d'affirmer plusieurs points quant à la biofonctionnalisation des surfaces. Ainsi, si un changement de couleur de la solution d'OPD est observé, cela témoigne directement de :

- La biofonctionnalisation effective du substrat
- La biodisponibilité des biotines de surface vis-à-vis de la streptavidine
- La spécificité de l'interaction (les blancs ont permis d'établir ce point)
- La bioactivité réelle de la SAM
- La biocompatibilité du substrat modifié

En effet, si la streptavidine-HRP présente une activité, même faible, cela veut dire qu'elle est liée de façon spécifique et favorable au substrat, et que ce dernier ne porte pas atteinte à l'activité enzymatique du bioconjugué. Ce résultat montre que la SAM est utilisable comme plateforme de détection.

De plus, la différence entre les deux mesures peut aussi être expliquée par l'immobilisation de streptavidine-HRP rendue inactive dû à une interaction non favorable avec la surface : problème d'orientation, SAM dénaturant la protéine, ...

Ainsi, si l'on compare les deux taux de recouvrement obtenus avec les deux méthodes, on peut estimer le taux de recouvrement en streptavidine-HRP rendue inerte en surface.

En effet, si une surface présente une absorbance directe assez faible mais une absorbance indirecte elle aussi assez faible, cela signifie qu'elle a besoin de beaucoup de bioconjugués pour exprimer cette activité enzymatique. En revanche, une surface présentant une absorbance directe assez forte et une absorbance indirecte elle aussi assez forte, signifie qu'elle n'a pas besoin de beaucoup de bioconjugués pour atteindre cette activité

enzymatique : en d'autres termes elle immobilise plus efficacement la streptavidine-HRP (sans la dénaturer ni perdre son activité).

Ce concept est donc évalué en calculant la différence entre les taux de recouvrement obtenus par les tests direct et indirect. Si cette différence est faible, cela signifie que toutes les streptavidine-HRP immobilisées en surface présentent une activité catalytique, et donc que la SAM en question a une bonne biocompatibilité. Cette conclusion peut être envisagée car le test direct estime le taux de recouvrement en streptavidine-HRP restées actives à la surface de la SAM, alors que le test indirect permet d'obtenir le nombre total de streptavidine-HRP immobilisées sur la surface.

Pour la SAM-alkyle-Br/N₃ biotinylée l'étude des deux mesures permet d'estimer que 34% de la surface de la SAM est recouverte de streptavidine-HRP, mais que 24% du substrat l'est par de la streptavidine-HRP non active. Cette SAM possède donc une assez faible biocompatibilité.

2- Test des SAM-urée-N₃ biofonctionnalisées

L'expérience précédente montrant qu'une surface modifiée par une SAM, contenant des azotures puis biofonctionnalisée par chimie click avec une biotine, est bien bioactive, il convient maintenant d'étudier les SAMs contenant un motif urée.

i- Test de la SAM-urée-N₃-100%

La SAM-urée-N₃-100% biofonctionnalisée après chimie click est tout d'abord incubée avec la streptavidine-HRP dans les conditions établies précédemment (**Figure 135**).

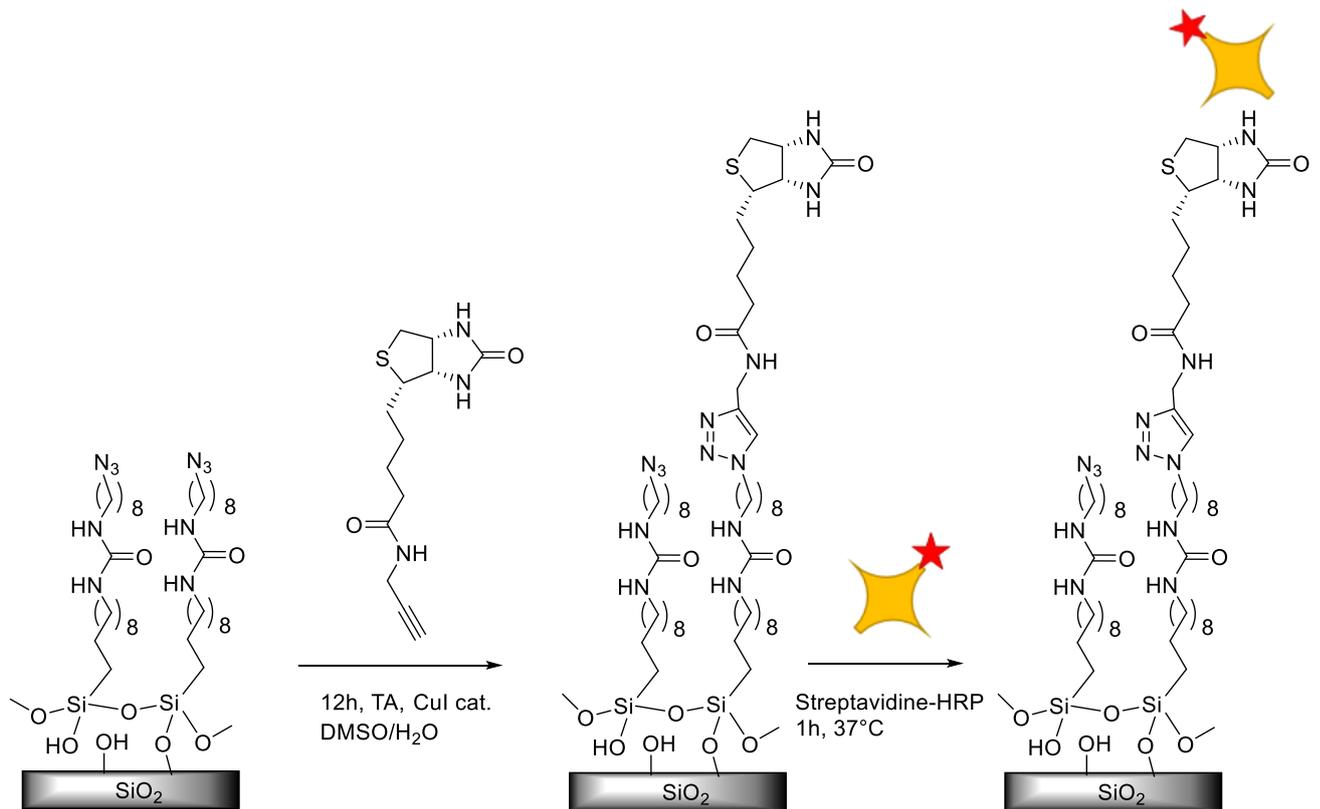
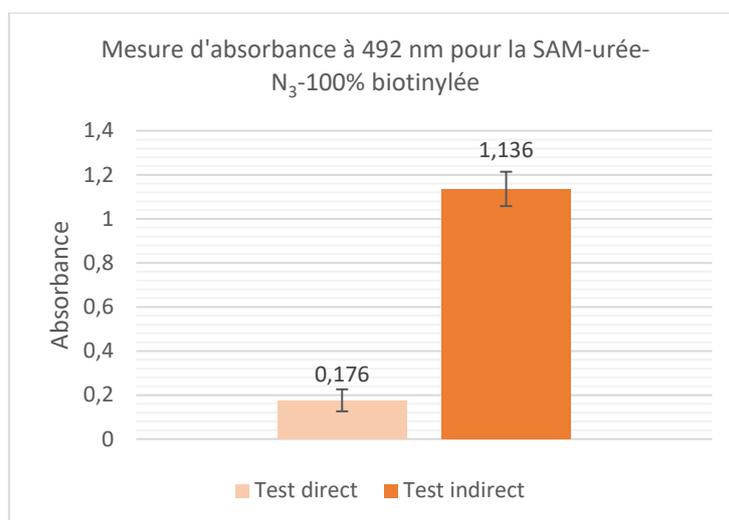


Figure 135. Processus complet de biofonctionnalisation de la SAM-urée- N_3 -100%

L'absorbance mesurée pour les dosages direct et indirect est présentée ci-dessous (**Figure 136**).



Type de SAM biotinylée	Abs (Indirect)	Taux de recouvrement	Abs (Direct)	Taux de recouvrement actif	Delta = pourcentage inactif
SAM-alkyle-Br/N ₃	0.752	34%	0.218	<10%	24%
SAM-urée-N ₃ -100%	1.136	<10%	0.176	<10%	~0%

Figure 136. Valeurs d'absorbance pour les deux tests pour la SAM-urée-N₃-100% biotinylée

Le graphique ci-dessus montre que le taux de recouvrement en streptavidine-HRP des surfaces biotinylées de type urée-N₃-100% est plus faible que pour la SAM-alkyle-Br/N₃ biofonctionnalisée.

Effectivement, l'absorbance mesurée lors du test direct montre un taux de recouvrement inférieur à 10% alors que l'absorbance mesurée lors du dosage indirect est supérieure à 1, ce qui sort de la zone de linéarité de la courbe de calibration, mais qui témoigne d'un faible recouvrement.

Ceci signifie que ces surfaces sont moins bien biofonctionnalisées, moins bioactives, que celles de type alkyle-Br/N₃. Cela peut être expliqué soit par un plus grand nombre de biotines accessibles dans la SAM-alkyle-Br/N₃, soit par un effet stérique empêchant l'interaction biotine-streptavidine (distribution des biotines en nano-domaines par exemple).

Néanmoins, dans le cas de la SAM-urée-N₃-100% biotinylée, il semble que le peu de streptavidine-HRP immobilisée en surface reste bien actif. En effet, la différence estimée entre les deux mesures du taux de recouvrement montre que 0% de la surface serait recouverte par de la streptavidine-HRP non active. Cette SAM, bien qu'à priori moins efficace que la précédente, présente ainsi une meilleure biocompatibilité : elle ne porte pas atteinte à l'activité catalytique de la HRP.

Ce constat peut être expliqué par la présence du motif urée au sein de la SAM, qui éloigne les molécules entre elles. Cela engendre ainsi moins de gênes stériques entre protéines une fois celles-ci immobilisées sur la surface.

ii- Comparaison des SAM-urée-N₃ mixtes

Les SAM-urée-N₃-50% et SAM-urée libre-N₃-50% ont aussi été testées selon ce protocole enzymatique afin de les comparer aux deux types de monocouches précédents (**Figure 137**).

