

N° d'ordre : 4393

THÈSE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

Par Hakim, RAHMA

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : CHIMIE ORGANIQUE

Synthèse de nanofilms à greffons dendritiques pour l'immobilisation de biomolécules

Directeur de recherche : HEUZÉ, Karine et VELLUTINI, Luc

Soutenue le : 04 octobre 2012

Devant la commission d'examen formée de :

M. GABOYARD, Manuel	Directeur R&D, (Ademtech, SA)	
Mme. HEUZÉ, Karine	Chargé de recherche au CNRS (Bordeaux I)	
M. MAILLEY, Pascal	Ingénieur de recherche CEA (CEA-LITEN-DTS Le Bourget du Lac)	Rapporteur
M. PAPON, Eric	Professeur (Bordeaux I)	
M. VELLUTINI, Luc	Maître de Conférences (Bordeaux I)	
M. WONG CHI MAN, Michel	Directeur de recherche au CNRS (Université de Montpellier II)	Rapporteur

Remerciements

Cette thèse a été effectuée à l'Institut des Sciences Moléculaire (ISM) dans le groupe Chimie Moléculaire et Matériaux (C2M) à l'université de Bordeaux 1 sous la direction de madame **Karine Heuzé** et monsieur **Luc Vellutini**. **Karine** et **Luc**, je tiens à vous remercier de m'avoir encadré durant ces trois années de thèse et de m'avoir apporté votre expérience de chercheurs. J'ai beaucoup appris grâce à vous, notamment grâce aux nombreux débats scientifiques enrichissants que nous avons eu ensemble. Je vous en suis extrêmement reconnaissant. Sans vous je n'en serais pas arrivé là.

Je tiens à remercier **Thierry Toupance**, chef du groupe C2M et **Bernard Bennetau**, responsable de la thématique chimie de surface ainsi que tous les permanents du groupe (**M. Degueil**, **Y. Nicolas**, **C. Olivier**, **S. Poix**, **A. Thienpont**, **M. Birot**, **H. Deleuze**, **L. Thomas**) de m'avoir accueilli dans les meilleures conditions au sein du laboratoire.

Je remercie également la Région Aquitaine et le CNRS d'avoir financé ce sujet de thèse, ainsi que la société Ademtech pour leur collaboration. **Manuel Gaboyard** et **Thomas Duluc** (Ademtech) ont participé activement à l'élaboration de ce travail dans la partie nanoparticules magnétiques.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres du jury d'avoir accepté de juger ce travail de recherche : monsieur **Pascal Mailler** et monsieur **Michel Wong-Chi-Man** en qualité de rapporteur, madame **Marie-Hélène Delville** en tant que présidente de jury et monsieur **Manuel Gaboyard** d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse.

J'adresse mes remerciements à Mme **Colette Belin** pour les mesures AFM et surtout pour les moments de discussions dans la salle de manipulation. **Colette**, vous avez su me remonter le moral quand il le fallait, un grand merci à vous !!!!!!! Mes remerciement vont également à monsieur **Thierry Buffeteau** et madame **Gwénaëlle Lebourdon** pour les mesures d'infrarouge, pour leur gentillesse et leurs disponibilités. Madame **Odile Babot**, merci pour les mesures de thermogravimétrie mais surtout pour votre bonne humeur et votre joie de vivre.

Je remercie tous les stagiaires avec qui j'ai travaillé : **Roxane** (on a passé de bons moments, je te souhaite de la réussite dans ton futur), **Aurore** et **Thomas**. Mes remerciements vont également à tous les thésards et postdoc du laboratoire pour les réunions de non permanents : **Matthieu**, merci d'être mon compagnon de bureau et bonne chance pour ta thèse, **Liuba**, hi, hi, hi, toi aussi bonne chance, tu parles bien français maintenant, continue comme ça, **Anaëlle** alias Hakim 2, ne t'inquiètes pas, tout va bien se passer pour ta thèse, Juju (**Julien**), merci pour tout les débats philosophiques et scientifiques qu'on a eu ensemble, je te souhaite une belle carrière de chercheur, Say me (**Samuel**), je ne t'ai pas oublié, je te souhaite plein de bonheur, **Liuda**, bon courage pour ta soutenance de thèse, tu y es presque !! Je remercie également **Tamez**. J'adresse mes remerciements aux anciens du Laboratoire, **Daniel**, **Marc**, **Sergei**, **Francisco**, **Claire**, **Dorra** et **Etienne**.

Pour clore les remerciements, je pense particulièrement à mes amis et ma famille d'être toujours là pour moi, **Jessica** (à qui j'ai promis que cette expérience ne se reproduira plus jamais), **Sihem**, **Mustapha**, à tous les **Rahma** et tous les **Ounzain** partout dans le monde et à tous mes cousins, à ma belle famille, à **Réda**, **Benoit**, **Cassandra**, **Younes**, **Fred**, **Cynthia**, **Maud**, **Fernand**, **Aurélien**, **Thomas**, **Nicolas**, **Moumou**, **Mélanie**, **Youssef**, et **Marion** ainsi que tous les habitants de mon quartier natal « La **Gauloise** », **Moussa**, **Mourad**, **Badrou**, **Mehdi**, **Karim**, **Aghiles**, **Mounir**....

*Dédiée à ma défunte mère **Fatiha Ounzain Rahma**.*

Sommaire

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

Chapitre I. Etude bibliographique	7
---	---

1. Introduction :.....	9
2. Classification des dendrons :.....	10
2.1. Dendrons polyamines :.....	11
2.2. Dendrons polyamides :.....	11
2.3. Dendrons polyéthers :.....	14
2.4. Dendrons polyesters :.....	15
2.5. Dendrons polycarbosilanes :.....	16
3. Greffage des dendrons sur un support solide :.....	16
3.1. Stratégie de greffage des dendrons :.....	16
3.1.1. Première voie : Synthèse de dendrons à partir de la surface :.....	17
3.1.2. Deuxième voie : Synthèse de dendrons sur le support solide:	17
3.2. Greffage non-covalent :.....	18
3.2.1. Voie par adsorption physique :.....	18
3.2.2. Interaction ligand métal :.....	21
3.3. Greffage covalent :.....	24
3.3.1. Silanisation :.....	24
3.3.2. Cycloaddition de Huisgen (Chimie click) :.....	27
3.3.3. Couplage par une réaction d'estérification ou amidation :.....	27
4. Intérêts du greffage de dendrons sur une surface :.....	29
4.1. Contrôle de la mouillabilité :.....	29
4.2. Contrôle de l'espacement entre les fonctions :.....	30
4.3. Augmentation de la fonctionnalité de surface :.....	31
4.4. Adsorption de protéine :.....	33
4.5. Contrôle de la dispersion des nanoparticules :.....	34
5. Conclusion :.....	34

Chapitre II : Fonctionnalisation de surfaces SiO ₂ par des systèmes dendritiques ..	41
--	----

1. Introduction :.....	43
2. Rappel sur les surfaces de silice :.....	47
3. Synthèse :.....	49
3.1. Première approche	49
3.1.1. La synthèse du composé 11-Amino-1-undecène 4 :.....	49
3.1.2. Synthèse du dendron 5 :.....	51
3.1.3. Synthèse du dendron 6 :.....	51
3.1.4. Synthèse du dendron 7 :.....	52

3.1.5.	Synthèse des dendrons D₁ , D₂ et D₃ (hydrosilylation) :	53
3.1.6.	Synthèse des dendrons 8 et 9 :	56
3.1.7.	Synthèse des dendrons 10 et 11 :	56
3.2.	Deuxième approche :	57
3.2.1.	Synthèse de l'acrylate de nitrobenzyle (composé 12) :	57
3.2.2.	Synthèse du dendron 7 selon la 2 ^{ème} approche :	58
3.2.3.	Synthèse du dendron 11 selon la deuxième approche :	59
3.2.4.	Synthèse des dendrons D₄ et D₅ (hydrosilylation) :	59
4.	Modification chimique des surfaces :	60
4.1.	Substrats utilisés :	60
4.1.1.	Substrats PM-IRRAS :	60
4.1.2.	Substrats de silicium :	61
4.2.	Activation de la surface des substrats :	61
4.3.	Greffage des composés dendritiques :	62
4.3.1.	Effet du groupement silyle et du temps de réaction :	63
a.	Greffage du composé D₁ : surface SiO₂@D₁ :	63
b.	Greffage du composé D₂ : surface SiO₂@D₂ :	67
c.	Greffage du composé D₃ : surface SiO₂@D₃ :	70
4.3.2.	Effet de température sur le greffage du composé D₁ : surface SiO₂@D₁ :	74
4.3.3.	Effet de solvant sur le greffage du composé D₁ : surface SiO₂@D₁ :	76
4.3.4.	Stabilité de la couche greffée : surface SiO₂@D₁ :	79
4.4.	Greffage du décyltrichlorosilane : surface SiO₂@C10 :	81
4.4.1.	Effet de température : surface SiO₂@C10 :	82
4.4.2.	Effet de solvant (SiO₂@C10) :	84
4.5.	Greffage d'un système mixte dendritique (D₁) et decyltrichlorosilane (C10) : surface SiO₂@D₁C10 :	86
4.5.1.	Effet du temps de réaction : surface SiO₂@D₁C10 :	87
4.5.2.	Effet de température : surface SiO₂@D₁C10 :	89
4.5.3.	Effet de solvant : surface SiO₂@D₁C10 :	92
4.6.	Etude comparative de SiO₂@D₁ , SiO₂@C10 et SiO₂@D₁C10 :	94
4.7.	Greffage des composés dendritiques D₄ et D₅ : SiO₂@D₄ et SiO₂@D₅ :	96
5.	Conclusion :	98

Chapitre III. Biofonctionnalisation de surfaces SiO₂. 103

1.	Introduction :	105
2.	Immobilisation de NP-pA sur différentes surfaces planes :	106
2.1.	Immobilisation de NP-pA sur la surface greffée SiO₂@D₁ :	107
2.1.1.	Photodéprotection de l'acide carboxylique :	107
2.1.2.	Activation de l'acide carboxylique :	109
2.1.3.	Immobilisation des NP-pA :	110
2.2.	Immobilisation de NP-pA sur la surface mixte SiO₂@D₂C10/H :	112
2.2.1.	Photo-déprotection de la fonction acide carboxylique :	113
2.2.2.	Activation de l'acide carboxylique :	114
2.2.3.	Immobilisation des NP-pA :	115
2.3.	Immobilisation des NP-pA sur la surface mixte SiO₂@D₁C10/I :	116

2.3.1.	Photo-déprotection de l'acide carboxylique :	117
2.3.2.	Activation des fonctions acide carboxyliques :	118
2.3.3.	Immobilisation des NP-pA :	118
2.4.	Etude d'immobilisation des NP-pA sur la surface SiO₂@C10 :	120
3.	Immobilisation de NP-PEG-NH ₂ :	123
3.1.	Etude d'adsorption physique des NP-PEG-NH ₂ sur des surfaces SiO₂@C10 :	123
3.2.	Immobilisation des NP-PEG-NH ₂ sur les surfaces greffées par les composés D₁ et D₅ :	125
3.3.	Immobilisation des NP-PEG-NH ₂ sur des surfaces greffées avec le système mixte :	127
4.	Conclusion :	129

Chapitre IV. Fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques par des agents de couplage dendritiques..... 133

1.	Introduction :	135
2.	Rappel bibliographique sur la stabilisation de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer 136	
2.1.	Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer :	136
2.2.	Modification de surface d'oxyde de fer par des molécules organiques	137
2.3.	Modification de surface d'oxyde de fer par enrobage	138
2.3.1.	Enrobage par un matériau polymère :	138
2.3.2.	Enrobage par un matériau inorganique :	138
2.4.	Présentation des MNPs utilisées dans nos travaux de Thèse :	139
3.	Greffage sur les MNPs d'une sonde fluorescente :	141
3.1.	Synthèse du composé P :	142
3.2.	Greffage du composé P sur les MNPs :	143
3.3.	Etude de fluorescence :	145
3.4.	Microscopie électronique à transmission :	148
3.5.	Potentiel zêta :	149
4.	Immobilisation de biomolécules : 1 ^{ère} stratégie	151
4.1.	Greffage du composé D₁ :	152
4.2.	Greffage du composé D₂ :	157
4.3.	Greffage du composé D₆ :	160
5.	Immobilisation de biomolécules : 2 ^{ème} stratégie	165
5.1.1.	Synthèse du composé D₇ :	166
5.1.2.	Greffage et déprotection du composé D₇ :	166
5.2.	Synthèse et greffage des composés APTES , AUTES , D₈ et D₉ : voie hydro-alcoolique	171
5.2.1.	Synthèse d' AUTES , D₈ et D₉ :	171
5.2.2.	Greffage de l' APTES , AUTES , D₈ et D₉ sur les MNPs :	173
5.3.	Introduction des fonctions COOH :	178
5.4.	Immobilisations de biomolécules :	181
6.	Conclusion :	187

Conclusion générale.....	193
Partie expérimentale	199
Annexes.....	237

Introduction générale

Introduction générale :

Dans le domaine de la biotechnologie, la modification chimique de surface représente un enjeu majeur dans la fabrication de nouveaux matériaux en leur apportant de nouvelles propriétés chimiques ou physiques. Ainsi, une maîtrise de la modification chimique de surface peut, par exemple, améliorer l'immobilisation de molécules biologiques (protéines, anticorps) sur un support solide, cette propriété étant exploitée dans un grand nombre d'applications, comme les biocapteurs ou la protéomique qui suscitent tous deux l'intérêt de nombreux groupes de recherche au niveau international et bien sur au Laboratoire.¹

La recherche et le développement de nouveaux biocapteurs a connu un essor exponentiel ces dernières années, en raison de leurs intérêts économiques considérables dans le domaine médical, dans l'agro-alimentaire ou dans le contrôle environnemental.² Cependant, la sensibilité des biocapteurs dépend fortement de la chimie à l'interface matériau/biomolécule. Maîtriser cette chimie est la clé qui contribuera à améliorer les performances du biocapteur.³ Par conséquent, l'immobilisation contrôlée de molécules biologiques sur des substrats solides est essentielle pour la bio-détection et la construction du biocapteur. Les surfaces SiO_2 sont souvent utilisées comme substrats solides des biocapteurs.

La protéomique, quant à elle, est une science offrant la possibilité de séparer, d'identifier, de caractériser et de quantifier les protéines exprimées par une cellule à un moment donné.⁴ La séparation étant une étape clé dans ce processus, l'utilisation de nanoparticules magnétiques (MNPs) est de plus en plus répandue dans ce domaine. En effet, la séparation par aimantation⁵ présente plusieurs avantages par rapport aux autres systèmes de séparation tels que la chromatographie ou la centrifugation : elle est généralement très simple à mettre en œuvre, très rapide et elle peut être utilisée dans des mélanges physiologiques complexes. Au Laboratoire, nous utilisons des MNPs de type cœur-écorce de 300 nm comportant une écorce de la silice (SiO_2) et un cœur magnétique de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Ces MNPs sont développées par la société Ademtech,⁶ avec qui nous avons une collaboration scientifique sur ce sujet de recherche.

La modification des surfaces SiO_2 (substrats plans ou MNPs) est réalisée par des agents de couplage organosiliciés fonctionnels permettant l'immobilisation des molécules biologiques en surface.⁷ Les agents de couplage sont greffés sur les supports par une réaction d'hydrolyse condensation avec les fonctions silanols (Si-OH) de surface pour former des

liaisons covalentes de type siloxane (Si-O-Si). La modification de surface SiO_2 est souvent réalisée à partir de molécules linéaires commerciales.

Cependant, il a été montré dans la littérature que l'utilisation de structures dendritiques⁸ permettait d'augmenter la biofonctionnalisation des surfaces par rapport à des structures linéaires.⁹ De ce fait, notre travail a consisté à synthétiser et à greffer des agents de couplage de type dendrons sur des surfaces SiO_2 . Les dendrons que nous avons synthétisés sont des molécules arborescentes composées d'un point focal (fonction silane) et de fonctions périphériques d'intérêt. Le point focal est une fonction chloro- ou alkoxysilyle (Si-X_3 ; $\text{X} = \text{Cl}, \text{OMe}, \text{OEt}$) permettant l'accroche avec la surface SiO_2 et la périphérie est constituée de fonctions acide carboxylique permettant l'immobilisation des molécules biologiques. Le but de cette démarche est de multiplier les sites d'accroches des molécules biologiques sur la surface SiO_2 des substrats plans et des MNPs. Deux voies de synthèse peuvent être utilisées pour la préparation de matériaux greffés par des dendrons : la voie divergente qui consiste à construire le dendron à partir de la surface du matériau (synthèse en phase solide) et la méthode convergente consistant en la synthèse préalable des dendrons, suivie de leur greffage sur les surfaces SiO_2 . Nous avons choisi la deuxième stratégie car elle permet de limiter les défauts du matériau final et également de caractériser les dendrons par différentes techniques comme la RMN en solution ou par la spectrométrie de masse.

Ce manuscrit s'organise en quatre chapitres :

Dans le chapitre I, nous présenterons une étude bibliographique. Il s'agira de décrire les différents types de dendrons, leurs structures, ainsi que leurs principales méthodes de synthèses et les différentes stratégies de leurs greffages sur un support solide. Et enfin, nous verrons l'intérêt d'utiliser des dendrons sur un support solide, en particulier les propriétés qui ont été exacerbées dans diverses applications dans les biotechnologies.

Le chapitre II sera consacré à la synthèse et au greffage de dendrons sur un support de silice plan. Dans ces travaux, nous nous intéresserons à des dendrons de première et de seconde génération constitués respectivement de deux et quatre branches, portant au point focal différents groupements silyle et en périphérie des fonctions acide protégées par un groupement photolabile. Différentes techniques seront utilisées pour caractériser les surfaces greffées : l'angle de contact, la spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption par modulation de polarisation (PM-IRRAS) et la microscopie à force atomique (AFM).

Dans le chapitre III, nous étudierons l'immobilisation d'une molécule biologique (protéine A) sur les surfaces SiO_2 modifiées dans le chapitre II. Nous verrons en particulier une étude de résolution structurale de la nano-structuration obtenue sur certaines surfaces du chapitre II.

Le chapitre IV sera consacré à la modification de surface SiO_2 de MNPs ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ / SiO_2) par des agents de couplage dendritiques de première génération constitués de deux branches et portant au point focal différents groupements silyle et en périphérie des fonctions acide carboxylique. Deux stratégies seront explorées pour le greffage des dendrons : en milieu anhydre et en milieu hydroalcoolique. Enfin, leur aptitude à immobiliser des molécules biologiques (protéine A et anticorps) sera étudiée. L'analyse de l'activité biologique des biomolécules immobilisées sera réalisée en collaboration avec la société Ademtech.

Bibliographie :

- [1] (a) L.S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 4025. (b) M. Fransconi, F. Mazzei, T. Ferri, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398, 1545. (c) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 1775.
- [2] (a) U. E. Spichiger-Keller, *Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications*, **1998**, WILEY-VCH. (b) S. R-Mozaz, M-P. Marco, M. J. Lopez de Alda, D. Barceló, *Pure Appl. Chem.*, **2004**, 76, 723. (c) J. H. T. Luong, P. Bouvrette, K. B. Male, *Trends biotechnol.*, **1997**, 15, 369.
- [3] (a) L. Gorton, *Biosensors And Modern Biospecific Analytical Techniques*, **2005**, Elsevier Science (b) B. Kasermo, *Surf. Sci.* **2002**, 500, 656-677.
- [4] R. Westermeier, T. Naven, H. R. Höpker, *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design*, **2008**, Wiley-VCH.
- [5] (a) O. V. Salata, *J. Biotechnol.*, **2004**, 2, 1. (b) C. C. Berry, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2009**, 42, 224003. (c) Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2003**, 36, R167. (d) R. F. Rezai, *Biomedical Engineering : Frontiers and challenges*, 2011, Intech (e) D. Horák, M. Babič, M. J. Beneš, *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30, 1751.
- [6] www.Ademtech.com
- [7] D. Samanta, A. Sarkar, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 2567
- [8] Newkome, G. R.; Moorefield, C. N. Vögtle, F. *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses and Applications*; **2002**, Wiley-VCH: Weinheim Germany.
- [9] (a) O. Iliashevsky, L. Amir, R. Glaser, R. S. Marks, N. G. Lemcoff, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 6616. (b) B. Pan, F. Gao, H. Gu, *J. Coll. Int. Sci.*, **2005**, 284, 1. (c) S. Wang, P. Su, Hongjun E, Y. Yang, *Anal. Biochem.*, **2010**, 405, 230. (d) F. Gao, B-F. Pan, W-M. Zheng, L-M. Ao, H-C. Gu, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 48. (e) K. Uzun, E. Çevik, M. Şenel, H. Sözeri, A. Baykal, M. F. Abasıyanık, M. S. Toprak, *J. Nanopart. Res.*, **2010**, 12, 3057.

Chapitre I. Etude bibliographique

1. Introduction :

Aujourd'hui, il existe une réelle demande de matériaux de plus en plus sophistiqués et hautement spécifiques. Dans ce domaine, les matériaux fonctionnels dendritiques représentent un fort potentiel du fait de leurs architectures et de leurs fonctionnalités qui peuvent être modulées et adaptées pour différentes propriétés et applications.¹ Ainsi, en raison de la demande accrue de molécules complexes, les structures dendritiques se sont imposées dans les différents domaines de recherche¹ en particulier en catalyse, en électrochimie, pour la délivrance de médicaments, pour l'imagerie et la reconnaissance moléculaire.² Dans le cas de matériaux hybrides, la partie dendritique est immobilisée sur des supports insolubles, et même si elle constitue une part minoritaire du volume total du matériau, elle reste néanmoins suffisante pour modifier complètement les propriétés de ce matériau.³

Pour rappel, les dendrimères sont des macromolécules arborescentes hyper-branchées formées de structures tridimensionnelles bien définies.⁴ A la différence des polymères ramifiés, leur structure est contrôlée grâce à un mode de synthèse itératif permettant la croissance du dendrimère génération après génération. Vögtle et *al.*⁵ ont été les précurseurs dans ce domaine en proposant dès 1978 une méthode de synthèse itérative conduisant à un système branché. Ce n'est qu'à partir du milieu des années 80 que la première famille de dendrimère voit réellement le jour avec la mise au point des poly(amidoamine) (PAMAM) par les groupes de Newkome⁶ et Tomalia⁷. Depuis la publication de ces travaux, l'intérêt pour les dendrimères n'a jamais cessé de croître, notamment avec l'apparition d'autres types de dendrimères comme les dendrimères à cœur diaminobutane (DAB) développés par Meijer⁸ et Mülhaupt.⁹ Il existe deux méthodes de synthèse des dendrimères : la méthode dite divergente où il s'agit de faire croître le dendrimère à partir du cœur (noyau) jusqu'à la périphérie et la méthode dite convergente où il s'agit d'assembler des dendrons sur le cœur.¹⁰ Au delà des dendrimères, on parle généralement de structures dendritiques ce qui englobe les dendrons et les polymères hyperbranchés.^{1a} Cependant, les polymères hyperbranchés n'ont pas de structure régulière comme les dendrimères et sont asymétriques. Dans cette Thèse, nous avons travaillé exclusivement avec des dendrons.

Les dendrons sont des molécules branchées constituées d'un point focal et de fonctions terminales (Figure 1).¹⁰ Ils sont généralement synthétisés par la répétition d'une même séquence de réactions soit à partir du point focal jusqu'à la périphérie. À la fin de chaque séquence réactionnelle, une nouvelle génération est obtenue avec un nombre croissant de branches identiques. Chaque génération est délimitée par des points de jonction. A la

périphérie des dendrons, nous retrouvons les fonctions terminales (Figure 1). La spécificité des dendrons résulte des structures chimiques qui le composent, c'est à dire : les fonctions chimiques de la périphérie, les fonctions qui permettent les jonctions des branches, le nombre de génération et la fonction au point focal. La synthèse des systèmes dendritiques demande de solides compétences en chimie organique. Typiquement, elle implique plusieurs étapes de synthèse et de purification pour atteindre la génération désirée.

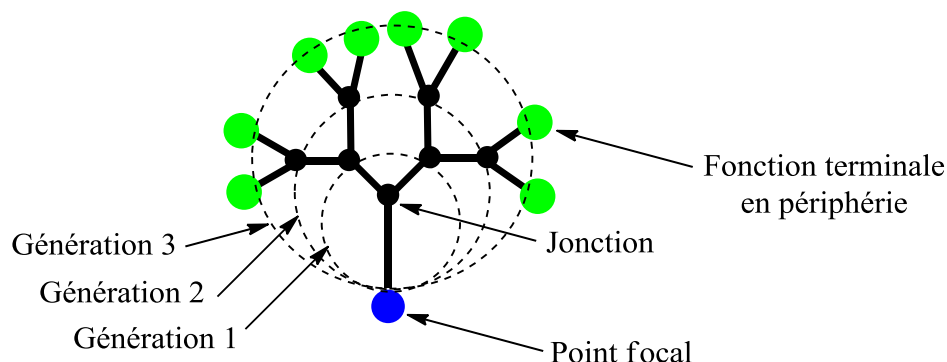


Figure 1. Représentation des caractéristiques structurales d'un dendron.

2. Classification des dendrons :

Dans la littérature, il existe différentes façons de nommer les dendrons : selon la structure chimique,^{1d} selon le nombre de branches de l'unité répétitive du dendron¹¹ (monomère) ou selon la génération. Par ailleurs, ces différentes classifications peuvent être utilisées selon l'effet attendu. Par exemple, afin de montrer un effet dendritique, il est plus judicieux de classer les dendrons en fonction de la génération et par le nombre de branche à la périphérie.

Par ailleurs, il existe une nomenclature alphabétique pour désigner l'unité répétitive en fonction du nombre de branche du dendron.¹¹ Elle se présente sous la forme : AB_n où A représente la partie qui précède le point de jonction, B représente la partie qui suit le point de jonction et n représente le nombre de branches de B, c'est un nombre entier entre 1 et 5. La Figure 2 illustre cette nomenclature.

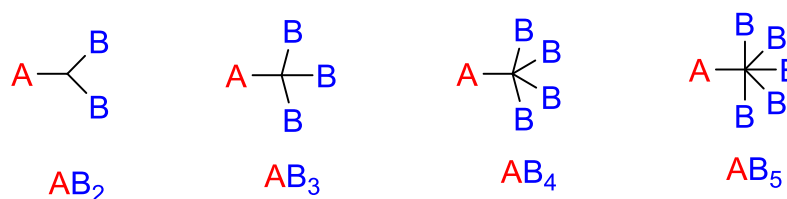


Figure 2. Classification des dendrons selon le nombre de branche de l'unité répétitive (monomère).

Nous pouvons également classer les dendrons par famille selon les fonctions chimiques qui les composent comme par exemple : des dendrons polyamides, polyamines, polyéthers, polyesters, polycarbosilanes etc. Chaque famille de dendrons va être maintenant décrite.

2.1. Dendrons polyamines :

Les dendrons polyamines (Figure 3) sont de type AB₂. Ils sont composés de fonctions amines tertiaires aux points de jonction. Ils sont synthétisés à partir d'une double addition de Michael d'une amine primaire sur de l'acrylonitrile suivi d'une réduction de la fonction nitrile. La répétition successive de ces deux réactions permet la synthèse de dendrons des générations supérieures. Les dendrons polyamines ont été synthétisés pour la première fois par Vögtle⁵ en 1978 puis par Meijer⁸ et Mülhaupt⁹ en 1993. Il existe dans la littérature quelques exemples de dendrons polyamines supportés sur des matériaux inorganiques comme de la silice¹² ou des nanocristaux de CdSe/CdS.¹³

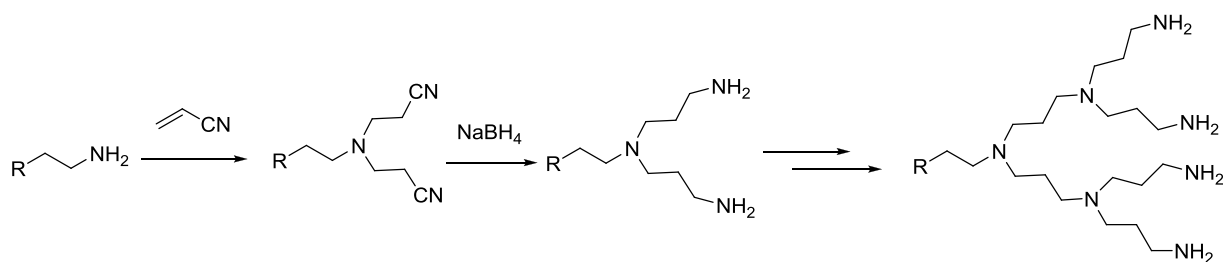


Figure 3. Schéma de synthèse de dendrons polyamine.

2.2. Dendrons polyamides :

Les dendrons polyamides PAMAM (Polyamidoamine) sont les plus connus et les plus utilisés dans la littérature.¹ Ils ont été synthétisés pour la première fois par Tomalia⁷ et ses collaborateurs. Les dendrons PAMAM sont de type AB₂ contenant une amine tertiaire au point de jonction. Leur structure a été largement étudiée dans différents groupes pour de nombreuses applications. Egalement, beaucoup d'exemples de matériaux à base de ce type de dendrons sont reportés dans la littérature que ce soit des matériaux inorganiques,¹⁴ métalliques¹⁵ ou bien organiques.¹⁶ La synthèse des dendrons PAMAM (Polyamidoamine) est basée sur deux réactions réalisées de manière itérative. Tout d'abord, une double addition de Michael d'une amine primaire sur un acrylate de méthyle et ensuite d'une amidation de l'ester méthylique avec de l'éthylène diamine (Figure 4).

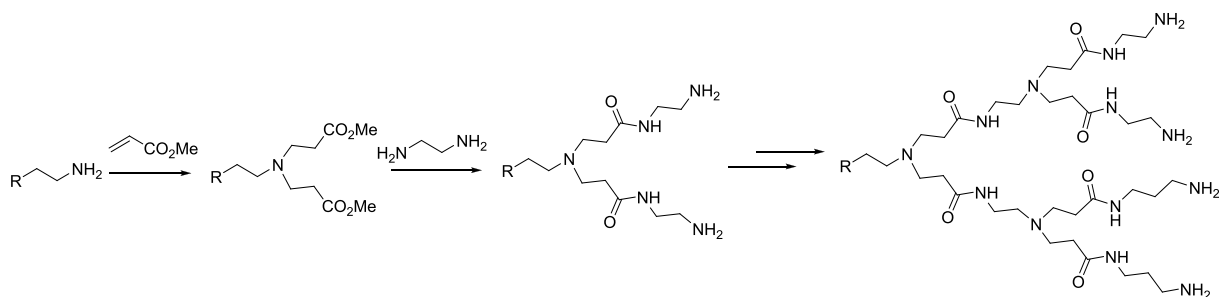


Figure 4. Schéma de synthèse de dendrons polyamidoamine.

D'une manière générale, les structures dendritiques PAMAM sont connues pour leur architecture tridimensionnelle et flexible ainsi que pour leur biocompatibilité. Ce qui est un point crucial pour certaines applications comme dans le domaine de la biologie ou de la médecine où ces propriétés sont exploitées. Cependant, dans d'autres domaines d'applications tel que la microélectronique, il est préférable d'avoir des dendrons plus robustes avec une structure plus rigide. Pour cette raison, les dendrons polyamides aromatiques connaissent un formidable essor sous l'impulsion de Kakimoto¹⁷ et de ses collaborateurs qui ont développé une nouvelle famille de dendron polyamides aromatiques assurant une robustesse et une stabilité thermique et mécanique. Les dendrons polyamides aromatiques ont été synthétisés pour la première fois en 1990 par Miller et de Neenan.¹⁸ Cependant, Fréchet et ces collaborateurs¹⁹ ont été les premiers à préparer des matériaux dendritiques avec ces dendrons polyamides aromatiques. De manière générale, leur synthèse est simple à réaliser. Le point de départ est un benzène trisubstitué aux positions 1-, 3- et 5- avec deux fonctions amine et une fonction acide (acide 3,5-diaminobenzoïque) (Figure 5). La croissance des dendrons se fait à partir des fonctions amine par addition de chlorure de 3,5-dinitrobenzoyl pour former des liaisons amide. Les fonctions NO₂ sont ensuite réduites en amine NH₂.

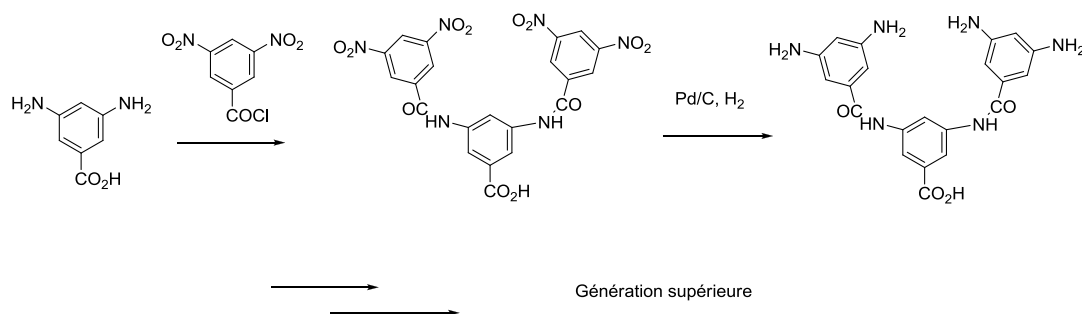


Figure 5. Schéma de synthèse de dendrons polyamides aromatiques.

Egalement, les structures dendritiques à base de peptides sont de plus en plus attrayantes pour des applications en nanomédecine car elles sont biocompatibles, biodégradables et peu immunogéniques.²⁰ En effet, plusieurs exemples de matériaux à base de

dendrons de polylysine et de polyacide glutamique ou polyarginine ont été étudiés.²¹ Ces structures ne sont pas symétriques, néanmoins, elles conservent l'appellation de dendron du fait de leur caractère hyper branché. Les dendrons à base de peptides sont souvent synthétisés par couplages peptidiques en présence de carbodiimides, en phase solide ou bien en phase liquide. Ainsi, une structure de polylysine a été synthétisée pour la première fois en 1981 par Denkwalter et *al.*²² et depuis les dendrons à base de peptides connaissent un large succès. La lysine porte deux fonctions amines : une en position α - et une en position ϵ -. La fonction acide de la lysine est activée à l'aide de la DCC* puis couplée à l'amine libre de départ (Figure 6). Ensuite, les fonctions amines sont déprotégées à leur tour obtenir la génération suivante. La propagation du dendron se fait par les deux positions α - et ϵ -, dans le but de distinguer les deux amines en position α - et ϵ -, elles peuvent être protégées par deux groupements protecteurs différents ($\text{Boc}^\dagger$ ou $\text{Fmoc}^\ddagger$) afin de bloquer ou de favoriser une direction de propagation.³

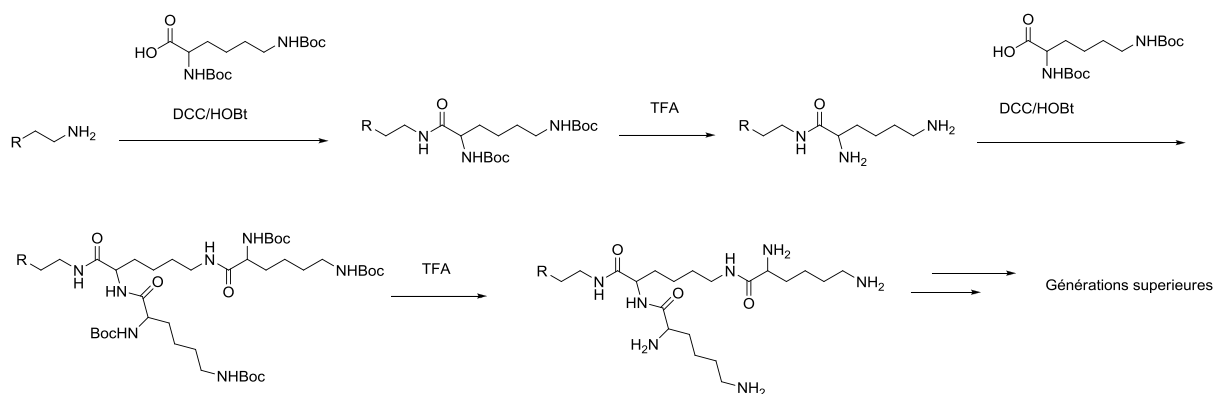


Figure 6. Schéma de synthèse de dendrons polylysine. (DCC : dicyclohexylcarbodiimide ; HOBT : hydroxybenzotriazole ; TFA : acide trifluoroacétique)

Des dendrons polyamides de type AB_3 ont été également développés par Newkome⁶ dès 1985, en utilisant un carbone quaternaire sp_3 comme un point de jonction du dendron. Ce type de dendron est également très utilisé que ce soit en phase homogène²³ ou greffé sur un support.³ On note que ce type de dendrons polyamide peut aussi contenir d'autres fonctions dans leurs structures comme par exemple des fonctions urée²⁴, des fonctions éther²³ ou bien ester²³ (Figure 7). Cependant, le point commun entre toutes les structures est qu'elles possèdent des fonctions amide et un point de jonction carboné sp_3 . Leur synthèse est basée

* DCC : dicyclohexylcarbodiimide

† Boc : *tert*-butoxycarbonyl

‡ Fmoc : fluorenylmethyl-oxycarbonyl

également sur une stratégie de synthèse itérative avec l'alternance de deux réactions chimiques.

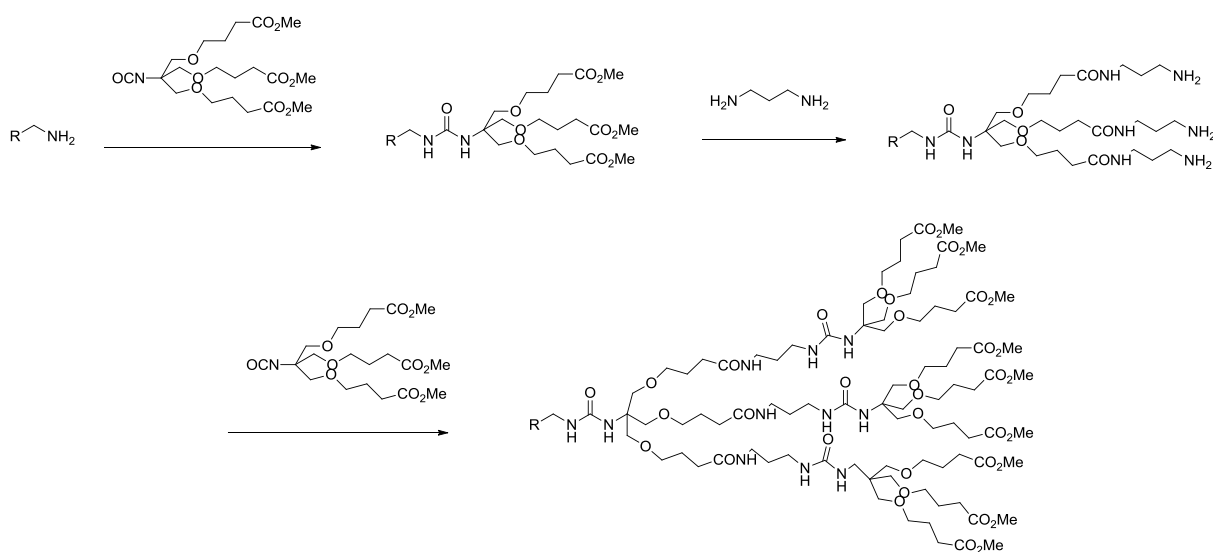


Figure 7. Schéma de synthèse de dendrons polyamide (AB₃).

2.3. Dendrons polyéthers :

Les dendrons polyéthers ont été développés car ils sont potentiellement plus inertes que les dendrons polyamides ou polyamines.³ Nous notons la présence dans la littérature de plusieurs types de dendrons polyéthers tels que les polyaryléthers ou les polyalkyléthers.^{10a} Le pionnier dans la synthèse de ce type de dendrons est Fréchet²⁵ en 1990. Il a développé la première stratégie de synthèse convergente des dendrimères de type polyalkyléthers et polyaryléthers à partir de l'alcool 3,5-dihydroxybenzylique (Figure 8 a).²⁵ L'expansion du dendron est réalisée à partir des fonctions phénoliques selon une synthèse itérative alternant une réaction de Williamson et une réaction de bromation de la fonction hydroxyle. Les polyalkyléthers, quant à eux, sont synthétisés en alternant une réaction de Williamson suivi d'une réaction générant un hydroxyle à partir du 3-chloro-2-chlorométhyl-propène.²⁶ (Figure 8 b).

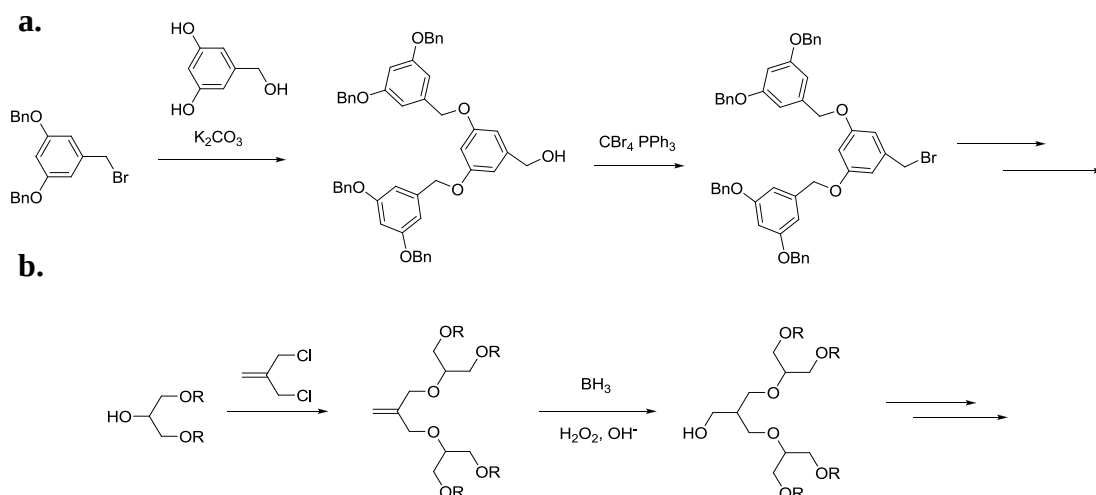


Figure 8. Schéma de synthèse de (a) dendrons polyaryléther et (b) polyalkyléther (Fréchet).

Précec et *al.* ont développés la synthèse de dendrons polyaryles éther de type AB_3 ,²⁷ AB_4 ²⁸ et AB_5 ²⁸ (Figure 9). Leurs synthèses reposent sur le même principe que la synthèse de Fréchet, c'est-à-dire l'alternance d'une réaction de Williamson et d'une halogénéation, à partir d'un monomère tri-phénolique pour les dendrons AB_3 . Ces dendrons connaissent un formidable essor en chimie supramoléculaire grâce à leurs propriétés d'auto-assemblages remarquables.^{11,29} Ces propriétés conduisent à la formation d'objets sphériques ou colonnaires de taille modulable.

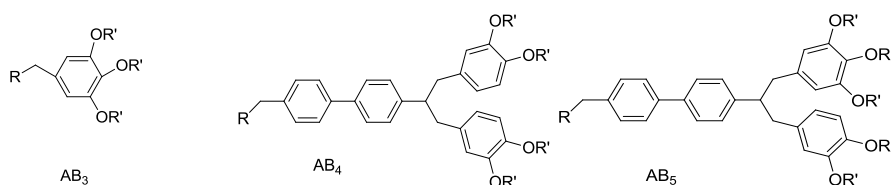


Figure 9. Structures moléculaires de dendrons polyéther AB_3 , AB_4 et AB_5 .

2.4. Dendrons polyesters :

Les dendrons polyesters ont une structure de type AB_2 . Ces structures ont été développées, pour la première fois, par Malmström et *al.*³⁰ puis par Fréchet et *al.*³¹ pour la synthèse de dendrons qui ont été immobilisés sur des supports polymères (Figure 10). La synthèse de ces dendrons a été réalisée par addition d'un hydroxyle sur l'anhydride de l'acide 2,2-bis(hydroxyméthyle) propionique permettant la formation d'un ester. Cette addition est répétée afin d'obtenir le dendron de génération supérieure après déprotection des fonctions hydroxyle intermédiaires. Plusieurs exemples de ces dendrons immobilisés sur des surfaces solides ont été répertoriés dans la littérature pour des nombreuses applications.^{31,32}

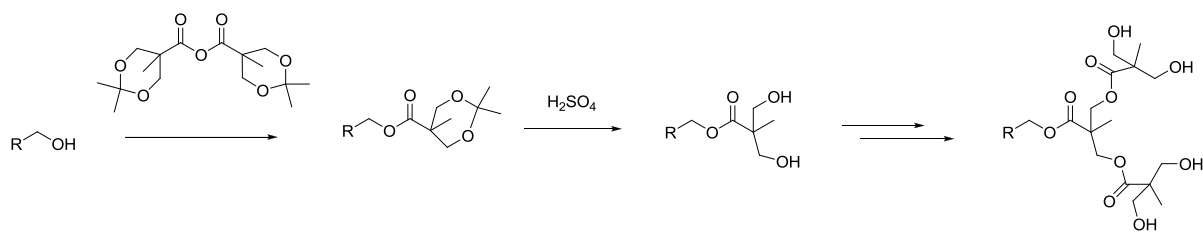


Figure 10. Schéma de synthèse de dendrons polyesters.

2.5. Dendrons polycarbosilanes :

Parmi les différentes familles de dendrimères connues, les dendrons carbosilane appartiennent à une catégorie un peu à part du fait de leurs propriétés physico-chimiques.³³ Connus pour leur caractère hydrophobe et leur robustesse, ils ont une faible viscosité et présentent une température de transition vitreuse basse. Leurs synthèses consistent en une séquence itérative de deux réactions: l'introduction des groupements alcènes terminaux à l'aide d'un réactif de grignard puis l'hydrosilylation de ces groupements par des chlorosilanes à l'aide d'un catalyseur à base de platine (Figure 11).³³ Le degré de branchement peut être modulé en choisissant un mono-, un di- ou un trichlorosilane. Ce type de structure est souvent utilisé dans le domaine de la catalyse que cela soit en catalyse homogène³⁴ ou bien supportée.³⁵

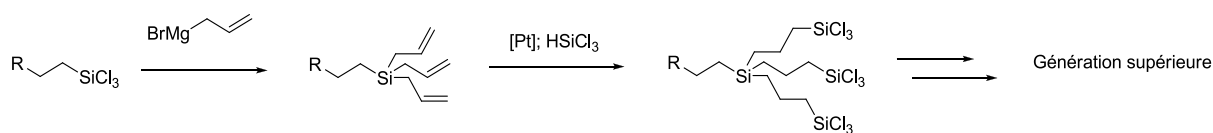


Figure 11. Schéma de synthèse de dendron polycarbosilane.

3. Greffage des dendrons sur un support solide :

En raison de leurs tailles, de leurs géométries et de leurs fonctionnalités modulables, les dendrons suscitent un intérêt croissant pour la modification chimique de surface notamment dans différents domaines d'applications en biologie, médecine, catalyse, etc. Les dendrons peuvent être utilisés pour modifier chimiquement une surface inorganique ou organique.^{1b} Le contrôle du greffage sur ces surfaces permet d'optimiser les propriétés de surface telles que : la mouillabilité, la rugosité, la réactivité ainsi que la dureté du matériau.

3.1. Stratégie de greffage des dendrons :

Il existe deux principales voies de greffage de dendrons sur un support solide^{1d,3} (Figure 12). Dans la première voie de greffage (Figure 12 a), il s'agit de construire le dendron directement sur le support insoluble étape par étape en utilisant les techniques de synthèse en

phase solide. La seconde voie de greffage (Figure 12 b) consiste en la construction du dendron dans son intégralité en solution puis de son greffage soit par son point focal soit par sa périphérie.

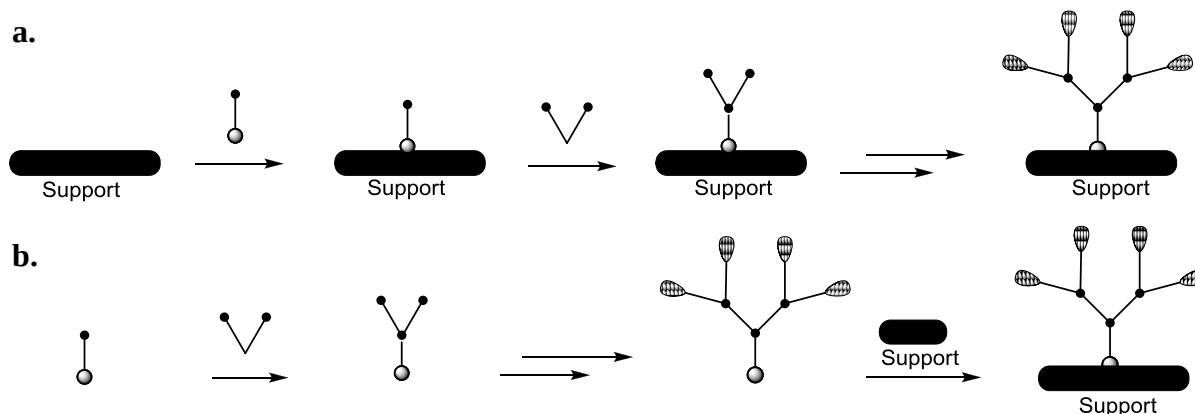


Figure 12. Représentation des deux méthodes de construction d'un dendron sur un support. (a) à partir de la surface ; (b) greffage post synthèse.

3.1.1. Première voie : Synthèse de dendrons à partir de la surface :

Ce type de fonctionnalisation de surfaces solides par des dendrons est très utilisé sur des supports polymères ou des supports de silice. La synthèse sur le support est principalement réalisée par voie divergente (Figure 12 a). La première étape consiste à immobiliser sur le support une molécule linéaire portant une fonction libre à son extrémité. A partir de cette fonction, le dendron sera construit étape par étape pour atteindre la génération voulue. Cette technique présente l'avantage d'obtenir des matériaux faciles à construire. Cependant, l'inconvénient majeur de cette technique concerne la formation de défauts sur les structures dendritiques engendrés en raison de la proximité des molécules.¹⁴

3.1.2. Deuxième voie : Synthèse de dendrons sur le support solide:

Seulement quelques cas de matériaux sont préparés de cette manière, c'est-à-dire que le dendron est synthétisé préalablement en solution puis finalement greffé sur un support solide. La grande majorité des greffages est réalisée sur des substrats d'or ou de polymères et de manière moins importante sur des substrats de silice. Le greffage se fait soit par le point focal du dendron, soit à partir de la périphérie (Figure 13). L'avantage majeur de cette technique est un contrôle de la structure dendritique qui est greffée à la surface ainsi qu'une maîtrise de la fonctionnalité apportées par le dendron. Cependant, l'inconvénient de cette stratégie est la limitation au greffage de dendrons de faibles générations à cause des difficultés de synthèse et de purification.³

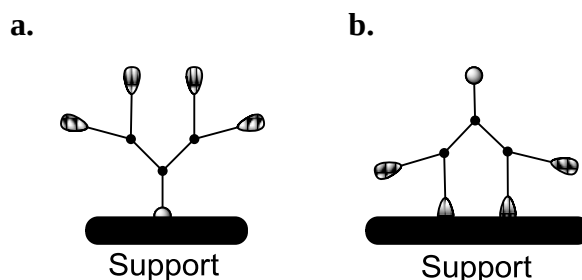


Figure 13. Représentation du greffage d'un dendron (a) par le point focal (b) par la périphérie.

Différentes méthodes de modification de surfaces ont été explorées pour le greffage de systèmes dendritiques sur des substrats insolubles tel que l'or,³⁶ la silice,³⁷ les surfaces d'oxydes métalliques,³⁸ polymères naturels³⁹ ou synthétiques.⁴⁰ Le greffage de dendrons sur une surface est réalisé par un greffage soit non-covalent soit covalent. Si les interactions entre le dendron et la surface sont des liaisons faibles (interactions électrostatiques, interactions de van der Waals ou interactions par coordination), il s'agit d'un greffage non-covalent. Si les interactions entre le dendron et la surface sont établies grâce à des interactions fortes comme les liaisons covalentes, il s'agit de greffage covalent. Dans la suite de ce chapitre, nous allons présenter ces deux types de greffage.