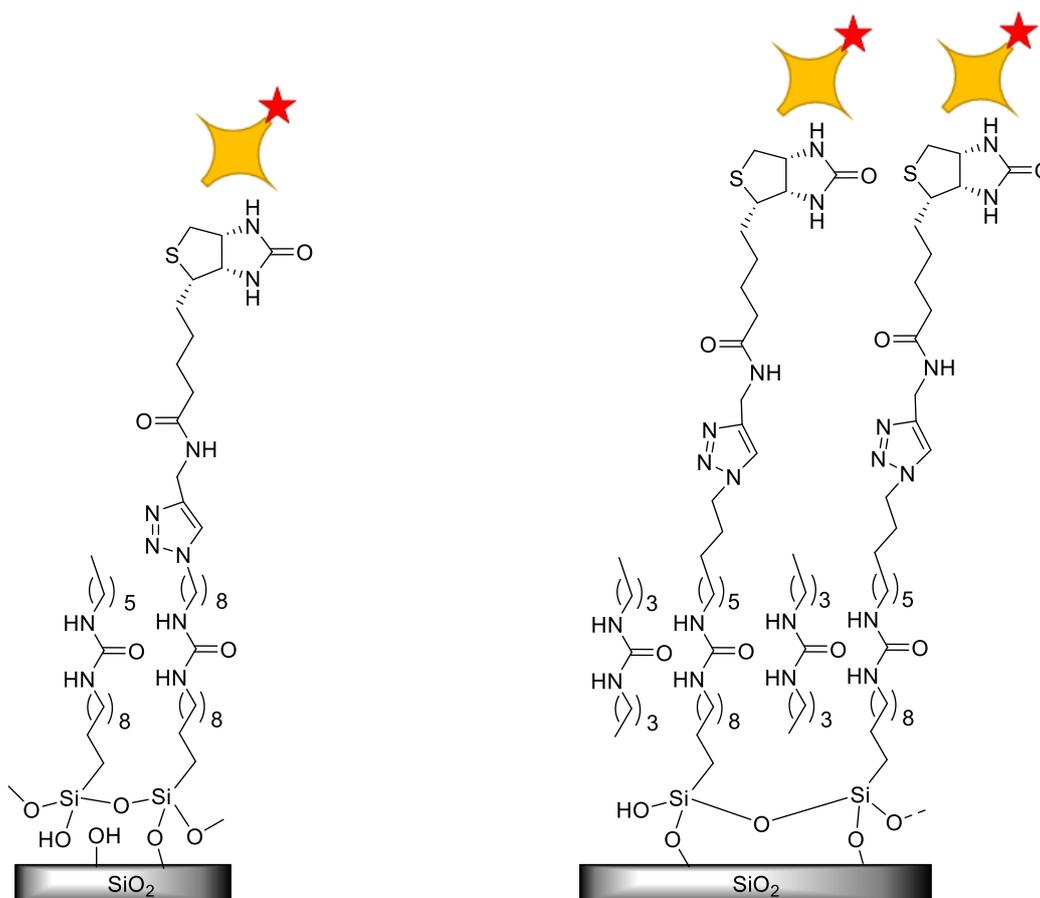
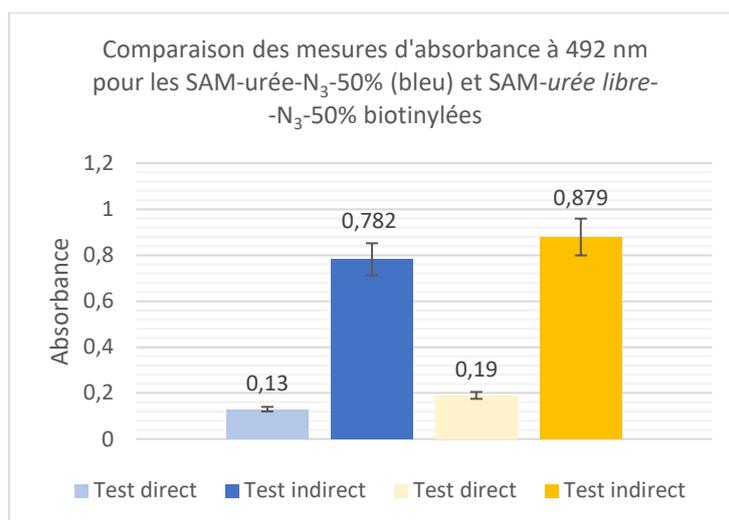


Figure 137. Représentation des SAM-urée-N₃-50% et SAM-urée libre-N₃-50% après incubation

Les absorbances mesurées pour les dosages direct et indirect sont présentées ci-dessous (**Figure 138**).



Type de SAM biotinylée	Abs (Indirect)	Taux de recouvrement	Abs (Direct)	Taux de recouvrement actif	Delta = pourcentage inactif
SAM-alkyle-Br/N ₃	0.752	34%	0.218	<10%	24%
SAM-urée-N ₃ -100%	1.136	<10%	0.176	<10%	~0%
SAM-urée-N ₃ -50%	0.782	31%	0.13	<10%	21%
SAM-urée libre-N ₃ -50%	0.879	23%	0.19	<10%	13%

Figure 138. Valeurs d'absorbance pour les deux tests pour les SAM-urée-azoture-50% biotinylée (bleu) et SAM-urée libre-N₃-50% biotinylée (jaune)

La figure ci-dessus nous permet de constater que, via l'étude de l'absorbance mesurée de façon indirecte, la SAM-urée-N₃-50% biotinylée présente un meilleur taux de recouvrement en streptavidine-HRP que la SAM-urée libre-N₃-50% biotinylée. En effet, cette dernière montre un taux de recouvrement d'environ 23% alors que la première exhibe un taux de recouvrement de 31% en moyenne.

Néanmoins, et en appliquant le raisonnement présenté précédemment, il s'avère que la SAM diluée par une urée libre immobilise plus efficacement le bioconjugué. Effectivement, pour celle-ci, le différentiel entre les deux mesures est de 13% alors que pour la SAM-urée-N₃-50% il est de 21%. Cela indique qu'elle a besoin de moins de bioconjugués pour atteindre une activité enzymatique plus importante, car l'absorbance mesurée directement (0.19 contre 0.13) est plus importante (même si la mesure est en dehors du domaine de linéarité de la courbe de calibration). Cette monocouche est donc plus efficace et détériore d'autant moins les protéines que les deux autres SAM-urée-N₃ 100% et 50%.

Cela peut s'expliquer par la présence de l'urée libre, qui oriente favorablement les N₃ en surface, et les rend plus accessibles pour la réaction de chimie click, ce qui conduirait éventuellement à une meilleure accessibilité du résidu biotine.

Les tests enzymatiques sur les SAMs de type azoture ont montré qu'il était possible d'estimer le taux de recouvrement des surfaces via la démarche indirecte. La comparaison des mesures d'absorbance directe et indirecte s'avère être une méthode intéressante pour évaluer de l'efficacité de l'immobilisation des bioconjugués sur les SAM, et donc de conclure sur leur biocompatibilité.

La comparaison des absorbances mesurées dans le test direct pour les différentes SAM-urée- N_3 semble indiquer que la plus efficace est celle diluée avec une urée libre, sûrement grâce à la diminution des gênes stériques. La moins bonne des monocouches en terme d'immobilisation est la SAM-urée- N_3 -100%, ce qui tend à confirmer l'observation générale que la dilution des sites actifs sur la surface d'un bio-capteur augmente son efficacité.

b- Test sur la SAM-urée-PEG-biotine-100%

La SAM-urée-PEG-biotine-100% se distinguant des autres SAMs par l'incorporation de la biotine au sein de la monocouche lors du processus de greffage (approche 100% « bottom-up »), il est intéressant de la comparer aux surfaces biotinyllées obtenues par chimie click (Figure 139).

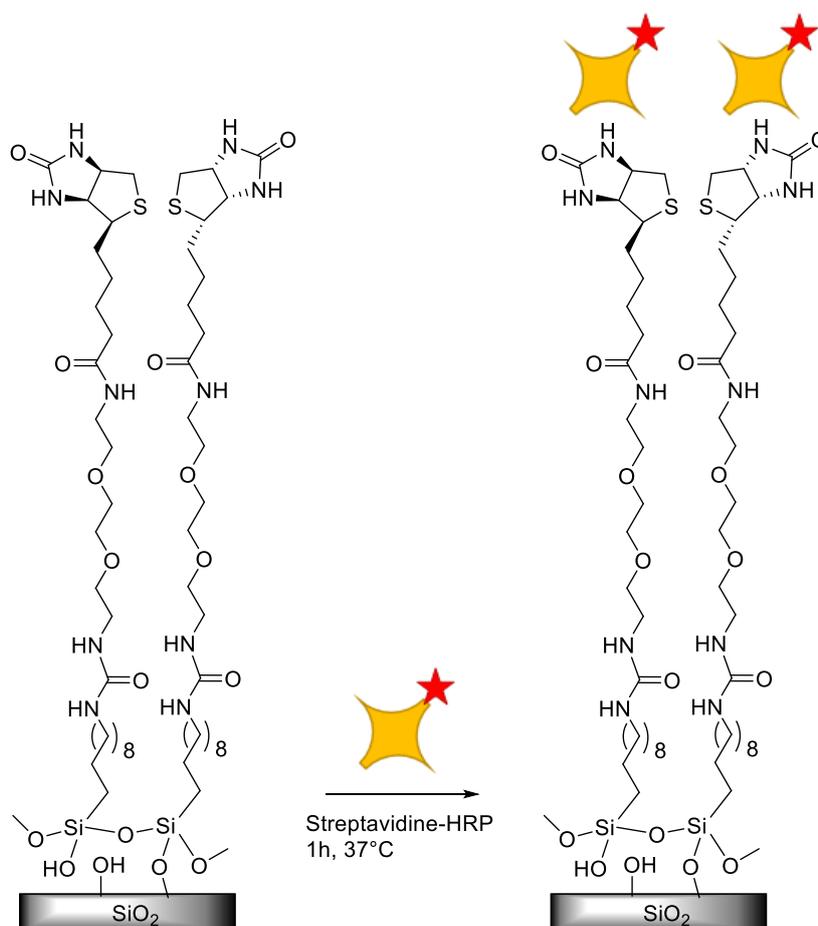
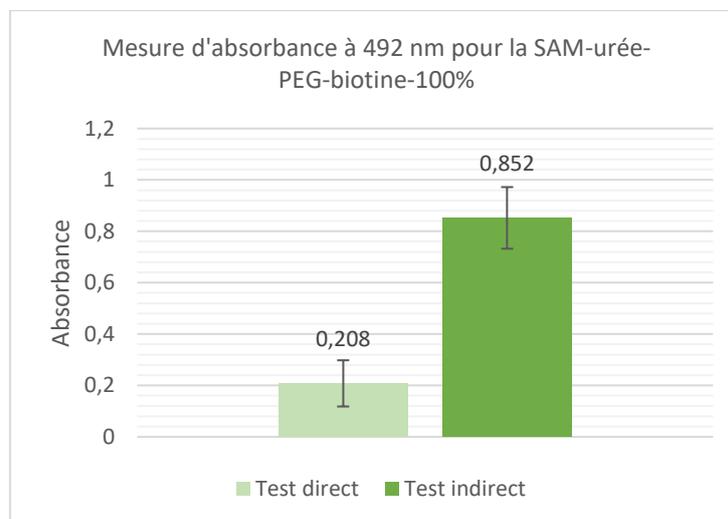