3.2. Greffage non-covalent :

3.2.1. Voie par adsorption physique :

L'assemblage de dendrons par adsorption physique sur une surface est un moyen de greffage particulièrement simple et peu coûteux mais avec des forces d'interactions faibles entre la surface du solide et l'adsorbat. Il présente donc l'inconvénient d'être réversible, les molécules adsorbées pouvant se désorber de la surface. De plus, l'immobilisation des dendrons sur un support solide par adsorption physique peut entraîner la formation de plusieurs couches peu contrôlables.

Néanmoins, dans la littérature nous retrouvons des exemples de greffage par des interactions faibles de type ionique ou par des interactions de van der Waals.^{1b} La technique la plus répandue est connue sous le nom de Langmuir-Blodgett.⁴¹ Dans ce cas, le substrat est introduit dans une solution contenant des dendrons amphiphiles. En raison de sa structure, le dendron va former un film monomoléculaire à la surface de l'eau (Figure 14). Une barrière mobile va permettre de comprimer ce film afin de ne laisser aucun espace libre sur la surface. Dans ces conditions, toutes les molécules se disposent parallèlement les unes aux autres avec l'extrémité hydrophile au contact de l'eau et leur partie hydrophobe au contact avec l'air

comme représenté sur la Figure 14. Ensuite, le support solide est retiré perpendiculairement à la solution. Ainsi, on observe la formation d'un film de dendrons, à la surface du support, avec une bonne adhérence. L'avantage majeur de cette technique résulte en sa simplicité, de plus elle ne nécessite aucun traitement chimique.

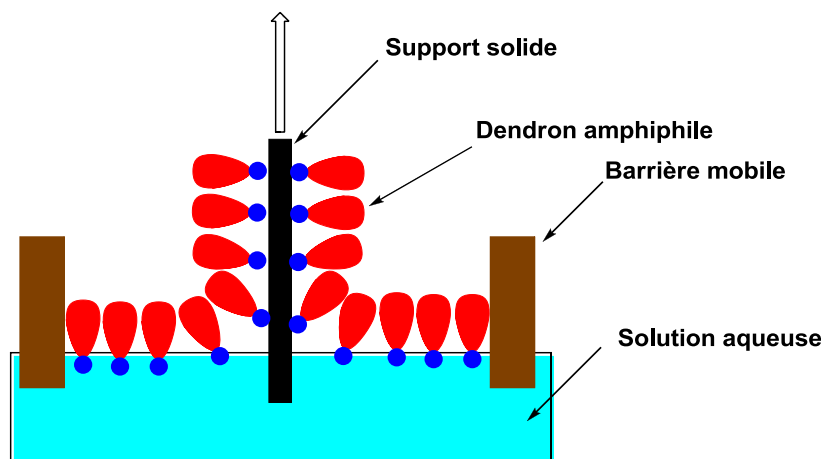


Figure 14. Schéma de la méthode de dépôt de Langmuir-Blodgett.

Mary Jane Felipe et *al.*^{41b} ont décrit les propriétés d'auto-assemblage des dendrons de type polyaryléthers ayant au niveau du point focal une fonction alcool et en périphérie des motifs carbazoles. Ces dendrons de génération 0 (linéaire) 1 et 2 ont été déposés sur une surface de mica par la méthode de Langmuir-Blodgett. Il a été montré que les différentes structures de la surface changeaient en fonction de la génération du dendron déposé. Celles de génération 0 ont montré une organisation en forme de nano-filament, celles de génération 1 forment des sphères tandis que celle de génération 2 forment des structures plus complexes. Cette étude montre que la technique de Langmuir-Blodgett associée aux dendrons amphiphiles donne des nanostructures contrôlées.

Une seconde méthode très utilisée pour la construction de matériaux dendritiques par adsorption physique est le spin-coating,⁴² où la force centrifuge est exploitée pour disperser les molécules sur le substrat solide.

Dans une étude réalisée par Yanbin Chen et *al.*⁴² des dendrons amphiphiles de type polyaryléthers ont été déposés par la méthode de spin-coating sur une surface de wafer de silicium. Les conditions expérimentales telles que la concentration (10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M) et la nature du solvant (DMF, Toluène) ont été optimisées. Ces dendrons montrent des structures de surface homogène sur l'ensemble du support. Cependant, des différences subtiles au niveau de l'organisation ont été remarquées selon la génération et la structure des dendrons comme présenté dans la Figure 15.

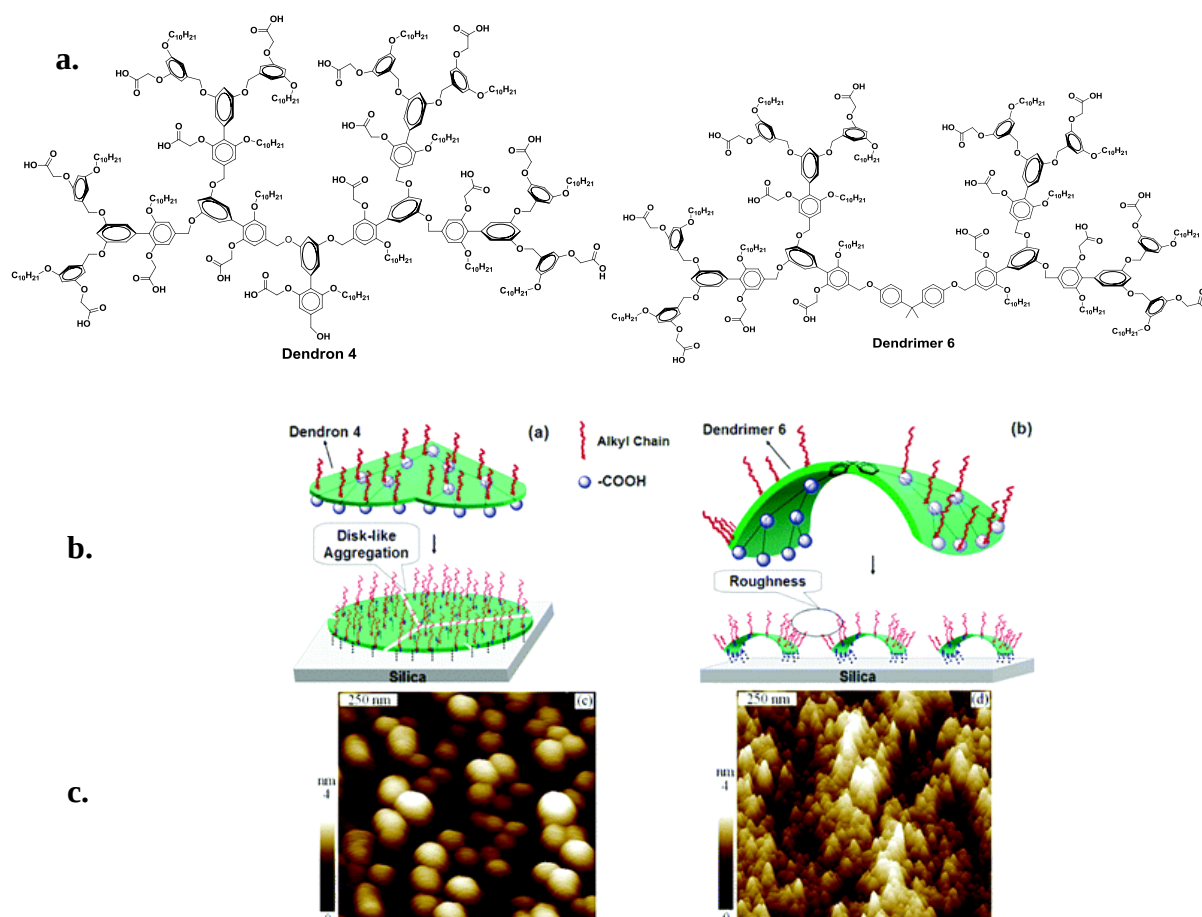


Figure 15. (a) Structures des dendrons utilisés par Bin Chen et al.⁴² (b) Représentation de l'organisation des dendrons à la surface. (c) Images AFM de hauteur correspondantes à (b).

Le greffage par voie ionique⁴³ nécessite un groupement donneur de protons et un groupement accepteur de protons afin de créer une différenciation de charge. Bong Jin Hong, et al.^{43b} ont utilisé ces interactions ioniques pour greffer des dendrons polyamide de deuxième génération (AB₃) (Figure 16). Ces dendrons possèdent des fonctions CO₂H à leur périphérie. Les auteurs ont modifié la surface d'un wafer de silicium pour avoir des fonctions amine en surface. Les interactions entre les fonctions acide du dendron et les fonctions amine de la surface ont été exploitées pour réaliser le greffage. Quatre types de solvants ont été utilisés (H₂O, EtOH, DMF et H₂O/DMF (1/1 : V/V)). L'utilisation de l'eau favorise la formation d'agrégats à la surface à cause de la formation de micelles. Les auteurs ont choisi le mélange de solvant H₂O/DMF (1/1 : V/V) car c'est celui qui donne les meilleurs résultats en terme de cinétique de greffage. Une fois les conditions expérimentales mises au point, le greffage s'est avéré assez stable car il a résisté à une température allant jusqu'à 100°C pendant une à deux heures et à un pH compris entre 4-10 pendant 3 h.

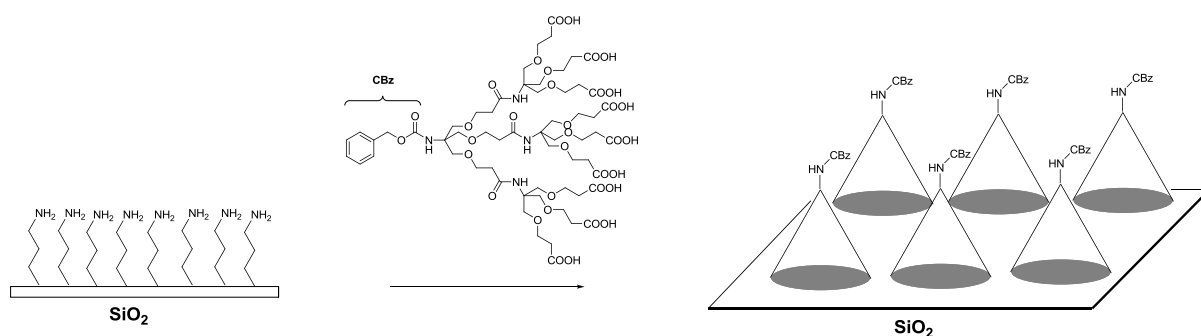


Figure 16. Schéma de la réaction de greffage par voie ionique.^{43b}

3.2.2. Interaction ligand métal :

Le greffage par interaction ligand métal est très répandu dans le cas de greffage de surface des nanoparticules. Il s'agit là d'un greffage que l'on peut qualifier d'intermédiaire entre covalent et non-covalent, du fait de la force des interactions mises en jeu (liaisons de coordination). Plusieurs groupements peuvent être utilisés comme des groupements thiolate,^{46,47,49} phosphonate,⁵⁰ carboxylate,¹³ alcoolate^{38a} ou amine⁵¹. Ce type de greffage nécessite une surface métallique comme de l'Au, Ag, Pd, des nanoparticules de semi-conducteur inorganiques (*quantum dots* : CdSe, CdS) ou bien des surfaces d'oxydes métalliques (oxyde de titane, l'oxyde de fer et l'oxyde de zinc).

L'exemple qui est sans doute le plus répandu est celui du greffage de thiols sur des surfaces d'or, quelque soit le type de surfaces (planes ou nanoparticules). Ces composés se coordinent de façon forte sur les métaux de transition. Deux formes d'organosulfures sont utilisées pour l'immobilisation des dendrons sur des surfaces d'or comme par exemple des disulfures ou des organothiols (Figure 17 a). Le mécanisme d'addition proposé est une addition oxydante sur l'or avec un dégagement d'hydrogène dans le cas des organothiols et sans dégagement d'hydrogène avec les composés disulfures (Figure 17 b).⁴⁴ Il faut toutefois noter que le mécanisme de la réaction fait encore débat.⁴⁵

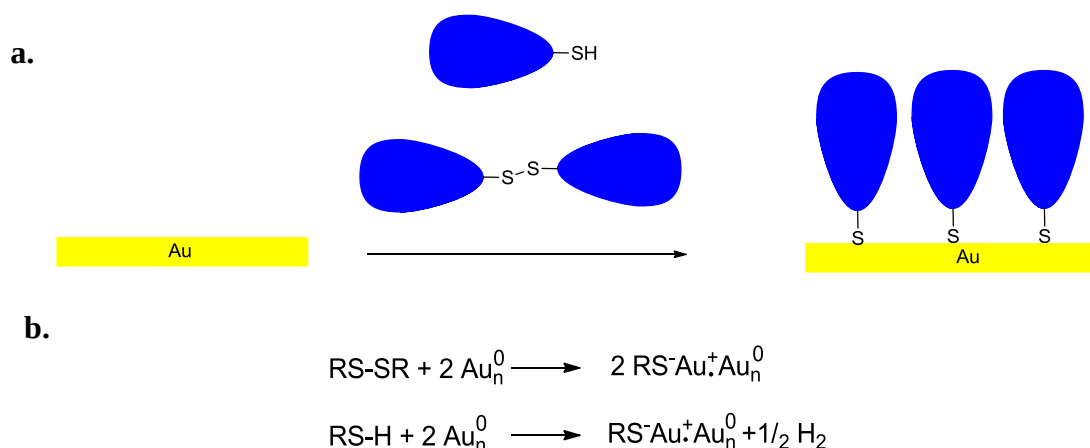


Figure 17. (a) Représentation du greffage d'un dendron thiol et disulfure sur une surface d'or.
(b) Equation de la réaction d'addition d'un thiol et d'un disulfure sur une surface d'or.⁴⁴

La plupart des études utilisent la fonction thiol au point focal pour permettre le greffage sur la surface. Différents types de dendrons ont servi à modifier les surfaces d'or. Nous notons principalement les travaux de Wyszogrodzka et *al.*⁴⁶ pour l'immobilisation de dendrons de type polyalkyléther. Ces dendrons ont d'abord été préparés en solution puis greffés selon le principe illustré dans la Figure 12 (b). Selon la même stratégie de synthèse, González de Rivera et *al.*^{33b} ont préparé des dendrons carbosilane qu'ils ont ensuite greffé sur des nanoparticules d'or dans le but d'augmenter leur dispersion en milieu organique.

Des dendrons polyester ont été synthétisés directement sur la surface en phase solide par Benhabbour et *al.*^{32b,32c} selon le principe illustré dans la Figure 12 (a). La première étape consiste d'abord à greffer un thiol portant une fonction hydroxyle. Puis, à partir de cette fonction, le dendron est construit génération après génération.

Des composés disulfures dendritiques sont également utilisés pour modifier les surfaces planes d'or. Nous notons les travaux de Östmark et *al.*⁴⁷ pour la synthèse de surface d'or recouverte de dendrons de type polyester. Tout comme ces dendrons polyester, les dendrons PAMAM peuvent être construits de la même façon sur les surfaces d'or.^{36a,15}

Les structures que nous venons de voir comportent un seul point d'ancrage sur le dendron. Pour renforcer les interactions avec le support, il est également possible d'utiliser deux points d'ancrage sur le dendron par une fonction acide thioctique.⁴⁸ Une étude réalisée par Joon Cho et *al.*⁴⁹ montre le greffage de dendrons polyamide AB₃ portant différentes fonctions au point focal sur des nanoparticules d'or (Figure 18). Les auteurs ont choisi: des dendrons avec au point focal un groupement thiol (a), des dendrons disulfure avec un dendron dans chaque direction (b) et des dendrons portant une fonction thioctique (c). Ils ont obtenu

un meilleur recouvrement avec le dendron ayant deux points d'ancrage au point focal (c), de manière moins importante le dendron thiol (a) et en dernier le dendron disulfure (b).

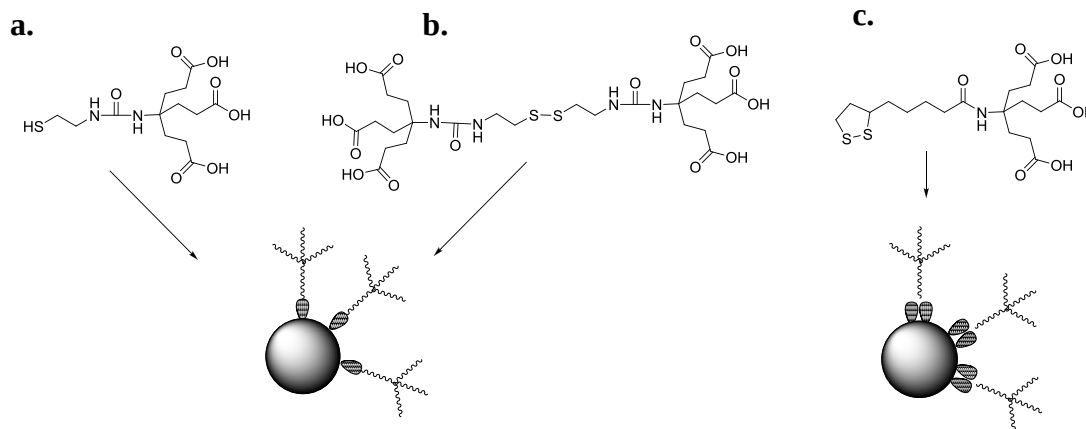


Figure 18. Structure chimiques des dendron utilisés par Joon Cho et al.⁴⁹ pour le greffage sur des nanoparticules d'or.

Des groupements phosphonate ont aussi été étudiés pour greffer des structures dendritiques sur des surfaces d'oxyde de fer, Pd ou CdSe.⁵⁰ T.J. Daou et al.^{50b,50c} ont décrit le greffage de dendrons de 1^{ère} génération de type polyéther sur des surfaces d'oxyde de fer. Ils ont montré que les dendrons étaient greffés de manière forte sur la surface grâce à la coordination du groupement phosphonate sur l'oxyde de fer.

Dans une autre étude, T.Gillich et al.^{38a} ont décrit le greffage de dendrons portant au point focal deux groupements catéchol sur des surfaces d'oxyde de titane. Ils ont montré que la présence de plusieurs groupements catéchol sur une molécule renforçait l'interaction avec le support.

Les fonctions carboxylate sont également utilisées pour le greffage de dendrons sur des surfaces métalliques. Liu et al.¹³ ont montré la synthèse et le greffage de dendrons polyamines portant deux fonctions carboxylate au point focal. Ils l'ont comparé avec des dendrons portant un groupement thiol au point focal. Ils en ont conclu que le greffage est plus stable dans le cas des carboxylates.

Les fonctions amine ont aussi été utilisées pour le greffage de dendrons de type polyamidoamine sur des surfaces de nanoparticules de semiconducteurs inorganiques. Yili Zhao et al.⁵¹ ont préparé des dendrons de type polyamidoamine portant au point focal deux groupements amine capables de se coordiner à la surface de CdSe/ZnS. Ces deux groupements amine au point focal renforcent la stabilité du greffage. Il a été rapporté que ces nanoparticules ont une très bonne stabilité chimique grâce à la structure bidendate du dendron

malgré des fonctions amine qui ne sont pas connues pour former une liaison forte avec une surface métallique.

3.3. Greffage covalent :

Des surfaces inorganiques et organiques sont utilisées pour le greffage par voie covalente. Les réactions permettant le couplage covalent sont des réactions de couplage comme la réaction de silanisation,^{14,52} de cycloaddition d'Huisgen^{39a} (chimie click), d'amidation⁵⁶ et d'estérification⁵⁷.

3.3.1. Silanisation :

Les surfaces d'oxydes métalliques peuvent être fonctionnalisées avec des réactifs tels que les chloro- ou alkoxy-silanes. Les sites M-OH (où M représente le métal) de surface sont utilisés pour la modification chimique de surface. Les organosilanes réagissent avec les M-OH pour conduire à la création de liaisons -M-O-Si-, chimiquement très stables (où MO représente l'oxyde de métal de surface).⁴⁴

Un organosilane est un composé de formule R-Si(X)₃ où X est un groupement hydrolysable (alcoyle ou halogénure) et R un groupement non hydrolysable pouvant être porteur d'une fonction d'intérêt pour une application visée. Lorsqu'un organosilane se trouve en présence d'eau, la première réaction qui a lieu est l'hydrolyse des groupements alcoyle ou halogénure en silanols (Si-OH). Ensuite, le silane peut se condenser sur lui-même (homocondensation) pour former des oligomères, ou sur une surface d'oxyde (greffage) afin d'en modifier les propriétés (Figure 19). Il est important de noter que les silanes peuvent créer trois liaisons covalentes avec les molécules voisines ou le substrat. Les silanes forment ainsi un réseau tridimensionnel de liaisons covalentes très fortes, appelées siloxanes (Si-O-Si).

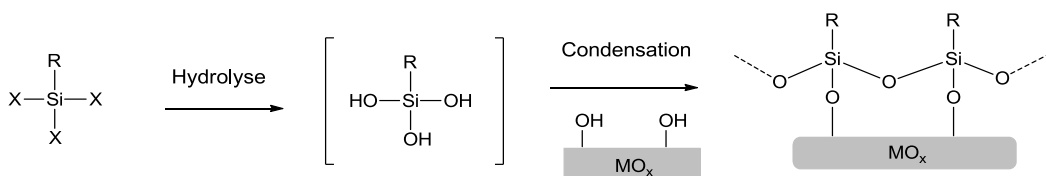


Figure 19. Réaction de silanisation.

L'exemple certainement le plus connu est le greffage de dendrons PAMAM sur des surfaces d'oxyde métallique (Figure 20). La majorité des travaux décrivent cette synthèse en phase solide. La première étape consiste à incorporer une fonction amine (*via* le greffage

d'APTES[§]) à partir de laquelle le dendron se propage linéairement. Cette propagation se fait sur le support en alternant les deux réactions qui permettent la synthèse des dendrons PAMAM (double addition de Michael/ amidation).

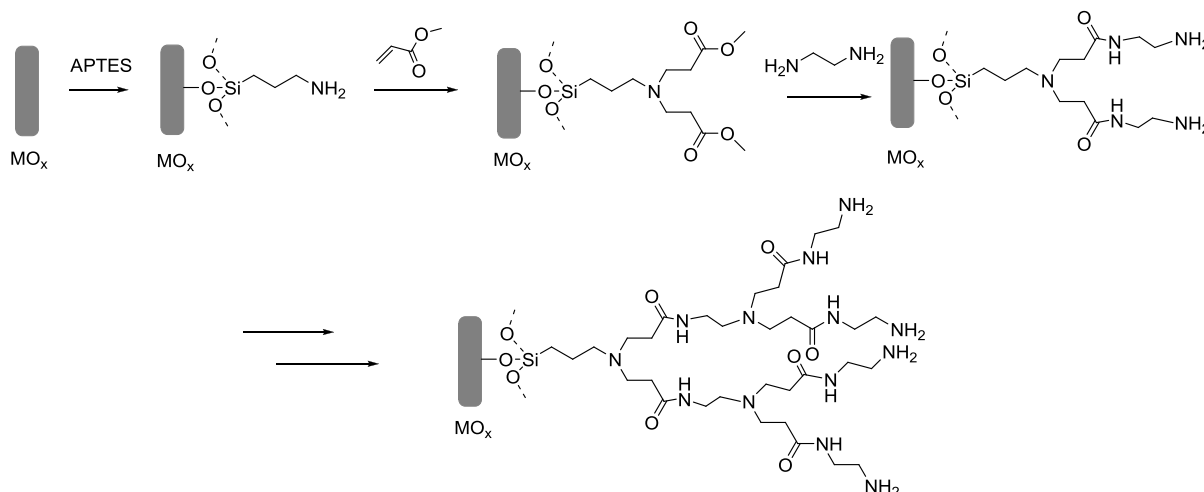


Figure 20. Construction de dendrons PAMAM en phase solide.

Une étude réalisée par M.Sharma et *al.*⁵² reporte la synthèse de dendron PAMAM sur une surface de silice en utilisant deux agents de couplage siliciés différents. Les deux organosilanes choisis pour la silanisation sont l'APTES et le 11-cyano-undécyltrichlorosilane (qui a été réduit en 12-amino-dodécyle après greffage). L'étude montre que la propagation des dendrons PAMAM à partir de la chaîne à 3 carbones (1-aminopropyle) est moins efficace que la chaîne à 12 carbones (12-amino-dodécyle). Cette perte de fonctionnalité est associée à l'interaction de l'aminopropyle avec le support en raison de sa proximité. Ainsi, le fait d'éloigner la fonction amine de la surface permettrait une meilleure propagation du dendron. Dans une étude cinétique des deux réactions (double addition de Michael/ amidation) qui permettent la propagation de dendrons PAMAM sur une surface de silice, Jie Bu et *al.*¹⁴ ont prouvé expérimentalement l'existence de défauts de manière conséquente sur la structure des dendrons, ces défauts résultent d'additions de Michael incomplètes et des réactions de pontage de l'éthylène diamine sur deux fonctions ester voisines (Figure 21).

[§] APTES : aminopropyltriéthoxysilane

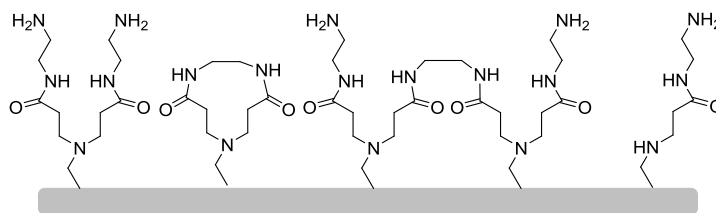


Figure 21. Représentation des défauts engendrés lors de la synthèse des PAMAMs en phase solide.

Il n'y a pas que les dendrons polyamidoamine qui présentent des défauts de structure lors de la synthèse en phase solide. Des résultats similaires ont été obtenus pour la synthèse de dendrons carbosilane^{33d} et de dendrons polyester.³¹

Certains chercheurs ont adopté une autre stratégie pour construire le dendron sur une surface (Figure 22). Ils silanisent d'abord la surface de silice avec une chaîne alkyle simple tel que l'APTES. Ils construisent le dendron en solution et ensuite ils couplent le groupement fonctionnel (amine) au bout de la chaîne alkyle greffée et le point focal (acide) du dendron par une réaction d'amidation ou d'esterification.^{37b,53} Cependant, cette stratégie présente un faible taux de fonctionnalisation des dendrons en surfaces.

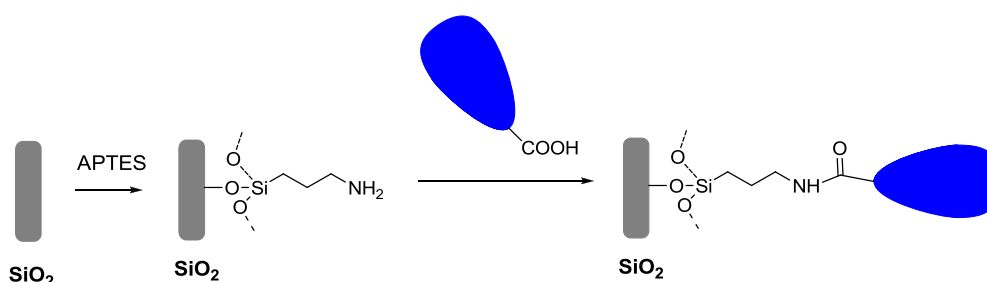


Figure 22. Immobilisation d'un dendron sur une surface de silice préalablement silanisée par l'APTES.

Pour éviter ces problèmes de structure mal contrôlée à la surface, certains chercheurs préfèrent au préalable synthétiser entièrement le dendron en solution puis le greffer malgré les difficultés synthétiques rencontrées. Dans ce cas, nous notons les travaux de Moussodia et *al.*^{38b} sur la modification de surface d'oxyde de zinc par des dendrons polyamidoamines portant une fonction triméthoxysilane au point focal. D'autres exemples similaires de greffage de dendrons polyamides (AB₃) terminés à la périphérie par des groupements benzyles sur une surface de silice et fonctionnalisée par un point focal triéthoxysilane ont été reportés par Newkome.^{1e}

3.3.2. Cycloaddition de Huisgen (Chimie click) :

Certains chercheurs ont exploité la chimie click (cycloaddition de Huisgen) pour greffer des dendrons sur des surfaces solides inorganiques ou organiques (Figure 23).^{39a,54} La cycloaddition de Huisgen est aussi appelée cycloaddition 1,3-dipolaire. Cette transformation chimique désigne la cyclisation entre un azoture et un alcyne conduisant à la formation d'une unité 1,2,3-triazole. La présence de cuivre (I) en tant que catalyseur dans la réaction permet une synthèse à température réduite, rapide et régiosélective, où seul le régioisomère-1,4 du triazole est formé. Cette technique de couplage est appelée chimie click du fait de sa facilité, de sa rapidité et de son rendement élevé.⁵⁵

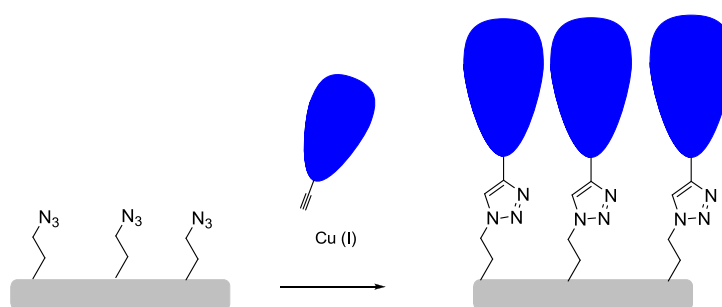


Figure 23. Représentation du greffage de dendrons par la cycloaddition de Huisgen.

Par exemple, Matthias Pohl et *al.*^{39a}, ont décrit le greffage de dendrons PAMAM (porteuses de fonctions amine en périphérie et un groupement alcyne au point focal) sur de la cellulose modifiée avec des groupements azoture. Ce matériau a servi à immobiliser des biomolécules avec succès. Des surfaces d'oxyde métallique^{54a,54c} ou des surfaces métalliques^{54b} ont été également utilisées pour ce type de greffage soit par silanisation sur les surfaces de silice soit par adsorption d'un organosulfure sur des surfaces d'or.

3.3.3. Couplage par une réaction d'estérification ou amidation :

Dans le cas particulier de greffage sur des matériaux polymères, les couplages entre la surface du polymère et le dendron se fait généralement *via* un couplage acide/amine ou bien acide/alcool (Figure 24).

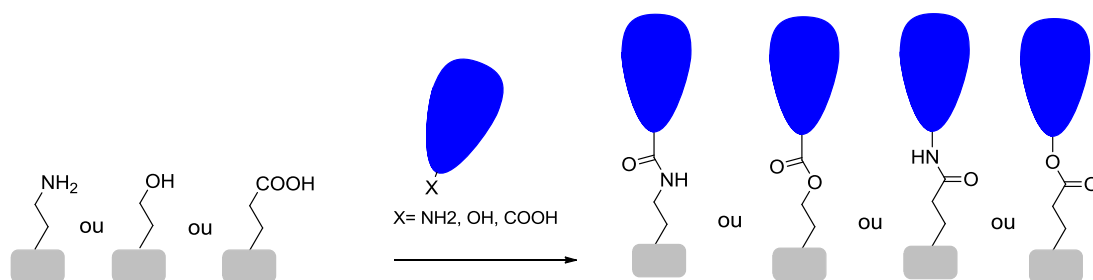


Figure 24. Représentation de greffage de dendrons par amidation ou esterification.

Par exemple, K. Heuzé et *al.*⁵⁶, ont montré le greffage d'un dendron de type polyamidoamine (PAMAM) (porteur au point focal une fonction amine) sur des surfaces de nanoparticules core-shell enrobées de polymère (acide polyacrylique). Pour effectuer les greffages, les fonctions COOH de la surface ont été activées à l'aide de la chimie des carbodiimides (EDC/NHS^{**} ou CHMS^{††}). Ces auteurs ont ainsi montré une augmentation de la fonctionnalisation grâce aux structures dendritiques.

Egalement, Dhruvajyoti Roy et *al.*⁵⁷, ont réalisé le greffage de dendrons polyamides (AB₃) par la périphérie (Figure 25). Ces dendrons possèdent des fonctions COOH en périphérie et la surface utilisée est une surface de polystyrène modifiée (porteuse des fonctions OH à sa surface). Le greffage a également été réalisé *via* la chimie des carbodiimides (DMAP/ EDC^{‡‡}) dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) où la DMAP fait office de catalyseur de la réaction d'estérification.

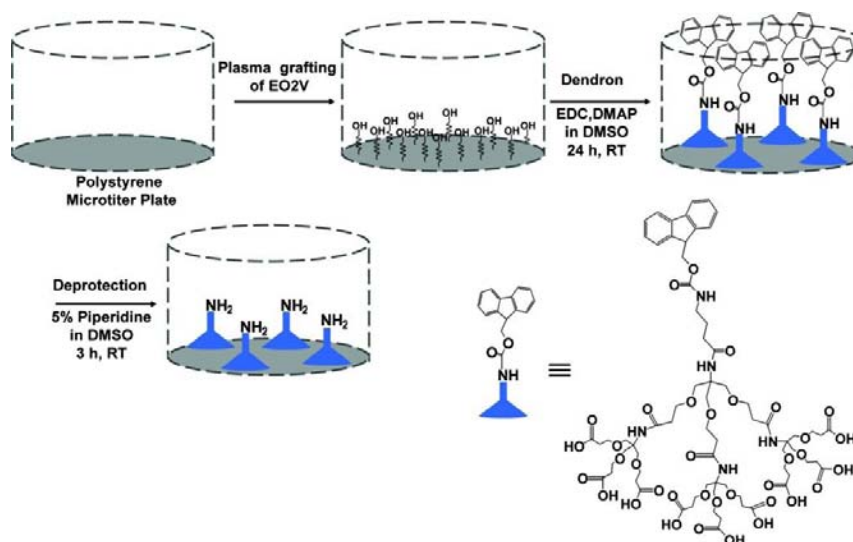


Figure 25. Mode opératoire réalisé par Dhruvajyoti Roy et *al.*⁵⁷ pour l'immobilisation de dendrons.

^{**} EDC/NHS : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyle) carbodiimide/*N*-hydroxysuccinimide

^{††} CHMS : 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoéthyle)

^{‡‡} DMAP/EDC : 4-diméthylaminopyridine/1-éthyle-3-(3-diméthylaminopropyle) carbodiimide

4. Intérêts du greffage de dendrons sur une surface :

La qualité du greffage des dendrons sur la surface de supports solides joue un rôle très important pour le contrôle des propriétés de surface et par conséquent pour les applications souhaitées. La densité de fonction élevée, l'architecture modulable des dendrons peuvent être utilisées pour conférer à un matériau des propriétés uniques. Les matériaux dendritiques sont utilisés dans différents domaines d'applications tels que la nanotechnologie et la biotechnologie. Dans cette partie, nous allons présenter les différentes propriétés induites par les structures dendritiques sur différents matériaux greffés.

4.1. Contrôle de la mouillabilité :

L'hydrophobicité de la surface d'un solide est souvent une propriété essentielle dans différentes applications, par exemple pour l'élaboration de surfaces auto-nettoyantes ou de surfaces hydrofuges. De nouveaux dendrons ayant des groupements terminaux fluorés en périphérie et un groupement thiol au point focal ont été fixés par Luscombe et *al.*⁵⁸ sur une surface d'or de manière à modifier la mouillabilité (Figure 26). Les monocouches formées présentent une augmentation de l'angle de contact avec différents solvants (H_2O , Hexadecane) en fonction de la génération des dendrons greffés. Par ailleurs, l'hydrophobicité augmente également avec la longueur et le nombre de chaînes perfluorées.

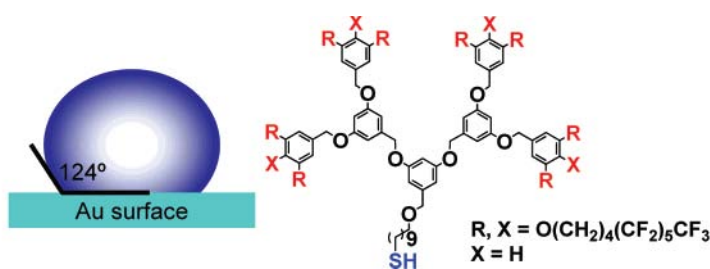


Figure 26. Représentation des dendrons utilisés par Luscombe et *al.*⁵⁸ dans l'étude de la mouillabilité.

Dans une approche différente, des structures dendritiques amphiphiles complexes ont été préparées : des dendrons de différentes générations, des structures dendritiques composées de deux dendrons appelé didendrons.⁴² Ces différentes structures ont été greffées sur une surface de silice par adsorption physique en procédant par spin coating. Il en ressort deux informations majeures. La première est que plus la génération augmente, plus la surface devient hydrophobe et la deuxième information est que les structures didendritiques donnent des surfaces plus hydrophobes que les simples dendrons. Il est rapporté également que les

différences dans l'architecture des deux structures sur la surface du support sont aussi à l'origine de ce comportement.

4.2. Contrôle de l'espacement entre les fonctions :

La particularité des dendrons par rapport aux dendrimères vient de leur forme ressemblant à un parapluie. Le greffage sur la surface par les groupements de périphérie peut permettre un contrôle de l'espacement entre les fonctions aux points focaux (Figure 27).^{57,59} Ainsi, l'espacement entre les fonctions de surface peut être contrôlé, ce qui permet de s'affranchir des problèmes d'encombrements stériques dans le cas d'immobilisation de biomolécules. Egalement, l'utilisation de dendrons par rapport à des chaînes linéaires diluées dans une SAM mixte peut permettre d'éviter les phénomènes de ségrégation de phase.

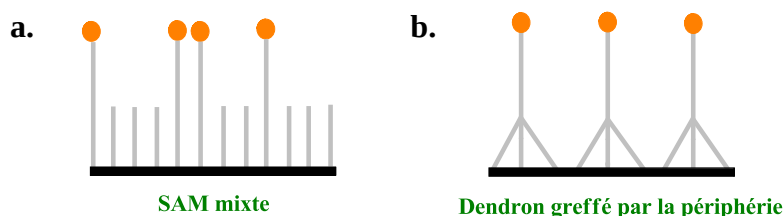


Figure 27. Représentation de surface greffée par une SAM mixte (a) et par un dendron à partir de la périphérie (b).

Une deuxième méthode développée par Tokuhsa⁴⁸ et al (Figure 28) permet de contrôler l'espace entre les fonctions sur une surface d'or. Il s'agit de greffer un dendron par le point focal contenant une partie clivable au centre. Ensuite, la partie clivable est éliminée, libérant ainsi un espace entre les fonctionnalités. En optant pour cette stratégie l'équipe de Tokuhsa a montré que l'espace entre les fonctionnalités peut être modulé en changeant la taille des dendrons (différentes générations) et ainsi adapter l'espacement par rapport à la taille de la biomolécule à immobiliser.

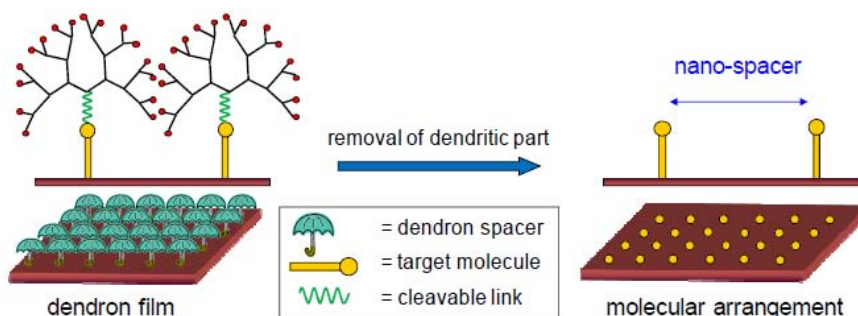


Figure 28. Représentation de la stratégie réalisée par Tokuhsa et al.⁴⁸ pour le contrôle de l'espace entre les fonctions.

4.3. Augmentation de la fonctionnalité de surface :

Récemment, les structures dendritiques ont été utilisées dans des dispositifs analytiques dans le but d'augmenter la sensibilité des biocapteurs.⁶⁰ En raison de leur densité élevée en groupements fonctionnels à la périphérie, les dendrons sont considérés comme des candidats idéals pour l'immobilisation de molécules biologiques.^{37a,38c,61} Ainsi une voie efficace de préparation de surfaces bioréactives a été entreprise par Yang et *al.*⁶⁰. Il s'agit de greffer sur une surface plane d'or, des dendrons de 3^{ème} génération portant des groupements thiols au point focal et des fonctions hydroxyles en périphérie. Des dendrimères de deuxième génération de type PPI (polypropylèneamine) ont été immobilisés de manière covalente sur les fonctions hydroxyle activées à la surface. Cette méthode a permis d'augmenter la bio-réactivité de la surface en prenant comme modèle le système avidine/biotine.

Egalement, un effet dendritique a été observé sur la bio-fonctionnalisation d'un gel de silice modifié avec des structures dendritiques de type polyaryléthers (génération : 0, 1, 2), portant des fonctions aldéhyde en périphérie.^{37a} De la BSA (Bovine Sérum Albumine) a été couplée à ce matériau dendritique par formation de liaisons imines réduites ensuite en amine pour éviter le relargage de la protéine en solution. Le dosage de la biomolécule immobilisée a été effectué en utilisant un anticorps anti-BSA fluorescent (reconnaissance avec la protéine BSA). Le résultat de cette étude montre une augmentation de la fluorescence de l'anticorps en fonction de la génération du dendron immobilisé. Dans une autre étude réalisée par Siming Wang et *al.*^{61a}, qui concerne la biofonctionnalisation d'un capillaire de silice avec l'enzyme de glucose oxydase, la surface de silice a été modifiée au préalable par un dendron PAMAM. Ces auteurs concluent que l'oxydation du glucose augmente avec la génération du dendron greffé.

L'augmentation de la biofonctionnalité des matériaux a aussi été exploitée en protéomique par greffage de structures dendritiques (Figure 29). Des matériaux à base d'oxyde de fer sont utilisés pour la séparation de biomolécules dans les milieux complexes et en biocatalyse. En effet, l'utilisation des dendrons permet d'augmenter l'activité enzymatique des nanoparticules. K. Uzun⁶² et ses collaborateurs ont fonctionnalisé des nanoparticules magnétiques par des dendrons de type polyamidoamine. Il a été remarqué que la quantité de l'enzyme immobilisé sur ces matériaux dendritiques augmente en fonction de la génération des dendrons et ce jusqu'à la génération 3 pour atteindre un plateau. Dans le même but, Feng Gao^{61b} et ses collaborateurs ont immobilisés des dendrons PAMAM sur une surface de nanoparticules magnétiques. Ils ont remarqué que la quantité de biomolécules immobilisées a

augmenté en fonction de la génération du dendron jusqu'à la génération 3, puis une légère baisse est observée de la génération 3 à la génération 5. Cet effet parfois appelé effet dendritique négatif serait dû aux gênes stériques entre les fonctions périphériques, ce qui réduit leur accessibilité.

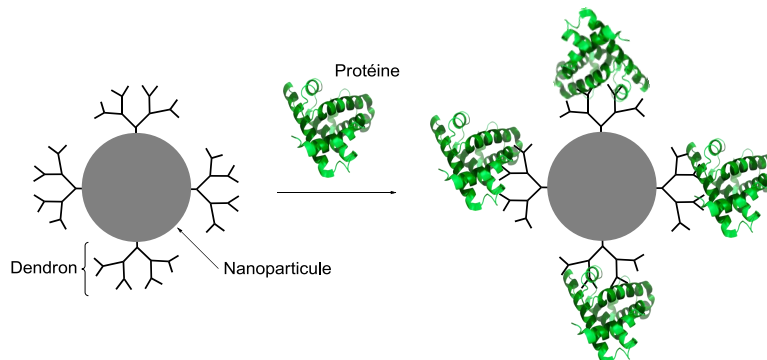


Figure 29. Représentation d'immobilisation de biomolécules sur un matériau fonctionnalisé par des structures dendritiques.

L'immobilisation de métallodendrons sur des supports insolubles organiques ou inorganiques a fait l'objet de nombreuses études depuis une dizaine d'années dans le domaine de la catalyse. Cette approche permet de combiner les avantages de la catalyse homogène (en terme de réactivité) à ceux de la catalyse supportée (en terme de recyclage).^{1d,3}

Nous notons les travaux de Daniel Amorin et *al.*⁶³ sur la fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques de type cœur-écorce (γ -Fe₂O₃/Polymère CO₂H) par des catalyseurs métallodendritiques de type AB₃ de 1^{ère} et de 2^{ème} génération. Les auteurs ont montré que l'activité catalytique était accrue par le greffage des structures dendritiques du fait de l'augmentation du nombre de sites catalytiques immobilisés à la surface.

Le greffage de métallodendrons sur la silice a été effectué entre autres par le groupe de Alper⁶⁴ qui reporte le greffage de dendrons PAMAM (génération 0 à 4) sur un gel de silice aminopropylée, fonctionnalisés en périphérie par des complexes de rhodium. Les auteurs ont également montré une activité catalytique accrue pour des réactions d'hydroformylation, avec des structures dendritiques. Cependant ces auteurs reportent aussi une chute importante de réactivité pour les métallodendrons de génération 3 et 4. Ils attribuent cette baisse de réactivité à une fonctionnalisation incomplète de la périphérie de ces dendrons en raison de l'encombrement stérique.

4.4. Adsorption de protéine :

Les surfaces limitant l'adsorption physique des protéines sont d'un grand intérêt pour le développement de biomatériaux utilisés dans des applications biomédicales. En conséquent, beaucoup d'efforts ont été fait afin de comprendre le mécanisme de répulsion des protéines pour concevoir ces nouveaux matériaux biocompatibles.

La présence de groupements hydrophiles flexibles combinée à une architecture dendritique permet de limiter l'adsorption de protéines sur la surface, comme cela a été décrit par Wyszogrodzka et *al.*^{46,65} (Figure 30). Il a été montré que des dendrons de type polyalkyléthers greffés sur des surfaces d'or permettaient de réduire l'adsorption de protéine comme des fibrogènes, lysozymes, l'albumine et de la pepsine par rapport à des surfaces greffées par des chaines linéaires hydrophobes. Cette étude a été réalisée par une caractérisation des surfaces par résonance plasmonique (SPR).

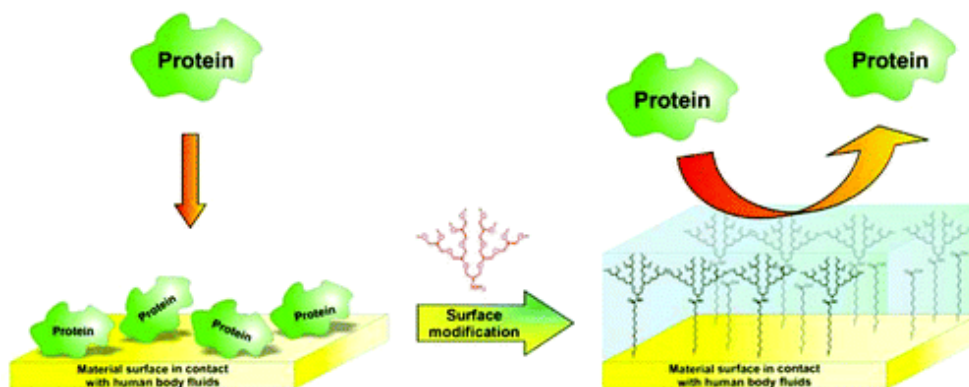


Figure 30. Représentation de l'utilisation des dendrons pour des surfaces résistantes à l'adsorption de protéine.⁴⁶

Dans une autre étude réalisée par Benhabbour et *al.*^{32c}, où des chaines polyéthylèneglycol ont été greffées sur des surfaces de silicium recouvertes d'une couche d'or, des structures dendritiques de type polyester de génération 1 à 4 ont été greffées. A la périphérie de ces dendrons, des chaines PEG de différentes longueurs ont été ajoutées. Il a été démontré que la répulsion des protéines fibrogènes augmente en fonction de la longueur des chaines éthylèneglycol et de la génération du dendron. Dans un autre article du même auteur,^{32b} il est montré que la répulsion des protéines fibrogènes viendrait de la flexibilité des chaines polyéthylèneglycol qui est exacerbée lorsqu'elles sont associées à des structures dendritiques.

4.5. Contrôle de la dispersion des nanoparticules :

Les nanoparticules connaissent un formidable essor dans le domaine biomédical pour leurs utilisations en tant qu'agents de contraste, pour l'hyperthermie, pour le transport de gènes et pour la délivrance de principes actifs. Dans ce domaine, la stabilité des nanoparticules en milieux aqueux est primordiale et les dendrons offrent des propriétés idéales grâce à leur architecture branchée, globulaire et leur fonctionnalité modulable. Ainsi, une fois greffés sur les nanoparticules, ils permettent une meilleure dispersion des nanoparticules par rapport à des nanoparticules greffées par des structures linéaires. Les dendrons utilisés dans ce domaine sont des dendrons polaires avec des groupements en périphérie tel que des alcools^{51,66} amines^{38b} ou des acides carboxyliques.^{49,15}

Tae Joon Cho et *al.*⁴⁹ ont étudié la stabilité de nanoparticules d'or greffées par des dendrons polyamide AB₃ de deuxième génération portant des fonctions acide en périphérie. Ces nanoparticules ont montré une bonne stabilité entre 30 et 60°C, dans une solution saline de PBS. Il s'est avéré que plus la densité du greffage est élevée, plus ces nanoparticules sont stables. Les auteurs ont également étudié la stabilité des nanoparticules dans une gamme de pH de 2 à 10. Ils ont remarqué qu'elles précipitaient à pH 2, qu'elles s'agrégeaient à pH 3 et au delà de 3 leur état colloïdal devenait stable. Ce phénomène serait dû à la répulsion électrostatique induite par la forme déprotonée des fonctions acide de surface. D'autres exemples de stabilisation des nanoparticules en milieux aqueux ont été réalisés sur des nanoparticules d'oxyde de fer,⁶⁷ d'oxyde de zinc^{38b} ou de semiconducteurs inorganiques qui ont été greffées par des dendons porteurs de fonctions amine, acide ou alcool en périphérie.^{15,51,66}

5. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons présenté différents types de dendrons en fonction de leurs structures moléculaires (polyamines, polyamides, polyéthers, polyesters, polycarbosilanes) ainsi que les méthodes générales de synthèse. Les synthèses peuvent s'effectuer du point focal vers la périphérie (divergente) ou de la périphérie vers le point focal (convergente).

Pour immobiliser les dendrons sur un support, deux stratégies sont employées:

- Une construction du dendron sur le support étape par étape en phase solide.
- Une construction du dendron en solution puis un greffage soit par son point focal soit par sa périphérie.

Dans les deux cas, le greffage met en jeu des liaisons covalentes ou des liaisons non-covalentes. Dans le cas des liaisons non-covalentes, nous avons présenté le greffage par adsorption physique grâce aux interactions faibles de type van der Waals ou liaisons ioniques ou de coordination. Le greffage par la voie covalente, quant à elle, met en jeu des réactions de couplage comme la silanisation de surface d'oxyde métallique, le greffage par la chimie click et le couplage amide ou ester.

Après avoir présenté les différentes synthèses des matériaux dendritiques nous avons illustré leurs utilisations dans différents domaines comme la biologie ou la chimie. En effet, ils sont utilisés pour moduler les propriétés physiques d'une surface telles que la mouillabilité, la densité de charge de surface de nanoparticules ou le contrôle de l'espacement entre les fonctions sur une surface. Leur caractère branché confère à un matériau une fonctionnalisation de surface élevée ce qui est exploité pour l'immobilisation de biomolécules, ou la catalyse.

Bibliographie :

- [1] (a) A. Calmark, Craig Hawaker, A. Hult, M. Malkoch, *Chem. Soc. Rev.*, **2009**, 38, 352. (b) J. I. Paez, M. Martinelli, V. Brunetti, M. C. Strumia, *Polymers*, **2012**, 4, 355. (c) S. E. Striba, H. Frey, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1329. (d) A. Dahan, M. Portney, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2005**, 43, 235. (e) G. R. Newkome, K. S. Yoo, A. Kabir, A. Malik, *Tetrahedron Lett.*, **2001**, 42, 7537. (f) C. C. Lee, J. A. MacKay, J. M. J. Fréchet, F. C. Szoka, *Nature Biotechnology*, **2005**, 23, 1517.
- [2] R. Hourani, A. Kakkar, *Macromol. Rapid Commun.*, **2010**, 31, 947.
- [3] T. Kehat, K. Goren, M. Portnoy, *New J. Chem.*, **2007**, 31, 1218.
- [4] A. W. Bosman, H. M. Janssen, E. W. Meijer, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 1665.
- [5] E. W. Bujleier, W. Wehner, F. Vögtle, *Synthesis*, **1978**, 2, 155.
- [6] G. R. Newkome, Z. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, *J. Org. Chem.*, **1985**, 50, 2003.
- [7] (a) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Macromolecules*, **1986**, 19, 2466. (b) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.*, **1985**, 17, 117.
- [8] E. M. M. Brabander-van den Berg, E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32, 1308.
- [9] C. Wörner, R. Mülhaupt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1993**, 32, 1306.
- [10] (a) S. M. Grayson, J. M. J. Fréchet, *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 3819. (b) R. Kreiter, A. W. Kleij, R. J. Klein Gebbink, G. van Koten, *Top. Curr. Chem.* **2001**, 217, 163. (c) G. R. Newkome, C. N. Moorefield, F. Vögtle, *Dendrimers and dendrons, concept, Syntheses and applications*, 2002, Wiley-VCH.
- [11] B. M. Rosen, C. J. Wilson, D. A. Wilson, M. Peterca, M. R. Imam, V. Precec, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 6275.
- [12] P. Liu, X. Wu, Q. Pu, Z. Su, *Annali di Chimica*, **2005**, 95, 695.
- [13] Y. Liu, M. Kim, Y. Wang, Y. A. Wang, X. Peng, *Langmuir*, **2006**, 22, 6341.
- [14] J. Bu, R. Li, C. W. Quah, K. J. Carpenter, *Macromolecules*, **2004**, 37, 6687.
- [15] B. Huang, D. A. Tomalia, *J. Luminesc.*, **2005**, 111, 215.
- [16] N. Pollock, G. Fowler, L. J. Twyman, S. L. McArthur, *Chem. Commun.*, **2007**, 24, 2482.

- [17] (a) Y. Ishida, A. C. F. Sun, M. Jikei, M. Kakimoto, *Macromolécules*, **2000**, 33, 2832.
(b) M. Jikei, M. Kakimoto, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **2004**, 42, 1293.
- [18] T. M. Miller, T. X. Neenan, *Chem. Mater.*, **1990**, 2, 346.
- [19] K. E. Uhrich, S. Boegeman, J. M. J. Fréchet, S. R. Turner, *Polym. Bull.*, **1991**, 25, 551.
- [20] P. Niederhafner, J. Šebestic, J. Jezec, *J. Peptide Sci.*, **2005**, 11, 757.
- [21] L. Crespo, G. Sanclimens, M. Pons, E. Giralt, M. Royo, F. Albericio, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 1663.
- [22] R. G. Denkwalter, J. Kole and W. J. Lukasavage, *US Pat.*, 4 410,688, **1983**.
- [23] G. R. Newkome, C. Shreiner, *Chem. Rev.*, **2010**, 110, 6338.
- [24] S. Lebreton, S. E. How, M. Buchholz, B. E. Yingyongnarongkul, M. Bradley, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 3945.
- [25] C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 7638.
- [26] M. Jayaraman, Jean M. J. Fréchet, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 12996.
- [27] V. S. K. Balagurusamy, G. Ungar, V. Percec, G. Johansson, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 1539.
- [28] V. Percec, B. C. Won, M. Peterca, P. A. Heiney, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 11265.
- [29] (a) V. Percec, M. N. Holerca, S. Nummelin, J. J. Morrison, M. Glodde, J. Smidrkal, M. Petreca, B. M. Rosen, S. Uchida, V. S. K. Balagurusamy, M. J. Sienkowska, P. A. Heiney, *Chem. Eur. J.*, **2006**, 12, 6216 (b) B. M. Rosen, D. A. Wilson, C. J. Wilson, M. Peterca, B. C. Won, C. Huang, L. R. Lipski, X. Zeng, G. Ungar, P. A. Heiney, V. Percec, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 17500.
- [30] E. Malmström, M. Johansson, A. Hult, *Macromolecules*, **1995**, 28, 1698.
- [31] F. H. Ling, V. Lu, F. Svec, J. M. J. Fréchet, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 1993.
- [32] (a) S. L. Goh, M. B. Francis, J. M. J. Fréchet, *Chem. Commun.*, **2002**, 24, 2954. (b) S. R. Benhabbour, H. Sheardown, A. Adronov, *Macromolecules* **2008**, 41, 4817. (c) S. R. Benhabbour, H. Sheardown, A. Adronov, *Macromolecules* **2008**, 41, 2567.
- [33] (a) R. van Heerbeek, P. C. J. Kamer, P. N. M. W. van Leeuwen, J. N. H. Reek, *Org. Biomol. Chem.*, **2006**, 4, 211. (b) F. González de Rivera, L. Rodríguez, O. Rossell, M. Seco, N. J. Divins, I. Casanova, J. Llorca, *J. Organomet. Chem.*, **2011**, 696, 2287. (c)

- M. Deluge, C. Cai, *Langmuir*, **2005**, 21, 1917. (d) Q. Zhang, L. A. Archer, *Langmuir*, **2006**, 22, 717.
- [34] A. W. Kleij, R. A. Gossage, R. J. M. Klein Gebbink, N. Brinkmann, E. J. Reijerse, U. Kragl, M. Lutz, A. L. Spek, G. van Koten, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 12112.
- [35] R. Andrés, E. de Jesús, J. L. G. Fierro, P. Terreros, *New J. Chem.*, **2011**, 35, 2203.
- [36] (a) R. Villalonga, P. Díez, S. Casado, M. Eguílaz, P. Y. Sedeño, J. M. Pingarrón, *Analyst*, **2012**, 137, 342. (b) L. Zhang, F. Huo, Z. Wang, L. Wu, X. Zhang, *Langmuir*, **2000**, 16, 3813. (c) K. R. Gopidas, J. K. Whitesell, M. A. Fox, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 14168.
- [37] (a) O. Iliashevsky, L. Amir, R. Glaser, R. S. Marks, N. G. Lemcoff, *J. Mater. Chem.*, **2009**, 19, 6616. (b) M. Driffield, D. M. Goodall, A. S. Klute, D. K. Smith, K. Wilson, *Langmuir*, **2002**, 18, 8660. (c) J. P. K. Reynhardt, Y. Yang, A. Sayari, H. Halper, *Adv. Funct. Mater.*, **2005**, 15, 1641.
- [38] (a) T. Gillich, E. M. Benetti, E. Rakhmatullina, R. Konradi, W. Li, A. Zhang, A. D. Schluter, M. Textor, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 10940. (b) R. O. Moussodia, L. Balan, C. Merlin, C. Mustin, R. Schneider, *J. Mater. Chem.*, **2010**, 20, 1147. (c) B. Pan, F. Gao, H. Gu, *J. Coll. Int. Sci.*, **2005**, 284, 1.
- [39] (a) M. Pohl, N. Michaelis, F. Meister, T. Heinze, *Biomacromolecules* **2009**, 10, 382. (b) M. I. Montanez, Y. Hed, S. Utsel, J. Ropponen, E. Malmstrom, L. Wagberg, A. Hult, M. Malkoch, *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 2114. (c) E. Östmark, J. Lindqvist, D. Nyström, E. Malmström, *Biomacromolecules* **2007**, 8, 3815. (d) M. Pohl, J. Schaller, F. Meister, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.*, **2008**, 29, 142.
- [40] (a) A. Mansour, T. Kehat, M. Portnoy, *Org. Biomol. Chem.*, **2008**, 6, 3382. (b) K. Goren, M. Portnoy, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 1965. (c) A. Dahan, A. Weissberg, M. Portnoy, *Chem. Commun.*, **2003**, 10, 1206.
- [41] (a) V. A-Venicio, B. J-Nava, M. D. P. C.-Castro, E. Rivera, I. A. Méndez, A. A. Huerta, M. G-Nava, *Polymer*, **2008**, 49, 3911. (b) M. J. Felipe, N. Estillore, R. B. Pernites, T. Nguyen, R. Ponnappati, R. C. Advincula, *Langmuir*, **2011**, 27, 9327. (c) J. Iyer and P. T. Hammond, *Langmuir*, **1999**, 15, 1299. (d) J. P. Kampf, C. W. Frank, *Langmuir*, **1999**, 15, 227.
- [42] Y. Chen, A. V. Ambade, D. R. Vutukuri, S. Thayumanavan, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 14760.
- [43] (a) D. C. Tully, A. R. Trimble, J. M. J. Fréchet, *Chem. Mater.*, **1999**, 11, 2892. (b) B. J. Hong, J. Y. Shim, S. J. Oh, J. W. Park, *Langmuir*, **2003**, 19, 2357.
- [44] A. Ulman, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 1535.

- [45] E. Pensa, E. Cortés, G. Corthey, P. Carro, C. Vericat, M. H. Fonticelli, Guillermo Benitez, A. A. Rubert, R. C. SALVAREZZA, *Acc.Chem. Res.*, DOI: 10.1021/ar200260p, **2012**, In Press.
- [46] M. Wyszogrodzka, R. Haag, *Biomacromolecules*, **2009**, 10, 1043.
- [47] E. Östmark, L. Macakova, T. Auletta, M. Malkoch, E. Malmström, E. Blomberg, *Langmuir*, **2005**, 21, 4512.
- [48] (a) H. Tokuhisa, J. Liu, K. Omori, M. Kanesato, K. Hiratani, L. A. Baker, *Langmuir*, **2009**, 25, 1633. (b) H. Tokuhisa, E. Koyama, A. Belaissaoui, H. Suga, T. Ishida, Y. Nishioka, M. Kanesato, *Curr. App. Phys.*, **2006**, 6, 723.
- [49] T. J. Cho, R. A. Zangmeister, R. I. MacCuspie, A. K. Patri, V. A. Hackley, *Mater. Chem.*, **2011**, 23, 2665.
- [50] (a) Y. Park, P. Taranekar, J. Y. Park, A. Baba, T. Fulghum, R. Ponnappati, R. C. Advincula, *Adv. Funct. Mater.*, **2008**, 18, 2071. (b) T. J. Daou, G. Pourroy, J. M. Greneche, A. Bertin, D. F-Flescha, S. B-Colin, *Dalton Trans.*, **2009**, 23, 4442. (c) B. Basly, D. F. -Flesch, P. Perriat, C. Billotey, J. Taleb, G. Pourroya, S. B. Colin, *Chem. Commun.*, **2010**, 46, 985. (d) L. Wu, B -L. Li, Y-Y. Huang, H-F. Zhou, Y-M. He, Q-H. Fan, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 3605.
- [51] Y. Zhao, Y. Li, Y. Song, W. Jiang, Z. Wua, Y. A. Wangb, J. Sunc, J. Wang, *J. Coll. Inter. Sci.*, **2009**, 339, 336.
- [52] M. Sharma, A. Dube, J. R. Engstrom, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 15022.
- [53] (a) J. I. Paez, A. L. Cappelletti, A. M. Baruzzi, V. Brunetti, M. C. Strumia, *Macromol. Symp.*, **2010**, 290, 37. (b) Z-X. Guo J. Yu, *J. Mater. Chem.*, **2002**, 12, 468.
- [54] (a) D. A. Long, K. Unal, R. C. Pratt, M. Malkoch, J. Frommer, *Adv. Mater.*, **2007**, 19, 447. (b) R. Zirbs, F. Kienberger, P. Hinterdorfer, W. H. Binder, *Langmuir*, **2005**, 21, 8414. (c) A. L. Martin, L. M. Bernas, B. K. Rutt, P. J. Foster, E. R. Gillies, *Bioconjugate Chem.*, **2008**, 19, 2375.
- [55] (a) W. H. Binder, R. Sachsenhofer, *Macromol. Rapid Commun.*, **2007**, 28, 15. (b) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, 40, 2004.
- [56] K. Heuzé , D. R.-Amorin, S. Nlate, M. Gaboyard, A. Bouterc, Rodolphe Clérac, *New J. Chem.*, **2008**, 32, 383.
- [57] D. Roy, J-W. Kwak, W. J. Maeng, H. Kim, J. W. Park, *Langmuir*, **2008**, 24, 14296.
- [58] C. K. Luscombe, S. Proemmel, W. T. S. Huck, A. B. Holmes, H. Fukushima, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 5505.

- [59] (a) B. J. Hong, S. J. Oh, T. O. Youn, S. H. Kwon, J. W. Park, *Langmuir*, **2005**, 21, 4257 (b) Y. J. Jung, B. J. Hong, W. Zhang, S. J. B. Tendler, P. M. Williams, S. Allen, J. W. Park, *J. Am. Chem. Soc.*, **2007**, 129, 9349 (c) Z. Xiao, C. Cai, A. Mayeux, A. Milenkovic, *Langmuir*, **2002**, 18, 7728.
- [60] M. Yang, E. M. W. Tsang, Y. A. Wang, X. Peng, H-Z. Yu, *Langmuir*, **2005**, 21, 1858.
- [61] (a) S. Wang, P. Su, Hongjun E, Y. Yang, *Anal. Biochem.*, **2010**, 405, 230. (b) F. Gao, B-F. Pan, W-M. Zheng, L-M. Ao, H-C. Gu, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 48.
- [62] K. Uzun, E. Çevik, M. Şenel, H. Sözeri, A. Baykal, M. F. Abasıyanık, M. S. Toprak, *J. Nanopart. Res.*, **2010**, 12, 3057.
- [63] D. R-Amorin, X. Wang, M. Gaboyard, R. Clérac, S. Nlate, K. Heuzé, *Chem. Eur. J.*, **2009**, 15, 12636.
- [64] (a) R. A-Reziq, H. Alper, D. Wang, M. L. Post, *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, 128, 5279. (b) S. C. Bourque, H. Alper, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 956. (c) S. C. Bourque, F. Maltais, W-J. Xiao, O. Tardif, H. Alper, P. Arya, L. E. Manzer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, 121, 3035.
- [65] M. Wyszogrodzka, R. Haag, *Langmuir*, **2009**, 25, 5703.
- [66] Y. A. Wang, J. J. Li, H. Chen, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 2293.
- [67] (a) R. Zhu, W. Jiang, Y. Pu, K. Luo, Y. Wu, B. He, Z. Gu, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 5464. (b) C. Duanmu, I. Saha, Y. Zheng, B. M. Goodson, Y. Gao, *Chem. Mater.*, **2006**, 18, 5973.

Chapitre II : Fonctionnalisation de surfaces SiO₂ par des systèmes dendritiques

1. Introduction :

Dans le domaine de la biofonctionnalisation, le choix des fonctions de surface est très important lorsqu'il s'agit d'immobiliser des biomolécules sur la surface d'un substrat (SiO₂).¹ Ces dernières années, l'immobilisation de protéines sur différents supports a fait l'objet de nombreuses études, dans le but de concevoir ou d'améliorer les performances de biocapteurs. Ainsi, il existe plusieurs façons d'immobiliser des biomolécules à la surface d'un support : par un accrochage par adsorption (couplage non-covalent), un accrochage par couplage covalent ou un accrochage par affinité biologique.¹

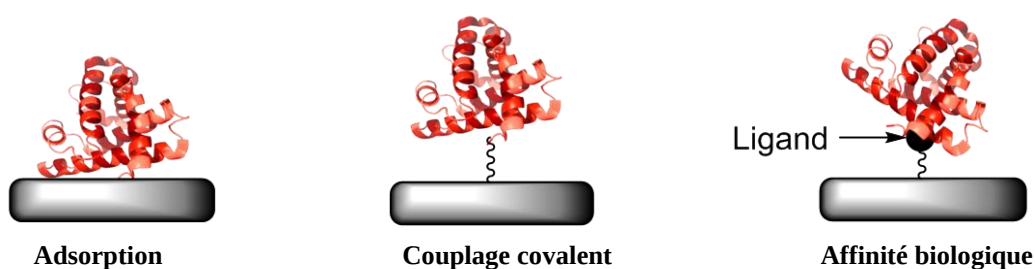


Figure 1. Méthodes d'immobilisation de biomolécules : adsorption, couplage covalent et affinité biologique.

Accrochage par adsorption. Les biomolécules ont la capacité de s'adsorber sur des substrats différents, hydrophobes ou hydrophiles.² L'adsorption est permise grâce à la formation de liaisons faibles : liaisons électrostatiques, interactions hydrophobes et polaires.¹ L'avantage majeur est qu'elle ne nécessite aucun agent de couplage intermédiaire. En revanche, ce type de liaison est réversible et entraîne le relargage des biomolécules. Il est également connu que l'adsorption des protéines peut entraîner un changement de conformation et une dénaturation et donc une perte d'activité préjudiciable.² Enfin, il n'y a aucun contrôle de l'empilement des biomolécules adsorbées ce qui crée une gêne stérique et donc également une perte d'activité biologique.

Accrochage par couplage covalent. Pour une attache plus solide avec le support, la formation de liaisons covalentes est nécessaire entre un groupement fonctionnel à la surface du support et un autre à la surface de la protéine. Cette méthode ne nécessite pas de transformation de la protéine si le groupement souhaité est naturellement présent à sa surface.¹ Par exemple, les résidus Cystéines (Cys) d'une protéine portent un groupement thiol qui est souvent utilisé pour l'immobilisation sur une surface fonctionnalisée par des groupements maléimides. Le groupement thiol s'additionne sur la double liaison du carbonyle alpha beta insaturé pour former une liaison thio-éther (Figure 2 a). Egalement, la méthode

utilisée pour immobiliser une protéine par ses résidus acides aspartique (Asp) et glutamique (Glu) est la conversion des fonctions acides de ces acides aminés en esters activés. Cette méthode nécessite un agent de couplage : un carbodiimide associé à un auxiliaire nucléophile (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et N-hydroxysuccinimide (NHS)). L'ester activé correspondant réagit avec des groupements amine du support pour former une fonction amide (Figure 2 b). L'inconvénient de cette méthode est que des résidus lysine de la protéine peuvent aussi réagir par les fonctions NH₂ avec l'ester activé et ainsi favoriser le couplage de la protéine sur elle-même. Dans le cas de protéines riches en résidus Lysine (Lys), les fonctions amine (NH₂) peuvent réagir sur des fonctions aldéhyde d'une surface pour former une liaison imine qui sera réduite en amine secondaire plus stable. Les amines peuvent également s'additionner sur une fonction glycidyle de la surface ou enfin, elles peuvent réagir avec des esters activés (NHS) de la surface en formant une fonction amide. (Figure 2 c)

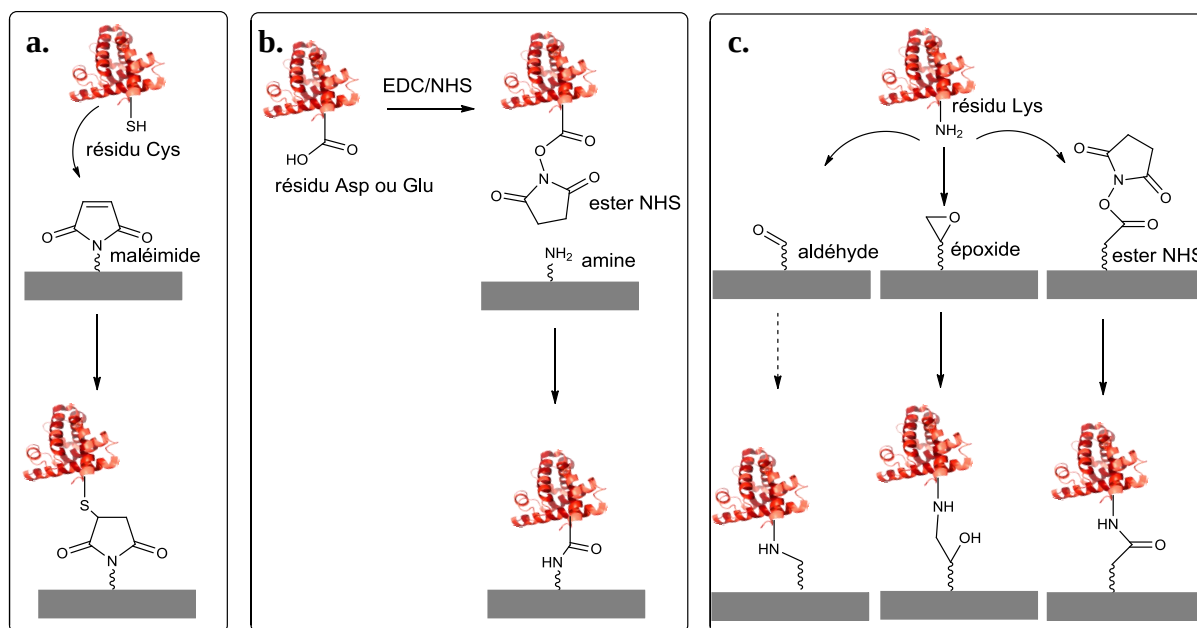


Figure 2. Différentes méthodes d'immobilisation de protéine par voie covalente : (a) par les résidus Cystéine (Cys) (b) par les résidus Acides aspartique (Asp) et glutamique (Glu) (c) par les résidus Lysine (Lys).

Accrochage par affinité biologique. De par la sélectivité des interactions, ce type d'immobilisation est très spécifique, elle permet d'orienter les biomolécules. Ainsi, les interactions protéine-protéine et protéine-(molécules cible) ont été étudiées.^{1,3} Il est aussi possible de désorber les biomolécules afin de réutiliser la surface. L'exemple probablement le plus utilisé est l'immobilisation d'une protéine marquée par une séquence d'oligo-histidine sur un chélate de Cu(II), Co(II), Zn(II) ou Ni(II) (Figure 3 a).¹

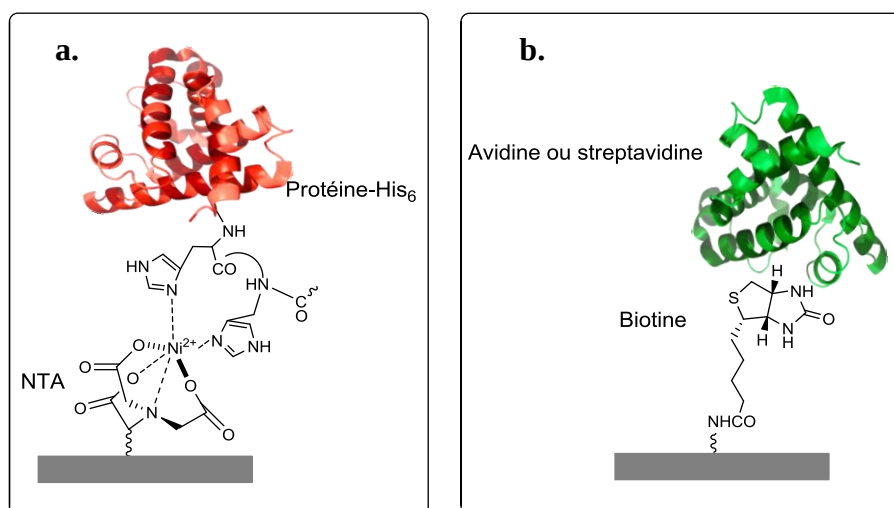


Figure 3. Exemples d'immobilisation par affinité biologique a. protéine-His₆ / NTA ; b. avidine ou streptavidine / biotine.

La molécule chélate peut être l'acide iminoacétique (IDA) ou l'acide nitrilotriacétique (NTA) d'une surface. Cette interaction est relativement faible, elle présente une constante de dissociation allant de 10^{-6} à 10^{-5} M. Ce type de marquage par une séquence d'oligohistidine est très utilisé en ingénierie génétique. Une autre approche également souvent utilisée est la reconnaissance avidine/biotine ou streptavidine/biotine et repose sur le principe clé-serrure (Figure 3 b).⁴ Ici, l'avidine ou la streptavidine sont les protéines et la biotine est le ligand. Ce système présente une des plus fortes interactions non covalentes connues avec une constante de dissociation de 10^{-15} M.

Le contrôle de l'immobilisation de protéines sur des substrats solides est crucial pour la bio-détection de molécules biologiques. En effet, maîtriser la chimie de surface contribuera de manière considérable à améliorer *in fine* les performances du biocapteur. Pour cela, les fonctions à la périphérie des protéines sont exploitées, il est alors nécessaire de fonctionnaliser à façon les surfaces des différents supports. D'après les exemples cités ci-dessus, on peut voir que l'immobilisation des protéines sur support solide nécessite une maîtrise de la chimie de surface.

Nous avons présenté dans le chapitre I les propriétés des systèmes dendritiques ainsi que des applications dans le domaine de la bio-fonctionnalisation. Nous avons vu qu'ils peuvent avoir une influence sur la fonctionnalisation du support et sur le greffage des biomolécules.

Dans ce chapitre nous allons voir la synthèse de systèmes dendritiques ainsi que leur greffage sur des surfaces de silice (SiO₂) de type wafer de silicium et lame de verre. Nous

étudierons particulièrement les différents paramètres qui influent sur leur processus de greffage.

De manière générale, les dendrons que nous avons synthétisés **D₁-D₅** (Figure 4) se divisent en plusieurs catégories, suivant la génération du dendron, les fonctions en périphérie, la fonction d'accroche (au point focal) et le segment espaceur. Nous nous sommes exclusivement focalisés sur la synthèse de dendrons de génération 1 et 2 pour les raisons explicitées dans le chapitre précédent, c'est-à-dire que des effets dendritiques négatifs pourraient être observés sur des structures de plus grande taille du fait de la congestion stérique à la périphérie.⁵

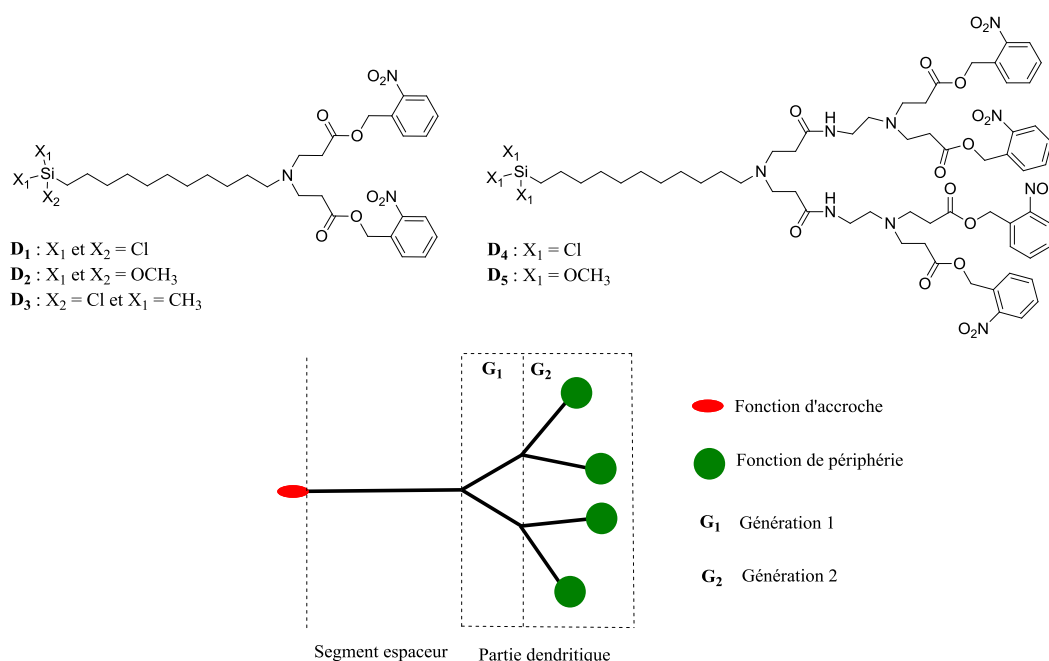


Figure 4. Structure et schématisation des composés siliciés étudiés.

Dans ce chapitre, nous avons voulu fonctionnaliser des surfaces SiO₂ afin d'immobiliser des biomolécules par voie covalente. Pour cela, nous avons choisi un couplage entre les liaisons amine des biomolécules (via les résidus Lys) et des fonctions acide (sous la forme ester activé) d'une surface que nous avons modifiée par des structures dendritiques. Ainsi, les dendrons présentés dans la Figure 4, possèdent des fonctions de périphérie de type ester nitrobenzylique (groupement photolabile protecteur d'acide).⁶ Il faut noter que ce groupement protecteur a été introduit afin d'éviter deux réactions secondaires qui pourraient intervenir lors du processus de greffage, qui sont soit une adsorption des agents de couplage sur la surface de silice par leurs fonctions acide, soit une complexation de ces fonctions acide avec le catalyseur de Pt qui est utilisé lors de l'étape d'hydrosilylation. L'avantage de ce

groupement protecteur est qu'il est photolabile sous irradiation UV, ce qui rend l'étape de déprotection relativement douce contrairement aux méthodes acides ou basiques généralement utilisées qui ont tendance à détériorer la couche de silice du substrat.⁷

En ce qui concerne la partie centrale des dendrons, nous avons choisi pour l'espaceur une chaîne alkyle linéaire à onze carbones. Les fonctions d'accroche au point focale sont des trichlorosilanes, des triméthoxysilanes ou des monochlorodiméthylsilanes (Figure 4). Ces fonctions sont introduites par hydrosilylation des oléfines terminales juste avant le greffage sur le support. Dans ce chapitre, deux types de greffage seront envisagés : le greffage des structures dendritiques seules et le greffage de systèmes mixtes. Le système mixte est composé d'organosilanes à structure dendritique et d'organosilanes à structure linéaire (chaînes alkyle) (Figure 5) afin de créer des monocouches auto-assemblées.

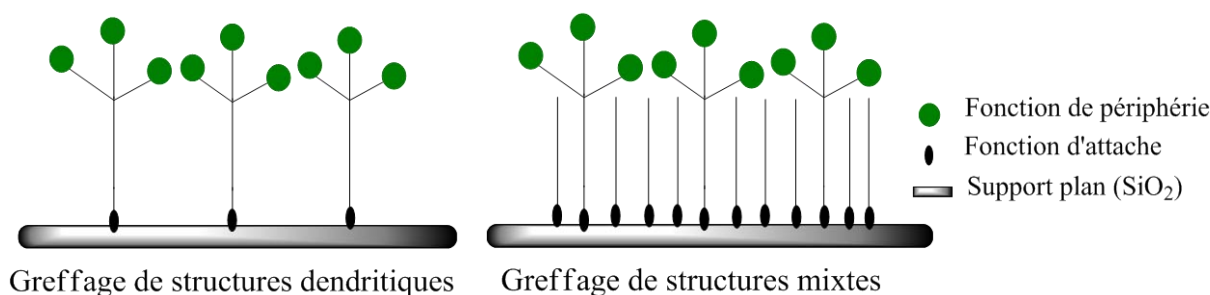


Figure 5. Schéma de surfaces modifiées avec une structure dendritique et avec une structure mixte.

2. Rappel sur les surfaces de silice :

Avant d'aborder la synthèse et le greffage des composés dendritiques, nous avons souhaité faire une revue rapide sur les propriétés et la composition de la silice.

La surface du solide SiO₂ est constituée de deux types d'atomes de silicium : les ponts siloxane Si-O-Si et les groupements silanols Si-OH. Ce sont ces derniers qui pourront être à l'origine d'interactions et/ou de réaction chimique (greffage) entre la surface de la silice et des composés possédant une fonction réactive vis-à-vis des silanols. Dans des conditions particulières, les ponts siloxanes peuvent être « activés », ce qui leur confère une certaine réactivité.

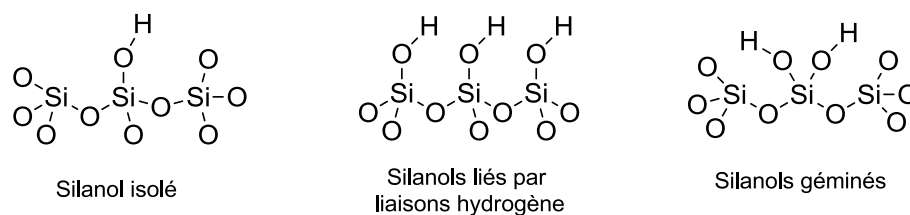


Figure 6. Représentation des trois types de fonction silanol.

Hormis les ponts siloxanes Si-O-Si, on distingue trois types de groupements silanols de surfaces⁸ (Figure 6) :

- Les groupements silanols isolés ou libres, pour lesquels l'atome de silicium forme trois liaisons covalentes avec des atomes d'oxygène de cœur et une quatrième avec un hydroxyle de surface.
- Les groupements silanols liés par liaisons hydrogènes, où deux fonctions hydroxyles liées à des atomes de silicium différents sont suffisamment proches pour interagir par liaisons hydrogènes.
- Les groupements silanols géminés, où deux fonctions hydroxyles sont liées à un même atome de silicium. Ces silanols sont minoritaires dans une surface de silice.

Les silanols présents à la surface de la silice lui confèrent des propriétés d'adsorption tout à fait particulières, notamment avec des composés pouvant créer des liaisons hydrogène.⁹ A température ambiante, sans précaution particulière, la silice est hydratée en surface. La désorption d'eau moléculaire physisorbée peut être effectuée par pompage sous vide primaire pendant au moins deux heures ou par chauffage à l'air à 110-150°C. Les groupements hydroxyles liés peuvent être éliminés sous vide vers 450°C. Pour des traitements thermiques au dessous de 400°C, la réhydratation de la silice est réversible. Au-delà de cette température, les processus sont beaucoup plus lents et la réversibilité n'est plus complète. La disparition des silanols isolés/gérminaux a lieu à température élevée, entre 600 et 1200°C¹⁰. Il y a alors formation de ponts siloxanes. Scott et Traiman¹¹ ont mis en évidence au moins trois couches d'eau adsorbée en surface (Figure 7).

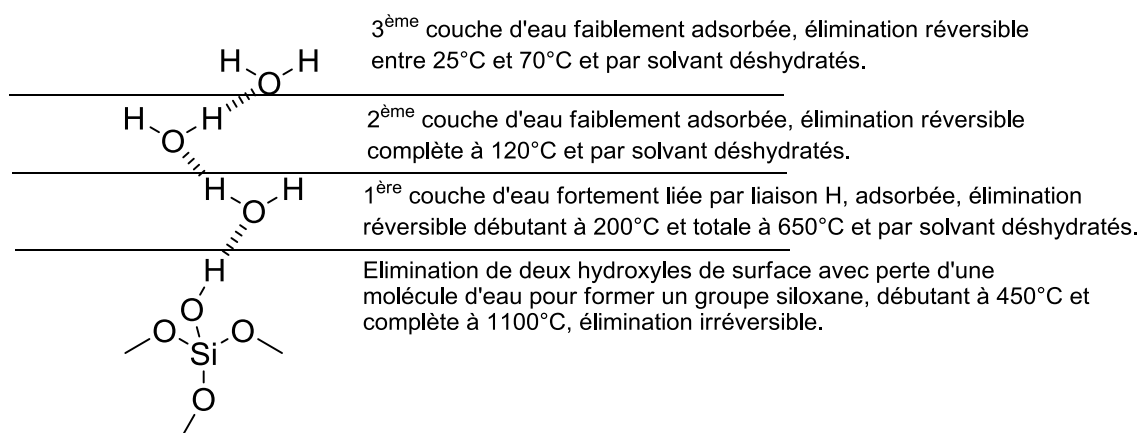


Figure 7. Représentation des trois monochouches d'eau physisorbées sur la silice.

Pour une silice non traitée, on estime la densité de groupements hydroxyles à 5 OH/nm² et de l'ordre de 3 OH/nm², après dégazage sous vide à 150°C. Après dégazage à 450°C, il ne reste plus sur la surface que des silanols isolés/géminés (1,2 à 1,5 OH/nm²). Ces valeurs peuvent varier jusqu'à une dizaine d'OH/nm² selon le type de silice étudiée et les traitements thermiques ou chimiques réalisés.¹²

3. Synthèse :

Dans une première approche, nous avons envisagé de synthétiser les dendrons **D₁-D₅** porteurs d'un ester nitrobenzylique en périphérie et d'un groupement silyle au point focal.

3.1. Première approche :

3.1.1. La synthèse du composé 11-Amino-1-undécène **4** :

La synthèse du composé **4** a déjà été décrite dans la littérature suivant deux différentes voies.^{13,15} Nous avons choisi une synthèse de Gabriel qui permet de synthétiser une amine primaire à partir d'un halogénure d'alkyle.¹⁴ Ainsi, le 11-bromo-1-undécène **1** réagit avec le phthalimide de potassium, dans un solvant polaire aprotique, favorable aux S_N2 qui est le DMF. Le composé **2** est ainsi obtenu avec un rendement de 99% (Figure 8).

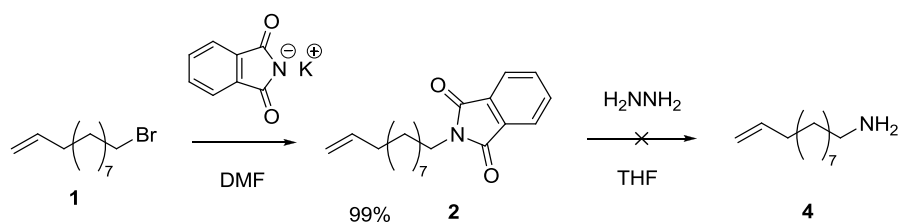


Figure 8. Synthèse du composé **4** à partir du composé **2**.

Ensuite, nous avons déprotégé la fonction phtalimide en utilisant de l'hydrazine monohydrate dans l'éthanol. Nous avons remarqué lors de cette réaction, une conversion totale de la fonction phtalimide en amine. Cependant, la RMN-¹H montre qu'il y a eu également une réduction de la fonction vinylique par l'apparition d'un CH₃ terminal. Pour éviter ce problème, nous avons choisi une autre méthode qui consiste à introduire un azoture à la place du phtalimide qui sera réduit par la suite pour obtenir une fonction amine (Figure 9). Dans cette synthèse décrite par Shuchun Joyce Yu et *al.*¹⁵, le groupement azoture est introduit à partir du composé **1** en présence d'azoture de sodium dans le DMF. Le composé **3** est obtenu avec un rendement de 90%. Ensuite, l'étape de réduction de l'azoture est envisagée suivant deux méthodes. La première méthode consiste à utiliser la réaction de Staudinger,¹⁶ permettant la réduction de l'azoture par la triphénylphosphine en présence d'eau (en tant que réactif de la réaction) dans le THF. L'inconvénient de cette réaction est l'élimination difficile de la triphénylphosphine en excès et de l'oxyde de triphénylphosphine formés lors de l'hydrolyse. En effet, l'oxyde de phosphine ainsi que la phosphine sont pratiquement solubles dans tous les solvants organiques exceptés les hydrocarbures, comme l'hexane et le pentane. De ce fait, nous avons procédé à plusieurs filtration dans l'hexane afin d'éliminer d'oxyde de phosphine, mais nous n'y sommes pas parvenu entièrement.

Une deuxième méthode a alors été explorée qui consiste en une réduction du composé **2** en présence de Zn et du NH₄Cl, dans un milieu hydro-alcoolique (Figure 9). Cette méthode a déjà été étudiée par exemple par Lin et *al.*¹⁷ ils ont ainsi réduit l'azidobenzlactame en dérivé aminé en seulement 10 minutes au reflux d'éthanol. En suivant ces conditions réactionnelles, le composé **4** est obtenu avec un rendement de 80% après distillation sous pression réduite à l'aide d'un four à boules.

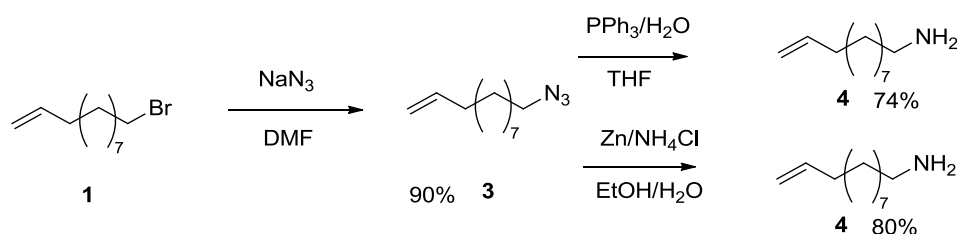


Figure 9. Synthèse du composé **4** à partir du composé **3**.

3.1.2. Synthèse du dendron 5:

La synthèse du composé **5** est réalisée à l'aide d'une double addition de Michael de l'amine primaire présente dans le composé **4** sur l'acrylate de méthyle (10 éq) (Figure 10). Cette réaction est effectuée dans le méthanol. C'est une réaction quantitative et l'excès de réactif (acrylate de méthyle) peut être éliminé par évaporation sous pression réduite. La synthèse du composé **5** nous a permis d'obtenir la structure dendritique de première génération correspondant aux molécules cibles **D₁**, **D₂** et **D₃** (Figure 4).

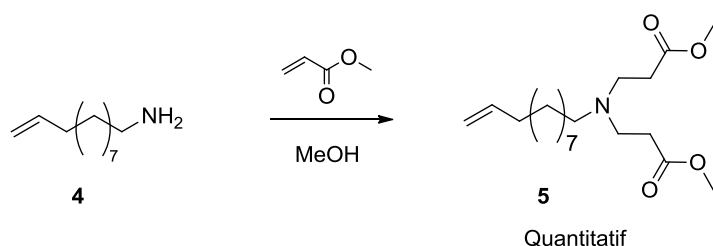


Figure 10. Synthèse du composé **5**.

L'addition de Michael ou réaction de Michael est une réaction qui permet la création de liaison carbone-azote. Il s'agit de l'addition nucléophile d'une amine primaire sur un composé carbonyle α,β -insaturé (esters ou amides) (Figure 11). L'addition de Michael appartient à la famille des additions nucléophiles conjuguées.

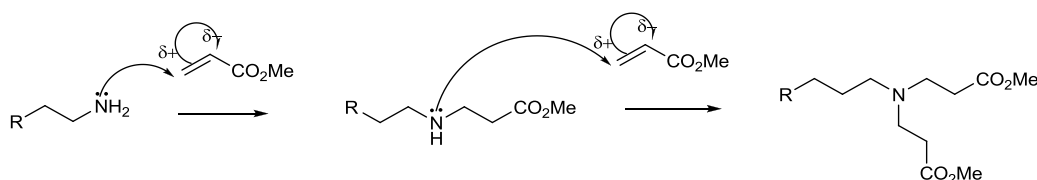


Figure 11. Mécanisme de la réaction de Michael.

3.1.3. Synthèse du dendron 6 :

Afin d'obtenir la formation des groupements nitrobenzyliques en périphérie du dendron **5**, il est nécessaire de générer des fonctions acides. Les fonctions acide relatives au composé **6** sont synthétisées par saponification des esters méthyliques en milieu hydroalcoolique en utilisant une solution de soude à 1 molaire. (Figure 12) Le composé **6** a ainsi été obtenu avec un rendement quantitatif.

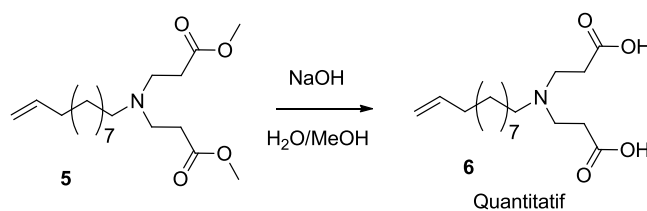


Figure 12. Synthèse du composé 6.

3.1.4. Synthèse du dendron 7 :

Pour introduire la fonction ester nitrobenzylique à partir des fonctions acides du dendron **6**, nous avons utilisé deux méthodes. La première méthode consiste en la formation d'un intermédiaire chlorure d'acyle à l'aide du chlorure d'oxalyle. La deuxième méthode un couplage peptidique en utilisant la chimie des carbodiimides (Figure 13).

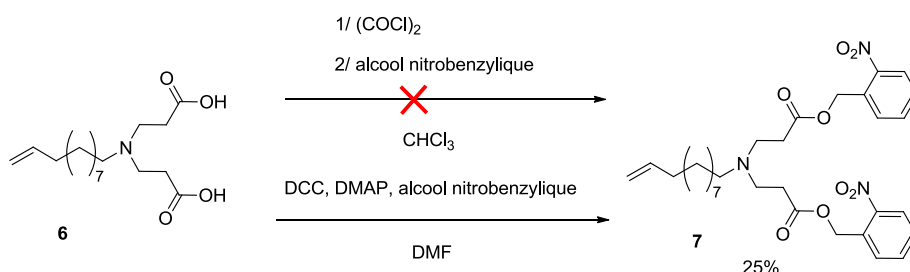


Figure 13. Synthèse du composé 7.

La réaction du dendron **6** avec le chlorure d'oxalyle pour former un chlorure d'acyle n'a pas permis l'obtention du composé **7**. Pour contourner ce problème, nous avons donc opté pour la chimie des carbodiimides. Ainsi, le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) est largement utilisée pour la formation des fonctions amide et ester en phase liquide ou solide, lors de la synthèse des peptides. Cependant, le sous produit *N,N'*-dicyclohexylurée (DCU) est difficile à éliminer car même après la filtration, il reste souvent des traces de ce produit dans le milieu réactionnel.¹⁸ Le mécanisme de cette réaction est détaillé dans la Figure 14. Ainsi, l'acide carboxylique réagit avec un carbodiimide, en présence de DMAP*. Le carboxylate formé va attaquer le carbone central du carbodiimide pour donner un composé intermédiaire *O*-acylisourée. Ce composé peut être considéré comme un ester activé qui va à son tour réagir avec l'alcool pour donner deux composés : un ester et une urée.

* DMAP : 4-diméthylaminopyridine

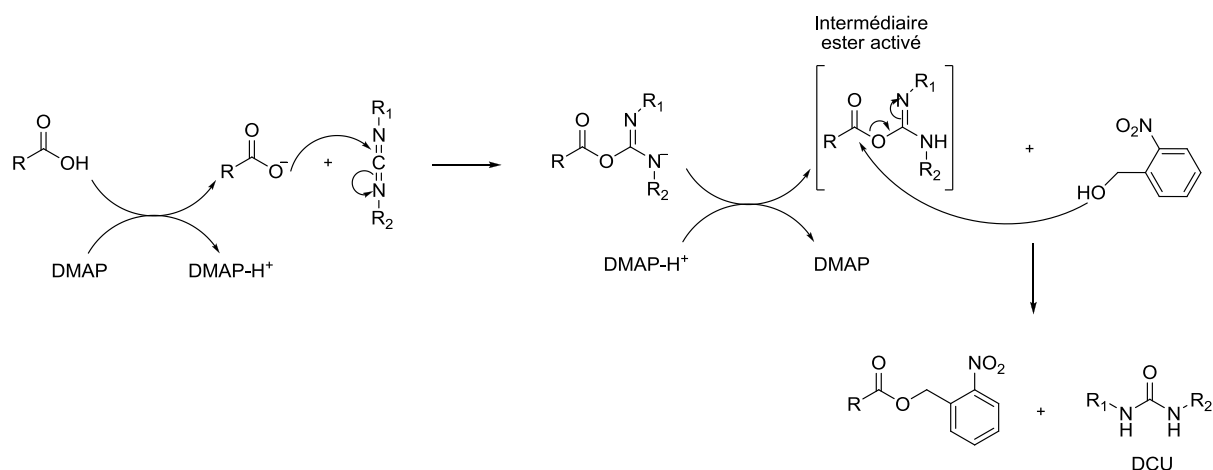


Figure 14. Mécanisme d'estérification par un carbodiimide.

La synthèse du composé nitrobenzylique **7** a été réalisée en faisant réagir le composé **5** dans le DMF avec de la DCC et de la DMAP en quantité catalytique. L'alcool 2-nitrobenzylique est alors ajouté pour obtenir le dendron **7**. La dicyclohexylurée (DCU) formée est insoluble dans les solvants organiques et est alors éliminée par filtration. Le composé **7** a été purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice. Il a été ainsi obtenu avec un rendement de 25%. Il est à noter que ce faible rendement peut être dû à la proximité des deux fonctions acide qui provoquent une gêne stérique responsable de la faible réactivité.

3.1.5. Synthèse des dendrons *D*₁, *D*₂ et *D*₃ (hydrosilylation) :

La réaction d'hydrosilylation est très utilisée en synthèse organique.¹⁹ Elle permet la formation d'organosilanes RCH₂CH₂SiX₃ (X : Cl, OMe) à partir de dérivés éthylénique R-CH=CH₂. Elle présente l'avantage d'être compatible en milieu anhydre avec de nombreux groupements fonctionnels (ester, urée etc.).¹⁹ L'addition d'un silane est catalysée par un catalyseur à base de platine. Le catalyseur de Karstedt est le plus souvent utilisé, il fait partie des catalyseurs les plus efficaces et les plus utilisés pour cette réaction.¹⁹ Il s'agit d'un complexe de platine (0) coordonné avec du divinyltétraméthyldisiloxane O(SiMe₂CH=CH₂)₂Pt (Figure 15).

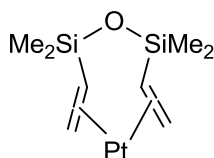


Figure 15. Représentation du catalyseur de Karstedt.

Le mécanisme de la réaction d'hydrosilylation par le catalyseur de Karstedt a fait l'objet de plusieurs études afin de déterminer les entités mises en jeu lors du cycle catalytique. Le mécanisme le plus couramment accepté est celui de Chalk-Harrod.²⁰ (Figure 16).

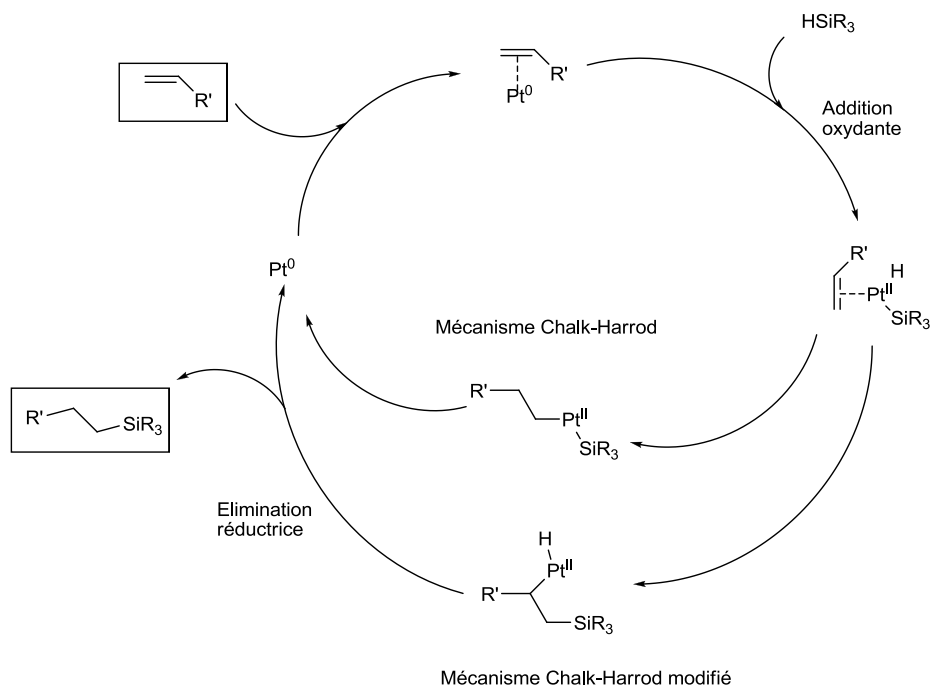


Figure 16. Mécanisme synthétique de la réaction d'hydrosilylation.

La première étape du cycle catalytique consiste en la coordination du platine (0) à l'oléfine. Ensuite, l'insertion du H-Si aura lieu sur le platine par addition oxydante, le platine passe au degré d'oxydation II. Puis, l'oléfine coordonnée avec le complexe migre entre la liaison Pt-H. La dernière étape est une élimination réductrice qui permet de libérer le produit de la réaction et de régénérer le Pt (0) dans le cycle catalytique. Le mécanisme initialement proposé par de Chalk-Harrod en 1965 a été modifié par Sakaki et *al.*²¹ en 1998. Ce nouveau mécanisme fait intervenir la migration de l'oléfine entre la liaison Pt-SiR₃ au lieu de Pt-H. L'hydrosilylation des oléfines terminales conduit généralement à la formation de deux isomères, α- et β- (Figure 17). Le catalyseur de Karstedt permet de former majoritairement l'isomère β-.