Figure 139. Représentation de la SAM-urée-PEG-biotine-100% après incubation

L'absorbance mesurée pour les dosages direct et indirect est présentée ci-dessous (**Figure 140**)



Type de SAM biotinylée	Abs (Indirect)	Taux de recouvrement	Abs (Direct)	Taux de recouvrement actif	Delta = pourcentage inactif
SAM-alkyle-Br/N ₃	0.752	34%	0.218	<10%	24%
SAM-urée-N ₃ -100%	1.136	<10%	0.176	<10%	~0%
SAM-urée-N ₃ -50%	0.782	31%	0.13	<10%	21%
SAM-urée libre-N ₃ -50%	0.879	23%	0.19	<10%	13%
SAM-urée-PEG-biotine-100%	0.852	25%	0.208	<10%	15%

Figure 140. Valeur d'absorbance pour les deux tests pour la SAM-urée-PEG-biotine-100%

Le taux de recouvrement en streptavidine-HRP de cette SAM est d'environ 25%, ce qui est comparable à la SAM-urée libre-N₃-50%. Néanmoins celle-ci présente une activité enzymatique directe plus importante (absorbance de 0.208, même si on approxime le taux de recouvrement à 10%), ce qui montre qu'elle est plus efficace.

Néanmoins, cette SAM possédant 100% de biotine en surface, on peut en conclure que seule une faible proportion est accessible, ce qui, sur ce point précis, la rend comparable à la SAM-alkyle-Br/N₃ biofonctionnalisée.

A l'issue de ces tests enzymatiques mettant à profit l'activité catalytique de la streptavidine-HRP, il est possible d'évaluer le recouvrement des surfaces en streptavidine en mesurant l'activité de la HRP, mais aussi l'efficacité de ce recouvrement.

D'une part, la SAM-alkyle-Br/N₃ biotinylée et la SAM-urée-N₃-50% biotinylée présentent des taux de recouvrement et des biocompatibilités comparables, alors que les autres SAM-urée-N₃ semblent moins prompts à immobiliser le bioconjugué. Néanmoins, si l'on se réfère aux absorbances mesurées durant le test direct, celles-ci permettent une immobilisation plus efficace des biomolécules, car il faut moins de streptavidine-HRP pour obtenir une certaine activité catalytique.

C- Conclusion

Cette partie nous a permis de mettre au point un test se basant sur une réaction enzymatique afin d'évaluer la bioactivité des surfaces obtenues dans les *chapitre II* et *chapitre III*. L'idée de ce test, facilement réalisable au sein du laboratoire, est d'incuber les diverses surfaces biotinylées par une streptavidine modifiée par une HRP, dont l'activité enzymatique permet de catalyser l'oxydation de l'OPD, passant ainsi d'un composé incolore à un composé coloré.

Ce simple test permet de vérifier si les surfaces sont bien biotinylées, quelle que soit leur méthode de conception, et si elles sont bien biocompatibles. De plus, par l'utilisation de courbes de calibration, nous disposons aussi d'une méthode d'estimation du taux de recouvrement des surfaces en streptavidine-HRP, en reliant l'absorbance finale mesurée à l'issue du test, à un pourcentage de recouvrement des substrats.

Ce test se divise entre une approche directe, plutôt qualitative, et une approche indirecte, estimant le taux de recouvrement des surfaces. La méthode directe permet ainsi de vérifier si la biofonctionnalisation du substrat est effective, si les biotines en surface sont disponibles, et si le substrat est globalement biocompatible.

Dans un second temps, la mise en œuvre de ce test sur les différentes surfaces étudiées nous a permis de montrer que les SAMs alkyle-Br/N₃ et urée-N₃-50% sont celles qui immobilisent le plus de bioconjugués, mais qu'en contrepartie, un grand nombre de ces biomolécules reste inactives sur le substrat.

D'autre part, les SAMs *urée libre*-N₃-50% et urée-PEG-biotine-100% immobilisent moins de streptavidine-HRP, mais semblent être plus biocompatibles car une plus grande proportion des bioconjugués immobilisés conservent leur bioactivité.

Références

- (1) Wolny, P. M.; Spatz, J. P.; Richter, R. P. *Langmuir* **2010**, 26 (2), 1029.

CONCLUSION

L'objectif de ces travaux de thèse était de synthétiser de nouveaux agents de couplage chimio- ou biofonctionnels, afin de les greffer et de donner une fonctionnalité spécifique aux substrats de SiO₂.

Pour ce faire, deux nouvelles familles d'organosilanes ont été considérées. Nous avons tout d'abord synthétisé des agents de couplages contenant un motif urée et un groupement azoture terminal, permettant la biofonctionnalisation des substrats par chimie click. Cette approche nous a permis de décrire l'hydrosilylation des composés azoture, qui, à notre connaissance, n'a pas fait l'objet d'une étude méthodologique rapportée dans la littérature. Cette méthode permet d'obtenir de façon rapide et direct des organosilanes contenant un groupement N₃, et donc de fonctionnaliser des substrats de silice en une seule étape. Ces substrats peuvent ensuite être fonctionnalisés à façon *via* chimie click. Dans le cas de la biofonctionnalisation, nous avons employé une biotine-alcyne afin de rendre la surface bioactive.

Lors de cette étude nous avons observé que l'utilisation d'un agent de couplage possédant un motif urée et azoture permet d'obtenir une SAM homogène. Ces monocouches révèlent un azoture en surface directement observable par PM-IRRAS ce qui n'est pas le cas pour leurs homologues alkyles. En effet, l'étude de la molécule modèle 11-azidoundécyltriméthoxysilane a révélé un phénomène inattendu lors de son greffage avec des groupements azoture qui semblent s'orienter de façon spécifique à la surface des substrats, rendant leur observation impossible en PM-IRRAS. La capacité de l'urée à écarter les molécules entre elle, semble réduire les interactions défavorables (interaction dipolaire entre N₃ voisins) et donc d'observer les azotures.

Nous avons également étudié la formation de SAMs mixtes intégrant l'agent de couplage possédant un motif urée et azoture, afin d'observer l'effet de la dilution sur les groupements azotures terminaux. Nous avons montré que l'agent de couplage contenant la fonction azoture pouvait être greffé en quantité variable, et que le processus de co-adsorption respecte bien les ratios introduits dans le bain de greffage. L'étude en PM-IRRAS de la bande à 2100 cm⁻¹ nous a permis de constater que celle-ci respecte le facteur de dilution propre à chaque SAM. Cette étude nous a permis d'utiliser une nouvelle méthode de dilution d'un organosilane, afin d'obtenir une SAM mixte originale. Nous avons en effet synthétisé une SAM mixte diluée par une urée libre non greffable, ce qui a permis de diluer l'azoture de la même façon que lors d'un greffage en co-adsorption classique.

Enfin, nous avons mis au point des conditions de chimie click afin de biofonctionnaliser les différentes surfaces obtenues par une biotine-alcyne. Nous avons alors observé que, quel que soit le type de SAM employé, un effet de saturation en biotine clickée en surface était présent. Le seuil nécessaire en N₃ de surface pour effectuer la click de la biotine-alcyne de façon optimale a été déterminé à 25%.

D'autre part, nous avons aussi considéré la synthèse d'agents de couplage intégrant directement la biotine au sein de leur structure. Cette approche permet, une fois les molécules siliciées obtenues, de biofonctionnaliser une surface en une seule étape de greffage. Ceci

montre ainsi la faisabilité d'une biofonctionnalisation « bottom-up », permettant d'éviter des étapes de chimie post-fonctionnalisation fastidieuses et parfois inefficaces.

Les différentes SAMs ont toutes été caractérisées par PM-IRRAS et AFM, afin de vérifier les différents groupements fonctionnels présents ainsi que l'état de surface des monocouches. Néanmoins, afin de s'assurer de la biocompatibilité et biofonctionnalité des divers substrats, nous avons mis au point un test enzymatique facilement réalisable au sein du laboratoire, afin de comparer l'efficacité des différentes surfaces. Ce test repose sur l'affinité des surfaces biotinylées pour la streptavidine-HRP, dont l'activité enzymatique est ensuite révélée par colorimétrie afin d'évaluer le taux de recouvrement des substrats en bioconjugué. Nous avons donc là un test très simple qui permet non seulement de mesurer la bioactivité des surfaces modifiées, mais aussi d'appréhender leur biocompatibilité, et donc de juger quel type de SAM se présente comme le meilleur candidat pour une application en détection.

Les différentes analyses nous ont permis de montrer que toutes les SAMs biotinylées étaient bioactives et biocompatibles, mais que les SAMs urée-PEG-biotine-100% et *urée libre*-N₃-50% étaient celles qui présentaient des résultats les plus encourageants.

Nous n'avons malheureusement pas pu, dans les délais impartis, réaliser la seconde partie de l'édifice initialement imaginé : après immobilisation de la streptavidine sur une SAM biotinylée, il aurait été intéressant d'y lier un bio-récepteur biotinylé. Si la poursuite des travaux s'avère concluante dans cette direction, il serait envisageable d'utiliser ces surfaces comme plateforme de détection versatile. Il suffit ainsi de les passiver pour qu'un biochimiste n'ait par la suite qu'à les incubier avec un bio-récepteur biotinylé pour obtenir un outil de détection de son choix.

Plusieurs pistes pourraient aussi être envisagées pour poursuivre l'exploitation des résultats originaux obtenus avec les azotures. En effet, il conviendrait de vérifier les hypothèses formulées durant ce manuscrit pour décrire plus en détail le comportement de ces groupements à l'approche de la surface. De nouvelles analyses pourraient être conduites, telles que l'XPS, afin de vérifier que les N₃ de surfaces sont bien présents, mais non observables en PM-IRRAS, ni disponibles pour la chimie click.