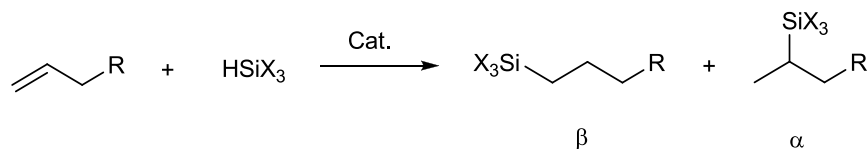


Figure 17. Synthèse des isomères α- et β- à partir d'une oléfine terminale.

Le composé **7** portant une fonction éthylénique terminale a été mis en présence de catalyseur de Karstedt et d'un large excès de silane (HSiCl₃ ou HSi(OMe)₃ ou HSi(Me)₂Cl) (Figure 18). Ainsi, 16 équivalents de silane ont été utilisés pour 0,1 équivalent de catalyseur (Pt). Des solvants anhydres sont nécessaires pour éviter l'hydrolyse du silane. Les réactions sont réalisées dans le toluène anhydre à 40°C pendant 2h. A la fin de la réaction, la purification des produits est effectuée par évaporation du solvant et de l'excès de silane. Le catalyseur de Karstedt introduit dans le milieu réactionnel n'est pas éliminé, mais sa présence ne pose pas de problème lors du greffage sur les surfaces.

Cette stratégie a permis de synthétiser les composés **D₁**, **D₂** et **D₃** (Figure 4). L'obtention des produits siliciés **D₁**, **D₂** ou **D₃** est contrôlée en RMN (¹H et ¹³C), par une disparition des protons et des carbones liés aux groupements éthyléniques. Les carbones (sp₂) à 139,2 et 114,1 ppm correspondants aux carbones de l'éthylénique disparaissent pour laisser apparaître deux carbones (sp₃) à 9,1 et 17,0 ppm correspondant à respectivement au CH₂-Si et CH₂-CH₂-Si.

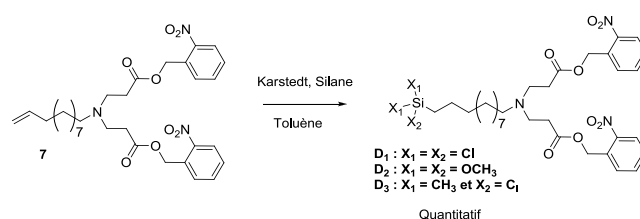


Figure 18. Synthèse des dendrons **D₁**, **D₂** et **D₃**.

Nous pouvons donc résumer le schéma réactionnel de synthèse en six étapes des composés **D₁**-**D₃** comme indiqué dans la Figure 19.

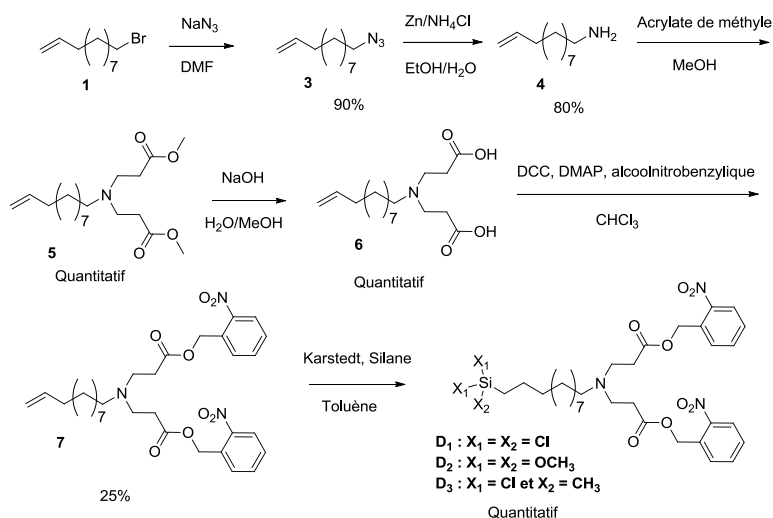


Figure 19. Schéma de synthèse des dendrons **D₁**-**D₃** selon la stratégie 1.

Nous avons voulu appliquer cette stratégie pour la synthèse des dendrons de deuxième génération **D₄** et **D₅**. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps construit le squelette dendritique et ensuite introduit les fonctions ester nitrobenzylique. La synthèse de la structure dendritique de deuxième génération est une synthèse classique des dendrons de types PAMAM.²² La propagation itérative du dendron est réalisée à partir du composé **4** par voie divergente, en faisant agir alternativement une double addition de Michael et une amidation.

3.1.6. Synthèse des dendrons **8** et **9** :

La première étape, est une amidation du composé **5** en présence d'un large excès d'éthylène diamine (80 équivalents) (Figure 20). Elle est réalisée avec un très grand excès d'éthylène diamine en milieu concentré pour éviter une double amidation intramoléculaire et pour favoriser une mono-addition intermoléculaire. L'éthylène diamine en excès est éliminé sous pression réduite à 40°C pendant une nuit. Le produit **8** est obtenu avec un rendement quantitatif.

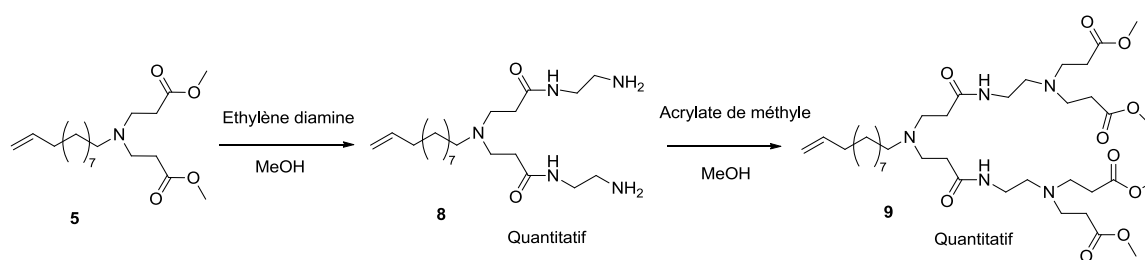


Figure 20. Schéma de synthèse des composés **8** et **9**.

La deuxième étape est une double addition de Michael du composé **8** avec de l'acrylate de méthyle qui nous permet d'obtenir le composé **9** avec un rendement quantitatif. L'excès d'acrylate de méthyle est également éliminé sous pression réduite à température ambiante.

3.1.7. Synthèse des dendrons **10** et **11** :

Il s'agit de réaliser une saponification du composé **9**, puis d'introduire l'ester nitrobenzylique à partir des fonctions acide *via* un chlorure d'acyle ou bien *via* un couplage peptidique (Figure 21).

Le composé **10** est synthétisé de manière quantitative par saponification des esters méthyliques du composé **9** en milieu hydroalcoolique et en utilisant une solution de soude à 1 molaire. Afin d'améliorer la résolution du spectre RMN ¹H (DMSO) du composé **10**, une

série de spectres ont été enregistrés en fonction de la température. Nous avons pu faire l'interprétation pour une température supérieure à 75°C.

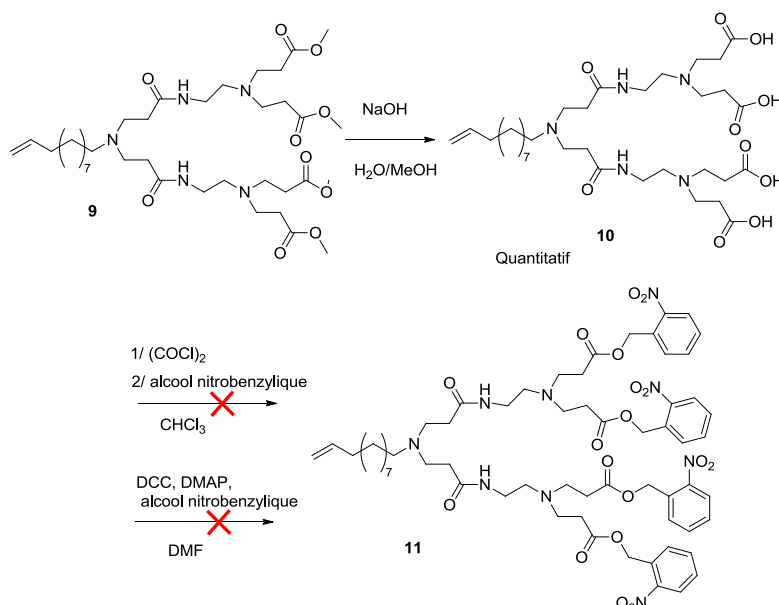


Figure 21. Schéma de synthèse de dendron de deuxième génération selon la 1^{ère} stratégie.

La formation du composé **11** via l'intermédiaire du chlorure d'acyle à l'aide du chlorure d'oxalyle n'a pas donné de résultats satisfaisants. Nous avons alors activé les fonctions acide du composé **10** par de la DCC/DMAP afin d'obtenir le composé **11**. Toutefois, cette méthode ne nous a pas permis de synthétiser le composé **11** probablement à cause de l'encombrement stérique entre les branches du dendrons **10**.

Nous avons alors envisagé une deuxième stratégie portant sur la formation d'un acrylate fonctionnalisé.

3.2. Deuxième approche :

Cette approche repose sur le principe de synthétiser un acrylate porteur de la fonction souhaitée (nitrobenzyle). Nous l'avons utilisé pour la synthèse des dendrons de première et de seconde génération (**7** et **11**). A la différence de la première approche, celle-ci n'implique pas de réaction à la périphérie ce qui permet d'éviter les problèmes de congestions stériques de la périphérie des dendrons.

3.2.1. Synthèse de l'acrylate de nitrobenzyle (composé **12**) :

Il s'agit d'une réaction entre le chlorure d'acryloyle et le 2-nitrobenzyl alcool en présence de la triméthylamine, dans du dichlorométhane anhydre (Figure 22). Le composé **12**

est obtenu après une purification par chromatographie sur gel de silice avec un rendement de 90%.

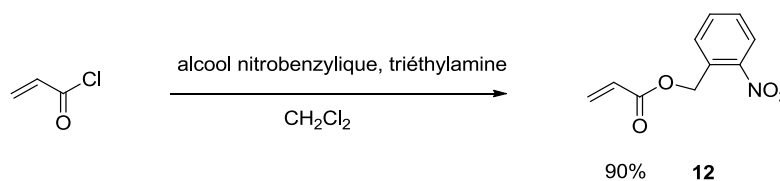


Figure 22. Synthèse du composé 12.

3.2.2. Synthèse du dendron 7 selon la 2^{ème} approche :

La synthèse du composé 7 (que nous avons déjà réalisé dans le §3.1.4, selon la première approche) est ici réalisée par double addition de Michael, la fonction amine primaire du composé 4 sur l'acrylate de nitrobenzyle (12) (Figure 23). Dans un premier temps, nous avons effectué cette réaction dans le méthanol mais une réaction de transesterification a été observée en RMN ¹H (caractérisée par l'apparition de signaux à 3,6 ppm), les pics correspondants à l'alcool nitrobenzylique, étant toujours présents dans le milieu réactionnel. Nous avons alors changé le solvant de la réaction par le DMF, qui est un solvant polaire aprotique. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours à 50°C. Le composé 7 est alors obtenu et purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice. Il a été obtenu avec un rendement quantitatif.

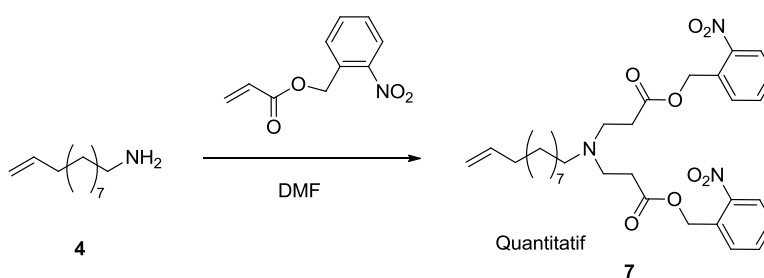


Figure 23. Synthèse du composé 7.

En optant pour cette seconde approche nous avons donc réussi à améliorer la synthèse du dendron 7 de première génération, en augmentant le rendement de façon significative (25% avec la première approche et un rendement quantitatif avec la deuxième approche). Cette seconde approche nous a également permis de réduire le nombre d'étapes de synthèse de 5 étapes à 4 étapes.

3.2.3. Synthèse du dendron 11 selon la deuxième approche :

La synthèse du dendron de seconde génération (composé **11**) est décrite dans la Figure 24. Ainsi, le composé **8**, portant deux fonctions amine primaire, réagit avec l'acrylate de nitrobenzyle dans le DMF à 50°C selon une double addition de Michael. Afin d'obtenir une conversion quantitative le mélange réactionnel est agité pendant 5 jours. A la fin de cette réaction, le composé **11** est purifié par colonne de chromatographie sur gel de silice avec un rendement quantitatif.

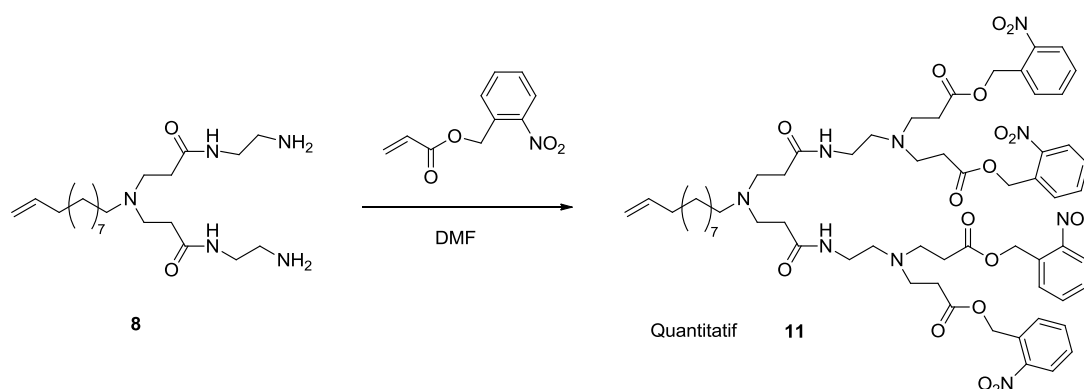


Figure 24. Synthèse du composé **11**.

3.2.4. Synthèse des dendrons D₄ et D₅ (hydrosilylation) :

L'étape d'hydrosilylation est une étape cruciale pour le greffage ultérieur de ces dendrons sur les surfaces. Le composé **D₄** a été synthétisé à partir du composé **11** (Figure 25) en présence du catalyseur de Karstedt (0,2 éq en Pt) et d'un large excès de trichlorosilane (32 éq) dans le dichlorométhane à 40°C pendant 16 heures. Le composé **D₅**, quant à lui, a été synthétisé à partir du composé **11** (Figure 25) en présence du catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt) et d'un large excès de triméthoxysilane (16 éq) dans le dichlorométhane anhydre à température ambiante pendant 2 heures. L'obtention des deux produits **D₄** et **D₅** a été confirmé par les analyses RMN ¹H.

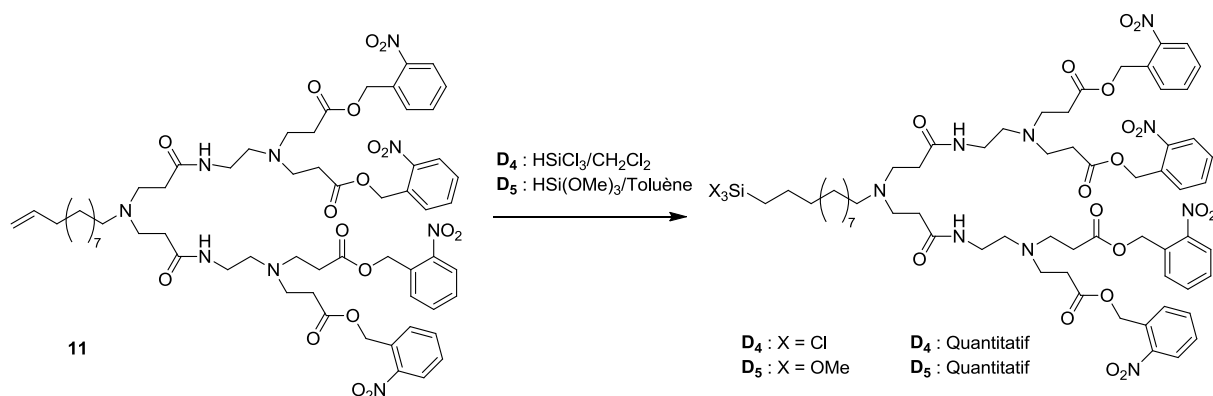


Figure 25. Synthèse des composés D_4 et D_5 .

4. Modification chimique des surfaces :

Deux types de substrats adaptés aux techniques de caractérisation de surface ont été utilisés pour les greffages. Des substrats pour l'analyse infrarouge adaptés pour le PM-IRRAS et des substrats de silicium pour les mesures de l'angle de contact et les mesures d'AFM.

4.1. Substrats utilisés :

4.1.1. Substrats PM-IRRAS :

Les substrats pour le PM-IRRAS (5 cm x 5 cm) sont des lames de verre recouvertes d'une couche d'or, elles-mêmes recouvertes d'une fine couche de SiO₂.[†] Ils permettent l'enregistrement de spectres PM-IRRAS (spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption par modulation de polarisation). L'or permet d'exalter le champ électrique au voisinage de la surface métallique, ce qui permet d'améliorer la qualité des spectres mesurés.

Grâce à la technique PMIRRAS, l'analyse par infrarouge des greffages peut être réalisée entre 1300 cm⁻¹ et 4000 cm⁻¹. A la différence de la technique infrarouge par transmission qui ne permet l'analyse qu'à des fréquences supérieures à 2500 cm⁻¹ à cause de l'absorption du support (verre), ce qui limite l'analyse qu'au mode de vibration d'élongation ν_{as} et ν_{s} des groupements CH₂. Ainsi, la technique PM-IRRAS, permet d'analyser d'autres groupements fonctionnels comme les esters, amides, nitros, etc. De plus, cette technique permet d'avoir des informations sur l'orientation des molécules à la surface des substrats dans certains cas (voir annexe 1).²³

[†] Ces substrats (Goldflex[®] pro de Optics Balzers) ont une épaisseur de silice de 21,5 ± 0,7 nm mesurée par ellipsométrie.

4.1.2. Substrats de silicium :

Ces substrats (1 cm²) sont des wafers de silicium, recouverts d'une couche native de SiO₂ de l'ordre du nanomètre d'épaisseur sur laquelle les greffages sont réalisés. Ces supports sont fournis par la société BT Electronics. Ils ont été choisis pour des études d'AFM car il présente une rugosité faible de 0,18 nm tandis que les substrats spécifiques pour l'analyse PM-IRRAS présentent une rugosité de 1 nm.

4.2. Activation de la surface des substrats :

L'activation des surfaces est une étape clé pour la réalisation du greffage car elle conditionne les propriétés et la qualité du revêtement. Elle permet d'éliminer les traces de contaminants organiques et d'enrichir la surface en groupement silanols. Il existe plusieurs méthodes d'activation de substrat de silice : lavage par un tensioactif basique, traitement par une solution H₂SO₄/H₂O₂ (solution "piranha") ou exposition à une lampe UV/ozone à l'air. Cependant, il a été montré que les deux premières méthodes d'activation engendraient une dégradation des substrats et une augmentation de la rugosité à la surface.²⁴ En conséquence, nous avons choisi l'activation avec un traitement UV/ozone qui préserve l'intégrité des surfaces.

Les supports pour le PM-IRRAS sont des miroirs d'or recouvert d'une couche de SiO₂ de 20 nm, ceux-ci sont découpés au préalable pour avoir une surface de 2,5 cm x 2,5 cm. Les supports PM-IRRAS et wafer de silicium sont lavés abondamment avec de l'eau ultra pure (milliQ) afin d'enlever les poussières et les débris de verres présents sur leur surface. Ensuite, ils sont plongés dans du chloroforme et mis dans un bain à ultrasons pendant 15 min. Ils sont séchés sous jet d'azote sec et placés sous une lampe UV/Ozone (185 nm – 254 nm) pendant 30 min. Ce rayonnement crée par photodissociation de l'oxygène, de l'ozone O₃ et des radicaux O[•].²⁵ Ces gaz viennent attaquer les composés organiques résiduels. À la fin de cette étape, les surfaces sont prêtes à être silanisées. Il est à noter que les supports (wafer de silicium) avant traitement UV/Ozone, présentent un angle de contact de 71° avec l'eau. Cependant, après traitement UV/Ozone l'angle de contact est proche de 0° (mouillage total) ; cette valeur est observée sur différents endroits de l'échantillon, ce qui montre l'homogénéité du traitement sur toute la surface. Ce résultat confirme la présence de groupements silanol en surface des échantillons. L'énergie de surface a été calculée à partir du modèle d'Owens-Wendt-Rabel-Kaelble (voir annexe 3). Avant traitement UV/ozone, l'énergie de surface est de 30,9 mN/m avec une composante polaire de 16,8 mN/m et une composante apolaire de 14,8

mN/m. Après traitement, elle est de 67,2 mN/m avec une composante polaire de 45,2 mN/m et une composante apolaire de 22,0 mN/m. Nous relevons que la valeur de l'énergie de la composante polaire a quasiment triplé. Ces valeurs indiquent que la surface est hydrophile.

Les surfaces ont également été imagées en AFM, en mode contact intermittent. L'image de hauteur (Figure 26 a) sur la surface d'un wafer après traitement UV/ozone, montre une homogénéité de la surface sans présence de défaut apparent. La rugosité moyenne (Rms), déterminée sur la globalité de l'image de 2 μm x 2 μm est de 0,18 nm. L'image de phase (Figure 26 b) montre que nous avons la même phase sur la globalité de l'image, ce qui indique l'uniformité de la nature du matériau après traitement UV/ozone.

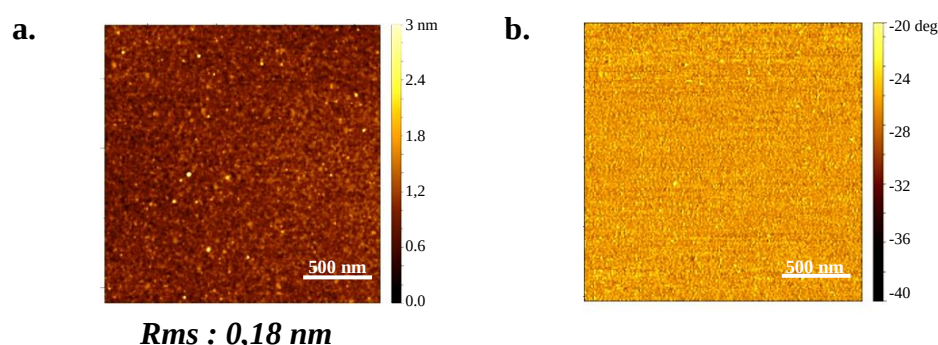


Figure 26. (a) Image AFM de hauteur ou topographie [2 μm x 2 μm] de wafer de silicium après traitement UV/O₃. (b) Image de phase de wafer de silicium après traitement UV/O₃.

4.3. Greffage des composés dendritiques :

Dans cette partie nous décrivons le greffage des dendrons de 1^{ère} génération **D₁-D₃**. Afin d'optimiser la qualité des couches greffées par ces agents de couplage dendritiques, l'effet de plusieurs paramètres expérimentaux a été examiné :

- La nature du groupement silyle (SiCl₃, Si(OMe)₃, Si(Me)₂Cl).
- Le temps de réaction (t).
- La température (T).
- Le solvant. Tous les solvants de la solution de silanisation (réaction de greffage) doivent être anhydres pour éviter l'hydrolyse en solution des agents de couplage.

La concentration en organosilane (**D₁-D₃**) a été fixée à 2,5 10⁻⁴ M, cette valeur a été choisie par rapport à des travaux réalisés antérieurement au Laboratoire sur des couches auto-assemblées.²⁶ En effet, des concentrations de 1.10⁻⁴ M, 2,5.10⁻⁴ M et 5.10⁻⁴ M avaient été testées et les résultats du greffage avaient montré que la meilleure couche était obtenue pour une concentration de 2,5.10⁻⁴ M en organosilane.

4.3.1. Effet du groupement silyle et du temps de réaction :

Le greffage sur les supports a d'abord été envisagé avec trois agents de couplage qui diffèrent par la nature du groupement silyle : SiCl₃ (pour **D**₁), Si(OMe)₃ (pour **D**₂) et Si(Me)₂Cl (pour **D**₃), avec des conditions expérimentales identiques : une concentration en organosilane de 2,5.10⁻⁴ M, une température de 18°C, et dans le toluène anhydre. Cependant nous avons varié le temps de réaction car la cinétique du greffage n'est pas la même. En effet, la liaison Si-Cl est beaucoup plus réactive que la liaison Si-OMe. Pour les composés **D**₁ et **D**₃, le temps est compris entre 5 min et 120 min et pour le composé **D**₂, le temps est compris entre 15h et 21h.

a. Greffage du composé **D**₁ : surface SiO₂@**D**₁ :

La cinétique de greffage du composé **D**₁ a été suivie par la mesure de l'angle de contact, l'infrarouge (PM-IRRAS) et par imagerie AFM des surfaces greffées. Lors de la silanisation (réaction de greffage ; Figure 27), il a été observé que la solution se troublait au cours du temps. Ce problème de solubilité pourrait venir de l'hydrolyse partielle du groupement chlorosilane à cause des traces d'eau résiduelles. Egalement, une réaction de protonation de l'amine tertiaire a été mise en évidence en RMN du proton. Ainsi, un déplacement des protons en α- de l'azote de 0,8 ppm et en β- de 0,6 ppm a été observé vers les plus hautes fréquences (entre avant et après la réaction d'hydrosilylation).

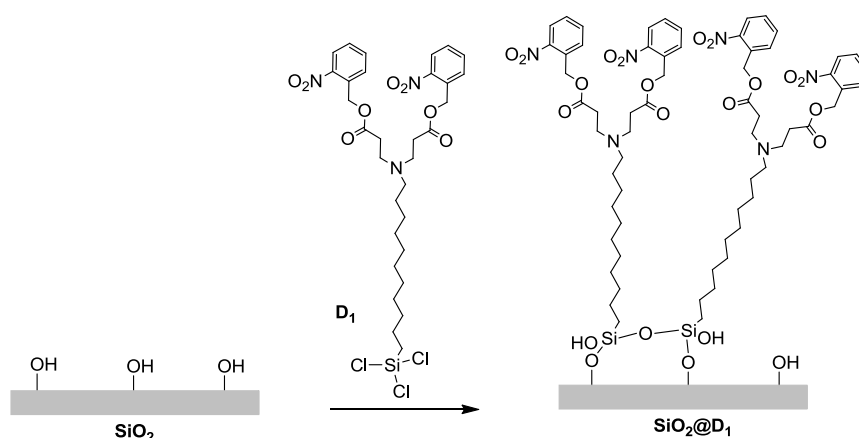


Figure 27. Schéma de la réaction de greffage du composé **D**₁.

L'angle de contact avec l'eau des surfaces SiO₂@**D**₁ a été mesuré et les valeurs sont rassemblées dans le graphe ci-dessous (Figure 28) :

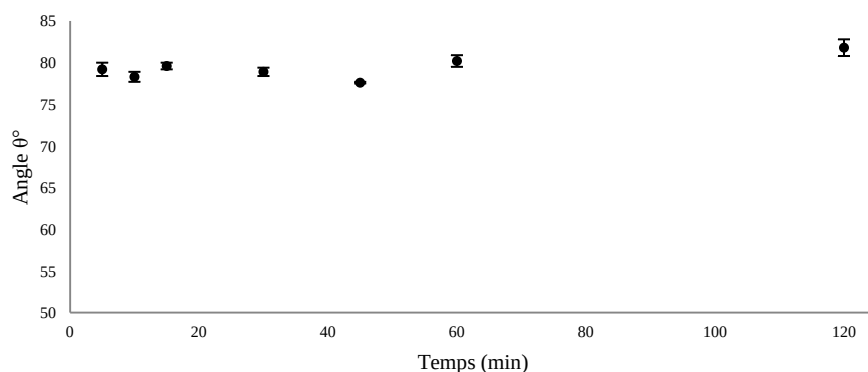


Figure 28. Évolution de l'angle de contact avec l'eau en fonction du temps d'immersion du support lors de l'étape de greffage du composé **D₁**.

L'angle de contact initialement de 0° (avant greffage) est de 79° après 5 min de greffage indiquant que la surface devient plus hydrophobe. Cependant, cette valeur reste constante en fonction du temps dès 5 min. Nous remarquons également que l'erreur sur la mesure (l'incertitude) est faible entre les différents endroits de l'échantillon ce qui indique que le greffage est homogène sur la globalité de la surface. Cette valeur d'angle de contact est plus forte que celle observée dans la littérature avec des chaînes linéaires ayant un ester nitro-benzylique qui est de 72°. ^{6b} L'énergie de surface mesurée est de 25,9 mN/m avec une composante polaire de 5,1 mN/m et une composante apolaire de 20,8 mN/m.

Des analyses des substrats greffés ont été réalisées par PM-IRRAS. Cette technique nous informe non seulement de la présence ou non de groupements fonctionnels de la molécule mais aussi de l'évolution de la quantité de matière à la surface des substrats car c'est une mesure quantitative.

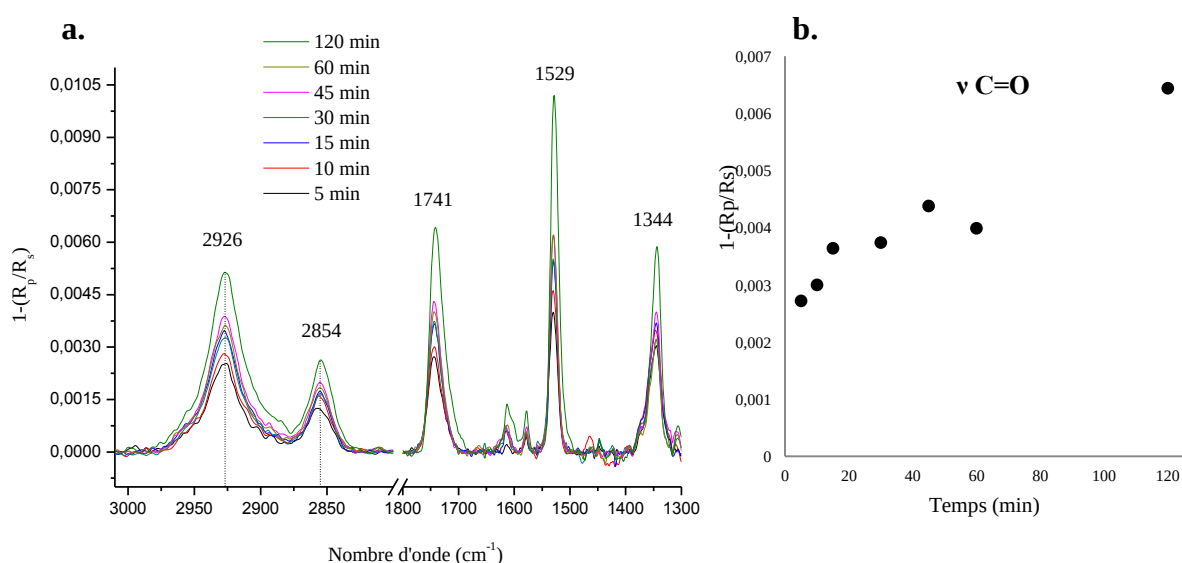


Figure 29. (a) Spectres PM-IRRAS de SiO₂@D₁ en fonction du temps. (b) Intensité de la bande de vibration ν_{CO} (1741 cm⁻¹) en fonction du temps.

Les spectres PM-IRRAS (Figure 29 a) montrent plusieurs modes de vibration : les modes de vibration d'élongation des CH₂ (ν_{as} et ν_s) à 2926 cm⁻¹ et 2854 cm⁻¹, le mode de vibration d'élongation de C=O de l'ester à 1741 cm⁻¹ et les modes de vibration d'élongation du groupement NO₂ (ν_{as} et ν_s) à 1529 cm⁻¹ et 1344 cm⁻¹ qui sont très intenses. L'observation de ces bandes sur la surface du support montre clairement la présence de la molécule **D**₁.

Le graphe b de la Figure 29, montre l'évolution des intensités du mode de vibration d'élongation relatif à la fonction C=O en fonction du temps de réaction. Nous remarquons une évolution relativement constante au cours du temps sans pour autant atteindre un plateau. Cette tendance est la même sur les autres bandes du spectre PM-IRRAS. Ainsi, nous pouvons d'ores et déjà dire que plus le temps d'immersion est long, plus il y a présence de matière à la surface des substrats.

La position des bandes associées aux modes CH₂ (ν_{as} et ν_s) ne varie pas avec le temps d'immersion. Ces bandes sont observées à des nombres d'onde relativement élevés, ν_{as} : 2926 cm⁻¹, ν_s : 2854 cm⁻¹, ce qui montre un désordre des chaînes alkyles de la molécule sur la surface.²⁷

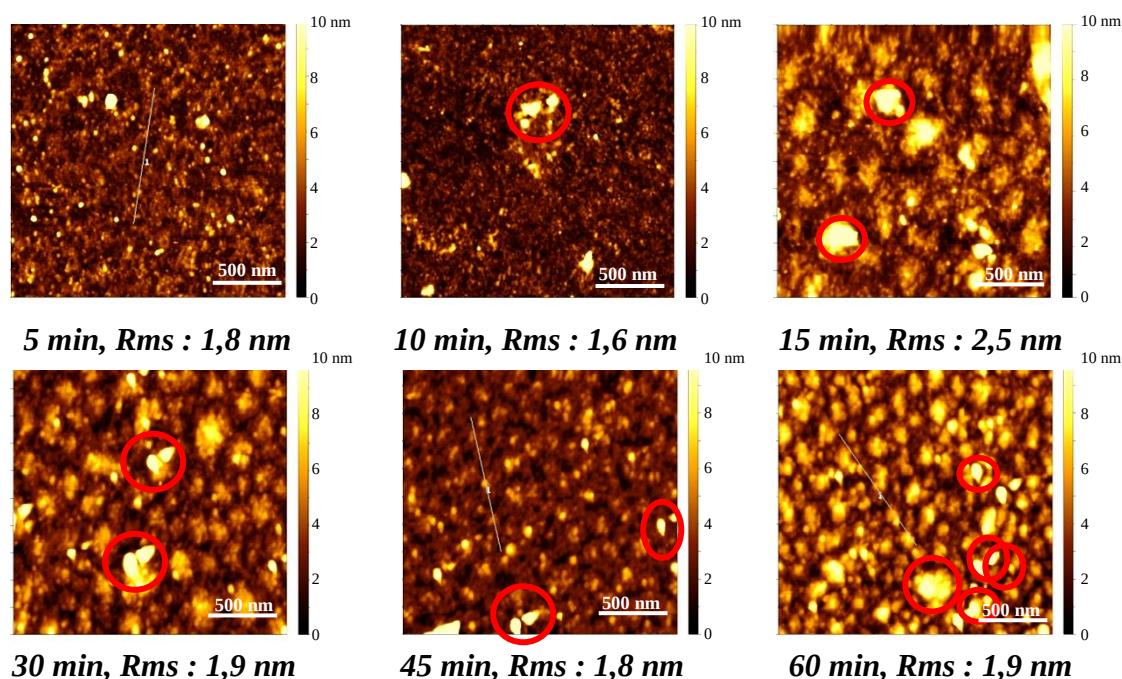


Figure 30. Images de hauteur (2 μm x 2 μm) et Rms des surfaces greffées avec le composé **D**₁ pour les différent temps de réaction dans le toluène à 18°C.

Une analyse par microscopie à force atomique (AFM) a été réalisée. Le greffage du composé **D**₁ réalisés sur des substrats silicium a été analysé en AFM, en mode contact intermittent, pour différents temps d'immersion dans la solution de silanisation (Figure 30).

Ces surfaces ont été caractérisées avec une pointe AFM en Silicium (Type forte, de Agilent) de faible constante de raideur 4 N/m. Le levier a une longueur de 225 μm , une largeur de 45 μm et une fréquence propre de 60-70 kHz.

Les images de hauteur (Figure 30) indiquent une progression de la quantité de matière à la surface du substrat au cours du temps. Cependant, la rugosité reste élevée quelque soit le temps entre 1,6 nm et 2,5 nm contre 0,2 nm observé avant le greffage. Cette rugosité est relativement élevée pour une monocouche. En général, dans le cas des monocouches réalisées avec des molécules linéaires, la valeur de la rugosité est plus faible que celle de la taille de la molécule. Dans notre cas, nous avons calculé que la taille de la molécule est d'environ 2,3 nm. Nous remarquons également la présence de quelques agrégats (polysiloxane) sur toutes les images de l'ordre de la dizaine de nanomètres (Figure 31) en hauteur et la centaine de nanomètre en largeur (indiquée par un cercle sur les images de hauteur). Egalement, les profils de hauteur (Figure 31) montrent une augmentation des îlots, essentiellement latéralement (en xy) en fonction du temps entre 5 min et 30 min. Ainsi, leurs largeurs passent de 20 nm à 160 nm et leurs hauteurs de 3 à 6 nm. A partir de 30 min et jusqu'à 60 la taille des îlots reste stable. Cependant, à partir de 60 min, on observe un plus grand nombre d'agrégats en surface ce qui est cohérent avec les résultats infrarouge.

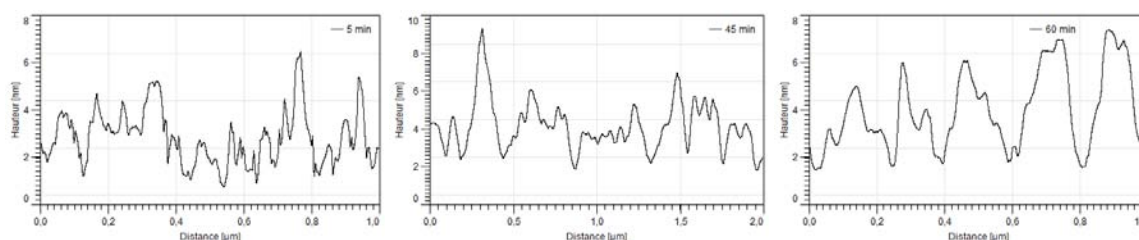


Figure 31. Profils de hauteur pour des temps d'immersion de 5, 30 et 60 minutes.

L'image de phase (Figure 32 b) montre une image uniforme de même phase sur la globalité de l'image de (2 μm x 2 μm), alors que l'image de topographie (Figure 32 a) montre la présence d'agrégats au centre de l'image d'une dizaine de nanomètre en hauteur. Ce résultat indique la présence de propriétés mécaniques de surface identiques entre le fond et les agrégats, ce qui prouve qu'ils sont de la même nature chimique.

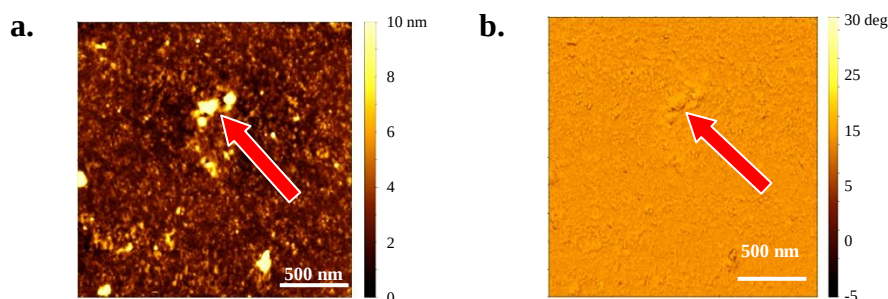


Figure 32. Image de hauteur (a) et de phase (b) à $t : 10 \text{ min}$ ($2 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m}$).

En conclusion, le greffage du composé **D₁** avec une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$, à 18°C dans le toluène montre une grande densité de greffage mais aussi un désordre des chaînes alkyles. Après seulement 5 min de temps d'immersion, la couche organique est complète, la formation d'agrégats apparaît avec le temps d'immersion. L'angle de contact indique que la surface a été modifiée de manière homogène dans sa globalité. L'infrarouge montre une augmentation constante de la quantité de matière à la surface. Les images AFM confirment les deux résultats précédents, et elles montrent aussi que les surfaces présentent une rugosité importante (R_{ms} entre 1,6 et 2,5 nm). Ces anomalies sur le greffage du composé **D₁** sont peut être dues à sa faible solubilité dans le toluène. Le temps de 45 minutes est retenu pour le greffage de **D₁** car à partir de 60 minutes, la présence d'agrégats est plus importante.

b. Greffage du composé **D₂** : surface **SiO₂@D₂**

Le greffage du composé **D₂** (Figure 33) porteur du groupement hydrolysable Si(OMe)₃ a été réalisé dans les mêmes conditions que le composé **D₁** avec une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ à 18°C et dans le toluène. Cependant, le greffage par le groupement silyle Si(OMe)₃ nécessite un catalyseur pour accélérer l'hydrolyse ; nous avons donc choisi l'acide trichloracétique (TCA). La quantité utilisée est de 10% molaire par rapport à la quantité de composé **D₂**. La nature du catalyseur ainsi que sa quantité ont été choisies en se référant à des travaux antérieurs réalisés au Laboratoire.²⁶ Malgré la présence de catalyseur la cinétique du greffage reste lente comparativement à un greffage avec des groupements SiCl₃. De ce fait, nous avons choisi trois temps d'immersion : 15 h, 18 h, 21 h. En revanche, il est à retenir que le composé **D₂** est très soluble dans le toluène contrairement au composé **D₁**.

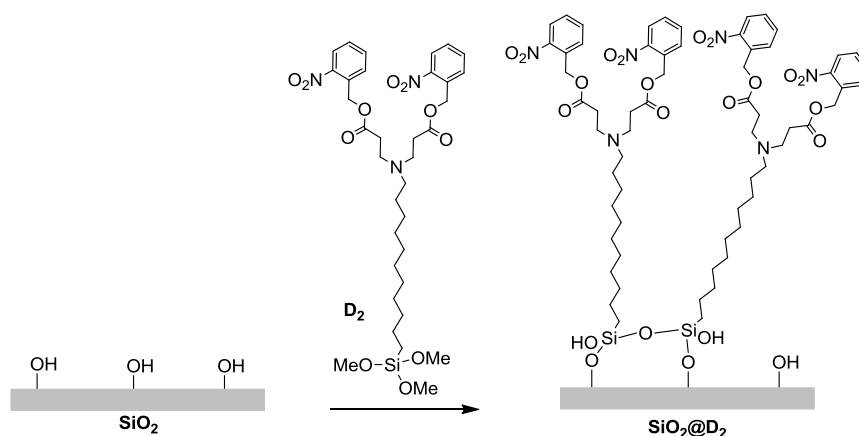


Figure 33. Schéma de la réaction de greffage du composé **D₂**.

L'angle de contact des surfaces greffées **SiO₂@D₂** a été mesuré avec l'eau (Figure 34). Il montre un greffage des molécules organiques car la surface est devenue hydrophobe. Cependant, nous n'observons pas d'évolution au cours du temps. La valeur de l'angle reste constante autour de 85°. Elle est plus élevée de 5° par rapport à celle observée pour le composé **D₁**. Nous constatons également que l'erreur sur la mesure (l'incertitude) est très faible de l'ordre de 2° indiquant une homogénéité du recouvrement sur l'intégralité du support.

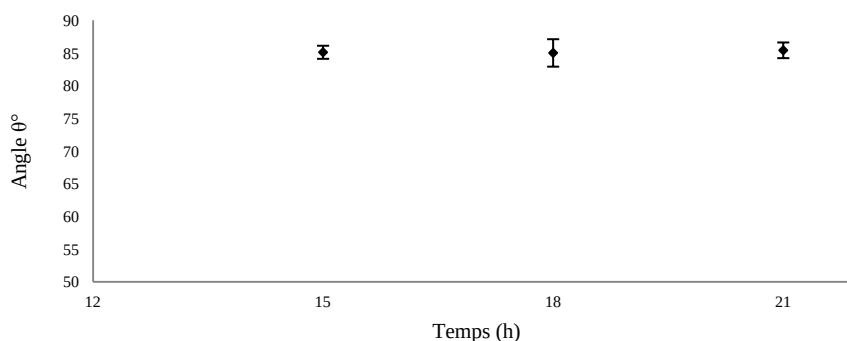


Figure 34. Évolution de l'angle de contact avec l'eau en fonction du temps d'immersion.

Les spectres PM-IRRAS correspondants aux différents temps de silanisation sur **SiO₂@D₂** sont présentés dans la Figure 35. Nous observons les différents modes de vibration de la molécule **D₂** : les modes d'élongations des CH₂ (ν_{as} : 2928 cm⁻¹ et ν_s : 2856 cm⁻¹), des C=O de l'ester (1740 cm⁻¹) et des NO₂ (ν_{as} : 1528 cm⁻¹ et ν_s : 1345 cm⁻¹). En revanche, les signaux des spectres sont très faibles en intensité par rapport à ceux observés dans le cas du composé **D₁**, ce qui montre que la quantité de matière à la surface est moindre. Nous pouvons donc penser que le greffage est moins dense. Les positions des bandes des modes d'élongation des CH₂ (ν_{as} et ν_s) à 2928 cm⁻¹ et 2856 cm⁻¹ montrent que les chaînes carbonées ne sont pas

ordonnées. Nous remarquons également que l'intensité des bandes augmente sensiblement avec un temps de réaction de 21h.

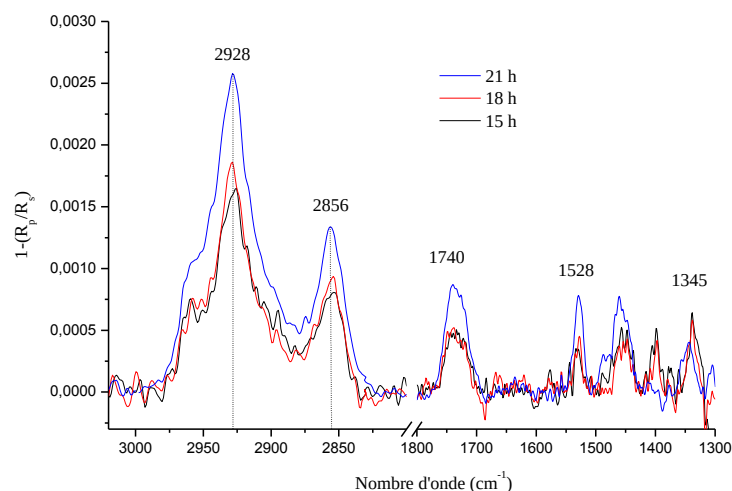


Figure 35. Spectres PM-IRRAS du composé **D₂** greffés en fonction du temps.

Les surfaces modifiées avec le composés **D₂** (SiO₂@**D₂**) ont également été caractérisées en AFM, en mode contact intermittent avec la même pointe que celle utilisée pour le composé **D₁**.

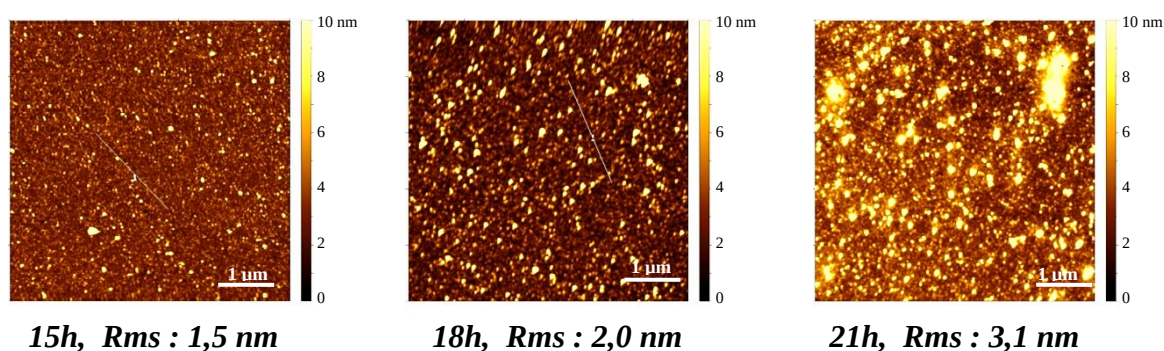


Figure 36. Images de Hauteur (5 μm x 5 μm) du composé **D₂** pour différents temps de réaction.

Les images de hauteur présentées dans la Figure 36 montrent une augmentation de la quantité de matière en fonction du temps. Les valeurs des Rms augmentent également au cours du temps, nous relevons une valeur de 1,5 nm pour 15 h de temps d'immersion et 3,1 nm pour 21 h. De plus, les images montrent la présence d'agrégats de polysiloxane surtout à 21 h de temps de réaction. Les profils de hauteur (Figure 37) montrent une augmentation des îlots essentiellement en hauteur. Ainsi leurs hauteurs passent de 3 nm en moyenne à 6 nm.

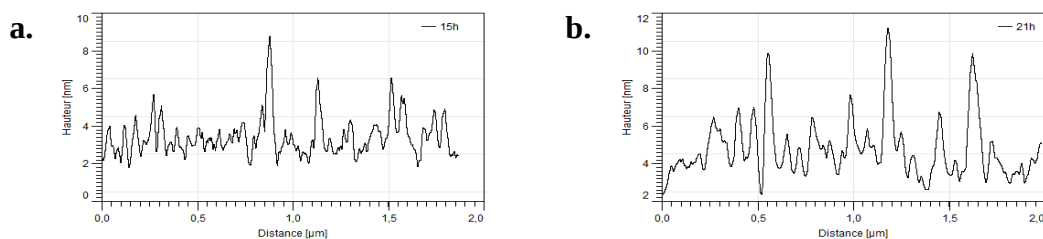


Figure 37. Profils de hauteur pour des temps d'immersion de 15h (a) et 21h (b).

L'image de phase (Figure 38) montre une image uniforme de même phase sur la globalité de l'image (5 μm x 5 μm). Ce résultat prouve que le greffage est homogène, de même nature chimique et dépourvu de défauts.

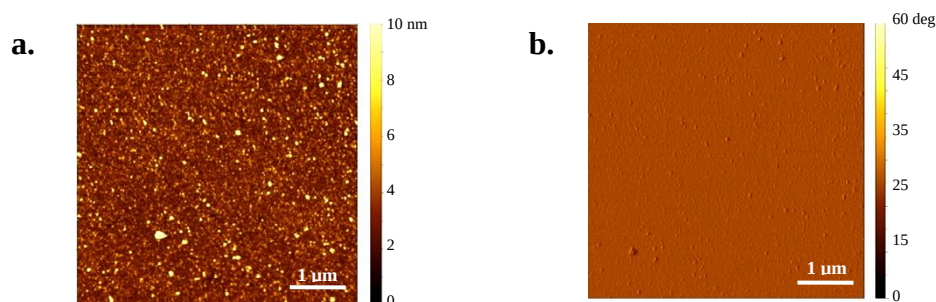


Figure 38. Image de hauteur (a) et de phase (b) à t : 15 heures (5 μm x 5 μm).

En conclusion, le greffage du composé **D₂** dans les mêmes conditions de température, de solvant et de concentration que le greffage du composé **D₁**, montre une faible densité de molécule à la surface des supports. Cependant, le greffage est homogène sur la globalité des substrats. En effet, l'angle de contact montre une valeur élevée (85°) avec une faible incertitude. L'infrarouge confirme la présence de la molécule sur la surface. Par contre, les signaux ont une faible intensité par rapport à ceux obtenus avec le composé **D₁**. Toutefois, les images AFM montrent des valeurs de rugosité élevées, mais cependant du même ordre de grandeur que celles obtenues avec le composé **D₁**.

c. Greffage du composé **D₃** : surface **SiO₂@D₃**

Le greffage du composé **D₃** (Figure 39) porteur du groupement hydrolysable SiMe₂Cl a été mis en œuvre dans le but de prévenir de la polymérisation entre les silanes. Il contient une seule fonction réactive et donc une seule direction d'ancrage tandis que les composés **D₁** et **D₂** en ont trois. Cependant, cette fonction d'attache (monochlorodiméthylsilane) est peu utilisée car généralement elle permet la formation de couches peu denses et inhomogènes.²⁸ Le greffage de **D₃** a été réalisé en employant les mêmes conditions expérimentales (solvant, température et concentration) que pour les greffages de **D₁** et **D₂**.

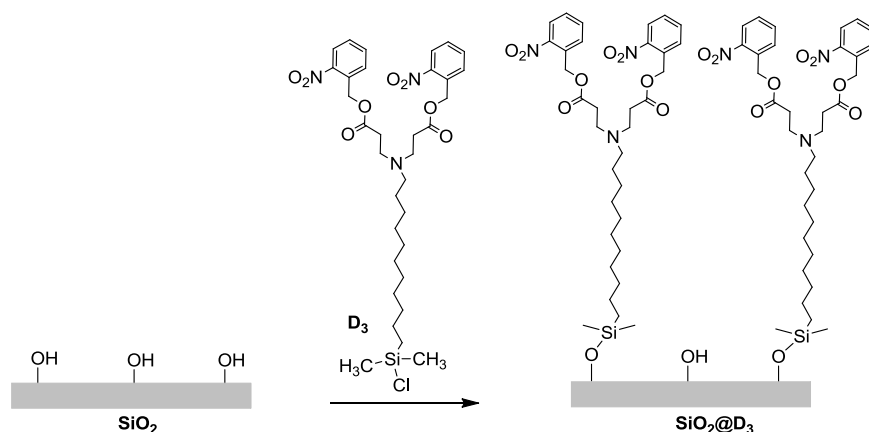


Figure 39. Schéma de la réaction de greffage du composé **D₃**.

L'angle de contact des surfaces greffées (**SiO₂@D₃**) a été mesuré avec l'eau (Figure 40) et montre que la surface a été modifiée. Nous remarquons une évolution de l'angle de contact de 50 à 75° entre 0 et 10 min, ensuite nous observons un plateau à partir de 10 min entre 75° et 81°. En revanche, l'incertitude sur la mesure est très grande, l'angle est très différent suivant les endroits de la surface. L'erreur est de $\pm 11^\circ$ à 5min et de $\pm 7^\circ$ à 120min. Ce résultat nous indique que le greffage n'est pas homogène sur la surface du support.

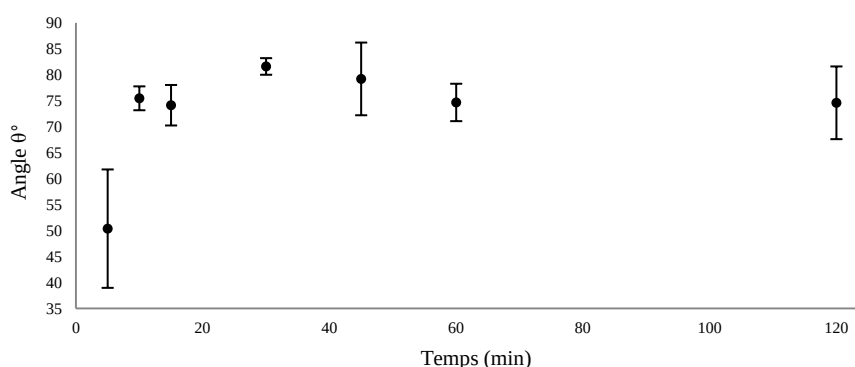


Figure 40. Évolution de l'angle de contact avec l'eau en fonction du temps d'immersion.

Les spectres PM-IRRAS correspondants aux différents temps de silanisation sont présentés dans la Figure 41. Nous avons choisi de ne montrer que la fenêtre spectrale entre 1700 et 3100 cm^{-1} du fait de la faible résolution des spectres à cause de la faible intensité des bandes de vibrations. Nous pouvons confirmer tout de même la présence de la molécule sur la surface, puisque nous observons les différents modes de vibration de la molécule : les modes d'élongations des **CH₃** (ν_{as} : 2961 cm^{-1}), **CH₂** (ν_{as} : 2926 cm^{-1} et ν_{s} : 2856 cm^{-1}), des **C=O** de l'ester (1739 cm^{-1}). Nous remarquons que les signaux des spectres sont très faibles en intensité par rapport à ceux observés dans le cas du composé **D₁**, montrant ainsi que la quantité de matière greffée est moindre. Les bandes des modes d'élongation des **CH₂**

montrent que la chaîne carbonée est désordonnée à cause de leurs valeurs relativement élevées. Cependant, nous ne remarquons pas d'évolution d'intensité du signal dans la durée étudiée.

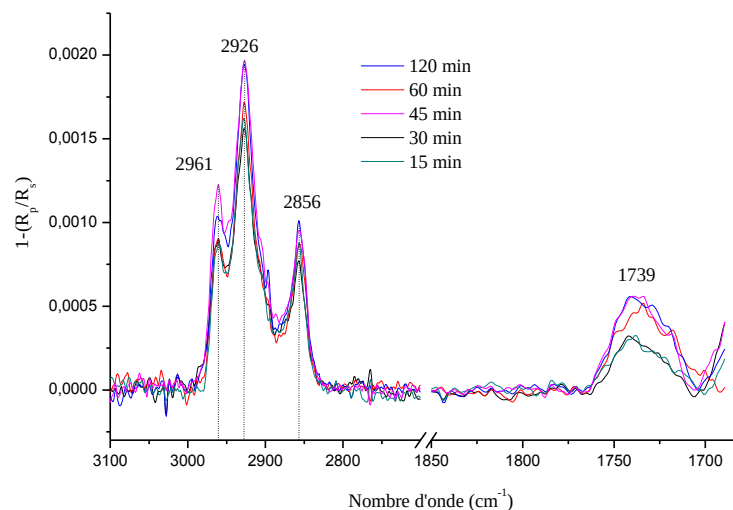


Figure 41. Spectres PM-IRRAS de SiO₂@D₃ en fonction du temps.

Les surfaces SiO₂@D₃ ont été caractérisées en AFM avec une pointe en Silicium (PPP-NCL, de Nanosensor) de constante de raideur 40 N/m. Le levier a une longueur de 225 μ m, une largeur de 38 μ m et une fréquence propre de 160-170 kHz.

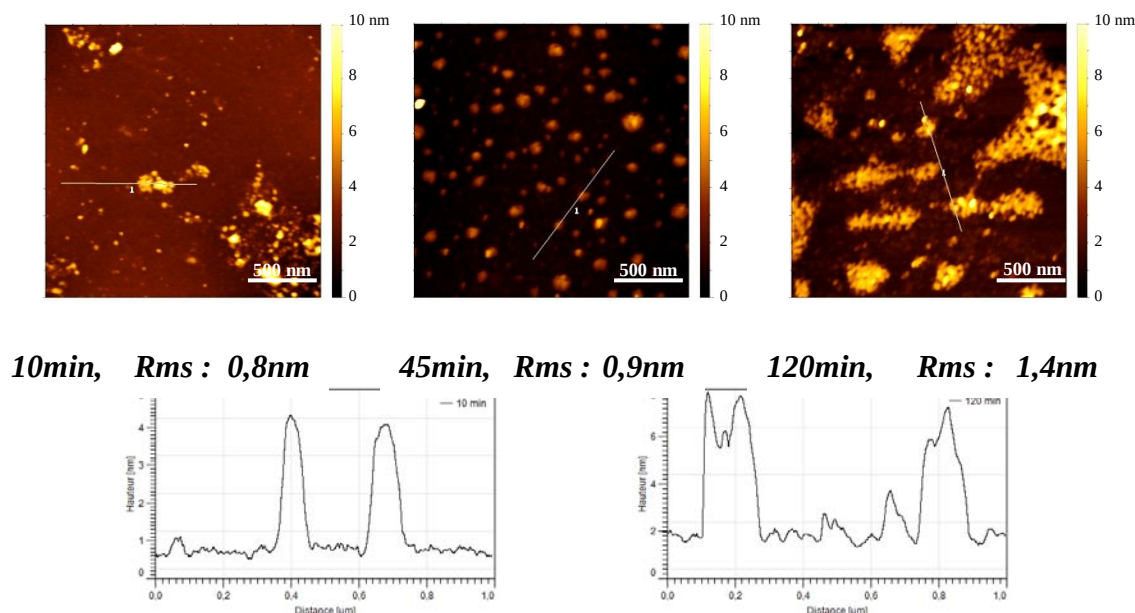


Figure 42. Images de hauteur (10, 45, 120 min) et profils à 10min et 120 min de temps de réaction de greffage.

Les images de hauteur des surfaces modifiées avec le composé D₃, en fonction du temps présentées dans la Figure 42, montrent une hétérogénéité de la surface. En effet, nous

observons des petits plots avec une taille d'environ 3 nm de hauteur et de 40 nm de largeur à mi-hauteur à 10 min de temps d'immersion. Ces plots grossissent latéralement en fonction du temps pour former des amas de même hauteur environ pour 120 min. Nous constatons également que le greffage est peu dense et présente beaucoup de trous correspondant au support vierge. Le Rms relevé sur les images augmente au cours du temps. Cependant, il n'est pas représentatif car les images de hauteur sont hétérogènes.

L'image de phase, (Figure 43) à 120 min, nous montre une ségrégation de phase. En effet, cette ségrégation suit bien l'image de topographie. Ainsi la couleur claire de l'image de phase correspond aux amas que nous observons sur l'image de topographie. Cela indique la présence de deux propriétés mécaniques différentes en surface. La couleur claire correspond à de la matière organique et la couleur foncée correspond au support de départ plus dur. Ces résultats confirment un greffage incomplet sur toute la surface.

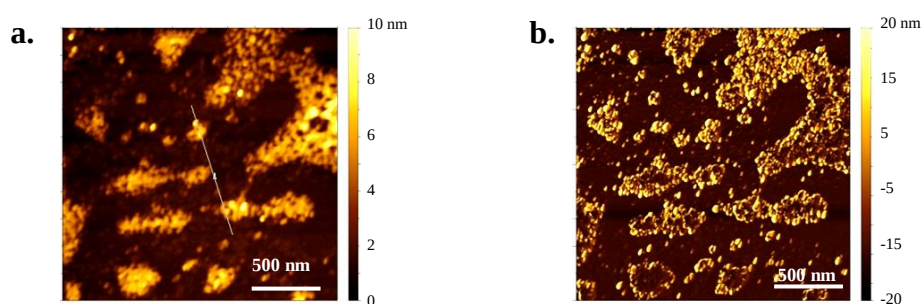


Figure 43. Image de hauteur (a) et de phase (b) à $t : 120\text{min}$ ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$).

En résumé, le greffage du composé **D₃** révèle un état de surface inhomogène et peu dense. En effet, l'angle de contact indique que la surface a été modifiée, cependant, l'erreur sur la mesure s'avère très importante indiquant l'hétérogénéité de la surface. L'infrarouge confirme la présence de molécules à la surface du support. En revanche, l'intensité des signaux est faible ce qui montre qu'il y a effectivement peu de matière à la surface par rapport au composé **D₁**. Enfin, l'AFM confirme l'hétérogénéité du revêtement sur la surface à l'échelle nanométrique.

En conclusion de cette partie nous avons étudié l'influence de la nature du groupement silyle dans l'étape de silanisation. Il a été montré en infrarouge et en AFM que plus le temps de réaction est long plus il y a de matière sur la surface et ceci quelque soit la fonction d'attache. La couche est en constante augmentation et aucun régime stationnaire n'est observé. Les couches restent relativement désorganisées.

Le greffage du composé **D₁** (SiCl₃) est dense et homogène sur toute la surface. Toutefois, la rugosité des surfaces relevée sur les images AFM est élevée (rms ~1,8 nm).

Le greffage du composé **D₂** (Si(OMe)₃) est homogène, cependant, les surfaces restent rugueuses (Rms ~ 2nm). L'infrarouge, montre un greffage peu dense à cause de la faible intensité des signaux.

Le greffage du composé **D₃** (Si(Me)₂Cl) est hétérogène à l'échelle macroscopique (angle de contact), et à l'échelle nanométrique (AFM).

Nous avons donc retenu le composé **D₁** pour la suite de l'étude car il semble être le meilleur candidat pour obtenir des surfaces à la fois denses et homogènes. Cependant, il est nécessaire d'améliorer encore la qualité du greffage en optimisant encore certains paramètres expérimentaux afin de réduire la rugosité comme nous allons le voir dans la suite de ce chapitre.

4.3.2. Effet de température sur le greffage du composé **D₁** : surface SiO₂@**D₁**

L'effet de température sur la préparation des monocouches auto-assemblées a été très étudié ces dernières années. Il a été montré, par exemple dans le cas de l'OTS (octadécyltrichlorosilane) une amélioration régulière de la qualité de la couche en diminuant la température de 35°C à 18°C.²⁹ Cette amélioration de la qualité de la monocouche a été attribuée à la diminution de la solubilité de l'OTS dans le solvant utilisé (hexadécane). Une étude réalisée par Rondelez et *al.*³⁰ et Kato et *al.*³¹ a montré l'existence d'une température critique (T_c) pour la qualité de la monocouche de différents alkyl-silanes. Au-dessus de cette température les molécules sont désordonnées à la surface du support et en dessous de cette température les molécules sont ordonnées. Cette T_c est de 28°C pour l'OTS et de 0°C pour le décyltrichlorosilane. Dans cette partie, nous allons comparer le greffage du composé **D₁** à deux températures différentes : 5°C et 18°C, dans le toluène à 2,5.10⁻⁴ M, et avec un temps de greffage de 45 min. Nous avons indiqué au début de ce chapitre que le composé **D₁** n'était pas très soluble dans toluène à 18°C. A 5°C, ce phénomène est encore plus accentué.

Les angles de contact avec l'eau (Tableau 1) des surfaces greffées ont été mesurés. Ils montrent qu'il y a eu une modification de la surface à 5°C et aussi à 18°C. Cependant, à 18°C la valeur de l'angle est plus élevée de 13° par rapport à 5°C et l'incertitude sur la mesure de l'angle de contact est plus élevée à 5°C qu'à 18°C. Ces résultats suggèrent que le greffage à 5°C est plus hétérogène qu'à 18°C. Par ailleurs, la valeur faible de l'angle à 5°C montre que la surface n'est peut être pas complètement recouverte.

Température	5°C	18°C
Angle (°)	64,6 ± 3,0	77.6 ± 0.1

Tableau 1. Angle de contact avec l'eau en fonction de la température.

Les greffages ont été analysés en PM-IRRAS (Figure 44), ces mesures confirment la présence des modes de vibration de la molécule **D₁** : les modes d'élongations des CH₂ (ν_{as} : 2926 cm⁻¹ et ν_s : 2854 cm⁻¹), des C=O de l'ester (1741 cm⁻¹) et des NO₂ (ν_{as} : 1529 cm⁻¹ et ν_s : 1344 cm⁻¹). Nous notons que l'intensité des signaux du greffage à 5°C est plus faible d'un facteur six (au niveau de ν_{CO}) que celle à 18°C. Ces résultats de PM-IRRAS confortent l'idée que la couche n'est pas complètement formée. De plus, la position des bandes associées aux modes CH₂ (ν_{as} et ν_s) ne varie pas en fonction de la température. Ces bandes sont observées à des nombres d'onde relativement élevés ν_{as} : 2926 cm⁻¹, ν_s : 2854 cm⁻¹ indiquant un désordre des chaînes alkyle de la molécule sur la surface aussi bien à 5°C qu'à 18°C.

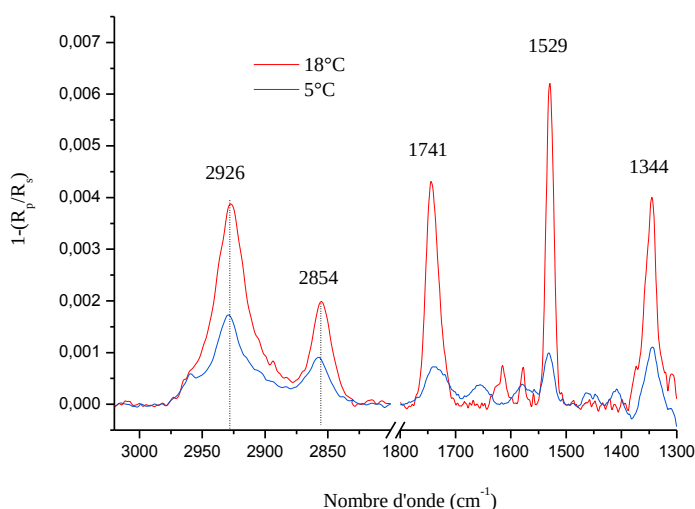


Figure 44. Spectres PM-IRRAS montrant l'effet de température sur le greffage de **D₁**.

Les surfaces greffées ont été analysées en AFM. Les images de hauteurs présentées dans la Figure 45, montrent qu'à 18°C il y a plus de matière qu'à 5°C. En outre, nous observons également que le greffage à 5°C n'est pas homogène. Il y a des endroits plus greffés que d'autres. La rugosité à 5°C est plus faible qu'à 18°C. Le profil de hauteur confirme cette observation.

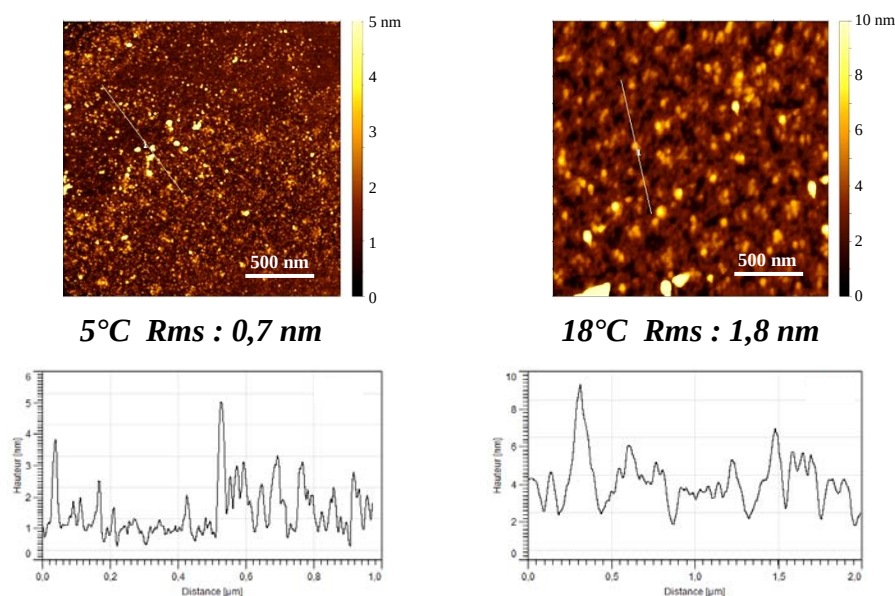


Figure 45. Images de hauteurs (2 μm x 2 μm) et Rms en fonction de la température.

Le greffage du composé **D₁** dans le toluène à 5°C pendant 45 min à une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ n'a pas donné un greffage satisfaisant, du fait de la faible solubilité du composé **D₁** dans le toluène à 5°C. Par conséquent, tout en gardant cette température de 5°C, nous avons décidé d'étudier l'influence d'un changement de solvant. En effet, le fait d'augmenter la polarité du solvant de la réaction de greffage pourrait améliorer la solubilité du composé **D₁** et par la même la qualité du greffage.

4.3.3. Effet de solvant sur le greffage du composé **D₁** : surface SiO₂@**D₁**

Gun et Sagiv³² ont été les premiers à montrer l'effet du solvant sur la qualité d'une monocouche. Ainsi, ils ont obtenu de meilleurs résultats avec le bicyclohexyle qu'avec l'hexadecane pour le greffage d'OTS. Une autre étude réalisée par McGovern *et al.*³³ détaille le greffage de l'OTS avec des solvants de natures différentes : huit hydrocarbonés, le tétrachlorure de carbone, le dichlorométhane et le 1,4-dioxane. Il en ressort que le 1,4-dioxane ne donne pas de bons résultats car il dissout une grande quantité d'eau de la surface du support. Par conséquent, cela entraîne une forte polymérisation du silane en solution. A l'inverse, les solvants comme le pentane ne solubilisent pas assez d'eau pour effectuer l'hydrolyse du silane. Cette étude montre l'importance du choix du solvant utilisé lors de la silanisation.

Dans cette partie nous avons comparé le greffage du composé **D₁** à $2,5 \cdot 10^{-4}$ M, à 5°C, pendant 45 min dans des solvants différents. En plus du toluène, nous avons choisi un mélange de deux solvants : un polaire (CHCl₃) et un apolaire (Cyclohexane). La polarité du mélange a été modulée en augmentant la proportion du chloroforme dans le cyclohexane (25%, 50%, 75% et 100% de CHCl₃). Nous avons remarqué une amélioration de la solubilité du composé **D₁** à 5°C en fonction de la proportion de chloroforme de la solution de silanisation. Plus le solvant est polaire, plus il solubilise le composé **D₁**. Les résultats du greffage ont été analysés en angle de contact, PM-IRRAS et AFM.

Les mesures d'angle de contacts, présentées dans le Tableau 2, sont proches entre 84° et 89° à l'exception du toluène qui est de 65°. Quand il y a du CHCl₃, cela améliore la solubilité du précurseur silicié conduisant à des valeurs plus élevées de l'angle (84°-89°) comparé toluène. Cependant, l'incertitude augmente en fonction de la proportion de chloroforme. Plus le solvant est polaire plus l'incertitude est grande, et donc plus la surface semble hétérogène.

Solvant	Toluène	25%CHCl ₃ 75% C ₆ H ₁₂	50%CHCl ₃ 50% C ₆ H ₁₂	75%CHCl ₃ 25% C ₆ H ₁₂	100%CHCl ₃
Angle (°)	64,6 ± 3,0	87,6 ± 0,2	89,3 ± 1,1	88,7 ± 3,8	84,0 ± 5,0

Tableau 2. Mesures de l'angle de contact en fonction du solvant.

Les mesures infrarouge (Figure 46) ont confirmé la présence des modes de vibration de la molécule à la surface des supports (CH₂, CO, NO₂) quelque soit la proportion des solvants. La position des bandes associées aux modes CH₂ (ν_{as} et ν_s) ne varie pas. En revanche, l'intensité des bandes est différente ce qui montre qu'il y a une quantité de matière variable suivant le solvant. En effet, l'intensité la plus faible est enregistrée avec le toluène, puis elle augmente pour les ratios (25% CHCl₃/75% C₆H₁₂) et (50%/50%), enfin elle diminue pour le greffage effectué uniquement dans le CHCl₃. Ce résultat montre l'importance de l'effet du solvant pour l'étape du greffage de la couche organique.

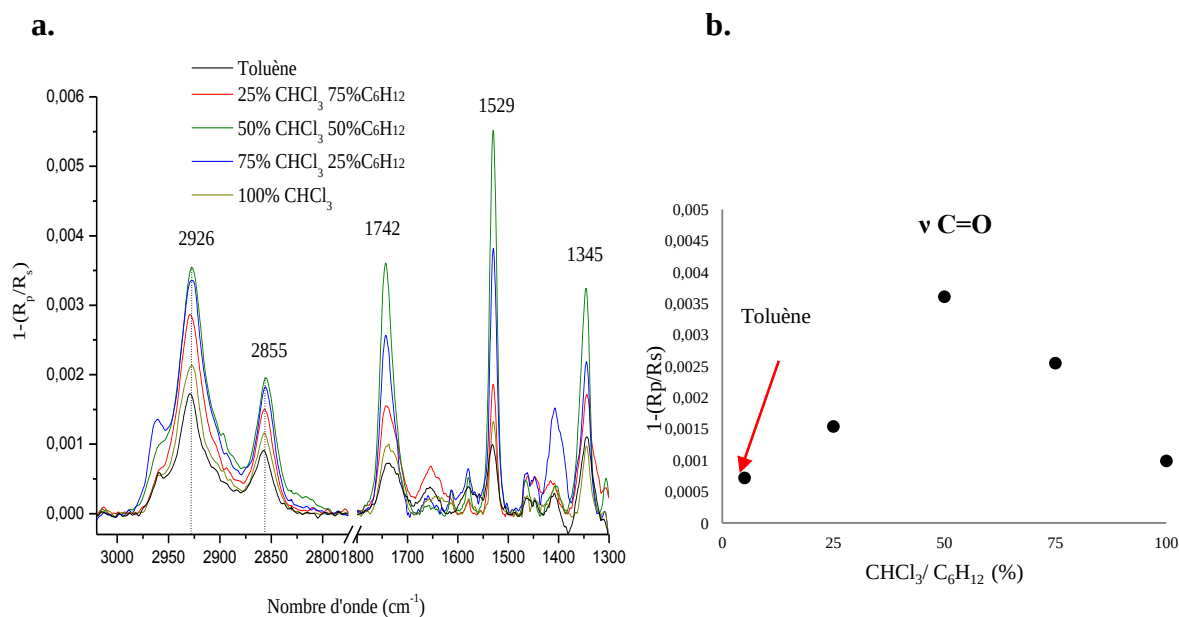


Figure 46. (a) Spectres PM-IRRAS en fonction du solvant de greffage. (b) Intensité de la bande ν co (1742 cm⁻¹) en fonction du solvant de greffage.

Les greffages ont été également analysés en AFM. Les images de hauteurs (2 μ m x 2 μ m) de la Figure 47 confirment bien un effet de solvant sur le greffage de **D**₁ dans ces conditions expérimentales (5°C, 2,5.10⁻⁴ M, 45 min).

Le greffage dans le toluène donne la couche la moins dense et la moins homogène. En revanche, les greffages avec les mélanges de solvant (CHCl₃/ C₆H₁₂) semblent plus homogènes et denses avec une structure en îlots. Sur les images de profils, nous remarquons que la couche la plus épaisse est obtenue avec le mélange 50% CHCl₃, 50% C₆H₁₂. Dans ce cas, on observe des îlots allant jusqu'à 8 nm de hauteur. Cependant, des hauteurs d'îlots plus faibles de 3 nm sont enregistrées avec le mélange de solvants (25% CHCl₃, 75% C₆H₁₂). Dans le cas des mélanges de solvant, la rugosité la plus faible est celle obtenue pour le mélange 25% CHCl₃, 75% C₆H₁₂. Nous remarquons que le greffage présentant la rugosité la plus élevée correspond au greffage qui présente aussi des intensités infrarouge les plus fortes.

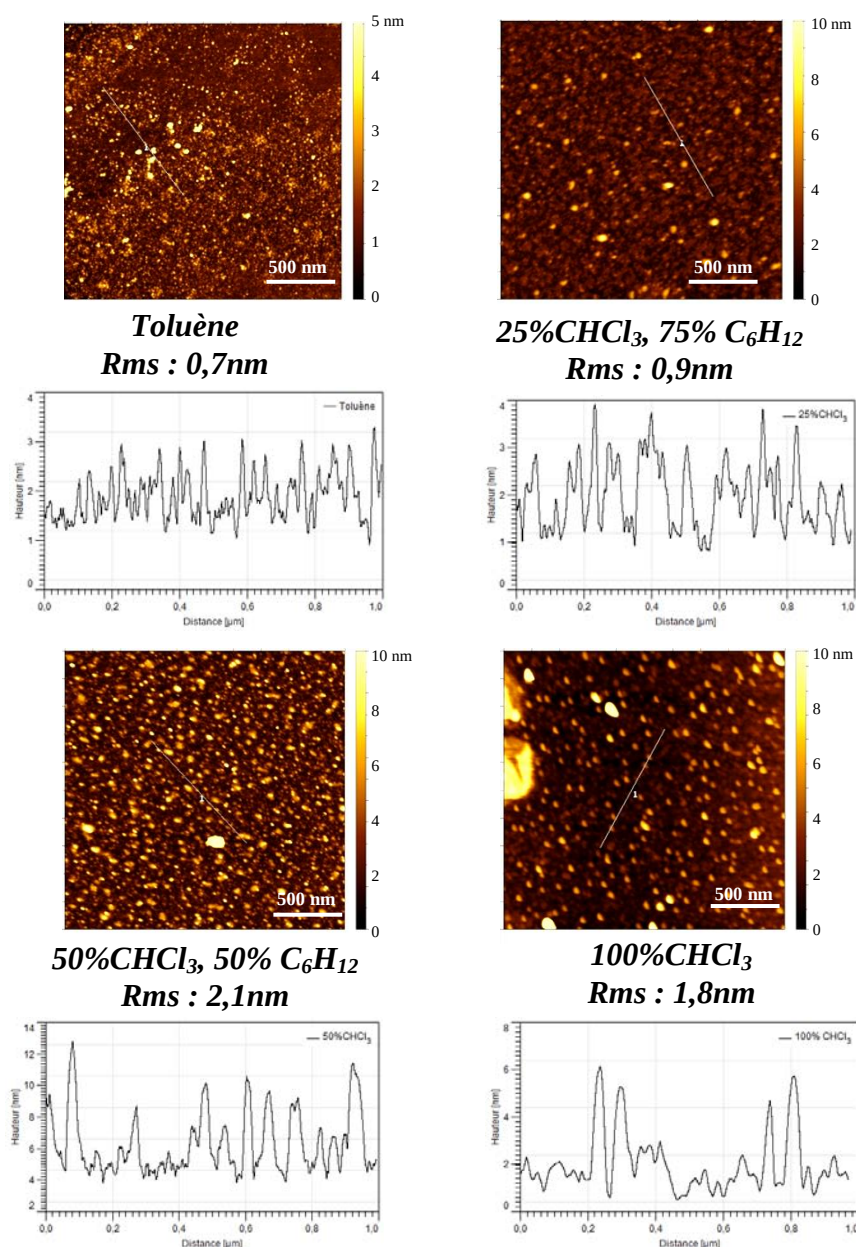


Figure 47. Images AFM de hauteur (2 μm x 2 μm), Rms et profils de hauteur du greffage du composé **D₁** dans des solvants différents.

4.3.4. Stabilité de la couche greffée : surface SiO₂@D₁

Il est intéressant de noter qu'une étude complémentaire sur la stabilité des couches dans le temps a été entreprise. Nous avons comparé les spectres PM-IRRAS d'une couche de composé **D₁** (5°C, 45 min, $2,5 \cdot 10^{-4}$ M dans 50% CHCl₃/ 50% C₆H₁₂) enregistrés entre $t = 1$ jour et $t = 30$ jours (Figure 48). Il en ressort, que les spectres ne varient quasiment pas au cours du temps ; nous avons la même quantité de matière en fonction du temps. Cependant, après 18 jours, nous avons remarqué une légère diminution de l'intensité des bandes relatives au mode de vibrations des NO₂ et une adsorption d'eau. Cette légère variation serait due à la déprotection du groupement photo-labile car l'échantillon n'a pas été protégé de la lumière

durant cette étude. Le produit de la photodéprotection de l'ester étant l'acide correspondant, celui-ci serait à l'origine de l'adsorption de l'eau.

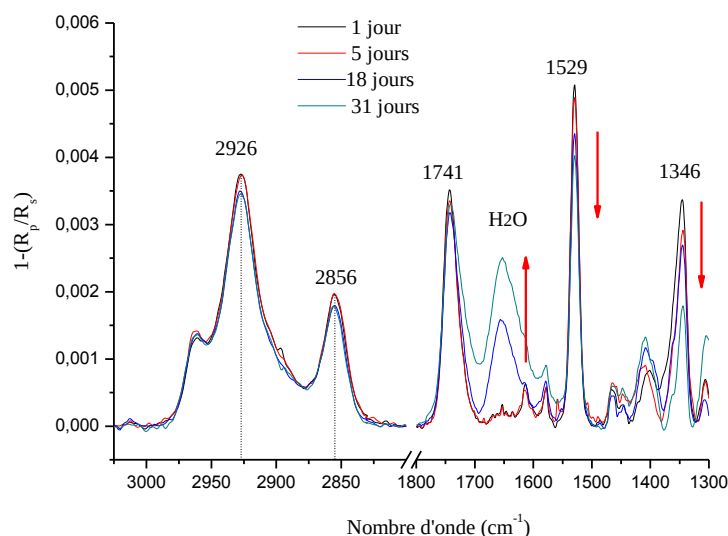


Figure 48. Spectres PM-IRRAS montrant l'évolution de la stabilité de la couche au cours du temps.

En conclusion, le changement de solvant peut influencer sur plusieurs paramètres expérimentaux :

- Premièrement, la solubilité de la molécule **D₁** (plus le solvant est polaire plus il solubilise la molécule), et donc permet une meilleure maîtrise de la concentration du précurseurs siliciés en solution et évite donc le dépôt d'agrégats sur la surface.
- Deuxièmement, la capacité du solvant à extraire l'eau du support (plus il est polaire, plus il extrait l'eau de la surface), et donc augmente le risque d'hydrolyse condensation en solution et la formation d'agrégats.

Le meilleur compromis pour le greffage de **D₁** semble être les conditions suivantes : 5°C, 45 min, $2,5 \cdot 10^{-4}$ M dans 25% CHCl₃/ 75% C₆H₁₂, conduisant à une couche avec une structure en îlots. La structure dendritique ne permet pas un auto-assemblage des molécules à la surface comme dans le cas des SAMs réalisées avec des molécules linéaires. En effet, les précurseurs de type dendrons présentent un fort encombrement stérique ce qui conduit à un greffage désordonnées des molécules.

Compte tenu des résultats obtenus avec le composé **D₁**, nous avons envisagé de réaliser une couche mixte constituée du composé **D₁** et du décyltrichlorosilane **C10** afin d'améliorer l'état de surface (Figure 49).

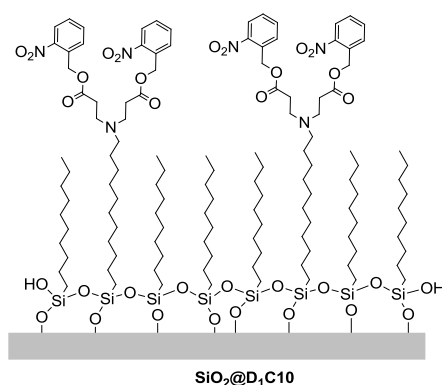


Figure 49. Représentation d'une couche mixte contenant le composé **D₁** et le composé **C10**.

L'utilisation du **C10** pourrait permettre un auto-assemblage des segments CH₂ du dendron et donc obtenir un meilleur contrôle de l'organisation des molécules sur la surface.

4.4. Greffage du décyltrichlorosilane : surface SiO₂@C10

Nous avons greffé une surface SiO₂ par du décyltrichlorosilane **C10** afin de préparer ultérieurement des couches mixtes **D₁**/Chaîne **C10**. Cette stratégie de dilution de **D₁** à la surface est utilisée pour améliorer l'état de surface, en utilisant les propriétés d'auto-assemblage des alkyl-silanes lors de l'étape de greffage. Les dendrons utilisés dans cette Thèse **D₁**-**D₅** portent un segment espaceur à onze carbones, c'est pourquoi nous avons choisi une chaîne alkyle à 10 carbones (décyltrichlorosilane) afin de diluer les dendrons à la surface et donc diminuer les contraintes stériques. Dans un premier temps, nous avons uniquement étudié le greffage de la chaîne **C10** (Figure 50). Dans un deuxième temps, nous verrons le greffage du mélange dendron **D₁**/ décyltrichlorosilane (**C10**) (voir §4.5).

Le greffage des alkylsilanes a été très largement étudié dans la littérature.³⁴ Il en ressort que la longueur des chaînes joue un rôle prépondérant sur la qualité du greffage. En effet, l'auto-assemblage des molécules sur la surface est assuré par les interactions de van der Waals. Ainsi, plus la chaîne est longue plus ces interactions sont importantes.³⁵ Cependant, au-delà de 25 carbones, les monocouches deviennent désordonnées, vraisemblablement à cause du repliement des chaînes.³⁶ La température de greffage joue également un rôle important dans la formation des monocouches auto-assemblées en raison de l'existence d'une température critique intrinsèque aux composés, au dessus de laquelle, le greffage est de mauvaise qualité. Avant de procéder au greffage, le décyltrichlorosilane a été synthétisé à partir du 1-décène en présence du catalyseur de Karstedt et d'un excès de trichlorosilane dans le toluène. L'obtention du produit silylé est confirmée en RMN ¹³C, elle se traduit par une

disparition des carbones éthyléniques (sp₂) à 139,2 et 114,0 ppm et une apparition de deux nouveaux carbones (sp₃) à 9,1 et 17,1 ppm.

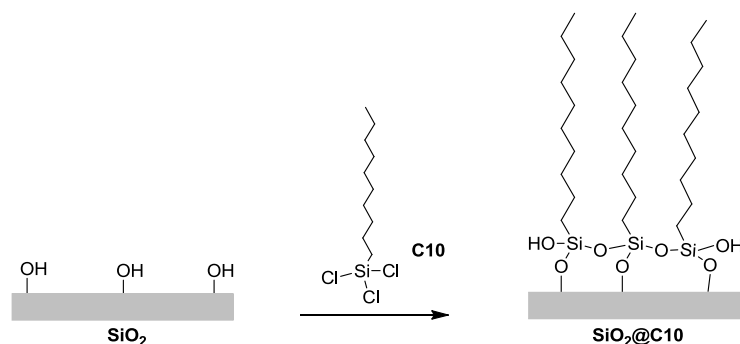


Figure 50. Schéma de la réaction de greffage du composé **C10**.

4.4.1. Effet de température : surface SiO₂@C10

La température est un paramètre important à prendre en compte pour le greffage des alkyl-silanes. En effet, afin de favoriser les interactions de van der Waals pour obtenir une monocouche, nous avons baissé la température à 5°C. Nous avons maintenu les mêmes conditions expérimentales de concentration ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M) et de solvant (toluène). Ainsi que pour le temps de greffage à 45 min.

L'angle de contact avec l'eau a été mesuré (Tableau 3). Il montre une valeur plus élevée à 5°C qu'à 18°C avec une différence de 7°. Celle-ci indique que le greffage a bien eu lieu et que la couche est plus hydrophobe qu'à 18°C. La valeur de l'incertitude est assez basse ce qui montre que le greffage est homogène sur l'ensemble de la surface du support.

<i>Température</i>	5°C	18°C
<i>Angle (°)</i>	99,3±1,4	92,5±1,2

Tableau 3. Angle de contact avec l'eau en fonction de la température du greffage de **C10**.

Les substrats PM-IRRAS ont été analysés en infrarouge, les spectres sont présentés dans la Figure 51. Nous observons, les mêmes profils entre 5°C et 18°C. Nous pouvons identifier les différents modes de vibration CH₃ (ν_{as}) à 2961 cm⁻¹, CH₂ (ν_{as}) à 2926 cm⁻¹ et CH₂ (ν_s) à 2857 cm⁻¹ caractéristiques de la molécule **C10**. De plus, nous observons une extinction des bandes de vibration des groupes CH₂ (ν_{as} : 2926 cm⁻¹ ; ν_{as} : 2857 cm⁻¹) ce qui semble indiquer une orientation plutôt verticale des chaînes alkyles par rapport à la surface.

La technique PM-IRRAS permet dans certains cas de déterminer l'orientation des molécules sur une surface grâce aux règles de sélection de surface (voir annexe 1).

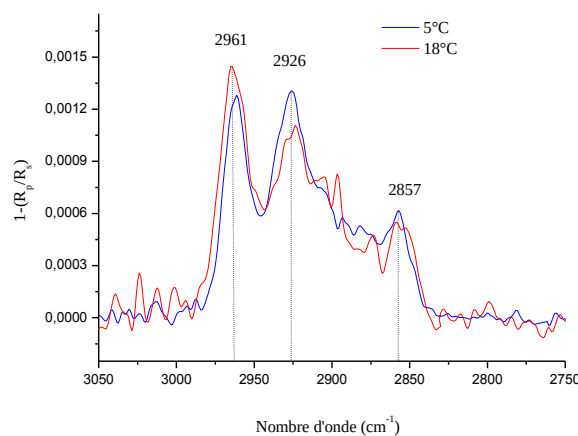


Figure 51. Spectres PM-IRRAS du greffage du composé **C10** en fonction de la température.

Les substrats silicium greffés par **C10** (surface SiO₂@**C10**) ont été analysés en AFM en mode intermittent.

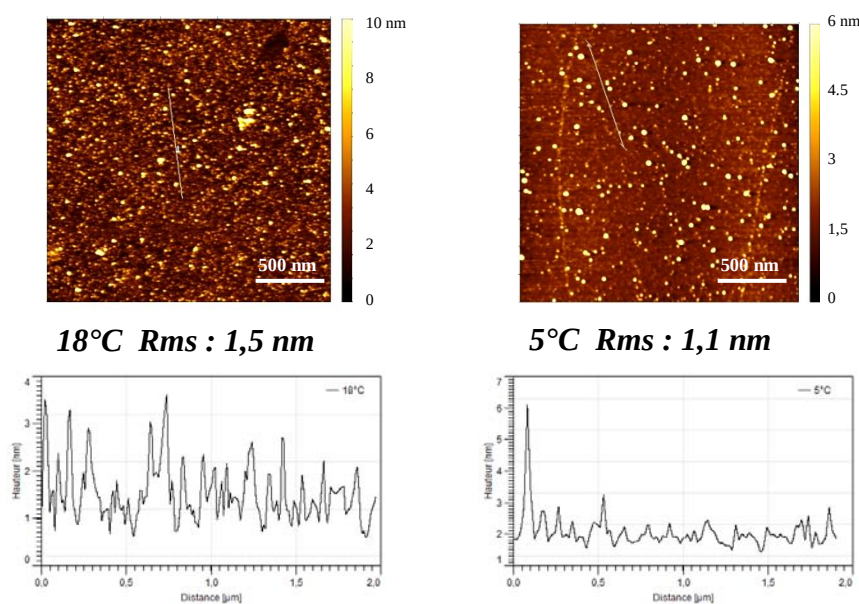


Figure 52. Images de hauteurs, Rms et profils de substrats greffés avec le composé **C10** en fonction de la température.

Les images de hauteurs (Figure 52) de 5 μm x 5 μm montrent un état de surface meilleur à 5°C qu'à 18°C. Ainsi, à 5°C, on n'observe pas la formation d'îlots. En revanche, nous observons des agrégats de hauteurs allant jusqu'à 6 nm. Ces agrégats sont dus à la polymérisation en solution du décyltrichlorosilane qui se sont déposés sur la surface. La valeur du Rms pour le greffage à 5°C (1,1 nm) est plus faible que pour le greffage à 18°C (1,5 nm).

nm). Par contre, la valeur de 1,1 nm n'est pas réellement représentative à cause de la présence d'agrégats. En effet, nous avons enregistré une rugosité de 0,4 nm sur la ligne du profil de la Figure 52 dans une zone sans agrégats.

Le greffage du décyltrichlorosilane est donc de meilleure qualité à 5°C. En effet, l'angle de contact est plus fort, avec une faible incertitude ce qui rend compte du caractère hydrophobe et de l'homogénéité de la surface. L'infrarouge montre une quantité de matière similaire pour les deux températures. Et enfin, l'AFM, montre une rugosité plus faible à 5°C (1,1 nm).

4.4.2. Effet de solvant (SiO₂@C10):

Lors du greffage du composé **D₁**, nous avons démontré que le solvant avait un effet important sur la qualité de greffage. Nous avons trouvé que le meilleur solvant pour le greffage du composé **D₁** était le mélange 25% CHCl₃/75% C₆H₁₂. Dans le but de réaliser des couches mixtes du composé **D₁** avec le décyltrichlorosilane, nous avons testé ce solvant avec le composé **C10** et nous avons comparé ces résultats du greffage avec ceux observés avec le toluène dans les conditions expérimentales suivantes : une concentration en organosilane de 2,5.10⁻⁴ M, une température de 5°C et un temps de greffage de 45 min.

Les surfaces greffées (SiO₂@C10) ont été caractérisées par la mesure de l'angle de contact avec l'eau (Tableau 4). Les résultats montrent des valeurs similaires ($\pm 1^\circ$) entre celles obtenues dans le toluène et celle obtenues dans le mélange de solvants (25% CHCl₃, 75% C₆H₁₂). De plus, l'incertitude sur la mesure est la même dans les deux cas, ce qui montre que le greffage est homogène conduisant à la surface avec un caractère hydrophobe.

Solvant	Toluène	25%CHCl ₃ 75%C ₆ H ₁₂
Angle (°)	99,3 $\pm$ 1,4	98,1 $\pm$ 1,4

Tableau 4. Angle de contact avec l'eau de substrats greffés avec le composé **C10** en fonction du solvant de greffage.

En infrarouge (Figure 53) les profils des deux spectres est proche avec des intensités comparables. Dans les deux cas, les bandes de vibration caractéristiques du **C10** sont présentes : CH₃ (v_{as}) à 2961 cm⁻¹, CH₂ (v_{as}) à 2926 cm⁻¹ et CH₂ (v_s) à 2857 cm⁻¹. De plus, nous

observons comme précédemment une orientation plutôt verticale des chaînes alkyles car les intensités des bandes ν_{as} et ν_s des CH₂ sont très faibles comparées au CH₃.

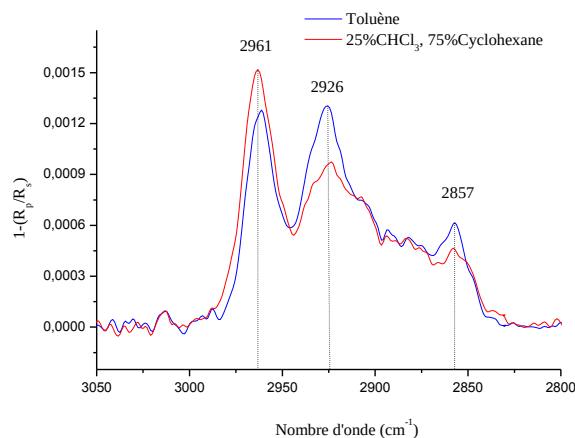


Figure 53. Spectres PM-IRRAS de substrats greffés avec le composé **C10** en fonction du solvant de greffage.

Les images AFM de hauteur (Figure 54) de 5 μm x 5 μm montrent, par contre, un effet de solvant sur le greffage. Effectivement, dans le mélange de solvant (25% CHCl₃/75% C₆H₁₂), nous constatons une couche homogène présentant des îlots de taille importante en hauteur (6 à 8 nm). De plus, une rugosité plus importante est enregistrée également sur l'ensemble de l'image. Elle est de 2,2 nm contre 1,1 nm observé dans le toluène. L'utilisation d'un mélange de solvant plus polaire que le toluène semble être défavorable pour le greffage du **C10**.

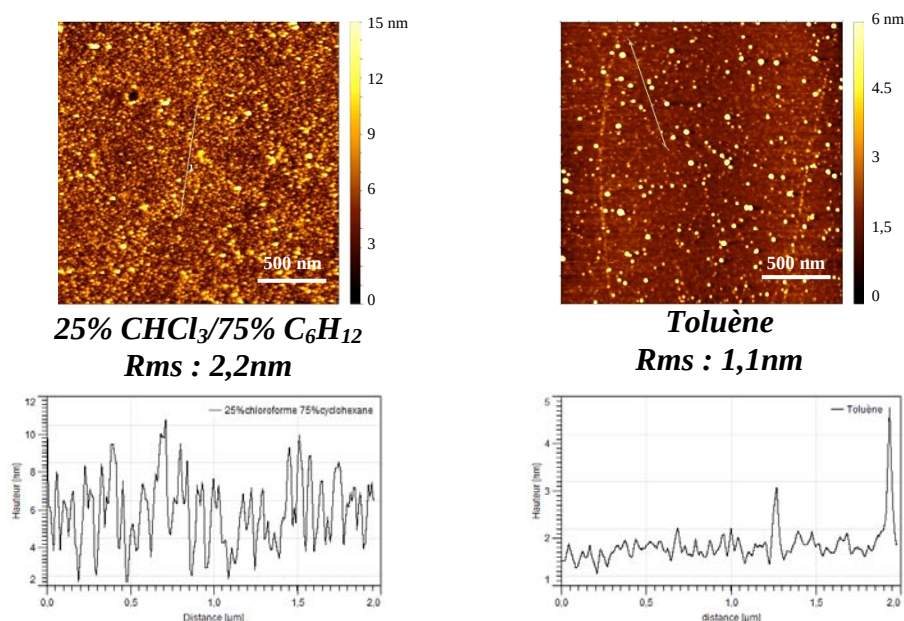


Figure 54. Images de hauteurs, Rms et profils de substrats greffés avec le composé **C10** en fonction du solvant de réaction.

En résumé, les meilleures conditions pour le greffage du **C10** sont obtenues avec une température de 5°C avec le toluène comme solvant.

En AFM, le Rms est plus faible à 5°C (1,1 nm) comparé à 18°C (1,5 nm). De plus, c'est avec le toluène que le Rms est plus faible (1,1 nm) au lieu de 2,2 nm dans le mélange 25% CHCl₃/ 75% C₆H₁₂.

4.5. Greffage d'un système mixte dendritique (**D₁**) et decyltrichlorosilane (**C10**) : surface SiO₂@**D₁****C10**

Des systèmes mixtes comportant deux organosilanes, sont utilisés pour diluer des fonctions à la surface des supports,³⁷ soit pour améliorer l'état de surface des greffages,³⁷ soit pour chercher certaines propriétés comme par exemple l'adsorption spécifique d'espèces biologiques.³⁸ En effet, il est connu qu'une faible densité de ligands actifs sur la surface des membranes biologiques joue un rôle crucial dans les interactions avec des biomolécules.³⁹ Dans ce contexte, les conditions expérimentales mises en œuvre lors de l'étape de greffage jouent un rôle important sur la répartition des fonctions à la surface. Dans certains cas de greffages mixtes, une ségrégation de phase a été observée sur les surfaces,⁴⁰ qui se traduit par la présence de nano-domaines qui ont été mis en évidence par AFM.

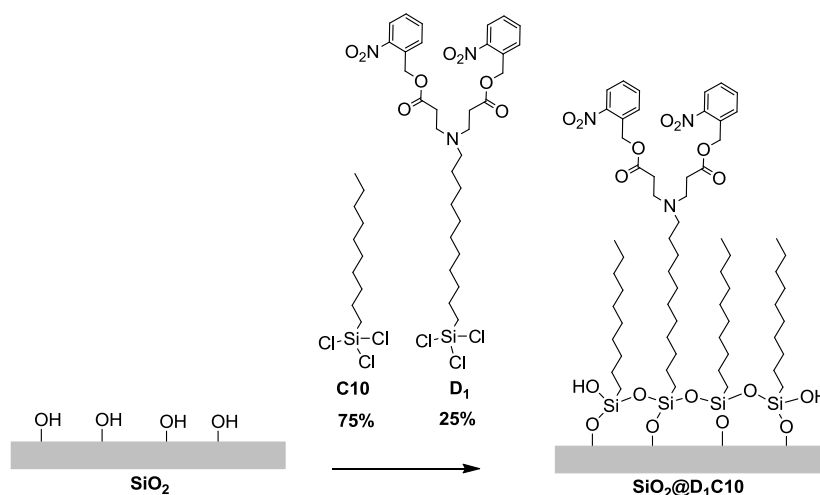


Figure 55. Schéma de la réaction de greffage de 75% de **C10** et de 25% de **D1**.

Dans cette partie, nous avons étudié le greffage d'un système mixte de 25 % de composé **D1** et 75% de decyltrichlorosilane (Figure 55). Nous avons choisi de mettre une proportion plus faible du composé **D1** afin de minimiser les contraintes stériques lors du processus d'auto-assemblage à la surface. Pour ce faire, les précurseurs insaturés **7** et 1-décène ont été hydrosilylés dans le même réacteur dans les proportions souhaitées (25% /

75%) en présence de trichlorosilane et de catalyseur de Karstedt. Le suivi de la réaction ainsi que les proportions mises en jeux ont été vérifiés par RMN ¹H. Lors de cette étude, nous avons fait varier plusieurs paramètres qui influent sur le greffage : le temps de réaction, la température et le solvant de réaction. Ces paramètres ont permis de déterminer les meilleures conditions de greffage du mélange **D₁ / C10** (25 % / 75 %).

4.5.1. Effet du temps de réaction : surface SiO₂@D₁C10

D'abord, nous avons fait varier le temps de réaction de 5 à 120 min. Nous avons analysé l'influence du temps sur le greffage, en premier lieu par la mesure de l'angle de contact des surfaces greffées, ensuite en infrarouge et enfin en AFM. Les conditions expérimentales utilisées par le greffage sont les suivantes : le solvant utilisé est le toluène avec une concentration en précurseur éthylénique de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M et une température de greffage de 18°C.