La mise au point de l'hydrosilylation des dérivés azoture permet aussi d'envisager de nouvelles applications pour la modification directe de surfaces. En effet, il est maintenant possible de synthétiser des organosilanes plus complexes, possédant des noyaux aromatiques par exemple, afin de donner en une seule étape de greffage non plus seulement une chimioactivité spécifique, mais aussi des propriétés physiques d'intérêt. On peut alors songer à synthétiser des agents de type fluorogéniques, qui émettront en fluorescence lors de la click d'objets spécifiques. Ceci permettrait de suivre directement la réaction chimique et donc d'évaluer le taux de recouvrement en molécules d'intérêt de la surface.

La nouvelle méthode de dilution originale décrite dans ce manuscrit pour la création de SAMs mixtes peut aussi par la suite présenter un intérêt pour l'élaboration de nouvelles

monocouches. En effet, au lieu d'utiliser une urée libre inerte, on peut maintenant considérer l'utilisation de molécules fonctionnelles non silylées, qui pourront s'intercaler avec les molécules greffées, tout en donnant de nouvelles propriétés, physiques ou chimiques, à la monocouche. Une telle approche peut sembler intéressante, car elle permettrait, en contrôlant la taille des différentes molécules, de faire « ressortir » certains groupes fonctionnels, qui se retrouveraient ainsi « au-dessus » de la SAM et non plus au sein de l'édifice, améliorant de fait leur accessibilité.

Enfin, la versatilité et la bioorthogonalité de tels groupements en font une cible de choix pour la fonctionnalisation d'un grand nombre de surfaces pour diverses applications : il serait par exemple intéressant de réaliser des SAMs mixtes azoture/biotine ou bien même de greffer les différents agents de couplage sur des nanoparticules pour faciliter l'accès à de nouvelles fonctionnalités.

PARTIE EXPERIMENTALE

a- Produits

Les différents produits chimiques, solvants et réactifs, utilisés durant ces travaux de thèses ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Fisher Acros, et TCI. Ceux-ci ont été utilisés tels quels, sans purification. Les synthèses nécessitant un milieu anhydre ont été réalisées dans les solvants commerciaux anhydres adaptés, ou suite à une distillation sur agent desséchant (cas du chloroforme, séché sur CaH₂ sous atmosphère inerte).

Toutes manipulations ou réaction décrites sous « atmosphère inerte » ont été conduites sous argon.

Les produits biologiques et associés ont été achetés auprès de Interchim et Aurum Pharmatech (Streptavidine-HRP et biotine-alcyne).

b- Appareillage

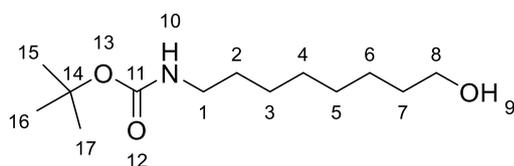
Les spectres infrarouge en mode PM-IRRAS ont été enregistrés sur un spectromètre NEXUS 670 (Thermo Optek) ayant une résolution de 4 cm⁻¹. Tous les spectres sont enregistrés sous une atmosphère d'air sec après 30 min d'incubation dans la chambre. Une moyenne est réalisée sur plusieurs blocs de 1500 scans (30 minutes d'acquisition).

Les wafers d'AFM sont analysés par un Dimension Icon de Bruker en mode Peak Force QNM (Quantitative Nanomechanical Mapping) avec des pointes ScanAsyst-Air (APEX = 2 nm, constante de raideur k = 0.4 N/m).

Les différents spectres RMN ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance I 300 MHz équipé d'une sonde BBI, un spectromètre Bruker Avance III 300 MHz équipé d'une sonde BBFO et un spectromètre Bruker Avance III 600 MHz équipé d'une sonde BBI.

c- Protocoles de synthèse

❖ Synthèse du composé 2



Masse Molaire : 245.20 g.mol⁻¹

Rendement : > 90%

Aspect : Solide blanc

Une solution de BOC₂O (1.2 eq) dans le dichlorométhane (10 ml) est lentement ajoutée à une solution de 8-amino-1-octanol **1** (1 eq. – 6.8mmol) dans le dichlorométhane (10 mL) à 0°C.

La suspension devient limpide suite à l'ajout de BOC_2O , et le mélange est laissé revenir à TA (on observe un dégagement gazeux). L'agitation est poursuivie à TA durant 12 heures.

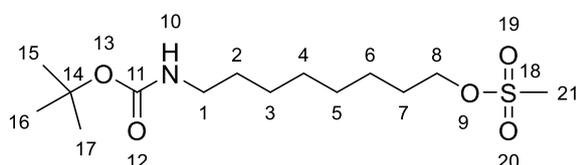
Le brut est ensuite concentré sous pression réduite avant d'être purifié sur colonne de silice par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (1 :1). $R_f = 0.55$

Analyses :

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δppm) : 3.63 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H, **8**) ; 3.10 (br, 2H, **1**) ; 1.58-1.53 (m, 2H, **2**) ; 1.48 (m, 2H, **7**) ; 1.44 (s, 8H, **3, 4, 5, 6**) ; 1.32 (s, 9H, **15, 16, 17**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 63,14 (**8**) ; 32.74 (**1**) ; 30.05 (**2**) ; 29.29-25.78 (**3, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17**)

❖ Synthèse du composé **3**



Masse Molaire : $323.18 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : $>80\%$

Aspect : Huile jaunâtre

A une solution à 0°C du composé **2** (1eq. - 3.2 mmol) dans le dichlorométhane (10 mL) est ajoutée la triéthylamine (1.5 eq) puis le chlorure de mésyle goutte à goutte (1.1 eq).

On note l'apparition d'un trouble puis d'un précipité ainsi qu'un dégagement gazeux.

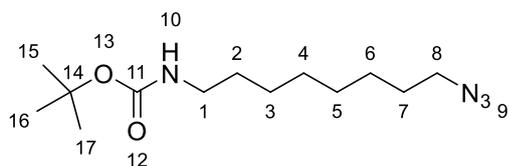
Le mélange est laissé revenir à TA puis l'agitation est poursuivie durant 12h.

Le brut est dilué avec 10 mL de CH_2Cl_2 et la phase organique est lavée par 4x10 mL de saumure. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO_4 avant d'être concentrée sous pression réduite pour obtenir le produit sous forme d'huile jaunâtre.

Analyses :

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δppm) : 4.22 (t, 2H, **8**) ; 3.10 (br, 2H, **1**) ; 3.00 (s, 3H, **21**) ; 1.44 (s, 12H, **2-7**) ; 1.31 (s, 9H, **15-17**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 70.23 (**8**) ; 37.53 (**1**) ; 30.17-25.49 (**2-7, 21, 15-17**)

❖ Synthèse du composé **4**Masse Molaire : 270.38 g.mol⁻¹

Rendement : >80%

Aspect : Huile jaune

A une solution du composé **3** (1 eq. – 2.3 mmol) dans le DMF anhydre (50 mL) sous argon est ajouté l'azoture de sodium (3 eq).

La solution se trouble à l'ajout de NaN₃ et l'agitation est poursuivie à TA durant 36h.

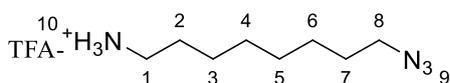
Le brut est partitionné entre la saumure (50 mL) et le CH₂Cl₂ (50 mL). La phase aqueuse est extraite par 2x50 mL de CH₂Cl₂ puis les fractions organiques combinées sont lavées par 2x50 mL de saumure avant d'être séchées sur MgSO₄ et concentrées sous pression réduite.

Un azéotrope avec le toluène est réalisé (2x15 mL) afin d'éliminer le DMF à la rampe à vide. Le composé **4** est obtenu sous la forme d'une huile jaune.

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 3.25 (t, J = 6.9 Hz 2H, **8**) ; 3.10 (br, 2H, **1**) ; 1.44 (s, 12H, **2-7**) ; 1.31 (s, 9H, **15-17**)

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃, δppm) : 51.60 (**8**) ; 30.19-26.77 (**2-8, 15-17**)

❖ Synthèse du composé **5**Masse molaire : 284.29 g.mol⁻¹

Rendement : quantitatif

Aspect : Huile

A une solution du composé **4** (1 eq. - 2 mmol) dans le CH₂Cl₂ à 0°C (45 ml) est lentement ajouté l'acide trifluoroacétique (12 eq.).

Le mélange est laissé lentement revenir à TA puis agité durant 12h. On observe alors un dégagement gazeux.

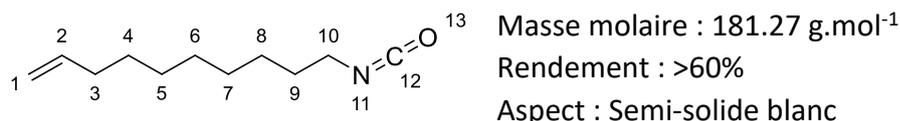
Le mélange TFA/CH₂Cl₂ est éliminé sous pression réduite et les résidus de TFA sont emportés par 3x10 ml de toluène.

Analyses :

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δppm) : 3.25 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, **8**) ; 2.87 (br, 2H, **1**) ; 1.72-1.67 (m, 2H, **2**) ; 1.61-1.54 (m, 2H, **7**) ; 1.30 (s, 8H, **3-6**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 51.37 (**8**) ; 40.26 (**1**) ; 28.71-26.06 (**2-7**)

❖ Synthèse du composé **7**



A une solution d'azoture de sodium (2 eq.) sous atmosphère inerte dans le toluène anhydre à 0°C (20 ml) est ajouté au goutte à goutte le chlorure de 10-undécényle **6** (1 eq. – 13.3 mmol).

Après ajout, le mélange est laissé revenir à TA puis l'agitation est poursuivie durant 3h. 1 équivalent d'azoture de sodium est ensuite ajouté et l'agitation est poursuivie sous atmosphère inerte durant 12h.

La solution est par la suite canulée dans un ballon contenant 200 ml de toluène anhydre à 200°C sous atmosphère inerte. L'agitation est conduite durant une nuit à cette température avant d'être laissée revenir à TA.