La mesure de l'angle de contact avec l'eau (Figure 56) des surfaces greffées montre qu'il évolue en fonction du temps d'immersion dans la solution de silanisation. En effet, nous constatons une évolution croissante de l'angle jusqu'à 15 min pour atteindre un plateau avec une valeur de 86° ce qui est proche de la valeur obtenue lors du greffage de 100% de **D₁**. Les valeurs de l'erreur sur la mesure sont faibles, ce qui montre que le greffage est homogène sur la globalité de l'échantillon. L'énergie de surface calculée est de 28,9 mN/m avec une composante dispersive ou apolaire de 23,7 mN/m et une composante polaire de 5,2 mN/m. La surface présente donc un caractère hydrophobe.

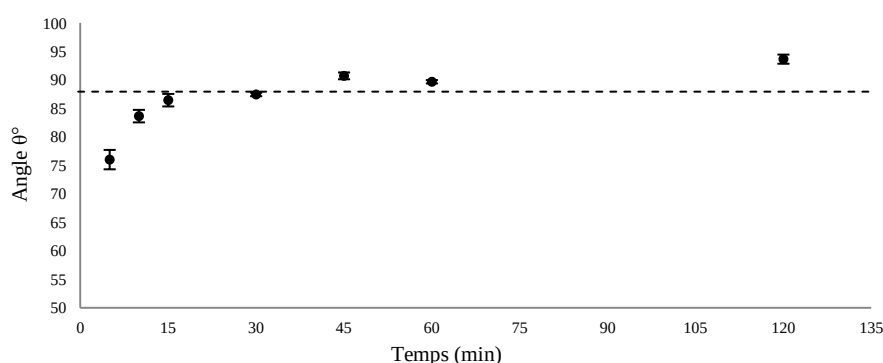


Figure 56. Évolution de l'angle de contact avec l'eau en fonction du temps d'immersion pour le greffage du système mixte.

Les surfaces greffées sont ensuite analysées en infrarouge (PM-IRRAS). Les spectres présentés dans la Figure 57 montrent bien la présence des deux molécules à la surface du

support. Nous notons la présence des bandes de vibration des modes suivants : CH₃ (ν_{as}) à 2961 cm⁻¹, CH₂ (ν_{as}) à 2926 cm⁻¹, CH₂ (ν_s) à 2856 cm⁻¹, $\nu_{C=O}$ à 1739 cm⁻¹, et des NO₂ (ν_{as} : 1532 cm⁻¹ et ν_s : 1341 cm⁻¹). Le mode de vibration des CH₃ est la signature du composé **C10** et les bandes de vibration CO et NO₂ celles du composé **D1**. La dilution du composé **D1** dans la couche s'observe par une baisse des intensités des bandes ν_{CO} et ν_{NO_2} comparativement au greffage de 100% **D1**. D'autre part, nous ne remarquons pas d'effet d'orientation en PM-IRRAS, contrairement à ce qui a été observé avec l'extinction de l'intensité des bandes CH₂ lors du greffage du composé décyltrichlorosilane (**C10**). L'évolution du greffage en fonction du temps a été également étudiée par la technique PM-IRRAS (Figure 57 b). Sur la Figure 57 (b) nous remarquons que l'intensité des bandes associées aux modes de vibration des groupements CH₂ en fonction du temps, est en constante augmentation sans la présence de plateau. A ce stade, seule l'imagerie par AFM nous permettra de conclure sur l'effet du mélange sur la topographie des surfaces.

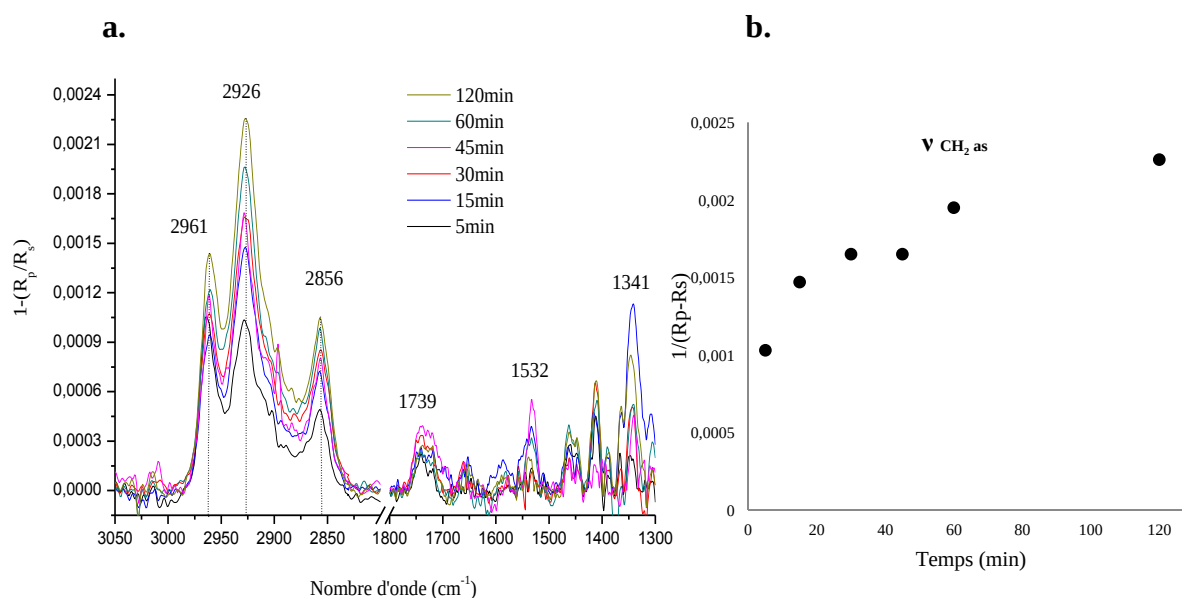


Figure 57. (a) Spectres PM-IRRAS en fonction du temps de greffage du système mixte. (b) Intensité de la bande $\nu_{CH_2 as}$ en fonction du temps de greffage.

L'analyse des images AFM de hauteurs (2 μ m x 2 μ m) de la Figure 58, montre une augmentation de matière en fonction du temps. Nous remarquons que les images sont homogènes quelque soit le temps d'immersion entre 5 et 45 min. En particulier, nous n'observons pas la présence de domaines dus aux mélanges des deux silanes. De plus, il y a peu d'agrégats de polysiloxanes en surface. Les rugosités des surfaces sont de 0,2 nm à 5 min et de 0,4 nm à 45 min. Ces valeurs de rugosités sont proches de la rugosité de la surface de

wafer de silicium avant le greffage (0,2 nm). Comparé au système à 100% de dendron (**D**₁) qui présentait un Rms de 1,8 nm, nous avons nettement amélioré la qualité du greffage avec l'utilisation d'un système mixte.

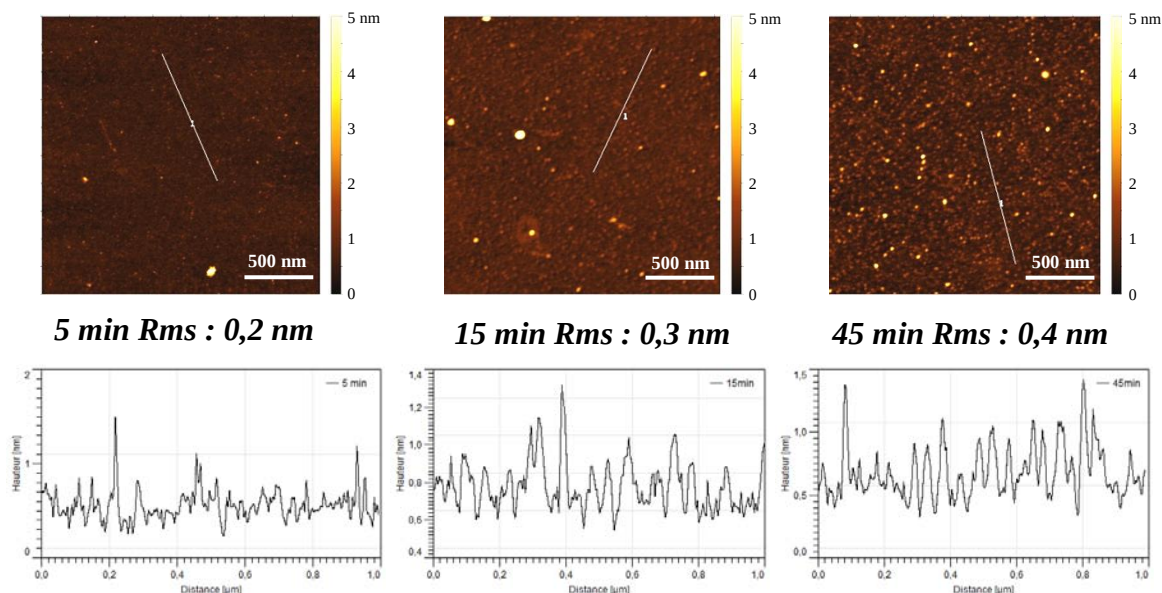


Figure 58. Images de hauteurs (2 µm x 2 µm), Rms et profils de hauteur de substrats pour le système mixte en fonction du temps de réaction.

En conclusion, le greffage des composés **D**₁ et décyltrichlorosilane **C**₁₀ a été réalisé simultanément dans la même solution de silanisation pour conduire à une couche mixte. Il en résulte des surfaces greffées hydrophobes et homogènes présentant un angle de contact qui augmente en fonction du temps de silanisation, pour atteindre 86° à 15 min. L'infrarouge a montré une augmentation constante de l'intensité des bandes en fonction du temps, la présence des bandes caractéristiques de chaque composé confirme la formation de la couche mixte. En AFM, la surface modifiée avec un temps de 45 min est homogène avec un bon Rms de 0,4 nm. De plus, aucune ségrégation de phase n'a été observée. Ce temps de 45 min semble donc approprié pour réaliser une couche mixte.

4.5.2. Effet de température : surface SiO₂@**D**₁**C**₁₀

Dans un deuxième temps, l'effet de la température a été étudié sur le greffage du système mixte. Nous avons réalisé le greffage dans les mêmes conditions de concentration ($2,5 \cdot 10^{-4}$ M) et de solvant (toluène) que précédemment avec un temps d'immersion dans la solution de silanisation fixé à 45 min. Nous avons réalisé les greffages à deux températures différentes : 18°C et 5°C. Le greffage du composé **D**₁ dans ces conditions était hétérogène et moins dense pour 5°C (cf. chap II.4.3.2), et le greffage du décyltrichlorosilane (**C**₁₀) avait

montré un meilleur Rms (1,1 nm) à 5°C (cf. chap II. 4.4.1). Ainsi, avec le système mixte, nous sommes dans des conditions expérimentales *a priori* favorables pour le composé **C10** et défavorables pour le composé **D1**.

L'angle de contact des surfaces greffées (**SiO₂@D1C10**) a été mesuré avec l'eau (Tableau 5). La valeur de l'angle a augmenté de 7° lors du passage de 18°C à 5°C, et elle se rapproche de la valeur obtenue avec le composé **C10** qui était de 99°. En revanche, l'incertitude est de 2,2°, plus forte que l'incertitude observée à 18°C. La mesure de l'angle de contact indique que la surface est plus hydrophobe à 5°C et moins homogène sur l'ensemble de l'échantillon.

Température	5°C	18°C
Angle (°)	97,2±2,2	90,7±0,6

Tableau 5. Angle de contact avec l'eau de substrats greffés avec le système mixte en fonction de la température.

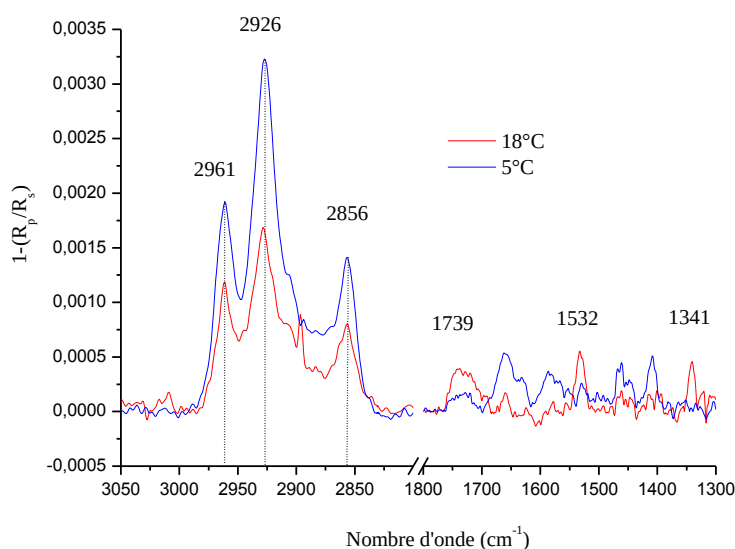


Figure 59. Spectres PM-IRRAS de substrats greffés avec le système mixte à 5°C et 18°C.

Les mesures infrarouges par la technique PM-IRRAS des surfaces greffées sont données dans la Figure 59. Elles nous indiquent que l'intensité des bandes relatives aux groupements CH₂ (ν_{as} : 2926 cm⁻¹, ν_s : 2856 cm⁻¹) et CH₃ (ν_{as} : 2961 cm⁻¹) augmentent lorsque la silanisation est réalisée à 5°C. Cependant, l'intensité des bandes relatives aux groupements CO ($\nu_{C=O}$: 1739 cm⁻¹) et NO₂ (ν_{as} : 1532 cm⁻¹ et ν_s : 1341 cm⁻¹) diminuent. Nous savons par ailleurs que les groupements NO₂ et CO sont présents uniquement dans le composé dendritique **D1** et le groupement CH₃ est présent uniquement dans le composé **C10**. Nous

pouvons donc interpréter ce résultat par une diminution de la proportion du composé **D₁** dans la couche mixte à 5°C et donc une augmentation de la proportion du composé **C10**. Ces résultats ne sont pas surprenants en raison de l'état du greffage de **D₁** seul à 5°C dans le toluène qui avait montré un greffage hétérogène et peu dense (cf chap II.4.3.2) et le greffage de **C10** seul à 5°C dans le toluène qui avait montré un greffage homogène et dense (cf chap II.4.4.1).

Les images AFM des surfaces greffées (Figure 60) de 2 µm x 2 µm ont été réalisées en mode intermittent. Les résultats obtenus sont les suivants : nous observons que le greffage à 5°C n'est pas homogène à la surface du support, il présente des domaines. En effet, l'image de hauteur montre des îlots avec des hauteurs de 4 à 6 nm en moyenne et des largeurs de 100 à 300 nm. L'image de phase (Figure 60 c) montre que la surface (entre les îlots) est bien greffée. En effet, des propriétés de phase similaires sont observées entre le fond de l'image et les îlots. Ainsi, des nano-domaines sont formés lors du greffage du système mixte à 5°C. Pour rappel, dans les mêmes conditions de greffage, nous avons remarqué que le composé **C10** formait une couche de faible rugosité (1,1 nm) et les greffages du composé **D₁** étaient hétérogènes. L'hypothèse envisagée à ce stade est que les îlots correspondent au composé **D₁**, et qu'ils seraient insérés dans une couche du composé **C10**.

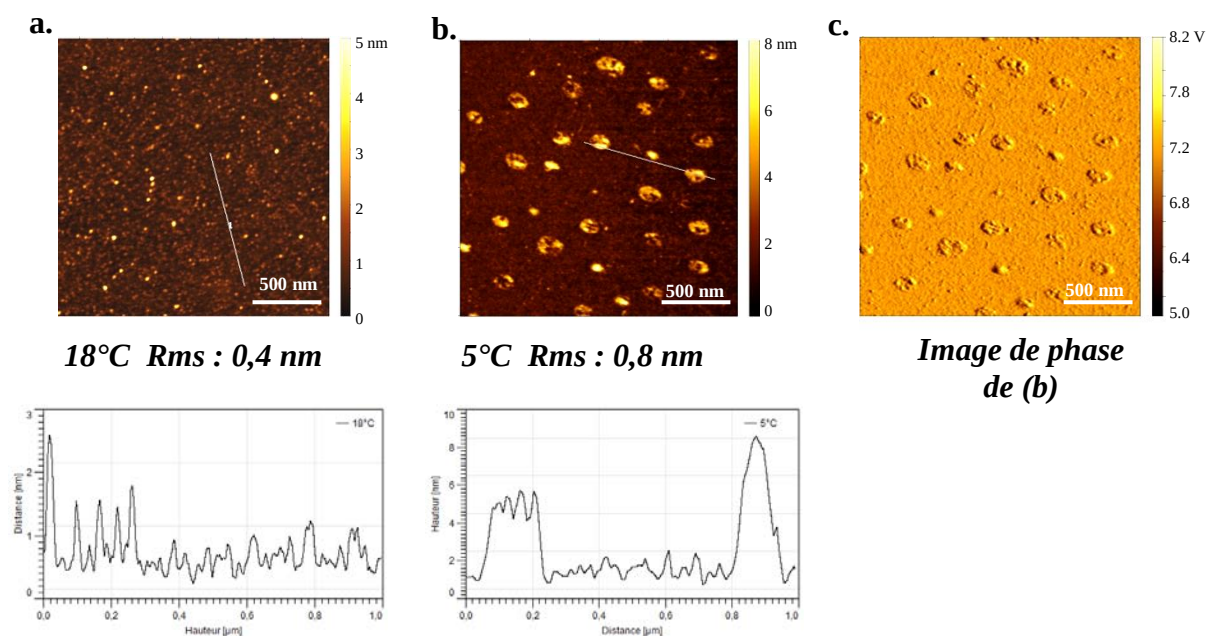


Figure 60. (a) Image AFM de hauteur (2 µm x 2 µm) et profil du greffage à 18°C. (b) Image AFM de hauteur (2 µm x 2 µm) et profil du greffage à 5°C. (c) : Image de phase de (b).

En résumé, le greffage mixte à 5°C de silanes (25% de **D₁** et 75% de **C10**) montre un greffage présentant des domaines. L'angle de contact indique une couche hydrophobe avec

des valeurs qui se rapprochent d'une couche de 100% de **C10**. L'infrarouge (PM-IRRAS) montre une incorporation plus grande de **C10** dans la couche mixte à 5°C comparé à 18°C. A 5°C, le greffage des deux composés ne se produit a priori pas à la même vitesse. Le greffage du composé **C10** serait plus rapide que le greffage du composé **D1**. Cette différence de réactivité est probablement due à la mauvaise solubilité de **D1** dans le toluène à 5°C.

4.5.3. Effet de solvant : surface SiO₂@D₁C10

Comme nous l'avons vu dans les paragraphes précédents, le solvant de greffage joue un rôle important pour le greffage des composés **D1** et **C10**. En effet, avec le composé **D1** l'utilisation du mélange de solvant avec 25% CHCl₃/ 75% C₆H₁₂ avait permis d'obtenir de meilleures qualités de surface. En revanche, pour le greffage du composé **C10**, l'utilisation du même mélange de solvants avait produit un état de greffage de moins bonne qualité à cause de l'augmentation de la polarité. A présent, nous avons évalué l'importance d'un changement de solvant pour le greffage du système mixte. Nous avons gardé les mêmes conditions expérimentales : une concentration en organosilane de 2,5.10⁻⁴ M et une température de silanisation de 5°C et 45 min de temps de réaction. Les solvants utilisés sont le toluène et le mélange de solvants (25% CHCl₃/ 75% C₆H₁₂). Les surfaces greffées ont été analysées par la mesure de l'angle de contact, la spectroscopie infrarouge et en imagerie AFM.

Les angles de contact avec l'eau sont répertoriés dans le Tableau 6. Ils montrent une diminution de l'angle de 17° avec le mélange de solvant. L'angle est passé de 97,2° à 79,8°. Cette valeur obtenue avec le mélange de solvant se rapproche des valeurs obtenues pour le greffage du composé **D1**. Ainsi la surface est devenue plus hydrophile.

Solvant	Toluène	25% CHCl ₃ / 75% C ₆ H ₁₂
Angle (°)	97,2±2,2	79,8±2,2

Tableau 6. Angle de contact avec l'eau de substrats greffés avec le système mixte en fonction du solvant de silanisation.

L'effet de solvant a été étudié en infrarouge par la technique PM-IRRAS.

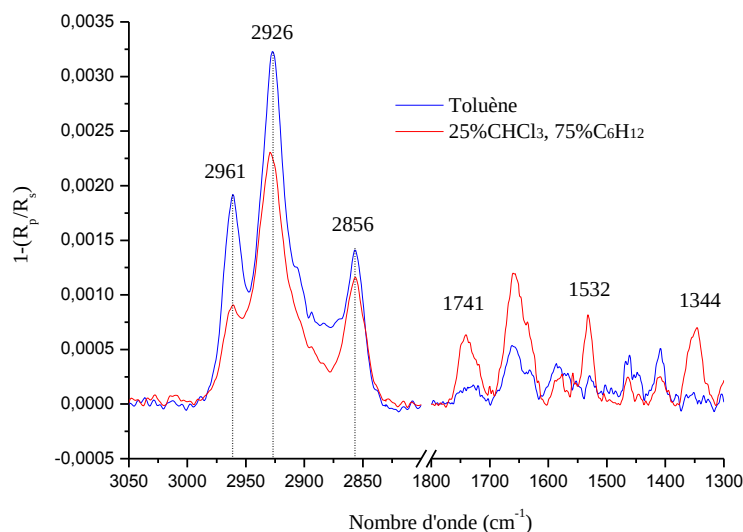


Figure 61. Spectres PM-IRRAS de substrats greffés avec le système mixte en fonction du solvant de réaction.

Dans la Figure 61, Il est montré que l'intensité des bandes obtenues dans les spectres varie en fonction du solvant. Ainsi, nous observons une baisse de moitié de l'intensité pour les bandes vibration relative au CH₂ (ν_{as} : 2926 cm⁻¹, ν_s : 2856 cm⁻¹) et CH₃ (ν_{as} : 2961 cm⁻¹) lors du passage du toluène vers le mélange 25% CHCl₃/ 75% C₆H₁₂ et un doublement d'intensité des bandes de vibration relatives aux fonctions CO ($\nu_{C=O}$: 1741 cm⁻¹) et NO₂ (ν_{as} : 1532 cm⁻¹ et ν_s : 1344 cm⁻¹). Ce résultat montre qu'avec l'utilisation de ce mélange de solvants, on obtient une meilleure incorporation de composé **D**₁ dans la couche et donc une moins bonne incorporation de **C**₁₀. Ces résultats sont en accord avec les valeurs obtenues par la mesure de l'angle de contact avec l'eau qui montre la formation d'une couche hydrophobe dans le toluène et une couche plus hydrophile lorsque le mélange de solvant est utilisé lors du greffage.

Les images AFM de 2 µm x 2 µm présentées dans la Figure 62 montrent que dans le cas du mélange de solvant l'image de hauteur est plus homogène et aucun défaut n'est apparent. Nous n'observons pas la présence de nano-domaines. Par ailleurs, nous retrouvons la même image que celle obtenue pour un greffage avec le toluène à 18°C. L'image de phase est elle aussi homogène, indiquant la présence sur toute la surface du même matériau. De plus, le profil de hauteur de 1 µm montre des hauteurs de 0,5 nm à 1 nm en moyenne. La rugosité mesurée sur toute l'image affiche une valeur faible de 0,4 nm. La surface greffée

avec ce système mixte et avec ces conditions expérimentales permet donc d'avoir une surface homogène et peu rugueuse.

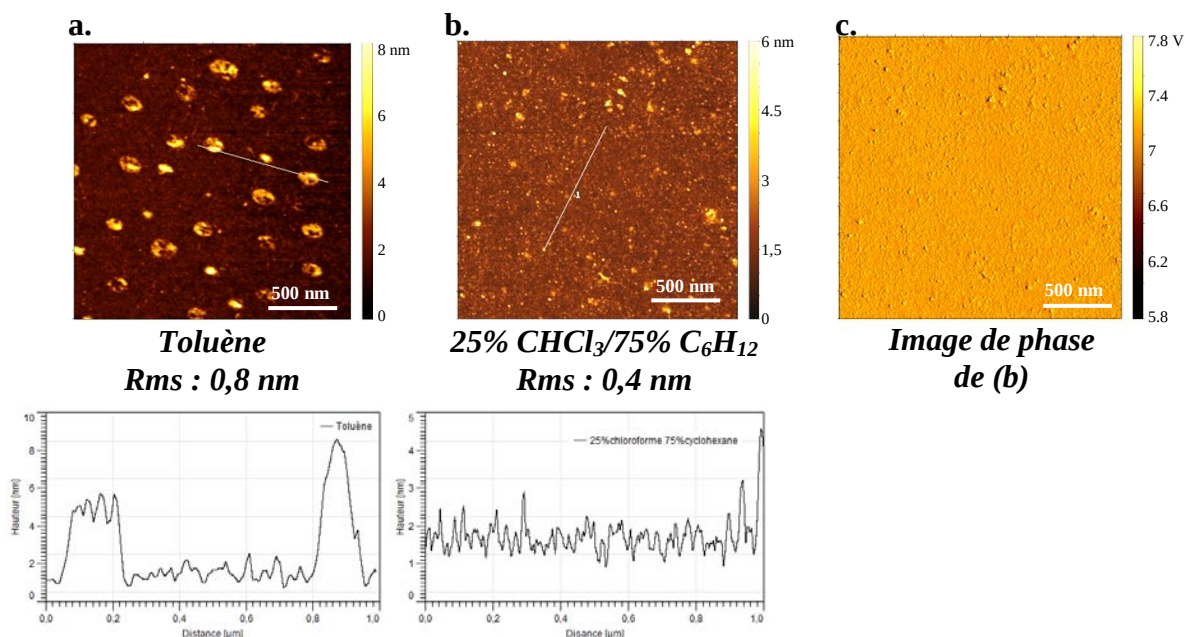


Figure 62. (a) Image AFM de hauteur ($2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$) et profil du greffage de 25% D_1 /75% C_{10} dans le toluène. (b) Image AFM de hauteur ($2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$) et profil du greffage de 25% D_1 /75% C_{10} dans (25% de CHCl_3 , 75% C_6H_{12}). (c) : Image de phase de (b).

En résumé, le greffage du système mixte dans le mélange de solvant a permis d'obtenir un greffage homogène. L'AFM, montre une topographie homogène sans défaut et de faible rugosité (0,4 nm). Par conséquent, le fait d'augmenter la polarité du solvant a permis de mieux incorporer le composé D_1 dans la couche simultanément au composé C_{10} . Ce résultat a été obtenu grâce à la meilleure solubilité du composé D_1 dans le mélange de solvant que dans le toluène. En fonction de la nature du solvant, il est donc possible de contrôler la structure de surface. Dans le cas du toluène, des nano-domaines en îlots sont constitués. Par contre, dans le mélange de solvant, c'est une couche homogène qui est formée.

4.6. Etude comparative de $\text{SiO}_2@D_1$, $\text{SiO}_2@C_{10}$ et $\text{SiO}_2@D_1C_{10}$:

Dans le Tableau 7 nous présentons l'énergie de surface totale ainsi que les deux composantes polaire et apolaire pour les quatre cas : surface non greffée, surface greffée avec le composé D_1 uniquement ($\text{SiO}_2@D_1$), surface greffée avec le composé C_{10} uniquement ($\text{SiO}_2@C_{10}$), surface greffée avec le système mixte ($\text{SiO}_2@D_1/C_{10}$). Nous remarquons que lors du passage de la surface non greffée à la surface greffée, nous baissions de manière significative l'énergie de surface, en particulier la composante polaire (due au greffage de

molécules organiques hydrophobes sur une couche minérale hydrophile de silice). Cependant, le greffage du système mixte (**D₁/C10**) présente une énergie qui se traduit par une conservation de la partie polaire du 100% **D₁** et de la partie dispersive du 100% **C10**. La couche mixte intègre donc les propriétés de chacune des molécules.

Substrats greffés avec	non greffé	D₁	C10	Système mixte
Energie de surface totale mN/m	67,2	25,9	25,9	28,9
Composante polaire mN/m	45,2	5,1	1,4	5,2
Composante dispersive mN/m	22,0	20,8	24,5	23,7

Tableau 7. Énergie de surface totale, composante polaire, composante dispersive de différents systèmes de greffage dans le toluène à 45 minutes de temps d'immersion et 18°C.

L'analyse des spectres PM-IRRAS des trois types de couches (**D₁/C10/mixte**) (Figure 63) préparées dans les mêmes conditions expérimentales (25% CHCl₃/ 75% C₆H₁₂, 5°C, 45 min et c : 2,5.10⁻⁴ M) montre que l'intensité des bandes relatives au composé **D₁** (CO et NO₂) baisse d'un facteur trois pour la couche mixte comparé à la couche du composé **D₁** à 100%. Par contre, les bandes de vibrations des fonctions communes aux deux composés (CH₂) nous indiquent qu'il y a la même quantité de matière dans les deux couches. Dans le cas du greffage mixte, nous avons mesuré une valeur de Rms de 0,4 nm en AFM attestant d'un mélange homogène des deux composés dans la couche.

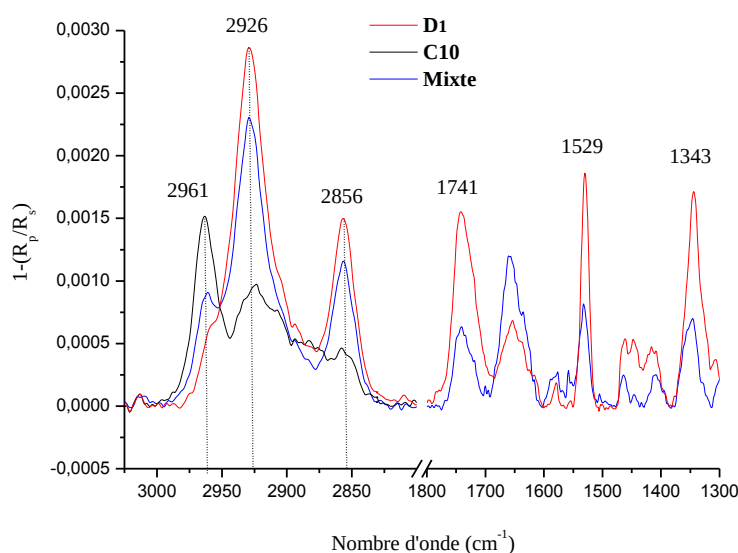


Figure 63. Spectres PM-IRRAS de greffage de différents systèmes.

4.7. Greffage des composés dendritiques **D**₄ et **D**₅ : SiO₂@**D**₄ et SiO₂@**D**₅

Une étude préliminaire sur les greffages des composés **D**₄ et **D**₅ (dendrons de 2^{ème} génération, 4 branches) a également été réalisée (Figure 64).

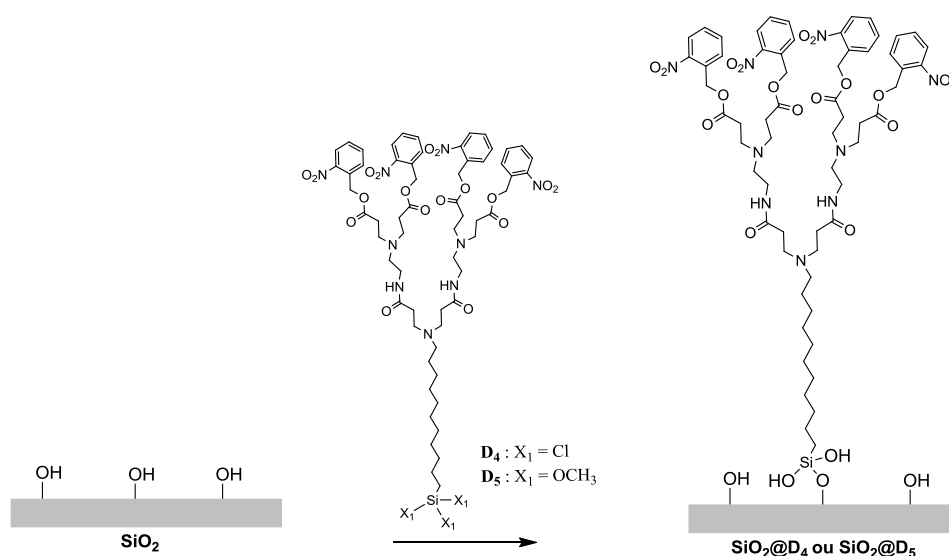


Figure 64. Schéma de la réaction de greffage des composés **D**₄ et **D**₅.

Ces deux composés sont plus polaires que les composés de première génération (**D**₁, **D**₂, **D**₃) car ils présentent beaucoup de fonctions polaires (amide et ester) dans la partie dendritique. Le composé **D**₄ a montré une insolubilité totale dans tous les solvants utilisés pour le greffage (toluène, chloroforme). Cette insolubilité serait due à l'hydrolyse partielle des groupements chlorosilanes qui dégageraient *in situ* de l'acide chlorhydrique à l'origine de la protonation des amines ce qui rendrait le composé **D**₄ insoluble. Le composé **D**₅ porteur d'un groupe Si(OMe)₃ moins sensible à l'hydrolyse que le groupement SiCl₃ a pu être solubilisé dans les solvants de greffage. Ce composé présente une fonction méthoxysilyle qui permet d'éviter la protonation des amines tertiaires. Il a été greffé dans les conditions expérimentales suivantes : une concentration de 2,5.10⁻⁴ M, dans un mélange de 50% CHCl₃/ 50% C₆H₁₂, pendant 15h, en présence du catalyseur de greffage (acide trichloracétique) à 10% molaire. L'angle de contact après greffage affiche une valeur de 88° ± 1,4. Cette valeur est très proche de celle obtenue avec les dendrons de première génération. Le spectre PM-IRRAS de ce greffage est donné dans la Figure 65. Il a été comparé avec le greffage du composé **D**₁ dans le même solvant (45 min). Nous constatons la présence des mêmes bandes de vibration avec des intensités plus importantes pour les bandes caractéristiques du groupe nitrobenzyle. Les

intensités sont multipliées par deux, ce qui est cohérent, car le composé **D₅** contient deux fois plus de fonctions nitrobenzylique comparé au composé **D₁**.

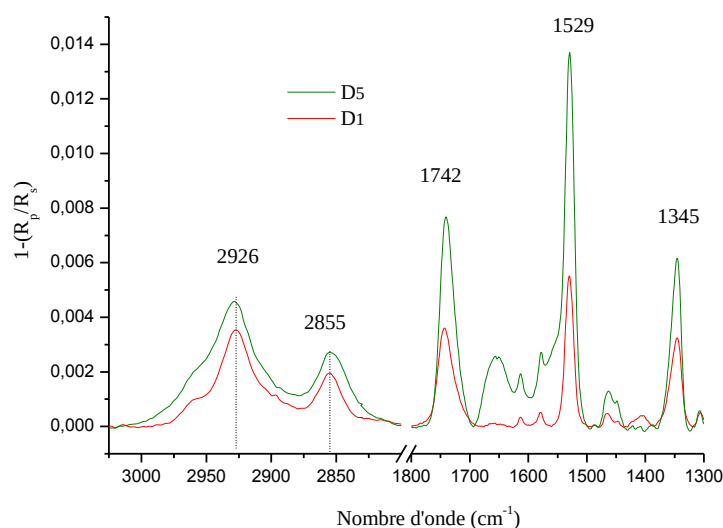


Figure 65. Spectres PM-IRRAS de greffage du composé **D₁** et du composé **D₅**.

Une analyse par spectroscopie AFM de ce greffage a été réalisée. Les images de hauteurs de 2 μm x 2 μm (Figure 66 a), montrent un état de surface homogène de faible rugosité (0,8 nm).

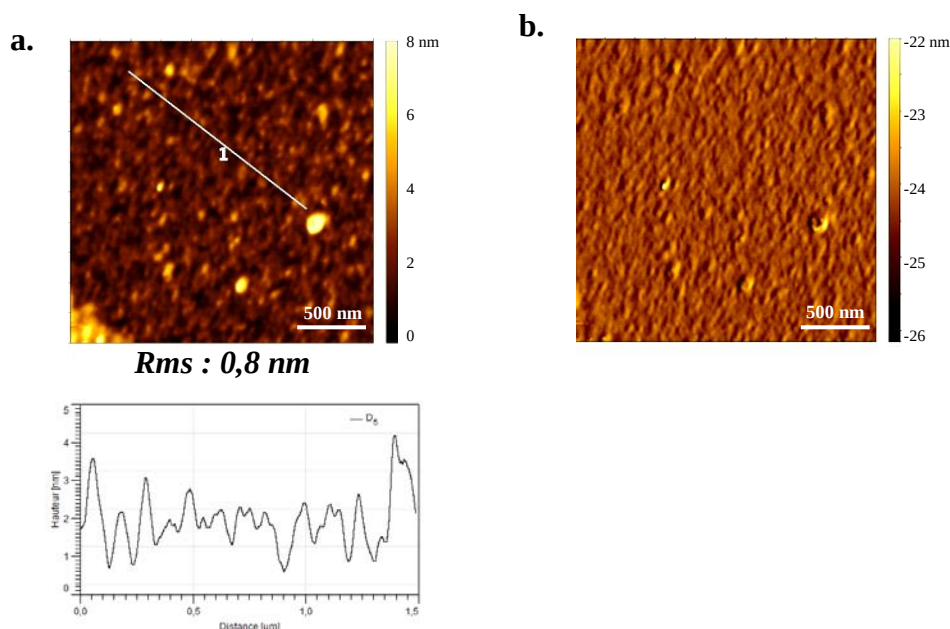


Figure 66. (a) Image AFM de hauteur (2 μm x 2 μm) et profil du greffage du composé **D₅**. (b) Image de phase du greffage du composé **D₅**.

L'image de phase (Figure 66 b) est également homogène ce qui montre que toute la surface a été recouverte. Sur le profil de hauteur, nous remarquons des hauteurs entre 1,5 nm

et 3 nm. Ce résultat est encourageant pour la suite de l'étude concernant la bio-fonctionnalisation (chapitre III). Néanmoins, des études complémentaires de greffage de ce composé dendritique de deuxième génération seraient nécessaires afin de compléter ce travail (en particulier le greffage de systèmes mixtes). Cependant, par manque de temps, nous n'avons pas pu continuer ce travail.

5. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons décrit la synthèse de différents composés dendritiques portant des fonctions photo-labiles en périphérie et un groupement silyle (SiCl₃, Si(OMe)₃, Si(CH₃)₂Cl) au point focal. Ces composés ont été obtenus avec un rendement global de 70% après 5 étapes de synthèse pour les composés à deux branches et 7 étapes pour les composés à 4 branches. Les composés **D**₁, **D**₂ et **D**₃ ont été greffés sur des miroirs d'or recouverts d'une couche de SiO₂ et des wafers de silicium. Les supports greffés ont été analysés par des mesures d'angle de contact, d'infrarouge et d'AFM. Différents paramètres ont été étudiés pour le greffage de la structure dendritique à deux branches: la nature du silane, le temps de greffage, la température et le solvant. Nous avons démontré que la fonction trichlorosilane (composé **D**₁) permet d'avoir le greffage le plus dense. Cependant, les autres paramètres expérimentaux (solvant, température) sont très importants pour la qualité du greffage en particulier la topographie de surface. En revanche, dans notre cas, le fait d'abaisser la température de silanisation à 5°C en utilisant le toluène comme solvant n'a pas amélioré le greffage de **D**₁. Par contre, il a été démontré que le mélange de 25% CHCl₃/ 75% C₆H₁₂ utilisé lors de l'étape de silanisation a permis d'obtenir des surfaces denses, de faible rugosité (0,9 nm) et homogènes. Néanmoins, la qualité des greffages a pu encore être améliorée, en utilisant un mélange de silanes composé de chaîne alkyles **C**₁₀ et de composé **D**₁, dans le toluène à 18°C. Ce greffage a permis de former un revêtement homogène sans domaine avec un Rms de 0,4 nm. Le même revêtement a également été obtenu dans le mélange de solvant (25%CHCl₃/ 75%C₆H₁₂). Par contre, des nano-domaines ont été observés dans le cas où le greffage a eu lieu à 5°C dans le toluène pendant 45 min. En fonction des conditions expérimentales, il est donc possible d'obtenir des couches mixtes de structures différentes.

Le greffage du dendron **D**₅ (de deuxième génération) a permis la formation d'une surface homogène et peu rugueuse avec un taux de fonctionnalisation élevé observé en PM-IRRAS. Dans cette étude, nous avons montré que les conditions expérimentales jouent un rôle crucial lors du greffage, de même que la nature des organosilanes.

Bibliographie :

- [1] (a) L.S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 4025. (b) M. Fransconi, F. Mazzei, T. Ferri, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398, 1545. (c) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 1775.
- [2] J.E. Butler, *Methods*, **2000**, 22, 4.
- [3] (a) J. A. Camarero, *peptide Sci.*, **2008**, 90, 450. (b) K. Terpe, *Appl. Microtechnol. Biotechnol*, **2003**, 60, 523. (c) M. Hedhammar, T. Gräslund, S. Hober, *Chem. Eng. Technol.*, **2005**, 28, 1315.
- [4] C. L. Smith, G. S. Milea, G. H. Nguyen, *Top. Curr. Chem.*, **2004**, 261, 63.
- [5] F. Gao, B. F. Pan, W. M. Zheng, L. M. Ao, H. C. Gu, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 48.
- [6] (a) E. Besson, A. M. Gue, J. Sudor, H. K. Yousoufi, N. Jaffrezic, J. Tardy, *Langmuir*, **2006**, 22, 8346. (b) P. F. Driscoll, E. Milkani, C. R. Lambert, W. G. McGimpsey, *Langmuir*, **2010**, 26, 3731. (c) K. Yamaguchi, H. Nakayama, T. Fatumi, T. Shimizu, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **2008**, 21, 519.
- [7] (a) G. E. Fryxell, P. C. Rieke, L. L. Wood, M. H. Engelhard, R. E. Williford, G. L. Grall, A. Campbell, R. J. Wiacek, L. Lee, A. Halverson, *Langmuir*, **1996**, 12, 5064. (b) O. Gershervitz, C. N. Sukenik, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 482.
- [8] L.T. Zhuravlev, *Colloids and surfaces A : Physicochel. Eng. Aspects*, **2000**, 173, 1.
- [9] L.T. Zhuravlev, *Colloids and surfaces A : Physicochel. Eng. Aspects*, **1993**, 74, 71.
- [10] (a) B.A. Morrow, I. A. Cody, *J. Phys. Chem.*, **1976**, 80, 1998. (b) B. C. Bunker, D. M. Halland, T. E. Michalske, W. L. Smith, *Surface Science*, **1989**, 222, 95. (c) B.A. Morrow, I. A. Cody, L. S. M. Lee, *J. Phys. Chem.*, **1976**, 80, 2761.
- [11] R. P. W. Scott, S. Traiman, *Journal of Chromatography*, **1980**, 196, 193.
- [12] B. A. Morrow, *Studies in surface Science and Catalysis*, **1990**, 57, 161.
- [13] X. Zhang, A. V. Teplyakov, *Langmuir*, **2008**, 24, 810.
- [14] C. S. Sheehan, W. A. Bolhofer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 2786.
- [15] S. C. Tsai, Y. S. Fu, J. H. Liao, S. J. Yu, *Hel. Chim. Acta*, **2006**, 89, 3007.
- [16] H. Staudinger, J. Meyer, *Hel. Chim. Acta*, **1919**, 2, 635.
- [17] W. Lin, X. Zhang, Z. He, Y. Jin, L. Gong, A. Mi, *Synth. Commun.*, **2002**, 32, 3279.

- [18] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, **2005**, 61, 10827.
- [19] B. Marciniec, H. Maciejewski, C. Pietraszuk, P. Pawluć, *Hydrosilylation. A Comprehensive Review on Recent Advances, dans Advances in Silicon Science, Vol. 1 ; B. Marciniec, Ed., 2009*, Springer
- [20] A. J. Chalk, J. F. Harrod, *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, 87, 16.
- [21] S. Sakaki, N. Mizoe, M. Sugimoto, *Organometallics*, **1998**, 17, 2510.
- [22] (a) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Macromolecules*, **1986**, 19, 2466. (b) D. A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, *Polym. J.*, **1985**, 17, 117.
- [23] (a) M. A. Ramin, G. Le Bourdon, N. Daugey, B. Bennetau, L. Vellutini, T. Buffeteau, *Langmuir*, **2011**, 27, 6076. (b) I. Pelletier, I. Laurin, T. Buffeteau, B. Desbat, M. Pézolet, *Langmuir*, **2003**, 19, 1189.
- [24] (a) S. Gauthier, J. P. Aimé, T. Bouhacina, A. J. Attias, B. Desbat, *Langmuir*, **1996**, 12, 5126. (b) N. Saito, K. Hayashi, H. Sugimura, O. Tokai, N. Nakagiri, *Surf. Interfac. Anal.*, **2002**, 34, 601.
- [25] J. R. Vig, *J. Vac. Sci. Technol. A*, **1985**, 3, 1027.
- [26] D. H. Dinh, L. Vellutini, B. Bennetau, C. Dejous, D. Rebière, E. Pascal, D. Moynet, C. Belin, B. Desbat, C. Laburgère, J. P. Pillot, *Langmuir*, **2009**, 25, 5526.
- [27] (a) R. G. Snyder, H. L. Strauss, C. A. Elliger, *J. Phys. Chem.*, **1982**, 86, 5145. (b) R. A. Vaia, R. T. Teukolsky, E. P. Giannelis, *Chem. Mater.*, **1994**, 6, 1017.
- [28] (a) J. Genzer, K. Efimenko, D. F. Fischer, *Langmuir*, **2002**, 18, 9307. (b) A. Y. Fadeev, T. J. McCarthy, *Langmuir*, **2000**, 16, 7268. (c) J. Rühe, V. J. Novotny, K. K. Kanazawa, T. Clarke, G. B. Street, *Langmuir*, **1993**, 9, 2383. (d) A. Y. Fadeev, T. J. McCarthy, *Langmuir*, **1999**, 15, 3759.
- [29] J. V. Davidovits, V. Pho, P. Silberzan, M. Goldmann, *Surface Science*, **1996**, 352-354, 369.
- [30] (a) A. N. Parikh, D. L. Allara, I. Ben Azouz, F. Rondelez, *J. Phys. Chem.*, **1994**, 98, 7577. (b) J. B. Brzoska, I. Ben Azouz, F. Rondelez, *Langmuir*, **1994**, 4367.
- [31] L. Netzer, J. Sajiv, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 675.
- [32] J. Gun, J. Sagiv, *J. Colloid Inter. Sci.*, **1986**, 112, 457.
- [33] M. E. McGovern, K. M. R. Kaluray, M. Thomson, *Langmuir*, **1994**, 10, 3607.

- [34] (a) A. Ulman, *Chem. Rev.*, **1996**, 96, 1533. (b) S. Onclin, B. J. Ravoo, D. N. Reinhoudt, *Angw. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 6282. (c) S. R. Wasserman, Y. T. Tao, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **1989**, 5, 1074.
- [35] (a) A. Lio, D. H. Charych, M. Salmeron, *J. Phys. Chem. B*, **1997**, 101, 3800. (b) L. Scheres, M. Giesbers, H. Zuilhof, *Langmuir*, **2010**, 26, 4790. (c) K. Limura, Y. Nakajima, T. Kato, *Thin Solid, Films*, **2000**, 379, 230.
- [36] (a) K. Bierbaum, M. Grunze, *Langmuir*, **1995**, 11, 2143. (b) S. Navarre, F. Choplin, J. Bousbaa, B. Bennetau, *Langmuir*, **2001**, 17, 4844.
- [37] (a) P. Martin, S. Marsaudon, L. Thomas, B. Desbat, J. P. Aimé, B. Bennetau, *Langmuir*, **2005**, 21, 6934. (b) Y. Tong, E. Troyrode, M. Osawa, N. Yoshida, T. Watanabe, A. Nakajima, S. Ye, *Langmuir*, **2011**, 27, 5420. (c) I. Choi, Y. Kim, S. K. Kang, J. Lee, J. Yi, *Langmuir*, **2006**, 22, 4885.
- [38] Z. H. Wang, G. Jin, *Coll. Surf. B: Biointerfaces*, **2004**, 34, 173.
- [39] V. Früh, P. IJerman, G. Siegal, *Chem. Rev.*, **2011**, 111, 640.
- [40] S. J. Stranick, A. N. Parikh, Y. T. Tao, D. L. Allara, P. S. Weiss, *J. Phys. Chem.* **1994**, 98, 7636.

Chapitre III. Biofonctionnalisation de surfaces SiO₂.

1. Introduction :

L'immobilisation de protéines par voie covalente est très souvent utilisée en raison de la stabilité de la liaison créée, par exemple entre les résidus lysines des protéines et des surfaces fonctionnalisées par des groupements acide carboxylique.¹ Cette immobilisation est, en général, réalisée après activation par la chimie des carbodiimides des fonctions acide carboxyliques de la surface. Dans la plupart des études sur l'immobilisation de protéines, le couple de réactifs EDC / NHS est utilisé pour la transformation de la fonction acide en fonction ester NHS ou ester activé plus réactif. L'ester NHS de la surface réagit alors avec les groupements amine de la protéine pour permettre la formation d'une fonction amide stable. L'efficacité de l'immobilisation dépend de plusieurs paramètres tels que le pH du milieu, la concentration, la force ionique et le temps de la réaction.¹

L'immobilisation de protéine A est souvent utilisée pour l'élaboration d'immunocapteurs sensibles et spécifiques.² En effet, la protéine A est une protéine qui possède la propriété de se lier aux immunoglobulines (IgG) et ainsi servir de support à l'immobilisation des anticorps.³ La protéine A est une protéine membranaire de 42 kDa initialement trouvée dans les parois des bactéries pathogènes *Staphylococcus aureus* qui sont responsables d'intoxications alimentaires, voire de septicémies.⁴ Elle possède cinq sous-unités pouvant fixer les fragments constants (ou chaînes lourdes, Fc) des anticorps.⁵ Au cours de l'immobilisation, trois de ces sous unités deviennent inactives ; une protéine A est donc capable de se lier à deux anticorps par leur extrémité Fc.⁶ Les anticorps se trouvent ainsi immobilisés de façon stable et dans une orientation telle que leur activité est préservée puisque les régions spécifiques (Fab), tournée vers l'extérieur, est rendue accessible pour interagir avec l'antigène.

Dans le chapitre II, nous avons montré le greffage des composés dendritiques de première génération (**D₁-D₃**) et de deuxième génération (**D₄-D₅**) portant des groupements acides carboxyliques protégés par un groupement photoclivable (ester 4-nitrobenzylique). Nous avons également montré le greffage du composé **C10** et de systèmes mixtes **C10/D₁**. Le greffage de ces composés a été optimisé en jouant sur les paramètres expérimentaux (température, solvant). Dans ce chapitre, nous allons étudier la biofonctionnalisation de ces surfaces avec la protéine A comme modèle. Afin de mieux observer ces protéines sur les substrats en imagerie AFM, nous avons choisi des nanoparticules d'or colloïdal de 20 nm de diamètre, recouvertes de protéines A notés NP-pA (fournisseur : TébuBio).

2. Immobilisation de NP-pA sur différentes surfaces planes :

Différentes surfaces ont été sélectionnées pour l'immobilisation des NP-pA, les images AFM de ces surfaces sont présentées dans la Figure 1.

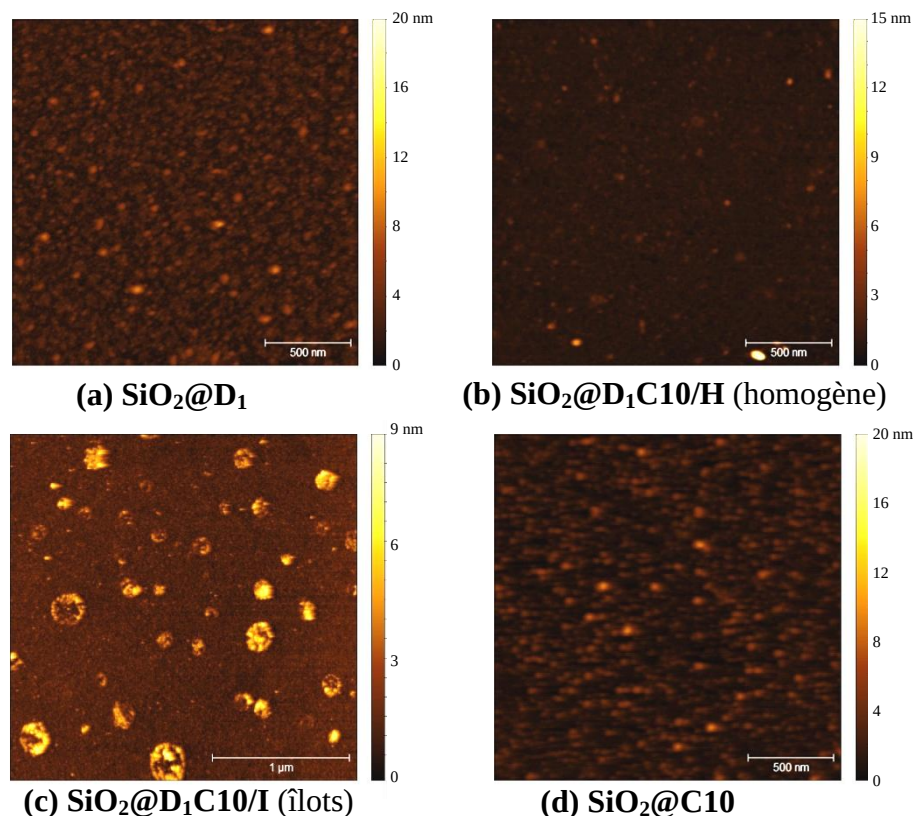


Figure 1. Images AFM de hauteur (2 μm x 2 μm) des différentes surfaces greffées qui seront utilisées pour immobiliser la protéine A.

Rappel des différentes surfaces utilisées :

SiO₂@D₁. Une surface greffée avec le dendron **D₁** à 5°C pendant 45 minutes dans 75% de cyclohexane et 25% de chloroforme. Ces conditions de greffage ont permis d'obtenir une surface homogène avec une rugosité de 1 nm.

SiO₂@D₁C10/H. Une surface mixte greffée avec 25% de dendron **D₁** et 75% de composé **C10** dans un mélange de 75% C₆H₁₂/ 25% CHCl₃ à 5°C pendant 45 minutes. Cette surface est homogène avec une faible rugosité de 0,4 nm.

SiO₂@D₁C10/I. Une surface mixte greffée avec 25% de dendron **D₁** et 75% de composé **C10** dans le toluène à 5°C pendant 45 minutes. Ces conditions de greffage ont permis d'obtenir une surface présentant des îlots. La présence de ces nano-domaines sur la surface pourrait s'expliquer par une ségrégation de phase entre le composé **D₁** et le composé **C10**. Nous avons émis l'hypothèse (Chap. II.4.5.2.) que les îlots sont formés par le composé **D₁** et que le reste

de la surface est formé du composé **C10**. L'immobilisation des NP-pA pourrait valider ou invalider cette hypothèse.

SiO₂@C10. Une surface greffée avec le composé **C10** dans le toluène à 18°C pendant 45 minutes. Cette surface sera utilisée pour l'immobilisation de NP-pA afin de vérifier l'adsorption non spécifique de la protéine sur la surface.

2.1. Immobilisation de NP-pA sur la surface greffée SiO₂@D₁ :

Les surfaces SiO₂@D₁ (Figure 1 a) ont été irradiées sous UV ($\lambda > 300$ nm) pour libérer les fonctions acide carboxylique qui, ensuite, ont été transformées en esters activés en présence d'EDC, NHS (pH=6, tampon MES*), puis les NP-pA ont été immobilisées sur les surfaces par un couplage peptidique (Figure 2).

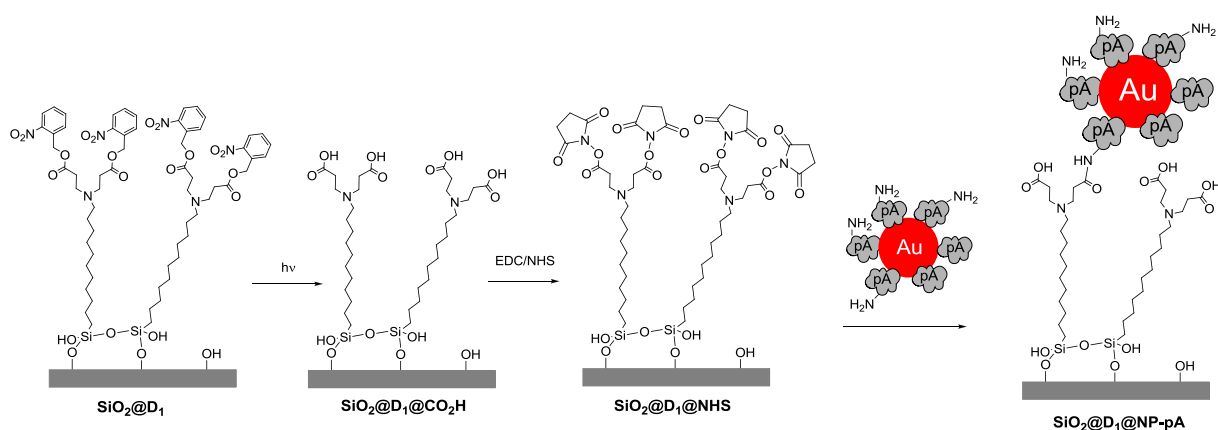


Figure 2. Représentation du processus d'immobilisation des NP-pA sur une surface SiO₂@D₁.

2.1.1. Photodéprotection de l'acide carboxylique :

Le photoclivage de la fonction ester nitrobenzylique libère deux fragments après excitation du chromophore par photoréarrangement de l'*o*-nitrobenzyle en *o*-nitrosobenzaldéhyde. Selon Patchornik,⁷ le mécanisme (Figure 3) repose sur l'arrachement d'un hydrogène benzylique par le groupe nitro suivi d'un réarrangement intramoléculaire rapide en *o*-nitrosobenzaldéhyde et la libération d'un acide carboxylique (réaction Norrish II).⁸ Le rendement quantique de cette réaction est de 0,13.⁸

* MES : acide 2-morpholino éthanesulfonique.



A l'issu de la photodéprotection, les substrats **SiO₂@D₁@CO₂H** ont été analysés par infrarouge (PM-IRRAS). Dans la Figure 4 sont représentés les spectres avant et après déprotection. Nous constatons que les bandes relatives à la fonction NO₂ (ν_{as} : 1530 cm⁻¹ ; ν_s : 1344 cm⁻¹) ont disparus, indiquant le départ du groupement ester nitrobenzylique. La bande de vibration C=O de l'ester subit un décalage de 1741 cm⁻¹ à 1718 cm⁻¹ dû à l'obtention de la fonction acide libre.¹⁰ Par ailleurs, nous remarquons que l'intensité des bandes du groupe CH₂ (ν_{as} 2928 cm⁻¹ et ν_s 2857 cm⁻¹) reste inchangée ce qui indique que la couche greffée n'a pas été dégradée.

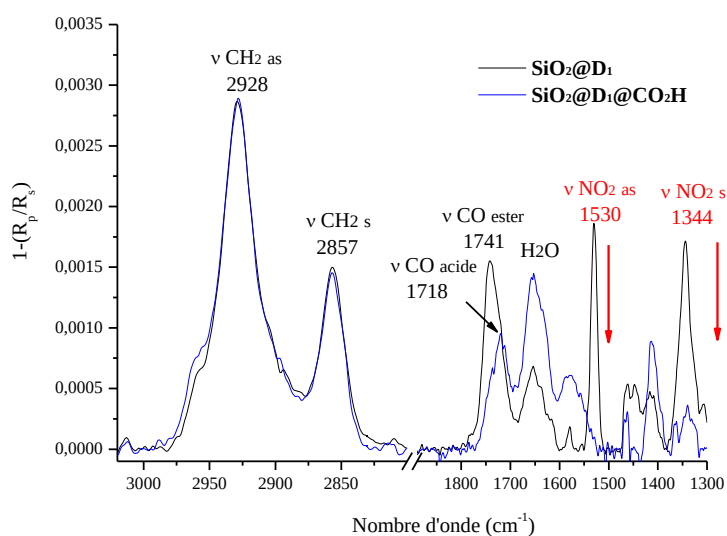


Figure 4. Spectres PM-IRRAS des surfaces **SiO₂@D₁** et **SiO₂@D₁@CO₂H**.

2.1.2. Activation de l'acide carboxylique :

L'étape d'activation des fonctions acides de surface (**SiO₂@D₁@CO₂H**) est réalisée à l'aide d'une solution aqueuse d'EDC et NHS en présence d'un tampon afin de maintenir le pH à 6. Le mécanisme de la réaction est détaillé dans la Figure 5. L'addition de la fonction carboxylate sur le carbodiimide forme un premier ester activé (ester EDC) puis le NHS vient réagir alors sur l'ester EDC pour former un deuxième ester activé plus stable (ester NHS).¹¹ Le sous produit de type urée est éliminé après lavages des substrats avec de l'eau et du chloroforme. Cette étape d'activation pour former **SiO₂@D₁@NHS** est réalisée *in-situ* juste avant le couplage avec la molécule biologique.

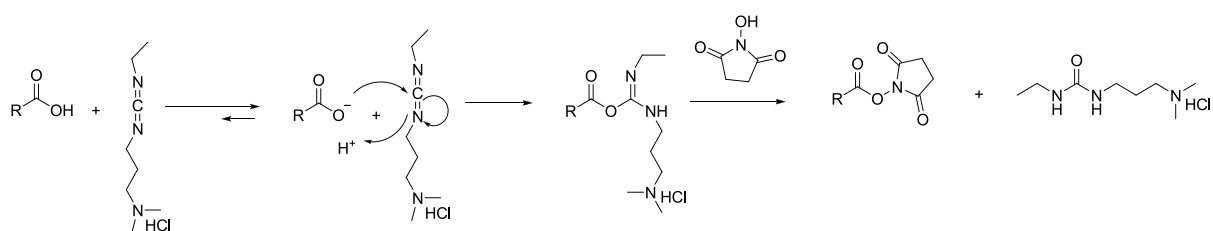


Figure 5. Mécanisme de la réaction d'activation des acides carboxyliques.

Après l'activation des fonctions COOH les substrats ont été analysés en infrarouge. Les spectres sont représentés dans la Figure 6.

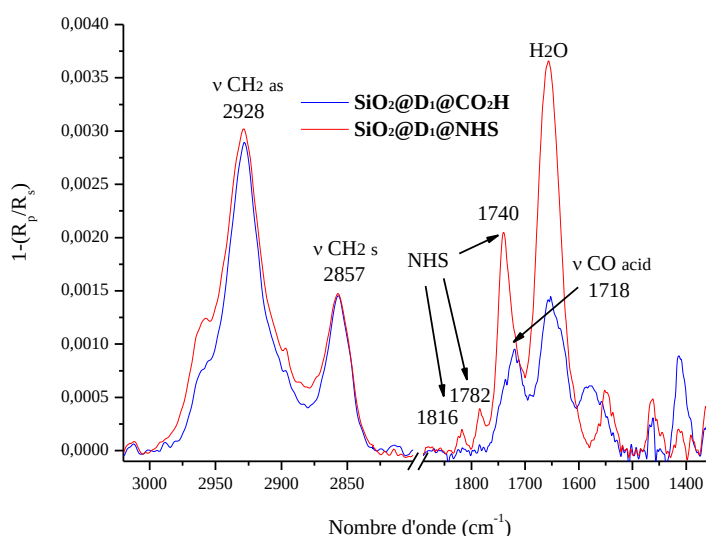


Figure 6. Spectres PM-IRRAS des surfaces $\text{SiO}_2@\text{D}_1@\text{CO}_2\text{H}$ et $\text{SiO}_2@\text{D}_1@\text{NHS}$.

Nous remarquons que les bandes associées au CH₂ (ν_{as} : 2928 cm⁻¹ et ν_{s} : 2857 cm⁻¹) sont restées inchangées ce qui indique que la couche organique n'a pas été dégradée. Par ailleurs, nous remarquons l'apparition de trois nouvelles bandes à 1740 cm⁻¹, 1782 cm⁻¹ et 1816 cm⁻¹. L'attribution exacte de ces trois bandes est toutefois controversée. Le plus souvent, les bandes à 1740 cm⁻¹ et 1782 cm⁻¹ ont été attribuées respectivement aux modes d'élongation asymétrique et symétrique des carbonyles du cycle par analogie avec des composés succinimides. La troisième bande à haute fréquence (1816 cm⁻¹) serait attribuée au carbonyle de l'ester de *N*-hydroxysuccinimide.¹² L'autre interprétation possible est que la bande à 1816 cm⁻¹ soit celle du mode symétrique des carbonyles du cycle NHS. En effet, ce mode présente une faible activité infrarouge et une fréquence plus grande que celle d'un carbonyle d'un ester. Les deux autres modes (à 1782 cm⁻¹ et 1740 cm⁻¹) peuvent résulter d'un couplage entre le mode d'élongation asymétrique des carbonyles du cycle et le mode d'élongation du carbonyle de l'ester.¹³

Quoi qu'il en soit, les trois bandes sont associées au groupe NHS et leurs présences sur le spectre confirment l'activation des fonctions acides carboxyliques à la surface.

2.1.3. Immobilisation des NP-pA :

Pour l'immobilisation des NP-pA ($\text{SiO}_2@\text{D}_1@\text{NP-pA}$), les surfaces activées ($\text{SiO}_2@\text{D}_1@\text{NHS}$) ont été immergées dans une solution aqueuse (tampon phosphate salin, PBS) ajustée à un pH = 8 contenant les NP-pA. L'incubation a eu lieu pendant 2 h à 37°C. Le pH légèrement basique permet de déprotoner les fonctions amine des résidus lysine pour

permettre leur réaction avec les fonctions ester NHS de la surface. Une liaison covalente forte de type amide est ainsi créée entre la surface du support et la protéine A. A la fin de la réaction, les supports sont lavés abondamment à l'eau MilliQ dans le but d'éliminer les sels, puis aux ultrasons dans de l'eau MilliQ pendant 5 minutes dans le but d'éliminer les particules NP-pA physisorbées.

A l'issue du couplage des NP-pA, les substrats **SiO₂@D₁@NP-pA** ont été analysés en PM-IRRAS et en AFM.

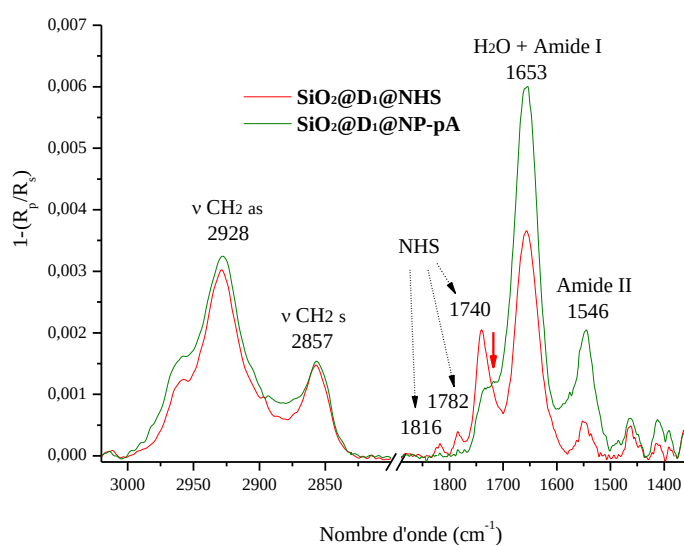


Figure 7. Spectres PM-IRRAS des surfaces **SiO₂@D₁@NHS** et **SiO₂@D₁@NP-pA**.

Les spectres infrarouges de la Figure 7 montrent que les bandes associées aux CH₂ (ν_{as} : 2928 cm⁻¹ et ν_s : 2857 cm⁻¹) restent inchangées indiquant que la couche organique a été préservée. Cependant, nous remarquons que les bandes relatives aux groupements NHS ont disparues. Nous remarquons également l'apparition de deux nouvelles bandes associées à la fonction amide, (amide I à 1653 cm⁻¹ et amide II à 1546 cm⁻¹). Ces bandes sont associées aux liaisons amide des acides aminés qui constituent la protéine A. Toutes ces observations montrent qu'une immobilisation covalente de la protéine A a été réalisée.

Les substrats de silicium ont été analysés en AFM et les résultats sont présentés dans la Figure 8. L'image de hauteur et de phase de la Figure 8, correspondent à la surface **SiO₂@D₁@NP-pA** issue de l'immobilisation de NP-pA. Sur la Figure 8 (a), nous remarquons l'apparition de billes sur la surface. Les mesures réalisées sur le profil montrent des hauteurs de 20 nm correspondant aux diamètres des nanoparticules d'or. Cependant, les largeurs mesurées sont de 40 nm. Ceci peut s'expliquer, par le rayon de courbure de la pointe AFM qui est de 6 nm et qui limite la résolution en xy. L'image de phase (Figure 8 b) permet de détecter

une différence de composition chimique et ainsi confirmer la présence des NP-pA. En mode intermittent, elle est liée au déphasage entre l'oscillation de la pointe et celle du piézoélectrique qui l'entraîne. Le contraste procure ainsi des informations sur les propriétés d'élasticité et d'adhésion de la surface. A partir des images AFM il est possible d'évaluer le nombre de NP-pA immobilisées sur la surface soit environ 7 NP-pA/ μm^2 .

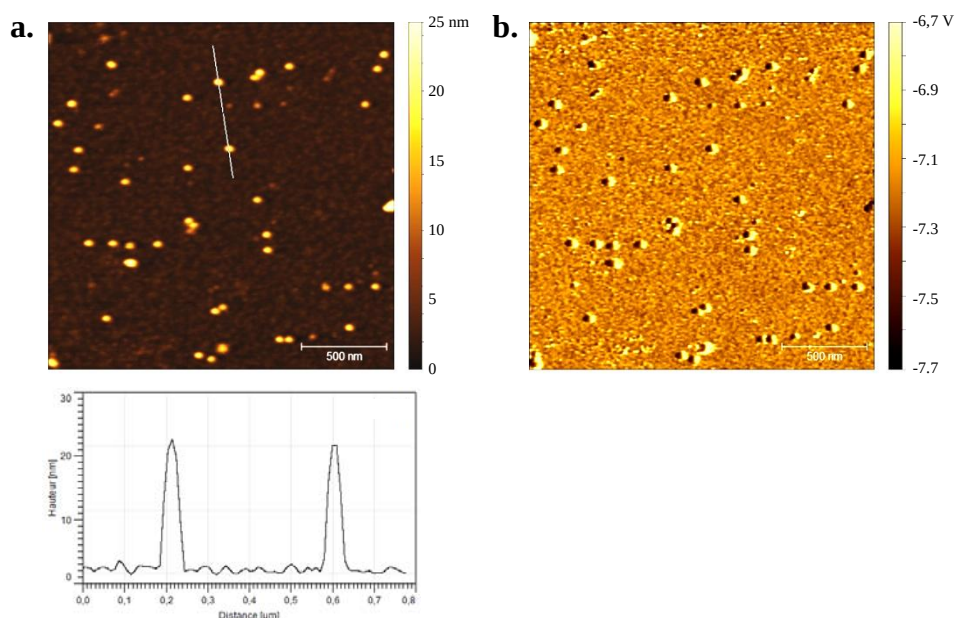


Figure 8. Images AFM de hauteur, profil de hauteur (a) et image AFM de phase (b) [$2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$] de $\text{SiO}_2@\text{D}_1@\text{NP-pA}$.

En résumé, dans cette partie (§2.1.), nous avons montré une immobilisation covalente de nanoparticules d'or recouvertes de protéines A sur une surface greffée par le composé D_1 ($\text{SiO}_2@\text{D}_1$). Nous avons caractérisé les différentes étapes du greffage : la déprotection et l'activation des fonctions acide et l'immobilisation covalente des NP-pA. La dernière étape a été analysée par AFM confirmant la présence de NP-pA d'une taille de 20 nm sur la surface. Ces surfaces modifiées par des molécules à structure dendritique sont donc capables d'immobiliser des molécules biologiques.

2.2. Immobilisation de NP-pA sur la surface mixte $\text{SiO}_2@\text{D}_2\text{C10/H}$:

Dans certaines études,² il a été montré que le fait de diluer les fonctions acide à la surface permettrait d'améliorer l'accessibilité de ces fonctions et ainsi d'augmenter la quantité de protéine greffée à la surface. Il a été montré qu'une quantité de 25% de fonctions acide à la surface permettrait d'améliorer de façon significative l'accrochage de protéine A sur une surface d'or.²

Dans un premier temps, nous avons choisi d'immobiliser les NP-pA sur la surface mixte homogène **SiO₂@D₁C10/H**. Pour rappel, cette surface a été réalisée par le greffage d'un mélange de 25% de **D₁** et 75% de **C10** dans un mélange de solvants de 25% CHCl₃/ 75% C₆H₁₂ à 5°C (Chap. II.4.3.3).

Le même processus d'immobilisation des NP-pA sur **SiO₂@D₁** a été utilisé pour les surfaces mixtes. (Figure 9).

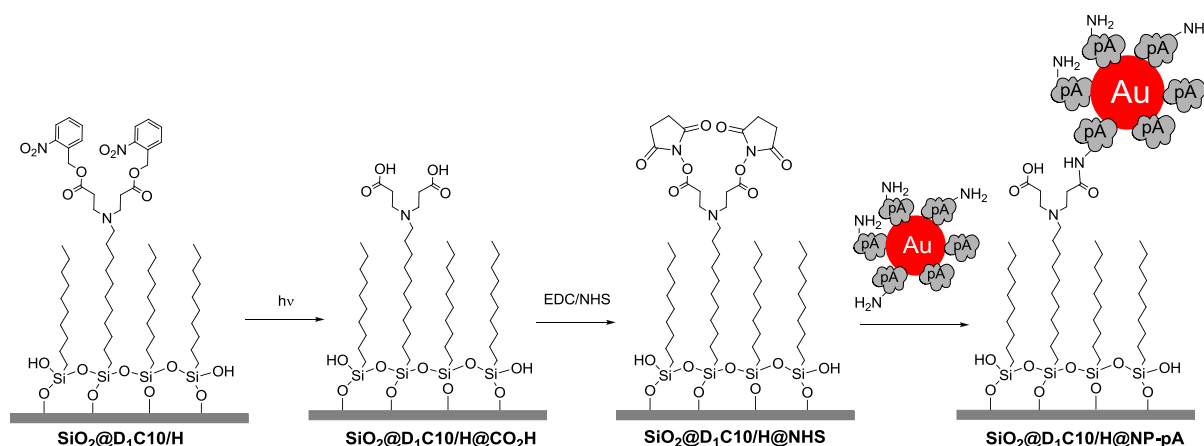


Figure 9. Représentation de l'immobilisation de NP-pA sur la couche mixte **SiO₂@D₁C10/H**.

2.2.1. Photo-déprotection de la fonction acide carboxylique :

La photo-déprotection des surfaces **SiO₂@D₁C10/H** a été effectuée sous UV pendant 30 minutes à travers une lame Pyrex ®. A la fin de la réaction, les surfaces ont été nettoyées aux ultrasons dans le chloroforme et l'éthanol afin d'éliminer le sous produit de la réaction. Les substrats PM-IRRAS ont été ensuite analysés par infrarouge (Figure 10).

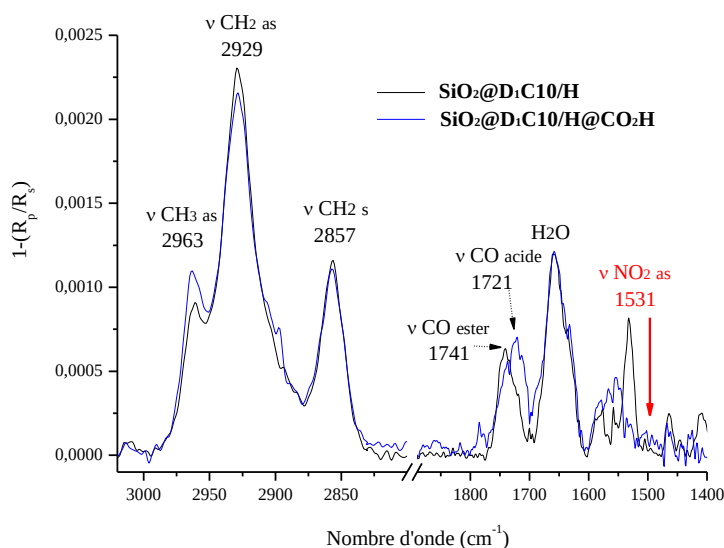


Figure 10. Spectre PM-IRRAS de **SiO₂@D₁C10/H** et **SiO₂@D₁C10/H@CO₂H**.

Sur le spectre infrarouge après irradiation (**SiO₂@D₁C10/H@CO₂H**), nous remarquons que les bandes relatives aux groupements CH₂ (ν_{as} : 2939 cm⁻¹ ; ν_s : 2857 cm⁻¹) et CH₃ (ν_{as} : 2963 cm⁻¹) des composés **D₁** et **C10** n'ont pas été modifiées, ce qui indique que la couche organique a été préservée. Cependant, nous remarquons la disparition de la bande correspondant au groupement NO₂ (ν_{as} : 2939 cm⁻¹) et un décalage de la bande de vibration de la fonction carbonyle de 1741 cm⁻¹ à 1721 cm⁻¹. Ces deux résultats nous confirment l'obtention de la fonction CO₂H à la surface des substrats.

2.2.2. Activation de l'acide carboxylique :

L'activation des fonctions acide a été réalisée en plongeant les substrats déprotégés dans une solution aqueuse contenant de l'EDC et du NHS à pH= 6 (Tampon MES à 0,3M). Les substrats ont été nettoyés au chloroforme et à l'eau puis le substrat PM-IRRAS a été analysé en infrarouge (Figure 11).

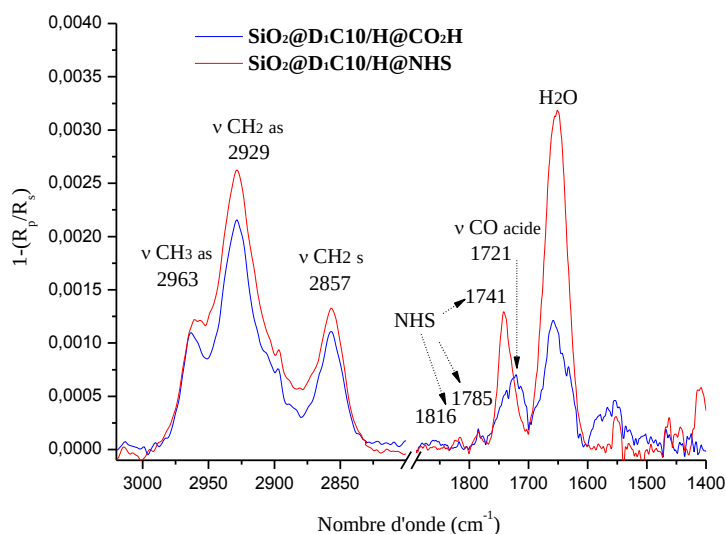


Figure 11. Spectres PM-IRRAS de **SiO₂@D₁C10/H@CO₂H** et **SiO₂@D₁C10/H@NHS**.

Le spectre infrarouge après activation (**SiO₂@D₁C10/H@NHS**) des fonctions acide montre que les bandes de vibration de CH₂ (ν_{as} : 2939 cm⁻¹ ; ν_s : 2857 cm⁻¹) et CH₃ (ν_{as} : 2963 cm⁻¹) ne varient pas. Nous remarquons l'apparition de trois nouvelles bandes à 1816, 1785 et 1741 cm⁻¹ associées au groupement NHS à la surface.

2.2.3. Immobilisation des NP-pA :

L'immobilisation des NP-pA a été réalisée de la même manière que précédemment (§. 2.1.3). Les substrats portant les groupements NHS ont été immergés dans une solution contenant les NP-pA en présence de tampon PBS à pH 8. Après un temps d'activation de deux heures à 37°C, les substrats **SiO₂@D₁C10/H@NP-pA** ont été lavés à l'eau MilliQ puis aux ultrasons dans l'eau (MilliQ) pendant 5 minutes. Les substrats ont été analysés par PM-IRRAS et par AFM.

Les spectres infrarouges de la Figure 12 ne montrent pas une augmentation des bandes relatives aux groupements CH₂ (ν_{as} : 2939 cm⁻¹ ; ν_s : 2857 cm⁻¹) et CH₃ (ν_{as} : 2963 cm⁻¹) après immobilisation des NP-pA. Nous observons l'apparition des bandes d'amide I (1658 cm⁻¹) et amide II (1547 cm⁻¹) correspondant aux acides aminés de protéine A. En revanche, nous remarquons que l'intensité des bandes associées au groupement NHS à 1816, 1785, 1741 cm⁻¹ n'a pas diminué. Ce résultat n'est pas en accord avec ce qui a été observé sur l'immobilisation covalente des NP-pA sur la surface **SiO₂@D₁@NP-pA** (§2.1.3). La présence des bandes du groupe ester activés sur **SiO₂@D₁C10/H@NP-pA** nous conduit à penser à une adsorption non spécifique des protéines A sur la surface par interactions hydrophobes. Ceci pourrait s'expliquer par la nature différente de la surface qui incorpore le composé **C10** plus hydrophobe. Cette hypothèse sera étudiée dans le §2.4 dans le cas de l'immobilisation des NP-pA sur la surface **SiO₂@C10**.

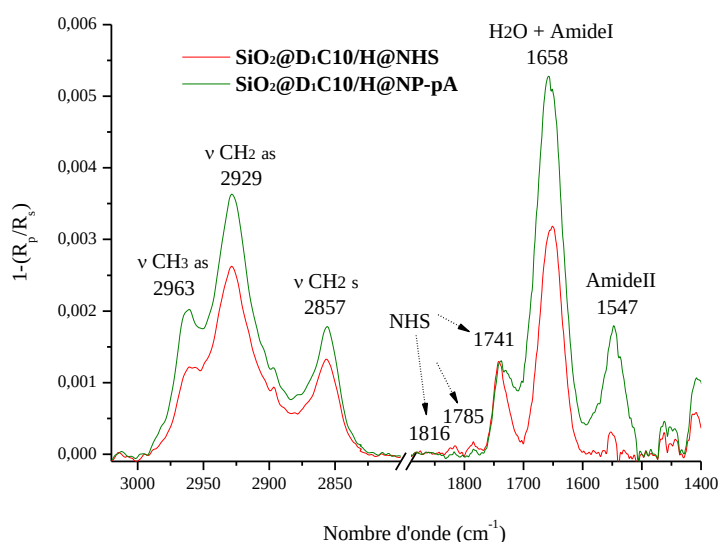


Figure 12. Spectres PM-IRRAS de **SiO₂@D₁C10/H@NHS** et **SiO₂@D₁C10/H@NP-pA**.

Les substrats de wafer de silicium greffés **SiO₂@D₁C10/H@NP-pA** ont été analysés en AFM (Figure 13). Nous remarquons que la densité de NP-pA sur la surface

SiO₂@D₁C10/H@NP-pA (41 NP-pA/μm²) est beaucoup plus élevée en comparaison avec les surfaces **SiO₂@D₁@NP-pA** (7 NP-pA/μm²). Nous avons réalisé un profil sur l'image de hauteur (Figure 13 a) et nous remarquons que la hauteur des nanoparticules est de 20 à 24 nm. L'image de phase montre que les billes et la surface ont des natures chimiques différentes. Le profil de phase permet de mesurer la largeur des billes. Elle est comprise entre 20 et 25 nm ce qui est compatible avec la taille des nanoparticules d'or.

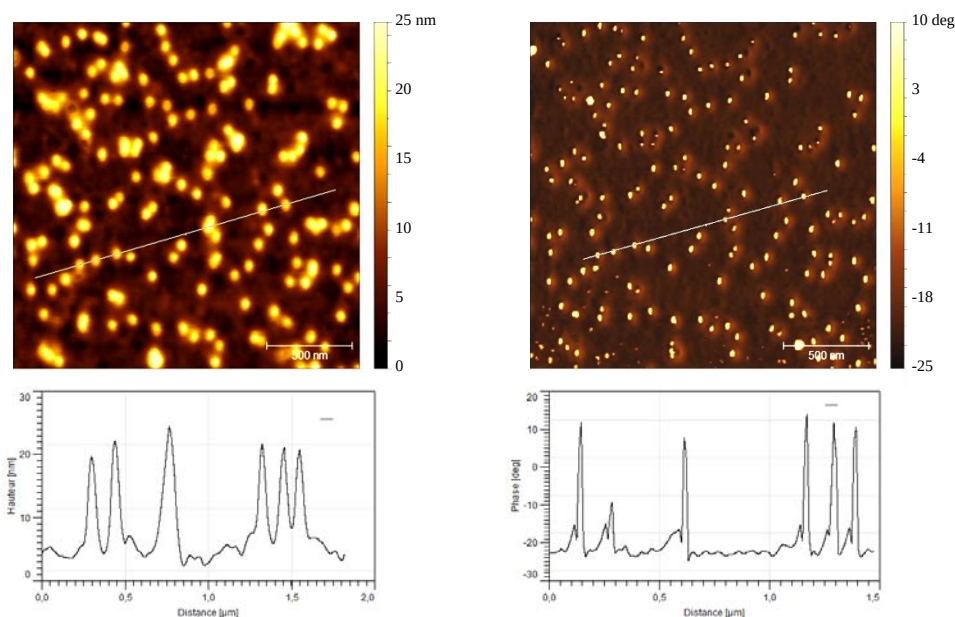


Figure 13. (a) Image de hauteur (2 μm x 2 μm) et profil de **SiO₂@D₁C10/H@NP-pA**. (b) Image de phase (2 μm x 2 μm) et profil de **SiO₂@D₁C10/H@NP-pA**.

En conclusion dans cette partie, nous avons étudié l'immobilisation des NP-pA sur la surface mixte **SiO₂@D₁C10/H**. Nous avons analysé les différentes étapes du processus par infrarouge et nous avons montré lors de la dernière étape que les fonctions ester activés terminales ne sont pas consommées ce qui suggère une immobilisation non covalente des NP-pA. Ce résultat montre donc une adsorption non spécifique de la protéine A sur cette surface mixte. Nous avons également observé une densité plus élevée de NP-pA sur la surface ce qui va dans le sens d'une immobilisation non spécifique des NP-pA majoritaire sur la surface.

2.3. Immobilisation des NP-pA sur la surface mixte **SiO₂@D₁C10/I** :

L'immobilisation des NP-pA sur la surface greffée par le système mixte présentant des îlots sur la surface **SiO₂@D₁C10/I** a été réalisée de la même manière que précédemment (Figure 14). D'abord, les fonctions acide sont déprotégées puis activées pour immobiliser les NP-pA par les résidus lysines. Dans cette étude, nous nous attendons à observer une

répartition particulière des NP-pA, soit sur les îlots, soit entre les îlots observés sur la surface (Chap. II.4.5.2.).

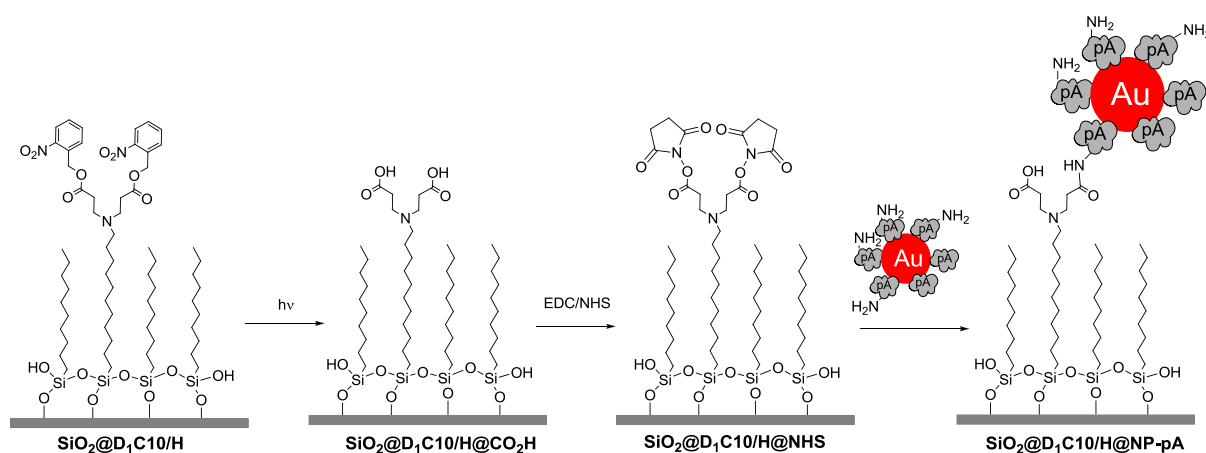


Figure 14. Représentation de l'immobilisation de NP-pA sur la couche mixte $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C}_{10}/\text{I}$.

2.3.1. Photo-déprotection de l'acide carboxylique :

La photo-déprotection a été réalisée de la même manière que précédemment. Après 30 minutes d'irradiation, une analyse infrarouge a été réalisée sur les supports $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C}_{10}/\text{I}@\text{CO}_2\text{H}$ (Figure 15) :

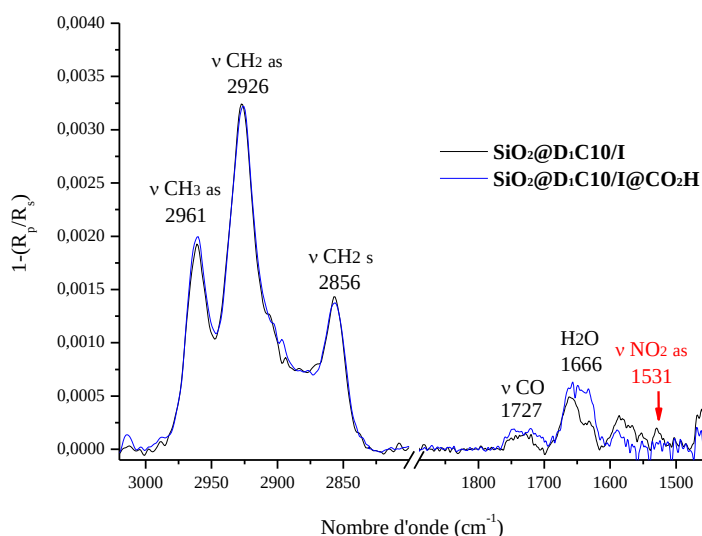


Figure 15. Spectre PM-RRAS avant ($\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C}_{10}/\text{I}$) et après traitement UV ($\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C}_{10}/\text{I}@\text{CO}_2\text{H}$)

Le spectre infrarouge de la Figure 15 indique que les bandes relatives aux groupements CH_2 (ν_{as} : 2926 cm^{-1} ; ν_{s} : 2856 cm^{-1}) et CH_3 (ν_{as} : 2961 cm^{-1}) sont relativement intenses. Ces bandes n'ont pas été modifiées après irradiation. Pour $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C}_{10}/\text{I}$, nous remarquons que les bandes de vibration du groupement carbonyle et les bandes NO_2 ont une intensité très faible. Cette faible intensité est due aux conditions expérimentales de greffage

décrites dans le chapitre précédent (Chap. II.4.5.2.). Néanmoins, après irradiation, nous pouvons confirmer la présence du groupement carbonyle (1727 cm⁻¹) du COOH et la disparition de la bande associée à la fonction NO₂.

2.3.2. Activation des fonctions acide carboxyliques :

L'activation des fonctions acide de la surface a été réalisée grâce au couple EDC/NHS dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment. À la suite de l'activation, les substrats **SiO₂@D₁C10/I@NHS** ont été nettoyés au chloroforme et à l'eau. Le substrat PM-IRRAS a été analysé en infrarouge (Figure 16).

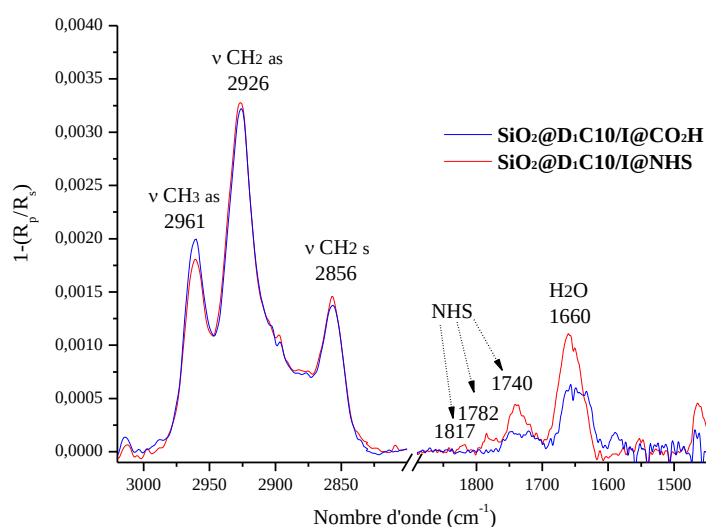


Figure 16. Spectres PM-IRRAS de **SiO₂@D₁C10/I@CO₂H** et **SiO₂@D₁C10/I@NHS**.

Dans la Figure 16, nous observons l'apparition de trois nouvelles bandes à 1740, 1782, 1817 cm⁻¹. Malgré leur faible intensité, ces trois bandes confirment la transformation des fonctions acide en ester activés (NHS). Par ailleurs, nous remarquons que l'intensité des bandes des CH₂ (v_{as} : 2926 cm⁻¹ ; v_s : 2856 cm⁻¹) et des CH₃ (v_{as} : 2961 cm⁻¹) n'a pas changée, indiquant la conservation de la couche organique. Ces substrats (**SiO₂@D₁C10/I@NHS**) vont donc être directement utilisés pour l'immobilisation de NP-pA.

2.3.3. Immobilisation des NP-pA :

L'immobilisation des NP-pA a été réalisée de la même manière que précédemment (§. 2.1.3). Les substrats activés **SiO₂@D₁C10/I@NHS** ont été plongés dans une solution contenant les NP-pA. Ensuite, les substrats ont été lavés à l'eau ultra-pure puis aux ultrasons. Les substrats (**SiO₂@D₁C10/I@NP-pA**) ont été analysés par PM-IRRAS et par AFM.

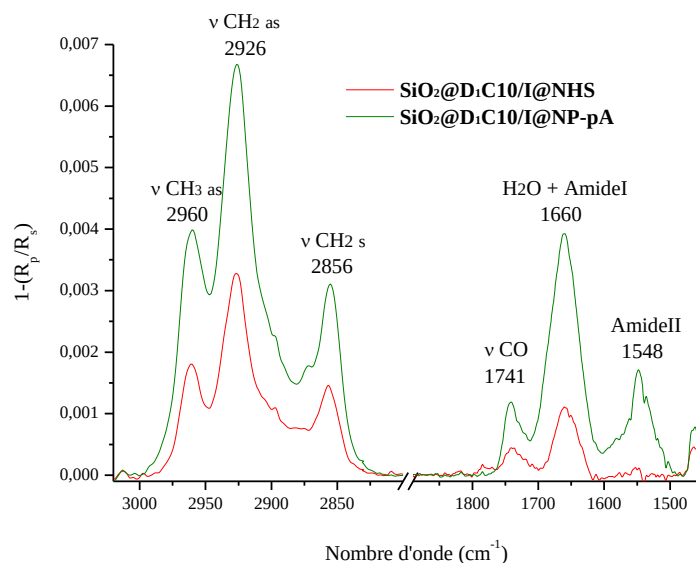


Figure 17. Spectres PM-IRRAS de **SiO₂@D₁C₁₀/I@NHS** et **SiO₂@D₁C₁₀/I@NP-pA**.

Le spectre après immobilisation des NP-pA (**SiO₂@D₁C₁₀/I@NP-pA**) (Figure 17) montre une importante augmentation de l'intensité des bandes des CH₂ (ν_{as} : 2926 cm⁻¹ ; ν_s : 2856 cm⁻¹) et des CH₃ (ν_{as} : 2961 cm⁻¹). Nous remarquons, par ailleurs, une apparition des bandes amide I à 1660 cm⁻¹ et amide II à 1548 cm⁻¹, ce qui indique la présence des NP-pA sur la surface du support. Cependant, nous ne remarquons pas de diminution de la bande à 1741 cm⁻¹ associée au groupement NHS, ce qui est en accord avec une physisorption des NP-pA sur la surface. Une analyse AFM des wafers de silicium a ensuite été réalisée (Figure 17).

Dans la Figure 18, nous avons présenté les images AFM de hauteurs du système mixte **SiO₂@D₁C₁₀/I** (a), et de **SiO₂@D₁C₁₀/I@NP-pA** (b). Sur le profil de l'image (b), des hauteurs correspondantes à 20 nm ont été observées ce qui est en accord avec la taille des NP-pA. Les images de phase de **SiO₂@D₁C₁₀/I@NP-pA** montrent la présence de deux types de matériaux aux propriétés mécaniques et élastiques différentes, ce qui confirme la présence de NP-pA sur la surface **SiO₂@D₁C₁₀/I@NP-pA**. Nous observons aussi une grande quantité de NP-pA sur les images de hauteur et de phase (Figure 18 b). Cependant, la répartition des NP-pA sur la surface est relativement aléatoire et ne semble pas être positionnée exclusivement sur ou entre les îlots de la surface. Ce résultat ne permet donc pas d'attribuer une nature particulière, (composé **D₁**/composé **C₁₀**) à ces îlots.

L'introduction de chaînes alkyle hydrophobes (composé **C₁₀**) sur la surface semble donc être à l'origine de l'adsorption physique des NP-pA. Afin de confirmer cette hypothèse, nous avons étudié l'immobilisation des NP-pA sur les surfaces **SiO₂@C₁₀**.

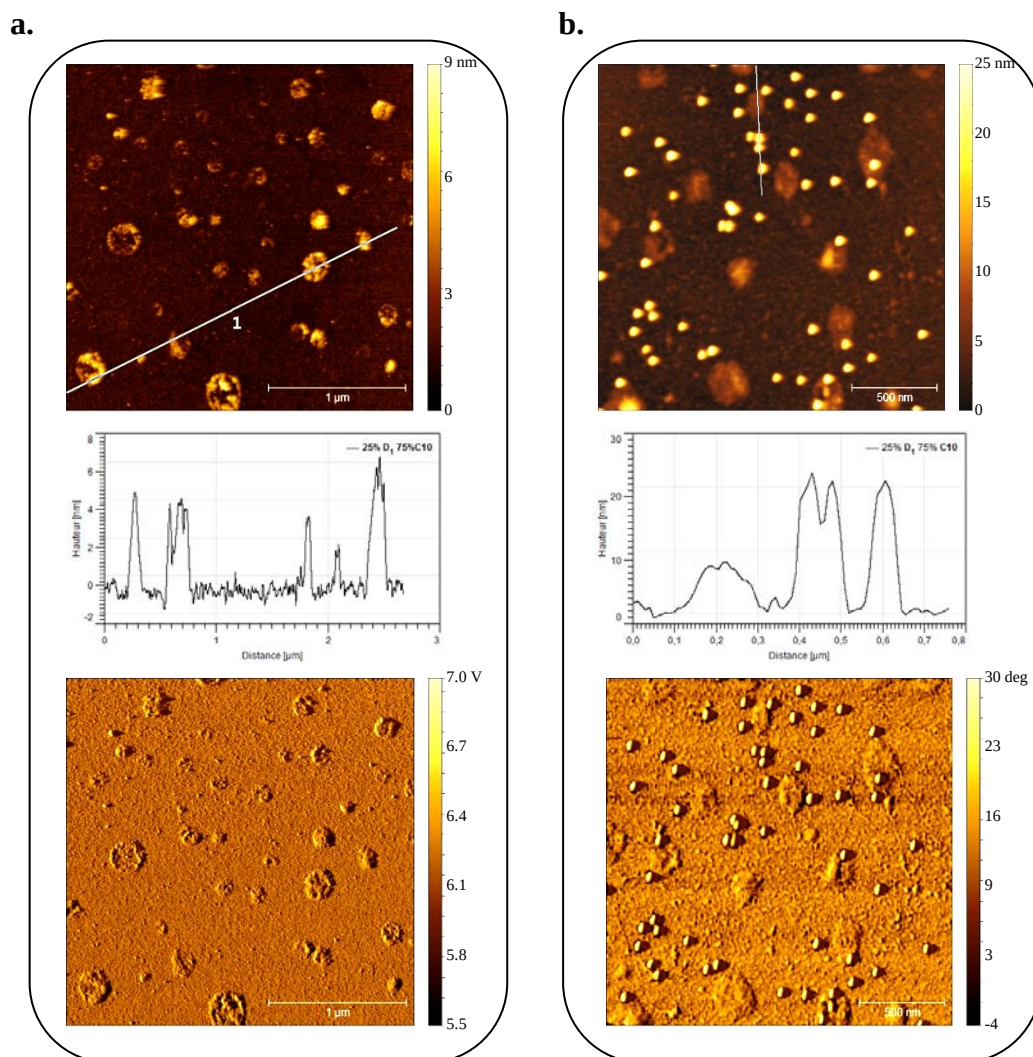


Figure 18. (a) Images AFM de hauteur, de phase (2 μm x 2 μm) et le profil de hauteur SiO₂@D₁C₁₀/I (b) Images AFM de hauteur, de phase (2 μm x 2 μm) et le profil de hauteur SiO₂@D₁C₁₀/I@NP-pA.

2.4. Etude d'immobilisation des NP-pA sur la surface SiO₂@C₁₀ :

L'adsorption de protéines sur des surfaces d'or modifiées par des SAMs a été largement étudiée dans la littérature.¹⁴ Plusieurs groupements terminaux ont été testés. Il a été observé que des chaînes alkyles avec un groupement méthyle terminal présentaient une grande capacité à adsorber les protéines.

Pour notre étude (Figure 19) nous avons immergé les substrats SiO₂@C₁₀ dans une solution contenant des NP-pA. Le temps d'incubation est de deux heures à 37°C. Par la suite, ces substrats SiO₂@C₁₀@NP-pA ont été abondamment lavés à l'eau ultra-pure, puis immergées dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Ces substrats ont été ensuite analysés par infrarouge puis par AFM.

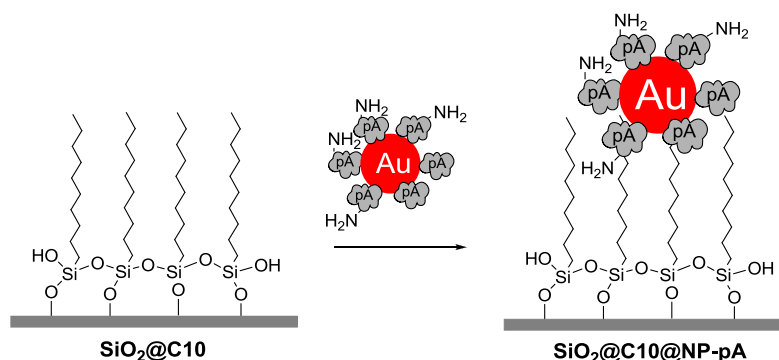


Figure 19. Représentation de l'immobilisation non-covalente des NP-pA sur $\text{SiO}_2\text{@C10}$.

Les spectres infrarouges (PM-IRRAS) avant et après l'exposition des substrats aux NP-pA sont donnés dans la Figure 20. Nous constatons que les bandes des vibrations des CH_2 (ν_{as} : 2926 cm^{-1} ; ν_{s} : 2856 cm^{-1}) et des CH_3 (ν_{as} : 2961 cm^{-1}) n'ont pas été modifiées. Cependant, nous constatons l'apparition de deux bandes très intenses d'amide I à 1661 cm^{-1} et d'amide II à 1544 cm^{-1} . Ce résultat indique la présence des NP-pA à la surface, ce qui démontre le phénomène d'adsorption physique sur $\text{SiO}_2\text{@C10}$.

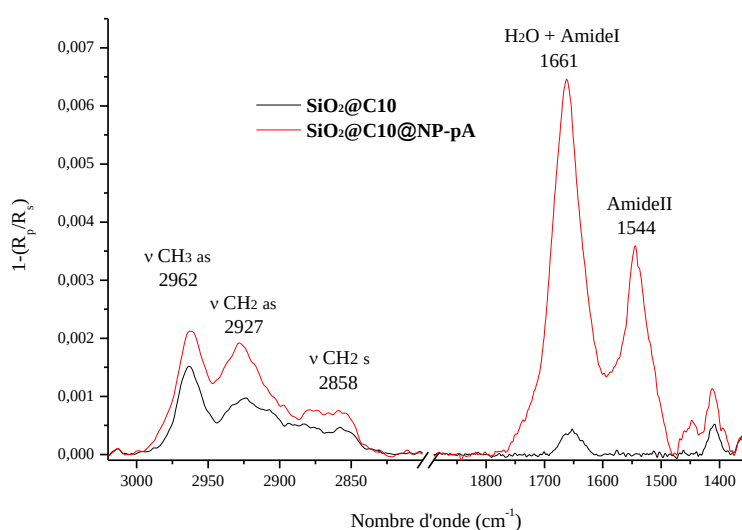


Figure 20. Spectres PM-IRRAS de $\text{SiO}_2\text{@C10}$ et de $\text{SiO}_2\text{@C10@NP-pA}$.