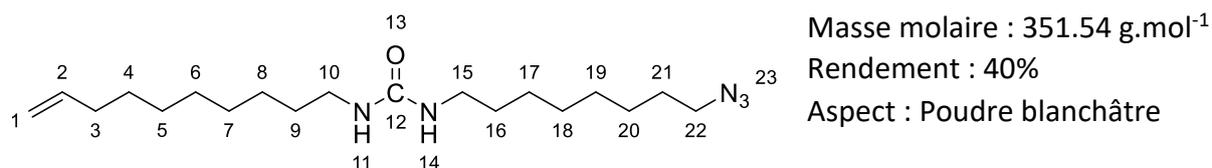
La solution obtenue est filtrée sur Célite puis le solvant est évaporé sous pression réduite afin d'obtenir le produit pur.

Analyses :

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δppm) : 5.87-5.72 (m, 1H, **1**) ; 5.03-4.88 (m, 2H, **2**) ; 3.27 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H, **10**) ; 2.04 (qt, 2H, **3**) ; 1.67-1.54 (m, 2H, **9**) ; 1.45-1.23 (m, 10H, **4-8**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 139.24 (**2**) ; 114.33 (**1**) ; 43.13 (**10**) ; 33.89 (**3**) ; 31.44-26.65 (**4-9**)

❖ Synthèse du composé **8**



A une solution du composé **5** (1 eq. – 0.5 mmol) dans le DMF anhydre (5 mL) sous atmosphère inerte est ajouté la triéthylamine préalablement distillée (1.5 eq.). Le mélange est laissé sous agitation à TA durant une heure.

L'isocyanatodéc-1-ène **7** (1.1 eq) dans le DMF anhydre (5 mL) est ajouté à la solution sous atmosphère inerte. L'agitation est poursuivie à TA durant 12h.

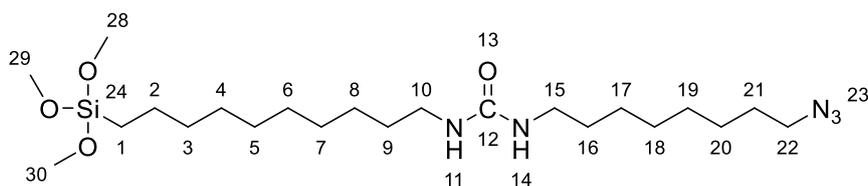
Le mélange est ensuite concentré sous pression réduite, puis l'huile obtenue est purifiée sur colonne de silice par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (60 : 40).

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 5.87-5.74 (m, 1H, **2**) ; 5.02-4.91 (m, 2H, **1**) ; 3.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, **22**) ; 3.15 (td, *J* = 7.2 Hz, 2.1 Hz, 4H, **10**, **15**) ; 2.02 (q, *J* = 14.3 Hz, 2H, **3**) ; 1.61-1.57 (m, 2H, **21**) ; 1.51-1.47 (m, 4H, **9**, **16**) ; 1.32-1.29 (m, 18H, **4-8**, **17-20**)

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃, δppm) : 139.15 (**2**) ; 114.16 (**1**) ; 51.45 (**22**) ; 40.69-40.61 (**10**, **15**) ; 33.78 (**3**) ; 30.23-26.64 (**4-9**, **16-21**)

❖ Synthèse du composé **9**



Masse molaire : 473.73 g.mol⁻¹

Rendement : quantitatif

Aspect : Huile

Le composé **8** (1eq. - 0.05 mmol) est pesé dans un schlenk séché sous vide puis conditionné sous argon, puis dissout dans 0.5 mL de chloroforme fraîchement distillé.

Le triméthoxysilane (5 eq.) préalablement distillé est ensuite ajouté à la solution, suivi du catalyseur de Karstedt (0.025 eq. en Pt). Le schlenk est ensuite scellé, et le milieu réactionnel est agité 3h à 60°C.

Le solvant et l'excès de triméthoxysilane sont ensuite évaporé à la rampe à vide afin d'obtenir le composé sous forme de produit huileux et noirâtre.

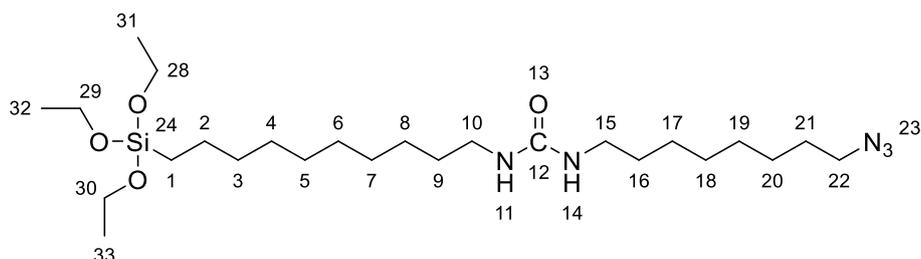
Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 3.56 (s, 9H, **28-30**) ; 3.25 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, **22**) ; 3.15 (td, *J* = 7.2 Hz, 2.1 Hz, 4H, **10**, **15**) ; 1.59 (m, 2H, **21**) ; 1.48 (m, 4H, **9**, **16**) ; 1.32-1.29 (m, 22H, **2-8**, **17-20**) ; 0.63 (m, 2H, **1**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 158.29 (**12**) ; 51.45 (**22**) ; 50.49 (**28-30**) ; 40.69-40.61 (**10, 15**) ; 33.10-26.64 (**3-9, 16-21**) ; 22.57 (**2**) ; 9.12 (**1**)

RMN ^{29}Si (59MHz, CDCl_3 , δppm) : -41.20 (**24**)

❖ Synthèse du composé **9'**



Masse molaire : 515.82 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : quantitatif

Aspect : Huile

Le composé **8** (1eq. - 0.05 mmol) est pesé dans un schlenk séché sous vide puis conditionné sous argon, puis dissout dans 0.5 mL de chloroforme fraîchement distillé.

Le triéthoxysilane (5 eq.) préalablement distillé est ensuite ajouté à la solution, suivi du catalyseur de Karstedt (0.025 eq. en Pt). Le schlenk est ensuite scellé, et le milieu réactionnel est agité 3h à 60°C.

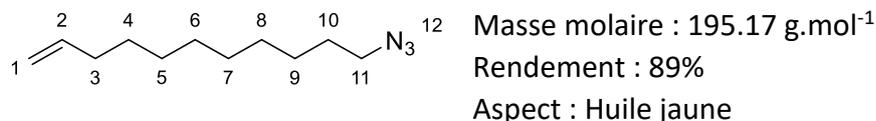
Le solvant et l'excès de triéthoxysilane sont ensuite évaporé à la rampe à vide afin d'obtenir le composé sous forme de produit huileux et noirâtre.

Analyses :

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δppm) : 3.84 (s, 9H, **28-30**) ; 3.25 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, **22**) ; 3.15 (td, $J = 7.2$ Hz, 2.1 Hz, 4H, **10, 15**) ; 1.59 (m, 2H, **21**) ; 1.48 (m, 4H, **9, 16**) ; 1.30 (m, 31H, **2-8, 17-20, 31-33**) ; 0.63 (m, 2H, **1**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 158.29 (**12**) ; 58.41-58.29 (**28-30**) ; 51.43 (**22**) ; 40.70-40.61 (**10, 15**) ; 33.17-26.63 (**3-9, 16-21**) ; 22.74 (**2**) ; 18.43-18.00 (**31-33**) ; 10.37 (**1**)

RMN ^{29}Si (59MHz, CDCl_3 , δppm) : -44.50 (**24**)

❖ Synthèse du composé **11**

A une solution du 11-bromo-undéc-1ène **10** (1 eq.- 17.15 mmol) dans le DMF (30 mL) est ajouté l'azoture de sodium (1.3 eq.).

Un trouble apparaît rapidement et le mélange est mis sous agitation durant 3h à TA. La solution est filtrée afin d'éliminer le précipité et le DMF est évaporé sous pression réduite.

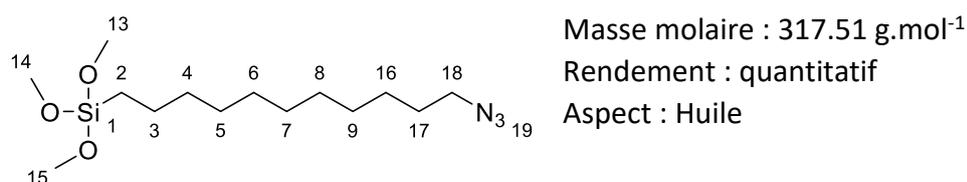
30 mL d'eau sont ajouté au brut de réaction puis la phase aqueuse est extraite par 4x30 mL de pentane.

Les fractions organiques combinées sont séchées sur MgSO₄ puis le pentane est évaporé sous pression réduite afin d'obtenir le composé **11**.

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 5.90-5.75 (m, 1H, **2**) ; 5.03-4.91 (m, 2H, **1**) ; 3.26 (t, 2H, J = 6.8 Hz, **11**) ; 2.05 (q, 2H, J = 6.8 Hz, **3**) ; 1.65-1.30 (m, 14H, **4-10**)

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃, δppm) : 139.15 (**2**) ; 114.1 (**1**) ; 51.4 (**11**) ; 33.8 (**3**) ; 33.8-26.7 (**4-10**)

❖ Synthèse du composé **12**

Le composé **11** (1eq. - 0.05 mmol) est pesé dans un schlenk séché sous vide puis conditionné sous argon, puis dissout dans 0.5 mL de chloroforme fraîchement distillé.

Le triméthoxysilane (5 eq.) préalablement distillé est ensuite ajouté à la solution, suivi du catalyseur de Karstedt (0.025 eq. en Pt). Le schlenk est ensuite scellé, et le milieu réactionnel est agité 3h à 60°C.

Le solvant et l'excès de triméthoxysilane sont ensuite évaporé à la rampe à vide afin d'obtenir le composé sous forme de produit huileux et orange.

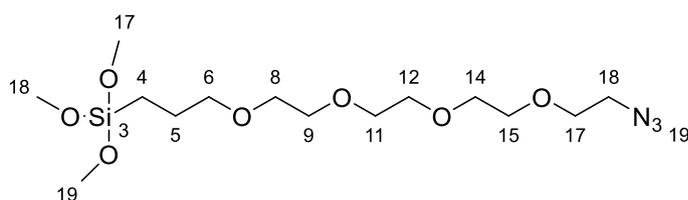
Analyses :

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δppm) : 3.60 (s, 9H, **13-15**) ; 3.25 (t, 2H, **18**) ; 1.60 (t, 2H, **17**) ; 1.35-1.28 (m, 16H, **3-9**, **16**) ; 0.68 (m, 2H, **2**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 51.62 (**18**) ; 50.61 (**13-15**) ; 33.27-26.85 (**4-9**, **16**, **17**) ; 22.73 (**3**) ; 9.27 (**2**)

RMN ^{29}Si (59MHz, CDCl_3 , δppm) : -41.27 (**1**)

❖ Synthèse du composé **b**



Masse molaire : 409.22 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : quantitatif

Aspect : Huile

Le composé **a** (1eq. - 0.05 mmol) est pesé dans un schlenk séché sous vide puis conditionné sous argon, puis dissout dans 0.5 mL de chloroforme fraîchement distillé.

Le triméthoxysilane (5 eq.) préalablement distillé est ensuite ajouté à la solution, suivi du catalyseur de Karstedt (0.025 eq. en Pt). Le schlenk est ensuite scellé, et le milieu réactionnel est agité 3h à 60°C.

Le solvant et l'excès de triméthoxysilane sont ensuite évaporé à la rampe à vide afin d'obtenir le composé sous forme de produit huileux.

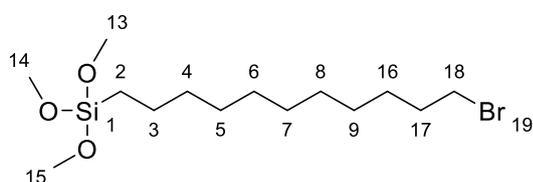
Analyses :

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δppm) : 3.65 (s, 14H, **6-15**) ; 3.55 (s, 9H, **17-19**) ; 3.46-3.37 (m, 4H, **18**, **5**) ; 1.71-1.65 (m, 2H, **17**) ; 0.67-0.62 (m, 2H, **4**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 73.57-70.15 ; 50.83 (**18**) ; 50.65 (**17-19**) ; 22.84 (**5**) ; 5.36 (**4**)

RMN ^{29}Si (59MHz, CDCl_3 , δppm) : -41.27 (**3**)

❖ Synthèse du composé **13**



Masse molaire : 355.39 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$

Rendement : quantitatif

Aspect : Huile

Le composé **10** (1eq. - 0.05 mmol) est pesé dans un schlenk séché sous vide puis conditionné sous argon, puis dissout dans 0.5 mL de chloroforme fraîchement distillé.

Le triméthoxysilane (5 eq.) préalablement distillé est ensuite ajouté à la solution, suivi du catalyseur de Karstedt (0.025 eq. en Pt). Le schlenk est ensuite scellé, et le milieu réactionnel est agité 3h à 60°C.

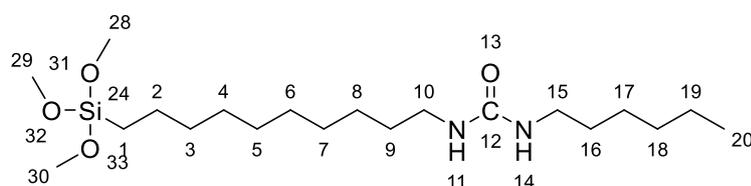
Le solvant et l'excès de triméthoxysilane sont ensuite évaporé à la rampe à vide afin d'obtenir le composé sous forme de produit huileux et orange.

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 3.60 (s, 9H, **13-15**) ; 3.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, **18**) ; 1.93-1.78 (m, 2H, **17**) ; 1.44-1.27 (m, 16H, **3-9**, **16**) ; 0.68-0.62 (m, 2H, **2**)

RMN ²⁹Si (59MHz, CDCl₃, δppm) : -41.27 (**1**)

❖ Synthèse du composé **17**



Masse molaire : 404.66 g.mol⁻¹

Rendement : quantitatif

Aspect : huile

Le composé **16** (1eq. - 0.05 mmol) est pesé dans un schlenk séché sous vide puis conditionné sous argon, puis dissout dans 0.5 mL de chloroforme fraîchement distillé.

Le triméthoxysilane (5 eq.) préalablement distillé est ensuite ajouté à la solution, suivi du catalyseur de Karstedt (0.025 eq. en Pt). Le schlenk est ensuite scellé, et le milieu réactionnel est agité 3h à 60°C.

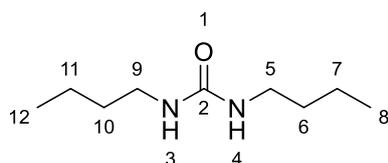
Le solvant et l'excès de triméthoxysilane sont ensuite évaporé à la rampe à vide afin d'obtenir le composé sous forme de produit huileux et noirâtre.

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 3.56 (s, 9H, **28-30**) ; 3.13-3.01 (m, 4H, **10**, **15**) ; 1.50-1.33 (m, 4H, **16**, **9**) ; 1.21 (m, 20H, **2-8**, **17-19**) ; 0.82 (t, 3H, **20**) ; 0.63 (m, 2H, **1**)

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃, δppm) : 159.20 (**12**) ; 50.49 (**28-30**) ; 40.69-40.61 (**10**, **15**) ; 33.17-26.73 (**3-9**, **16-19**) ; 22.65 (**2**) ; 14.04 (**20**) ; 9.18 (**1**)

RMN ²⁹Si (59MHz, CDCl₃, δppm) : -41.31 (**24**)

❖ Synthèse du composé **20**Masse molaire : 172.16 g.mol⁻¹

Rendement = 60%

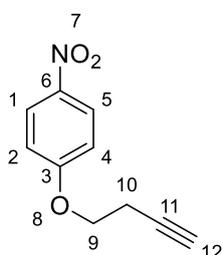
Aspect : solide granuleux

L'isocyanate **18** (1 eq. – 1 mmol) est ajouté au goutte à goutte à une solution d'amine **19** (1 eq.) dans le dichlorométhane (2 mL) à 0°C. Le mélange est laissé revenir à température ambiante puis l'agitation est poursuivie durant 12h.

Le solvant est éliminé sous pression réduite et le produit est obtenu sous la forme d'un solide blanc cristallin.

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 5.84 (br, 2H, **3, 4**) ; 3.07 (t, 4H, **5, 9**) ; 1.39-1.29 (m, 8H, **6, 7, 9, 10**) ; 0.84 (t, 6H, **8, 12**)

❖ Synthèse du composé **23**Masse molaire : 191.19 g.mol⁻¹

Rendement : 68%

Aspect : Poudre blanche légèrement jaune

A une solution de 4-nitrophénol **21** (1eq.- 7.2 mmol) dans le toluène anhydre sous argon (45 mL) à 0°C est ajouté le 3-butyn-1-ol **22** (1.1 eq.)

Sont ensuite ajoutés la triphénylphosphine (1.1 eq.) et le DIAD (1.1 eq.) en solution dans 10 mL de toluène anhydre et à 0°C au goutte à goutte.

La solution est laissée revenir à TA puis l'agitation est poursuivie durant 20h.

Le produit obtenu est purifié sur colonne de silice (dépôt solide) par un mélange pentane/acétate d'éthyle (gradient de 98 : 2 à 90 : 10).

Analyses :

RMN ^1H (300MHz, CDCl_3 , δppm) : 8.21 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, **1**, **5**) ; 6.98 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, **2**, **4**) ; 4.19 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H, **9**) ; 2.74 (td, $J = 6.9$ Hz, 2.7 Hz, 2H, **10**) ; 2.07 (t, $J = 6.9$ Hz, 1H, **12**)

RMN ^{13}C (75MHz, CDCl_3 , δppm) : 163.6, 142.0, 126.1, 114.7, 78.7, 70.5, 66.8, 19.6

Le DMF est évaporé sous pression réduite jusqu'à obtenir un liquide visqueux.

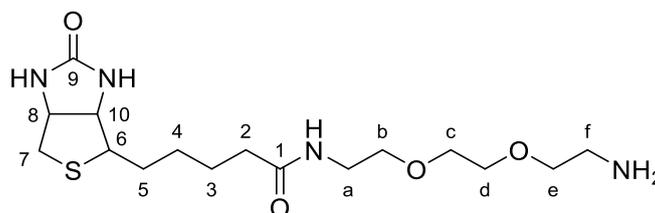
Le brut est purifié sur colonne de silice par un mélange CH₂Cl₂/MeOH (90 :10). R_f = 0.47

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 4.52 (dd, 1H, **8**) ; 4.33 (dd, 1H, **10**) ; 3.63 (s, 4H, **c, d**) ; 3.53 (m, 4H, **b, e**) ; 3.40 (t, 2H, **a**) ; 3.24 (m, 3H, **6, f**) ; 2.95 (dd, 1H, **7a**) ; 2.72 (d, 1H, **7b**) ; 2.24 (t, 2H, **2**) ; 1.69 (m, 4H, **4, 5**) ; 1.45 (s, 11H, **3, i**)

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃, δppm) : 174.71 (**g**) ; 173.54 (**1**) ; 164.67 (**9**) ; 69.86-69.22 (**a, c, d, e**) ; 61.95 (**10**) ; 60.21 (**8**) ; 55.60 (**6**) ; 39.82 (**f**) ; 39.66 (**7**) ; 38.89 (**b**) ; 35.33 (**2**) ; 28.36 (**3**) ; 28.10 (**5**) ; 27.40 (**i**) ; 24.90 (**4**)

❖ Synthèse du composé **28**



Masse Molaire : 375.5 g.mol⁻¹

Rendement : 100%

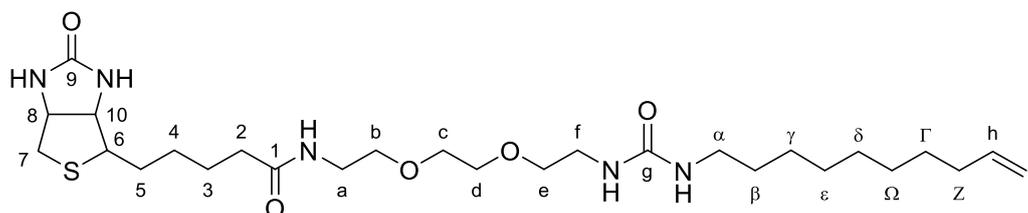
Aspect : Huile orange visqueuse

L'acide trifluoroacétique (~52 eq.) est ajouté au goutte-à-goutte au composé **27** à 0°C. Après addition, le mélange est agité à TA durant 2 heures. Le TFA est ensuite éliminé sous pression réduite et le résidu est dilué dans l'éther diéthylique (30 mL).

La solution organique est lavée à l'eau (3x20 mL), puis les fractions aqueuses combinées sont concentrées sous pression réduite, et le produit pur est obtenu après lyophilisation.

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, MeOD d₄, δppm) : 4.51 (m, 1H, **8**) ; 4.32 (dd, 1H, **10**) ; 3.73 (t, 2H, **b**) ; 3.68 (s, 4H, **c, d**) ; 3.59 (t, 2H, **e**) ; 3.39 (t, 2H, **b**) ; 3.23 (m, 1H, **6**) ; 3.14 (t, 2H, **f**) ; 2.95 (dd, 1H, **7a**) ; 2.72 (dd, 1H, **7b**) ; 2.24 (t, 2H, **2**) ; 1.67 (m, 4H, **4, 5**) ; 1.46 (m, 2H, **3**)

❖ Synthèse du composé **29**

Masse Molaire : 556.7 g.mol⁻¹

Rendement : 55%

Aspect : Poudre blanche

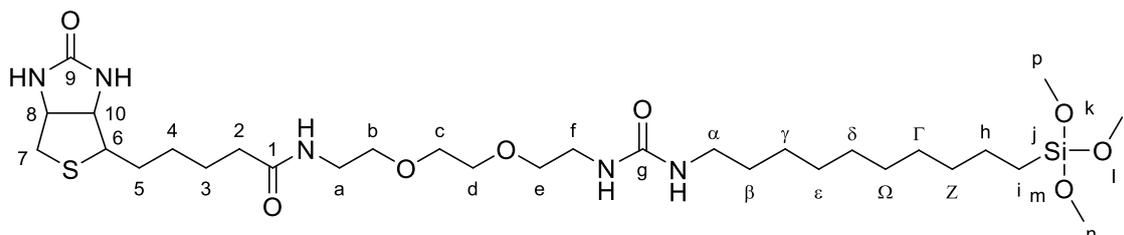
À une solution de **28** (1eq.) dans le DMF anhydre (7.5 mL) est ajouté sous atmosphère inerte la triéthylamine (1.5 eq.) Le mélange est agité à TA durant 1 heure. L'isocyanatodéc-1-ène **11** (1.2eq) dans le DMF anhydre (7.5 mL) est ensuite ajouté à la solution et l'agitation est poursuivie durant 12 heures.

Le DMF est évaporé sous pression réduite et le solide obtenu est lavé dans un premier temps au pentane puis au pentane au reflux.

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 5.84 (m, 1H, **h**) ; 4.98 (m, 2H, **i**) ; 4.54 (dd, 1H, **8**) ; 4.36 (m, 1H, **10**) ; 3.61 (s, 4H, **c, d**) ; 3.59 (m, 2H, **b**) ; 3.47 (br., 2H, **e**) ; 3.40 (m, 2H, **a**) ; 3.18-3.09 (m, 5H, **f, 6, α**) ; 2.94 (dd, 1H, **7a**) ; 2.76 (d, 1H, **7b**) ; 2.28 (t, 2H, **2**) ; 2.07 (dd, 2H, **Z**) ; 1.72 (m, 4H, **4, 5**) ; 1.44 (t, 2H, **3**) ; 1.39-1.28 (m, 12H, **β, δ, γ, ε, Γ, Ω**)

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃, δppm) : 173.77 (**g**) ; 164.12 (**1**) ; 159.12 (**9**) ; 139.19 (**h**) ; 114.16 (**i**) ; 70.94-69.79 (**a, c, d**) ; 61.81 (**10**) ; 60.19 (**8**) ; 55.51 (**f**) ; 40.44-40.15 (**7, e, b, α**) ; 38.13 (**2**) ; 33.78 (**Z**) ; 30.32-28.02 (**β, δ, γ, ε, Γ, Ω**) ; 27.95 (**3**) ; 26-97-27.47 (**4, 5**)

❖ Synthèse du composé **30**

Le composé **29** (1eq. - 0.05 mmol) est pesé dans un schlenk séché sous vide puis conditionné sous argon, puis dissout dans 0.5 mL de chloroforme fraîchement distillé.

Le triméthoxysilane (5 eq.) préalablement distillé est ensuite ajouté à la solution, suivi du catalyseur de Karstedt (0.025 eq. en Pt). Le schlenk est ensuite scellé, et le milieu réactionnel est agité 3h à 60°C.

Le solvant et l'excès de triméthoxysilane sont ensuite évaporé à la rampe à vide afin d'obtenir le composé sous forme de produit huileux et noirâtre.

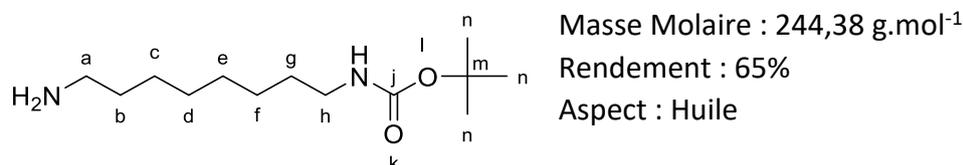
Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 4.52-4.48 (m, 1H, **8**) ; 4.33-4.29 (m, 1H, **10**) ; 3.60-3.51 (m, 15H, **b, c, d, n, o, p**) ; 3.47 (br., 2H, **e**) ; 3.36-3.32 (m, 2H, **a**) ; 3.16-3.07 (m, 5H, **f, 6, α**) ; 2.93-2.91 (dd, 1H, **7a**) ; 2.70-2.68 (d, 1H, **7b**) ; 2.22 (t, 2H, **2**) ; 1.69-1.65 (m, 4H, **4, 5**) ; 1.44 (t, 2H, **3**) ; 1.36-1.24 (m, 16H, **Z, β, δ, γ, ε, Γ, Ω, h**) ; 0.66-0.60 (m, 2H, **i**)

RMN ¹³C (75MHz, CDCl₃, δppm) : -43-69.84 (**a, c, d**) ; 61.93 (**10**) ; 60.37 (**8**) ; 55.64 (**f**) ; 50.61 (**n, o, p**) ; 40.44-40.15 (**7, e, b, α**) ; 37.47 (**2**) ; 33.28-22.73 (**Z, β, δ, γ, ε, Γ, Ω, 3, 4, 5, h**) ; 22.73 (**i**) ; 21.45 (**i**) ; 8.65 (**j**)

RMN ²⁹Si (59MHz, CDCl₃, δppm) : -41.21 (**j**)

❖ Synthèse du composé **26'**

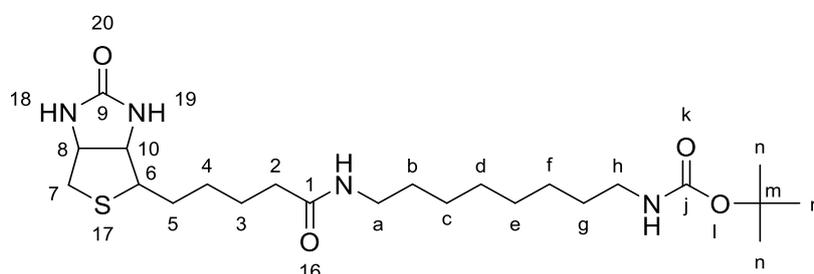


À une solution de diamino-octane **25'** (5 eq. – 11.5 mmol) dans le chloroforme (50 mL) à 0°C est lentement ajoutée une solution de di-*tert*-dibutyle dicarbonate (1eq.) dans le dichlorométhane (10 mL). L'addition s'effectue à 0°C durant 6h, puis l'agitation est poursuivie à TA durant 12h.

Le brut est concentré sous pression réduite avant d'être purifié sur colonne de silice par un mélange CHCl₃/MeOH/TEA (92 : 5 : 3). R_f = 0.29

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 4.55 (br, NH₂) ; 3.13-3.06 (m, 2H, **h**) ; 2.68 (t, 2H, **a**) ; 1.45 (s, 12H, **b, c, d, e, f, g**) ; 1.29 (s, 9H, **n**)

❖ Synthèse du composé **27'**

Masse Molaire : 470.61 g.mol⁻¹

Rendement : 54%

Aspect : Solide blanchâtre

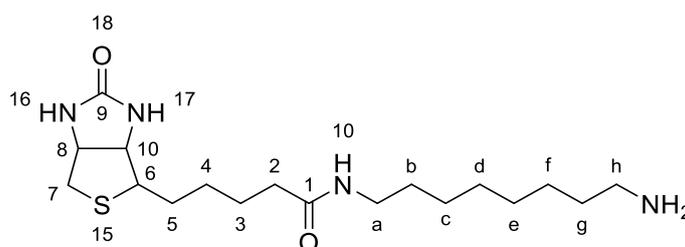
À une solution de biotine (1eq. – 1 mmol) dans le diméthylformamide sont ajoutés sous atmosphère inerte le N-hydroxysuccinimide (1.2 eq.) puis le dicyclocoxydiimide (1.2 eq.). Après 12 heures d'agitation à TA la solution est filtrée afin d'enlever la DCU, puis le composé **26'** est ajouté au filtrat. Le milieu est laissé sous agitation, à TA et sous atmosphère inerte durant 12 heures.

Le DMF est évaporé sous pression réduite jusqu'à obtenir un liquide visqueux.

Le brut est purifié sur colonne de silice par un mélange CH₂Cl₂/MeOH (90 :10). R_f = 0.47

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, CDCl₃, δppm) : 4.55-4.51 (m, 1H, **8**) ; 4.36-4.31 (m, 1H, **10**) ; 3.24-3.15 (m, 3H, **6, a**) ; 3.13-3.06 (m, 2H, **h**) ; 2.94-2.88 (m 1H, **7a**) ; 2.77-2.73 (m, 1H, **7b**) ; 2.20 (t, J = 7.3 Hz, 2H, **2**) ; 1.73-1.62 (m, 4H, **4, 5**) ; 1.42 (s, 12H, **3, b, c, d, e, f, g**) ; 1.29 (s, 9H, **n**)

❖ Synthèse du composé **28'**

Masse Molaire : 371.56 g.mol⁻¹

Rendement : 100%

Aspect : Huile visqueuse

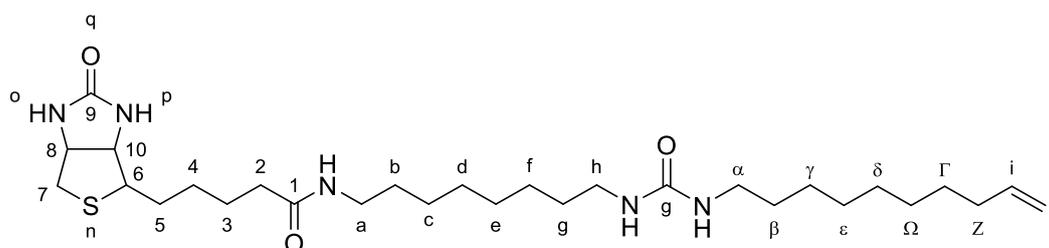
L'acide trifluoroacétique (~52 eq.) est ajouté au goutte-à-goutte au composé **27'** à 0°C. Après addition, le mélange est agité à TA durant 2 heures. Le TFA est ensuite éliminé sous pression réduite et le résidu est dilué dans l'éther diéthylique (30 mL).

La solution organique est lavée à l'eau (3x20 mL), puis les fractions aqueuses combinées sont concentrées sous pression réduite, et le produit pur est obtenu après lyophilisation.

Analyses :

RMN ¹H (300MHz, MeOD d4, δppm) : 4.39-4.34 (m, 1H, **8**) ; 4.19-4.15 (m, 1H, **10**) ; 3.11-3.00 (m, 3H, **6, a**) ; 2.82-2.75 (m 1H, **7a, h**) ; 2.59-2.55 (m, 1H, **7b**) ; 2.06 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, **2**) ; 1.64-1.23 (m, 18, **3, 4, 5, b, c, d, e, f, g**)

❖ Synthèse du composé **29'**



Masse Molaire : 551.84 g.mol⁻¹

Rendement : 55%

Aspect : Poudre blanche

À une solution de **28'** (1eq.) dans le DMF anhydre (7.5 mL) est ajouté sous atmosphère inerte la triéthylamine (1.5 eq.). Le mélange est agité à TA durant 1 heure. L'isocyanatodéc-1-ène **11** (1.2eq) dans le DMF anhydre (7.5 mL) est ensuite ajouté à la solution et l'agitation est poursuivie durant 12 heures.

Le DMF est évaporé sous pression réduite et le solide obtenu est lavé dans un premier temps au pentane puis au pentane au reflux.

Analyses :

RMN ¹H (600MHz, CDCl₃+MeOD d4, δppm) : 5.63-5.56 (m, 1H, **i**) ; 4.80-4.70 (m, 2H, **j**) ; 4.36-4.34 (m, 1H, **8**) ; 4.19-4.14 (m, 1H, **10**) ; 3.01-2.93 (m, 8H, **h, a, 6, α**) ; 2.75-2.72 (m, 1H, **7a**) ; 2.57-2.55 (m, 1H, **7b**) ; 2.02 (td, *J* = 7.3 Hz, 2.8 Hz, 2H, **2**) ; 1.85-1.81 (m, 2H, **Z**) ; 1.56-1.39 (m, 4H, **4, 5**) ; 1.30-1.10 (m, 26H, **3, b, c, d, e, f, g, β, δ, γ, ε, Γ, Ω**)

d- Protocole général de greffage

Les substrats sont tout d'abord lavés à l'eau MilliQ puis lavés au chloroforme dans un bain à ultrasons (37 kHz) durant 15 minutes. Après séchage, ils sont activés par UV/O₃ ($\lambda = 185\text{-}254$ nm)

Une fois les surfaces activées de la sorte, elles sont rapidement introduites dans le réacteur double enveloppe sous vide pendant 1h30 à la température décidée pour le greffage.

Un premier schlenk **A** est séché sous vide puis conditionné sous argon avant d'être rempli par 40 mL de solvant de greffage anhydre (dans le cas des présents travaux, le chloroforme).

L'organosilane fraîchement préparé comme décrit dans les protocoles précédents est resolubilisé dans le solvant de greffage anhydre par 2x5 mL et transféré dans le schlenk **A** (contenant maintenant une solution d'organosilane dans 50 mL de solvant).

Un second schlenk, noté **B**, est séché puis conditionné sous argon. On prépare dans celui-ci une solution d'acide trichloroacétique (510-6 mol pour un réacteur de 200 mL) dans 50 mL de solvant de greffage.

Le réacteur double enveloppe contenant les surfaces activées sous vide est mis sous atmosphère d'argon puis rempli par 100 mL de solvant de greffage anhydre. Les contenus du schlenk **A** puis **B** sont ensuite injectés dans le réacteur. La fin de l'injection du contenu du schlenk **B** marque le point de départ du greffage.

Le réacteur contient donc un volume total de 200 mL de solution d'organosilane à $2.4 \cdot 10^{-4}$ mol.L⁻¹.

Après un temps de greffage décidé, les substrats sont sortis du réacteur puis lavés aux ultrasons 2x5 min par le solvant de greffage, 2x5 min à l'eau MilliQ, puis 2x5 min au chloroforme. Ils sont ensuite séchés par un jet d'azote sec sous une hotte à flux laminaire, et stockés à l'abri des poussières.

e- Protocole général de click des surfaces terminées par des groupements N₃

Les substrats sont tout d'abord placées dans des boites de pétris puis recouverts par 7.7 mL d'un mélange DMSO/H₂O à 20% volumique en DMSO. 0.25 mL d'une solution en biotine-alcyne à 3.55 mM sont ajoutés au mélange, puis 7.1 μ L d'une solution de CuSO₄.5H₂O à 12.5 mM et enfin 35.5 μ L d'une solution d'ascorbate de sodium à 10 mM.

Les substrats sont mis sous agitation à TA, à l'obscurité, sur un agitateur orbitalaire durant 12h.

Les surfaces sont ensuite lavées aux ultrasons 2x5 min dans le DMSO, 2x5 min dans l'eau MilliQ, 2x5 min dans l'éthanol et 2x5 min dans le chloroforme. Elles sont ensuite séchées par un flux d'azote sec sous une hotte à flux laminaire et stockées à l'abri des poussières.

f- Protocoles de tests d'activité biologique des surfaces biotinylées

Les substrats biotinylés sont tout d'abord incubés dans une solution de streptavidine-HRP dans le PBS à $1.24 \cdot 10^{-8}$ mol.L⁻¹ à 37°C durant une heure. Après incubation, les surfaces sont lavées abondamment à l'eau distillée, et la solution d'incubation est mise de côté.

Pour le test « direct » de l'activité des surfaces, les surfaces incubées sont plongées dans 6 mL de solution d'OPD/H₂O₂ dans le PBS, à 25 mM en OPD et 12.5 mM en H₂O₂, durant 30 minutes à température ambiante et dans l'obscurité. Les surfaces sont ensuite retirées du bain de révélation et lavées à l'eau distillé ; et ce dernier est quenché par 1 mL de solution d'acide chlorhydrique à 3M. L'absorbance de la solution ainsi obtenue est mesurée par un spectromètre à 492 nm en observant un facteur de dilution (150 µL dilué à 3 mL). Grace aux courbes de calibration réalisées dans les mêmes conditions que ce test, il est alors possible de relier l'absorbance mesurée au nombre de streptavidine-HRP recouvrant la surface biotinylée.

Pour le test « indirect », 2.9 mL du bain d'incubation préalablement conservé est dosé par 3.1 mL de solution d'OPD/H₂O₂ à 0.4 mM en OPD et 0.2 mM en H₂O₂. La révélation s'effectue durant 45 secondes à température ambiante, puis la solution est quenchée par 1 mL d'acide chlorhydrique à 3M. L'absorbance de la solution est directement mesurée, sans dilution, à 492 nm.

Titre : Synthèse de nano-films biofonctionnels pour l'immobilisation spécifique d'espèces biologiques

Résumé

Le contrôle des propriétés physicochimiques et de l'état de surface des solides constituent un enjeu majeur pour le développement des biotechnologies, et notamment des bio-capteurs. Pour des applications en analyse et diagnostic biologique, la fonctionnalisation des surfaces à base de silicium peut être réalisée grâce à la formation d'un nano-film organique appelé SAM (Self-Assembled Monolayer). L'objectif de ce travail de thèse est ainsi de synthétiser des monocouches sur des substrats de silice afin de les rendre biofonctionnels en vue de développer une plateforme de biodétection polyvalente.

Pour ce faire, deux types d'agents de couplages ont été envisagés : l'un possédant un motif azoture et l'autre une biotine. L'obtention de ces deux types de molécules a fait l'objet d'un travail de synthèse permettant d'aboutir à de nouveaux organosilanes fonctionnels directement greffables sur des surfaces de SiO₂. La biofonctionnalité est introduite sur le substrat par la biotine, soit directement lors de la formation de la SAM, soit par chimie click sur les monocouches fonctionnalisées par des azotures.

Les différentes surfaces obtenues ont ensuite été caractérisées par Spectroscopie Infrarouge de Réflexion–Absorption par Modulation de Polarisation (PM-IRRAS) et par Microscopie de Force Atomique (AFM). La bioactivité des SAMs biotinylées a enfin été évaluée par un protocole mettant en jeu une streptavidine modifiée par une enzyme (la HRP) capable de catalyser des réactions d'oxydoréduction de molécules chromogènes.

Mots clefs : Monocouches auto-assemblées (SAMs), bio-capteurs, hydrosilylation, biotine, azoture, chimie click, biofonctionnalisation

Title : Synthesis of biofunctionalized nanofilms for the immobilization of biomolecules

Abstract

Control of surface physicochemical properties is a key aspect for the development of many biotechnological tools, such as biosensors. For analysis and diagnostic, the functionalization of silica-based surfaces may be carried out through the creation of an organic nano-film named a Self-Assembled Monolayer (SAM). The main goal of this PhD work is thus to synthesize monolayer on SiO₂ substrates in order give them biofunctionality, aiming at developing a versatile biodetection platform.

In order to do so, we focused on the synthesis of two types of coupling agents, either bearing an azide moiety or a biotin. This organic synthesis work led to two new sorts of functional organosilanes which can be directly grafted onto silica surfaces. Biofunctionality itself is introduced by the biotin, either through the formation of the monolayer or through click chemistry on azide-functionalized SAMs.

Said surfaces were then fully characterized using Polarization Modulation Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy (PM-IRRAS) an Atomic Force Microscopy (AFM). Bioactivity of biotinylated surfaces was then monitored using streptavidin conjugated with HRP in order to catalyze the redox reaction of chromogenic substrates.

Key words : Self-assembled monolayers (SAMs), biosensors, hydrosilylation, biotin, azide, click chemistry, biofunctionalization