Dans la Figure 21, sont représentées des images AFM de hauteur et des profils de la surface $\text{SiO}_2\text{@C10}$ avant et après l'exposition aux NP-pA. Nous observons la présence de nanoparticules d'une taille de 20 nm ce qui correspond à la taille des NP-pA. Ce résultat confirme les observations en PM-IRRAS et conforte l'hypothèse de l'adsorption physique des protéines sur les surfaces hydrophobes.

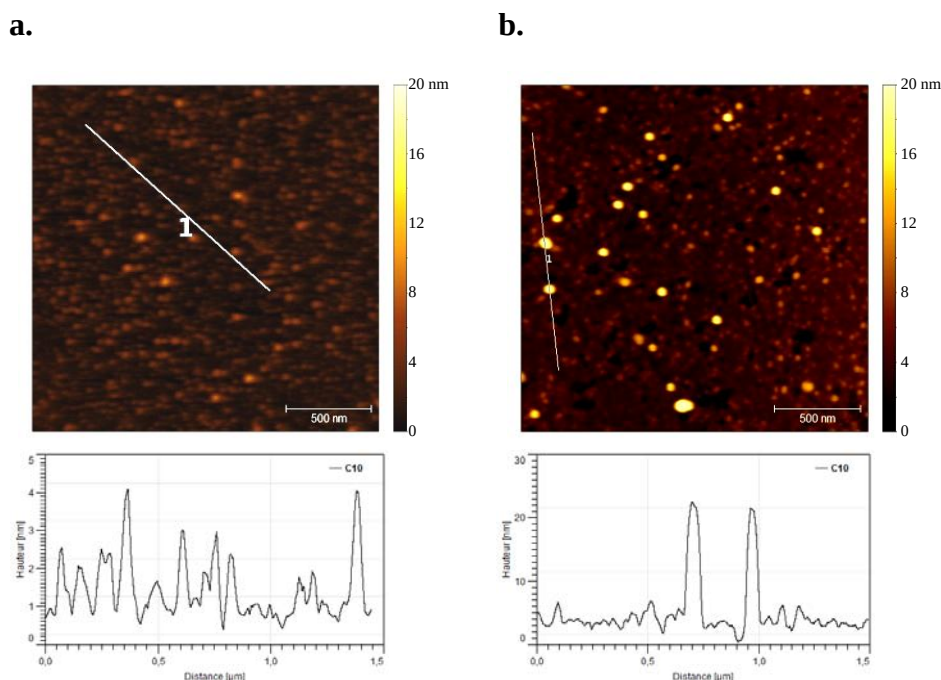


Figure 21. (a) Image de hauteur (2 μm x 2 μm) et profil de SiO₂@C10 (b) Image de hauteur (2 μm x 2 μm) et profil de SiO₂@C10@NP-pA.

En conclusion, nous avons étudié dans cette partie, l'immobilisation de NP-pA sur les deux surfaces SiO₂@D₁, SiO₂@D₁C10/H, SiO₂@D₁C10/I et SiO₂@C10. Les analyses infrarouge et AFM, nous ont renseigné sur la nature de l'immobilisation : une immobilisation covalente sur les surfaces greffées uniquement avec le composé D₁ et une adsorption physique sur les surfaces greffées par le système mixte et par le composé C10. Nous avons montré que l'utilisation pour une couche mixte d'un composant purement hydrocarboné est défavorable pour une immobilisation covalente contrôlée des biomolécules sur une surface.

Cependant, il est intéressant d'essayer d'étudier la réactivité des fonctions COOH de couches mixtes comparées aux surfaces 100% D₁. Pour cela, il faut s'affranchir de l'adhésion non-spécifique. Nous avons choisi pour cette étude des nanoparticules d'or enrobées d'un polymère de type polyéthylène glycol porteur de fonctions NH₂ (NP-PEG-NH₂[†]). La présence du fragment polyéthylène glycol sur la surface des particules permettra d'éliminer le phénomène d'adsorption physique.

[†] NP-PEG-NH₂ : nanoparticules d'or recouvertes d'un polyéthylène glycol terminé par des fonctions NH₂, la taille de ces nanoparticules est de 20 à 25 nm (mesurés par HR-TEM).

3. Immobilisation de NP-PEG-NH₂ :

Le fragment polyéthylène glycol est très flexible et polaire, il est souvent utilisé pour prévenir de l'adsorption non spécifique des protéines sur une surface.¹⁵ Dans notre cas, il est utilisé pour les mêmes propriétés.

3.1. Etude d'adsorption physique des NP-PEG-NH₂ sur des surfaces SiO₂@C10 :

Tout d'abord, nous avons voulu vérifier l'absence d'adsorption de ces nanoparticules sur les surfaces SiO₂@C10 (Figure 22). Pour ce faire, nous avons immergé ces surfaces dans une solution contenant des NP-PEG-NH₂ pendant 20 heures à 37°C, puis nous avons analysé ces surfaces (SiO₂@C10@NP-PEG-NH₂) par PM-IRRAS et par AFM.

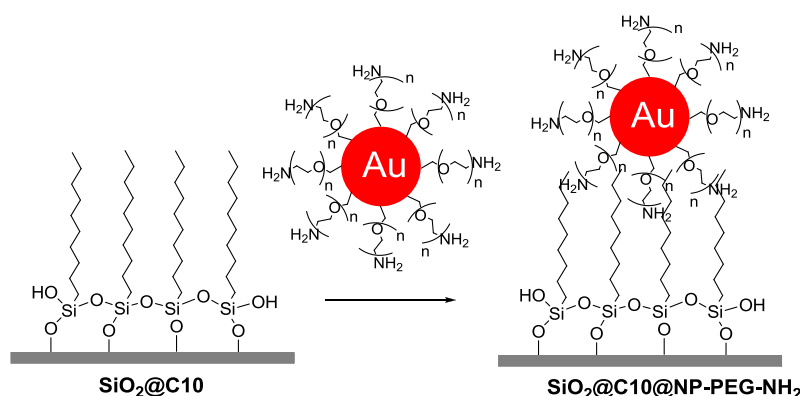


Figure 22. Représentation de l'immobilisation de NP-PEG-NH₂ par adsorption sur SiO₂@C10.

Dans la Figure 23, nous observons que le spectre n'a pas changé après le dépôt de NP-PEG-NH₂. En effet, les bandes relatives au groupement CH₂ (ν_{as} : 2927 cm⁻¹ ; ν_s : 2855 cm⁻¹) et CH₃ (ν_{as} : 2962 cm⁻¹) ont des intensités similaires. Cependant, en raison de l'absence de bandes caractéristiques des groupements PEG-NH₂, il est nécessaire d'examiner les images AFM avant de conclure sur une adsorption ou non des nanoparticules sur cette surface.

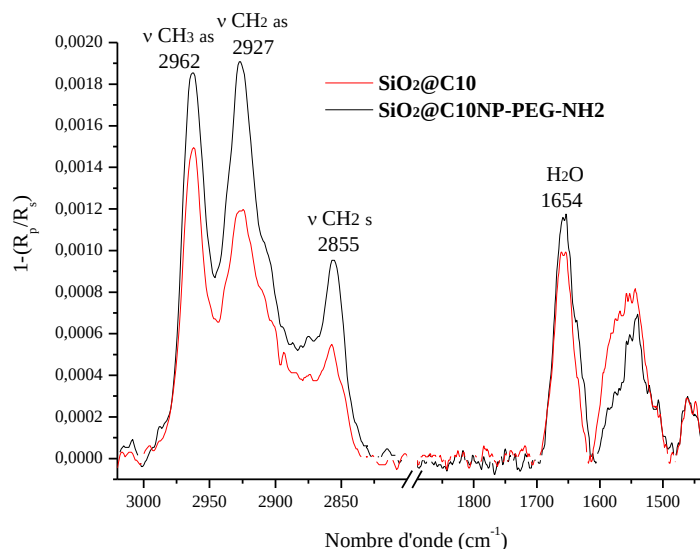


Figure 23. Spectres PM-IRRAS des surfaces $\text{SiO}_2@\text{C10}$ et de $\text{SiO}_2@\text{C10NP-PEG-NH}_2$.

Les images AFM et les profils de hauteur de la Figure 24, montre l'absence de NP-PEG-NH₂ ce qui démontre l'absence du phénomène d'adsorption physique des NP-PEG-NH₂.

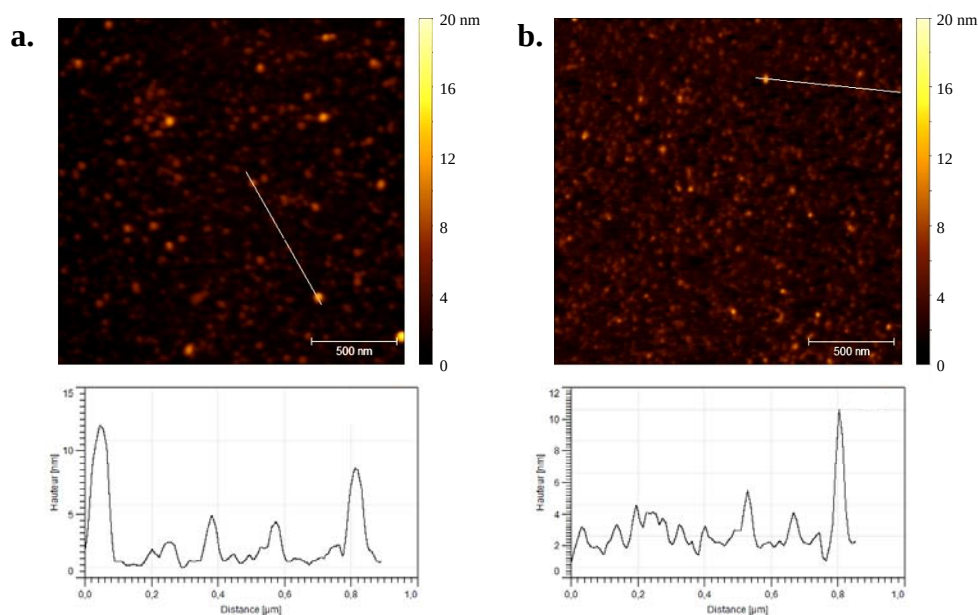


Figure 24. (a) Image de hauteur (2 μm x 2 μm) et profil de $\text{SiO}_2@\text{C10}$ (b) Image de hauteur (2 μm x 2 μm) et profil de $\text{SiO}_2@\text{C10NP-PEG-NH}_2$.

Désormais, nous pouvons étudier la réactivité des surfaces greffées par des groupements acides avec ces nanoparticules puisque nous savons que l'utilisation de celles-ci permet de nous affranchir du phénomène d'adsorption physique.

3.2. Immobilisation des NP-PEG-NH₂ sur les surfaces greffées par les composés D₁ et D₅ :

L'immobilisation des NP-PEG-NH₂ sur les surfaces greffées par le composé D₁ (dendron de première génération) et D₅ (dendron de deuxième génération) a été réalisée en suivant la même stratégie que précédemment (§2.) (Figure 25). La première étape est la déprotection des fonctions acides par irradiation pendant 30 minutes, la deuxième étape est l'activation des fonctions acides après un traitement EDC/NHS. La troisième étape est le dépôt des NP-PEG-NH₂ pendant 20 h. Les différentes étapes ont été contrôlées par PM-IRRAS selon les procédures déjà décrites (§2). Dans cette étude, nous allons présenter uniquement l'analyse AFM de la dernière étape. En effet, du fait de l'absence de bande caractéristique des NP-PEG-NH₂, l'AFM est la seule analyse pertinente qui permet de trancher sur la présence ou l'absence des nanoparticules en surface.

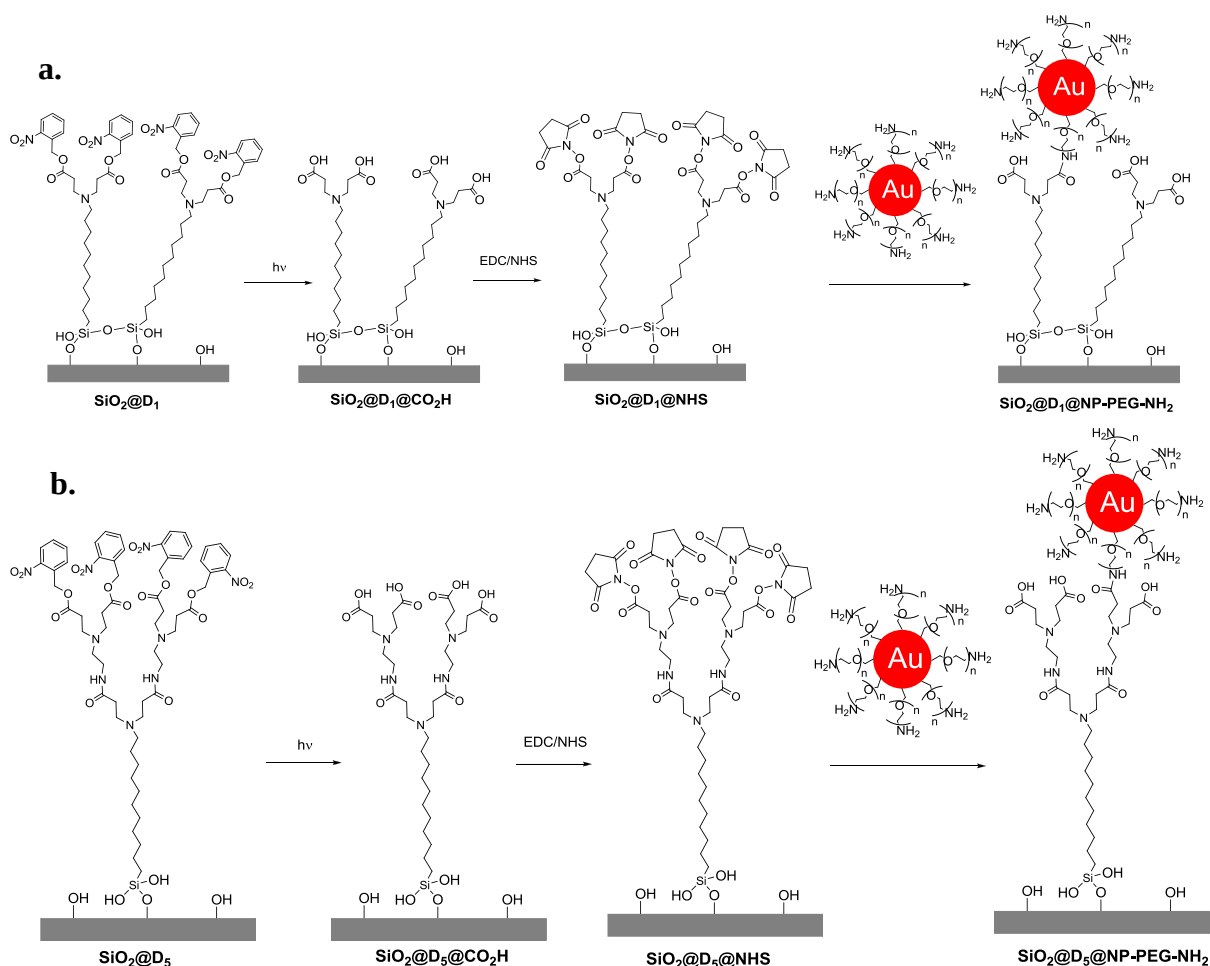


Figure 25. Représentation de l'immobilisation des NP-PEG-NH₂ sur SiO₂@D₁ (a) et SiO₂@D₅ (b).

Dans la Figure 26, sont représentées les images de hauteurs : (a) de la surface SiO₂@D₁@NP-PEG-NH₂ et (b) de la surface SiO₂@D₅@NP-PEG-NH₂. Nous observons la

présence de nanoparticules de hauteurs comprises entre 25 et 30 nm ce qui correspond à la taille des NP-PEG-NH₂. Ce résultat montre bien que ces surfaces sont fonctionnelles. Qualitativement, il semblerait y avoir légèrement plus de nanoparticules dans le cas des surfaces modifiées par le composé **D**₅ (Figure 26 b), ce qui ne nous permet pas de conclure sur un probable effet dendritique. Cependant, le dénombrement exact reste difficile du fait de l'aggrégation de certaines nanoparticules entre elles

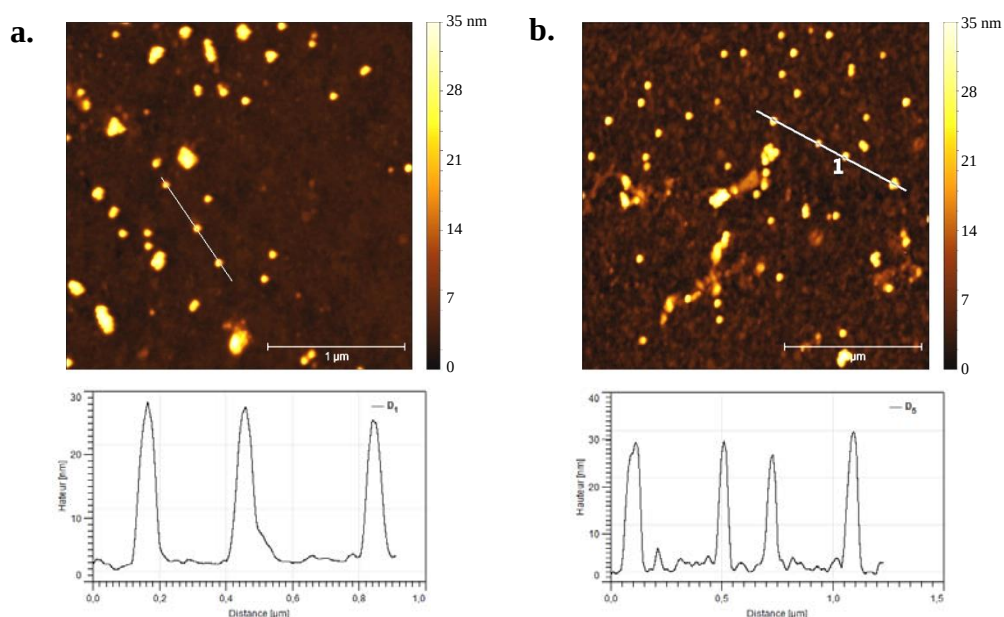


Figure 26. (a) Image de hauteur (2,5 μm x 2,5 μm) et profil de **SiO₂@D₁@NP-PEG-NH₂**. (b) Image de hauteur (2,5 μm x 2,5 μm) et profil **SiO₂@D₅@NP-PEG-NH₂**.

Les images de phase de la Figure 27, révèlent la présence de deux phases différentes et donc de deux types de matériaux aux propriétés mécaniques et élastiques différentes. L'analyse de ces images permet de mettre en évidence la présence de NP-PEG-NH₂ sur les deux surfaces.

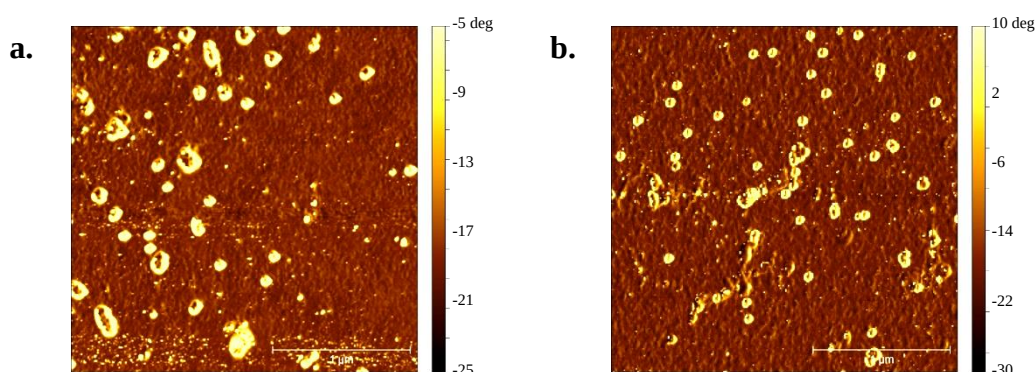


Figure 27. (a) Image de phase (2,5 μm x 2,5 μm) de **SiO₂@D₁@NP-PEG-NH₂**. (b) Image de phase (2,5 μm x 2,5 μm) de **SiO₂@D₅@NP-PEG-NH₂**.

3.3. Immobilisation des NP-PEG-NH₂ sur des surfaces greffées avec le système mixte :

Les NP-PEG-NH₂ ont été immobilisées sur les surfaces mixtes $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/H}$ et $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/I}$ (Figure 28). Pour rappel, lors du greffage du système mixte, nous avons obtenu deux types de surface : une homogène de faible rugosité ($\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/H}$), et une présentant des îlots ($\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/I}$). Dans le §2, nous avons montré que l'immobilisation des NP-pA sur ces surfaces conduisait à une adsorption physique de ces dernières. Nous savons maintenant qu'il est possible de s'affranchir de cette adsorption physique par l'utilisation de NP-PEG-NH₂. Grâce à leur utilisation, nous espérons obtenir des informations sur la composition des îlots de la surface $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/I}$.

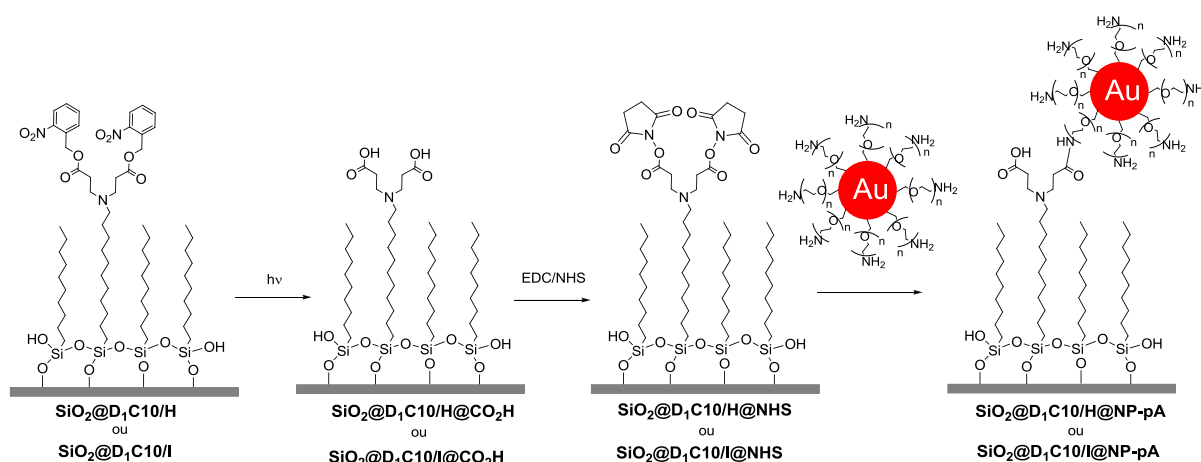


Figure 28. Représentation de l'immobilisation de NP-PEG-NH₂ sur $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/H}$ et $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/I}$.

L'immobilisation des NP-PEG-NH₂ sur les surfaces $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/H}$ et $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/I}$ a été réalisée en suivant le même protocole que celui que nous avons mis en place pour l'immobilisation des NP-pA. Nous avons déprotégé les fonctions acide par irradiation UV de 30 minutes puis nous avons activé les fonctions acide à l'aide de la chimie des carbodiimides pour conduire à des esters activés. Enfin, nous avons réalisé le dépôt des NP-PEG-NH₂ avec un temps d'incubation de 20 heures.

Dans la figure 29 (a) sont présentées les images AFM de hauteur et de phase de la surface $\text{SiO}_2@\text{D}_1\text{C10/H@NP-PEG-NH}_2$ (surface homogène). Nous observons environ $12 \text{ NP-PEG-NH}_2/\mu\text{m}^2$ avec des hauteurs de 25-30 nm sur la surface. Il semble y avoir plus de NP-PEG-NH₂ sur la surface que dans le cas de la surface $\text{SiO}_2@\text{D}_1@\text{NP-PEG-NH}_2$ ou $\text{SiO}_2@\text{D}_5@\text{NP-PEG-NH}_2$. Ce résultat pourrait s'expliquer par une meilleure accessibilité

des fonctions esters activés dans le cas de la couche mixte car sa structure permet de réduire les contraintes stériques au niveau des fonctions terminales.²

Dans la Figure 29 (b) sont présentées les images AFM de hauteur et de phase de SiO₂@D₁C10/I@NP-PEG-NH₂ (surface avec des îlots). Nous mesurons grâce au profil de hauteur la présence d'objets de 30 nm de hauteur. Ce profil caractéristique que nous observons nous laisse penser à un greffage des NP-PEG-NH₂ (20-30 nm) sur les îlots de taille (5-6 nm) initialement présents sur la surface. Une analyse des images de phase et de hauteur (Figure 29) permet de mettre en évidence la présence des nanoparticules aux niveaux des îlots (cercles rouges). Ce résultat conforte l'hypothèse que les îlots sont composés majoritairement du composé D₁.

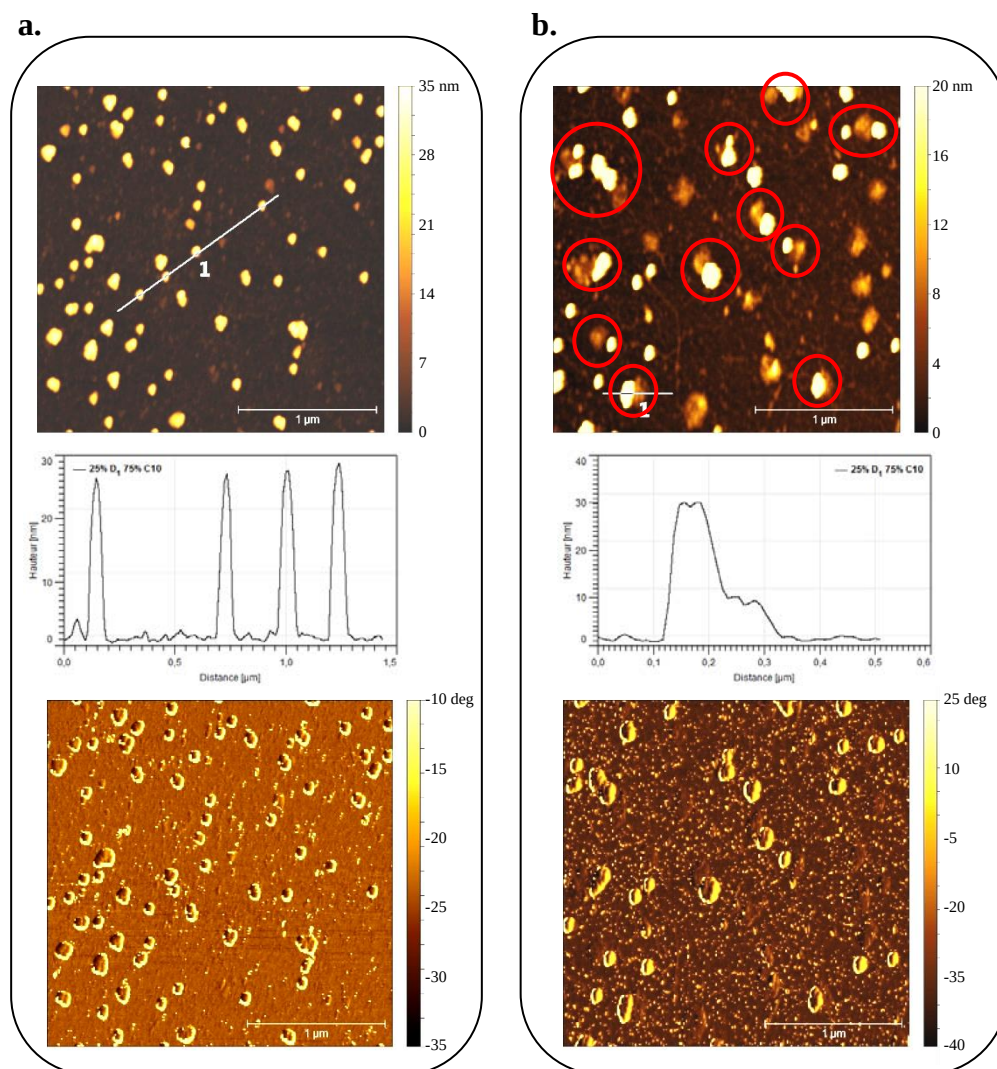


Figure 29. (a) Image de hauteur, de phase (2,5 μm x 2,5 μm) et profil de hauteur de SiO₂@D₁C10/H@NP-PEG-NH₂. (b) Image de hauteur, de phase (2,5 μm x 2,5 μm) et profil de hauteur SiO₂@D₁C10/I@NP-PEG-NH₂.

4. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'immobilisation de biomolécules. Pour cela nous avons pris la protéine A comme modèle. L'utilisation de nanoparticules d'or de 20 nm de diamètre nous a permis de déterminer la distribution des protéines sur les surfaces modifiées par les dendrons. Cette immobilisation de nanoparticules a été réalisée sur différentes surfaces : des surfaces fonctionnalisées par le composé **D₁** (**SiO₂@D₁**), deux surfaces fonctionnalisées par le mélange 25% de **D₁** et 75% de **C10** (**SiO₂@D₁C10/H** et **SiO₂@D₁C10/I**) et une surface fonctionnalisée par le composé **C10** (**SiO₂@C10**). Nous avons observé une immobilisation covalente de NP-pA sur la surface **SiO₂@D₁**, et une immobilisation majoritairement non covalente (adsorption physique) sur les surfaces **SiO₂@D₁C10** et sur les surfaces **SiO₂@C10**. Cette adsorption physique résulte d'interactions hydrophobes non spécifiques dues à la présence du composé **C10** sur les surfaces.

Afin de nous affranchir des ces interactions hydrophobes, et dans le but de démontrer la réactivité des fonctions terminales de nos surfaces greffées, nous avons utilisé des nanoparticules NP-PEG-NH₂, ce qui a permis d'étudier uniquement l'immobilisation covalente des nanoparticules. Le résultat de ces immobilisations a montré que toutes les surfaces étaient fonctionnelles. De plus, l'immobilisation des NP-PEG-NH₂ sur **SiO₂@D₁C10/H** (homogène) a montré un taux de fonctionnalisation plus élevé que la même immobilisation sur les couches **SiO₂@D₁** ou **SiO₂@D₅**. Ceci est probablement dû à la meilleure accessibilité des fonctions acide à la surface. Pour les couches mixtes présentant des îlots (**SiO₂@D₁C10/I**), nous avons montré une immobilisation des NP-PEG-NH₂ principalement au niveau des îlots, ce qui indiquerait que les îlots sont constitués principalement du dendron **D₁**, et le reste de la surface, du composé **C10**.

Bibliographie :

- [1] (a) L. S. Wong, F. Khan, J. Micklefield, *Chem. Rev.*, **2009**, 109, 4025. (b) M. Frasconi, F. Mazzei, T. Ferri, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398, 1545. (c) D. Samanta, A. Sarkar, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, 40, 2567. (d) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules*, **2007**, 8, 1775.
- [2] (a) E. Briand, M. Salmain, C. Compère, C-M. Pradier, *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22, 2884. (b) E. Briand, M. Salmain, J-M. Herry, H. Perrot, C. Compère, C-M. Pradier, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 22, 440. (c) E. Briand, C. Gu, S. Boujday, M. Salmain, J-M. Herry, C-M. Pradier, *Surf. Sci.*, **2007**, 601, 3850. (d) E. Briand, M. Salmain, C. Compère, C-M. Pradier, *Coll. Surf. Sci. B : Biointerfaces*, **2006**, 53, 215. (e) N. Patel, M. C. Davies, M. Hartshorne, R. J. Heaton, C. J. Roberts, S. J. B. Tendler, P. M. Williams, *Langmuir*, **1997**, 13, 6485, (f) W. Lee, D-B. Lee, B-K. Oh, W. H. Lee, J-W Choi, *Enz. Microbiol. Technol.*, **2004**, 35, 678.
- [3] (a) B. Lu, M. R. Smyth, R. O’Kennedy, *Analyst*, **1996**, 121, 29R. (b) J. J. Turkova, *J. Chromatogr. B*, **1999**, 722, 11. (c) V. Srivatsa, W. K. Anderson, L. G. Bachas, *Microchim. Acta*, **1998**, 128, 127.
- [4] H. Hjelm, J. Sjodahl, J. Sjöquist, *Eur. J. Biochem.*, **1975**, 57, 395.
- [5] T. Moks, L. Abrahmsen, B. Nilsson, U. Hellman, J. Sjöquist, M. Uhlén, *Eur. J. Biochem.*, **1986**, 156, 637.
- [6] L. Yang, M. E. Biswas, P. Chen, *Biophys. J.*, **2003**, 84, 509.
- [7] A. Patchornik, B. Amit, R. B. Woodward *J. Am. Chem. Soc.*, **1970**, 92, 6333-6335.
- [8] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **2002**, 2, 125.
- [9] K. Yamaguchi, H. Nakayama, T. Futami, T. Shimizu, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, **2008**, 21, 519.
- [10] P. F. Driscoll, E. Milkani, C. R. Lambert, W. G. McGimpsey, *Langmuir*, **2010**, 26, 3731.
- [11] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron*, 2005, 61, 10827.
- [12] B. L. Frey, R. M. Corn *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 3187-3193.
- [13] A. Moraillon, A. C. Gouget-Laemmel, F. Ozanam, J.-N. Chazalviel *J. Phys. Chem. C*, **2008**, 112, 7158 .
- [14] (a) K. P. Fears, R. A. Latour, *Langmuir*, 2009, 25, 13926. (b) E. Ostuni, R. G. Chapman, R. Erik Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **2001**, 17, 5605.

- [15] (a) J. M. Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry : biotechnical and biomedical applications*, **1992**, Plenum Press New York. (b) S. R. Benhabbour, H. Sheardown, A. Adronov, *Macromolecules* **2008**, *41*, 4817. (c) S. R. Benhabbour, H. Sheardown, A. Adronov, *Macromolecules* **2008**, *41*, 2567.

Chapitre IV. Fonctionnalisation de nanoparticules magnétiques par des agents de couplage dendritiques

1. Introduction :

Les nanoparticules magnétiques (MNPs) sont d'un grand intérêt car elles présentent un large éventail d'applications comme la biotechnologie, la catalyse, le stockage d'information, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et l'environnement.¹ Depuis quelques décennies, l'amélioration et le développement de nouvelles stratégies de synthèse des MNPs ont permis un meilleur contrôle de leurs tailles ainsi que de leurs propriétés magnétiques. L'intérêt porté à ces MNPs s'est accru en partie grâce au développement de leur encapsulation par différentes types d'écorces permettant la stabilité des dispersions en milieux aqueux et en milieux organiques de ces matériaux. En effet, pour de nombreuses applications, il est crucial d'élaborer des stratégies de protection pour stabiliser chimiquement les nanoparticules magnétiques nues contre la dégradation (l'oxyde de fer étant le constituant principal des nanoparticules magnétiques, même si les métaux tels que le cobalt et le nickel sont également utilisés).¹ Ces écorces offrent également une surface stable pour la fonctionnalisation des matériaux.

L'une des principales applications des nanoparticules en biotechnologies est la protéomique qui permet la séparation spécifique de biomolécules.² En effet, le protéome peut être défini comme étant l'ensemble des protéines codées par un génome. La protéomique, quant à elle, permet d'étudier la séparation, l'identification, la caractérisation et la quantification des protéines exprimées par une cellule à un moment donné, dans un tissu et un environnement donné, à divers états de développement, dans des contextes physiologiques et pathologiques variés.³ L'application des MNPs dans ce domaine consiste à incuber des MNPs portant un biorécepteur avec une solution contenant une biomolécule cible. Lorsque la biomolécule cible se lie aux MNPs, l'ensemble magnétique est facilement et rapidement séparé de l'échantillon par décantation magnétique (à l'aide d'un simple aimant). Le système peut être utilisé plusieurs fois après relargage de la molécule cible. La séparation magnétique présente plusieurs avantages par rapport aux autres systèmes de séparation tels que la chromatographie ou la centrifugation: elle est généralement très simple à mettre en œuvre, très rapide et elle peut être utilisée dans des mélanges physiologiques complexes.

Ce chapitre est consacré à la fonctionnalisation des MNPs cœur-écorce par des systèmes dendritiques. La mise au point d'un greffage optimal des systèmes dendritiques est très important pour les applications visées (protéomiques). En effet, il est nécessaire de prendre en compte les propriétés d'état de surface des MNPs ainsi que leur état colloïdal lors de la réaction de greffage.

Dans ce chapitre, nous présenterons successivement :

- Les différentes stratégies pour la modification chimique de surface des MNPs reportées dans la littérature.
- Le greffage d'une sonde fluorescente sur les MNPs, cette étude ayant pour objectif d'évaluer l'impact des conditions expérimentales sur le greffage des MNPs.
- Le greffage d'un dendron AB₂ porteur de fonctions acide en périphérie ainsi que l'immobilisation covalente de molécules biologiques.

2. Rappel bibliographique sur la stabilisation de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer :

La fonctionnalisation des particules d'oxyde de fer est une étape cruciale qui permet de stabiliser leur état colloïdal. En effet, comme toute espèce colloïdale de petite taille, elles sont instables thermodynamiquement et soumises aux forces d'attraction de van der Waals et d'interactions hydrophobes. Les particules magnétiques d'oxydes de fer ont tendance à s'agglomérer pour diminuer l'énergie à l'interface en réduisant le rapport surface/volume du fait de leur caractère hydrophobe. Les agglomérats ainsi formés peuvent induire des interactions magnétiques dipôle-dipôle, faisant passer le matériau d'un comportement superparamagnétique (aimantation nulle à champs nul) à un comportement ferromagnétique (aimantation résiduel à champs nul). Une aimantation rémanente peut alors être observée en présence d'agrégats d'autant plus que ces agrégats exercent une force d'attraction magnétique sur les nanoparticules isolées.^{1a, 1b}

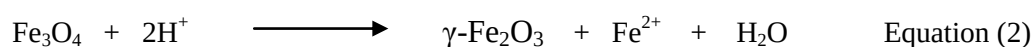
2.1. Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer :

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont classées en deux catégories. SPION (*SuperParamagnetic Iron Oxides Nanoparticles*) si les particules individuelles ont un diamètre supérieur à 20 nm et USPIO (*Ultrasmall SuperParamagnetic Iron Oxides Nanoparticles*) pour des tailles inférieures à 20 nm.⁴ Par ailleurs, il existe plusieurs phases d'oxyde de fer dont la magnétite (Fe₃O₄), la maghémite (γ -Fe₂O₃), l'hématite (α -Fe₂O₃) et la wüstite (FeO).⁵ La magnétite et la maghémite sont les phases le plus souvent utilisées dans le cas des MNPs. Leur synthèse a été largement étudiée, en particulier par la voie chimique qui permet un meilleur contrôle de la taille des nanoparticules à l'échelle nanométrique.⁶ La méthode la plus souvent utilisée est la synthèse par co-précipitation, bien qu'il en existe d'autres (synthèse par émulsion, synthèse hydrothermale, synthèse par décomposition

thermique etc.).^{1b,1c,6} Les particules de magnétite (Fe_3O_4) sont préparées par co-précipitation d'ions ferriques (III) et ferreux (II) en présence d'une base forte selon l'Equation (1).



Cependant, ces particules ne sont pas très stables et s'oxydent facilement à l'air libre. La magnétite (Fe_3O_4) est alors transformée en maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) en présence d'oxygène. L'oxydation à l'air libre n'est pas la seule voie pour transformer la magnétite en maghémite. Cette transformation peut aussi être réalisée en solution acide où l'on favorise la désorption d'ions Fe^{2+} du solide ce qui conduit à la formation maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (Equation 2).



Il existe deux façons de stabiliser une dispersion de nanoparticules magnétiques. Le principe est basé sur une compensation des forces d'attraction soit par des forces de répulsion électrostatique soit par des forces de répulsion stérique.^{2d} Ceci est réalisé soit par l'immobilisation de molécules organiques en monocouches denses à la surface soit par l'enrobage des nanoparticules magnétiques par un matériau polymère organique ou inorganique.

2.2. Modification de surface d'oxyde de fer par des molécules organiques :

Les groupements fonctionnels tels que les carboxylates, les phosphates ou les silanes sont souvent utilisés pour stabiliser les nanoparticules magnétiques (Figure 1).¹

Dans le cas de ligands carboxylates, l'immobilisation est obtenue par une coordination bidentate des deux atomes d'oxygène du carboxylate sur un site de fer ou deux sites de fer adjacents de la surface de l'oxyde magnétique (Figure 1 a). Selon la nature du ligand, hydrophile ou hydrophobe, nous obtiendrons des nanoparticules stables en milieux aqueux (acide citrique,⁷ acide gluconique⁸), ou des nanoparticules stables en milieux organiques (avec l'acide oléique⁹). Des ligands phosphonates peuvent être également utilisés pour stabiliser les nanoparticules magnétiques.^{9b} En effet, le groupement phosphonate peut se complexer avec le fer (Figure 1 b).¹⁰ Des systèmes utilisant des phosphonates comme ligands de MNPs ont été amplement utilisés pour les applications biomédicales grâce à leur forte cohésion et leur biocompatibilité.^{1b} Les alkoxysilanes sont également souvent utilisés comme par exemple l'aminopropyltriéthoxysilane.¹¹ En effet, l'oxyde de fer contient des fonctions hydroxyle à sa

surface qui permettent de former une liaison covalente par condensation avec le silanol (Figure 1 c). On peut également noter que d'autres stabilisations ont été étudiées comme par exemple avec l'utilisation de ligands catéchols (Figure 1 d).¹²

Dans tous les cas, les particules stabilisées ont des tailles relativement petites de l'ordre de la dizaine de nanomètres.

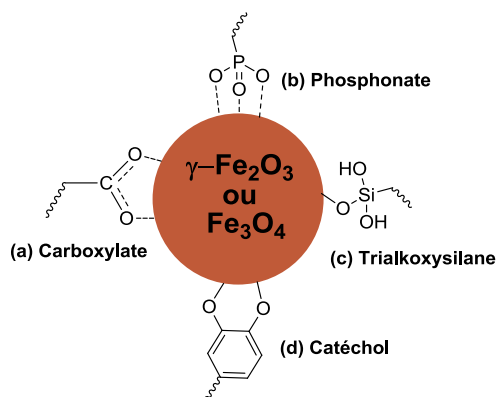


Figure 1. Schéma de modification de surface des nanoparticules magnétique par différents groupes.

2.3. Modification de surface d'oxyde de fer par enrobage :

2.3.1. Enrobage par un matériau polymère :

L'enrobage des MNPs par un polymère organique permet l'obtention de matériaux de type cœur-écorce. Plusieurs stratégies d'enrobage de nanoparticules magnétiques sont reportées.¹³ L'enrobage peut être réalisé *in situ* lors de la synthèse initiale des particules d'oxyde de fer ou postérieurement. La plupart des polymères présentés dans la littérature sont biocompatibles (alcool polyvinyle, poly éthylène glycol, acide polyacrylique, dextran, polysaccharide, polypeptide)⁶ et ils permettent de maintenir les particules dans un état colloïdal stable en milieu aqueux. Ainsi, leurs applications sont souvent destinées aux biotechnologies. De plus, la couche de polymère qui peut être fonctionnelle peut également prévenir d'une éventuelle dégradation du cœur magnétique.

2.3.2. Enrobage par un matériau inorganique :

L'enrobage des nanoparticules magnétiques par des matériaux inorganiques est couramment réalisé avec des matériaux inorganiques, parmi eux, la silice (la plus utilisée),^{1b} l'or,¹⁴ le platine,¹⁵ le gadolinium¹⁶ ou l'oxyde d'yttrium¹⁷.

L'utilisation de la silice est très répandue pour l'enrobage des MNPs. Généralement, elle prévient l'agrégation en phase aqueuse et apporte une protection chimique du cœur

magnétique.^{1b} La stabilité colloïdale des MNPs enrobées avec de la silice en milieu aqueux est due à deux phénomènes. Le premier est l'absence d'interaction dipolaire magnétique grâce à la couche de silice. Le deuxième est la répulsion électrostatique entre les MNPs qui sont favorisées par les charges négatives présentes à la surface de la silice (qui est légèrement acide). Deux approches de synthèse de la coque de silice sont reportées dans la littérature. La première est réalisée par une synthèse de Stöber¹⁸ : il s'agit de condenser le tetra-éthyl-orthosilicate (TEOS) suivant le procédé sol-gel dans un milieu basique. Im et *al.*¹⁹ ont préparé de la silice colloïdale et ils ont montré que la taille des coques de silice obtenues dépend de la concentration en nanoparticules élémentaires d'oxyde de fer et du solvant utilisé lors de la condensation de la silice. La taille des nanoparticules cœur-écorce peut être également contrôlée en effectuant la synthèse de Stöber en émulsion.²⁰ La taille des nanoparticules va alors dépendre de la taille des micelles. La deuxième méthode de synthèse consiste à déposer de la silice autour du cœur magnétique à partir d'une solution d'acide orthosilicique (SiOH_4).²¹ Dans ce cas, la taille des particules peut être contrôlée et varie de quelques dizaines à plusieurs centaines de nanomètres en changeant le ratio SiO_2 /oxyde de fer. La particularité des nanoparticules cœur-écorce oxyde de fer / SiO_2 est la présence de fonctions silanol à leur surface. Ces fonctions peuvent ensuite être utilisées pour le greffage covalent d'agent de couplage siliciés comme l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES) ce qui permet l'obtention de surfaces porteuses de fonctions amine.^{1a, 1b}

L'enrobage des nanoparticules magnétiques est également réalisé avec de l'or ou avec du platine. Ces coquilles à base de métaux précieux sont utilisées surtout pour prévenir contre l'oxydation du cœur métallique. Ce type de MNPs peut être obtenu par réduction du métal ou par microémulsion.^{14,15} Cet enrobage offre ensuite une surface chimique modifiable par des thiolates par exemple.

2.4. Présentation des MNPs utilisées dans nos travaux de Thèse :

Lors de ces travaux, nous avons utilisé des nanoparticules magnétiques (Figure 2) développées par la société Ademtech (Pessac, France) dans le cadre d'une collaboration scientifique. Il s'agit de MNPs cœur-écorce de 300 nm comportant une écorce de la silice et un cœur super-paramagnétiques de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). En outre, la société Ademtech commercialise également des MNPs calibrées de différentes tailles de 200 nm à 500 nm avec des écorces de silice mais aussi des écorces de polymères fonctionnels (NH_2 ou CO_2H) pour des applications en biotechnologie (protéomique, génomique, isolation de cellules etc.).²² On

peut noter que ces MNPs (écorce SiO_2 ou polymère) ont été utilisées antérieurement au Laboratoire dans le domaine de la catalyse supportée.²³ Dans ce cas, elles avaient été greffées par des métallodendrons porteurs de complexe de Pd (II) actifs dans des réactions de couplage C-C. Ainsi, des résultats remarquables en termes de réactivité et de recyclage ont été reportés.²⁴

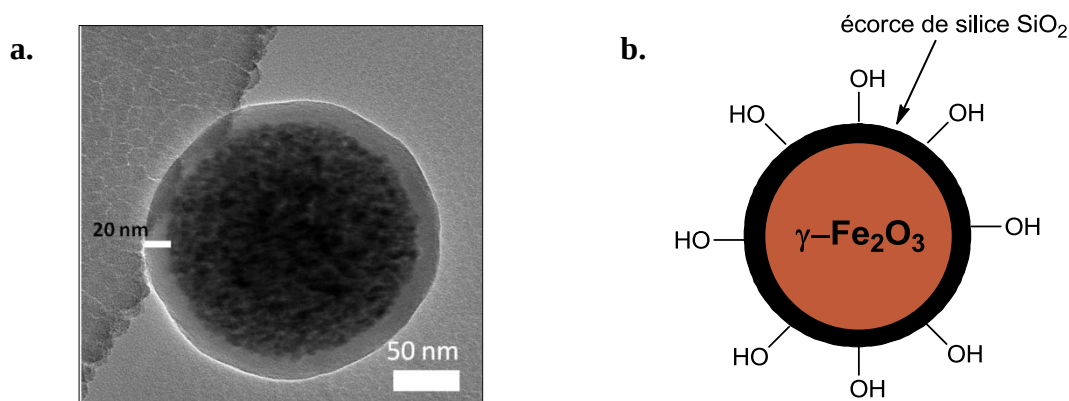


Figure 2. Image HR-TEM des MNPs cœur écorce de 300 nm (a) et leur représentation schématique (b).

Les nanoparticules que nous avons utilisées sont de grande taille (300 nm) par rapport à la majorité des nanoparticules reportées dans la littérature, dont la taille est souvent inférieures à 10 nm. Cette taille sub-micrométrique est particulièrement adaptée pour les applications que nous visons. En effet, en protéomique, ces particules vont permettre une aimantation rapide ce qui facilite leur manipulation. On peut noter que les MNPs de petite taille entre 10 et 100 nm sont en revanche souvent utilisées pour des applications en hyperthermie dans des conditions *in vivo*.²

Dans le cas des particules supérieures à 10 nm, le cœur magnétique est un ferrofluide d'oxyde de fer, c'est-à-dire un ensemble de nanoparticules de tailles inférieures à 10 nm stabilisées dans un fluide. Ces particules élémentaires sont indépendantes les unes des autres et conservent chacune leur caractère superparamagnétique. L'ensemble des particules présente alors ce même comportement superparamagnétique. Les MNPs que nous utilisons présentent une aimantation à saturation (M_s) de $38 \text{ cm}^3/\text{g}$ à 300 K, ce qui permet une décantation magnétique rapide (supérieure à 99% en une minute) avec un simple aimant. L'écorce de silice qui est de 20 nm, joue le rôle de protection du cœur magnétique, de stabilisant de la dispersion colloïdale en milieu aqueux et de support pour le greffage des molécules siliciées.

Cette chimie de surface que nous souhaitons mettre en œuvre implique la préparation d'agents de couplage organosiliciés qui vont réagir sur les silanols de surface par réaction de polycondensation.

En général, les composés organosilylés sont mono- ou trifonctionnels : RSiCl_3 ,²⁵ RSiOMe_3 ,²⁶ RSiOEt_3 ,²⁷ RSiMe_2Cl .²⁸ Il existe deux méthodes de greffage des surfaces de silice soit en milieu organique soit en milieu hydroalcoolique voire complètement aqueux. La majorité des études a été réalisée en milieu organique anhydre dans des solvants apolaires ou peu polaires comme le toluène et le chloroforme par exemple. Le greffage en milieu organique permet de contrôler l'étape d'hydrolyse du silane et d'éviter la polycondensation en solution avant le greffage.²⁹ Par contre, les nanoparticules ont tendance à s'agréger dans les milieux organiques à cause de leur caractère hydrophile. Depuis quelques années, des études en milieu hydroalcoolique ou purement aqueux ont été réalisées. Cependant, la plupart des organosilanes ne sont pas miscibles en milieu aqueux. Dans ce cas, il est possible d'utiliser un mélange de solvant eau/ éthanol avec des proportions variables.³⁰ En présence d'eau, il y a compétition entre l'homo-condensation du silane et les réactions de greffage sur la surface de silice, la difficulté réside alors dans le contrôle de cette polycondensation du silane.

3. Greffage sur les MNPs d'une sonde fluorescente :

Avant d'aborder le greffage de structures dendritiques sur la surface des MNPs cœur-écorce de 300 nm pour l'immobilisation de biomolécules, nous nous sommes intéressés, dans un premier temps, au greffage d'une sonde fluorescente. Le but de cette démarche était d'étudier la faisabilité du greffage des MNPs en milieu organique et en particulier, l'influence de la concentration en précurseur silicié sur le greffage. Pour cette étude, nous avons donc choisi le groupement pyrène comme sonde fluorescente et le groupement SiCl_3 comme fonction hydrolysable. (Figure 3)

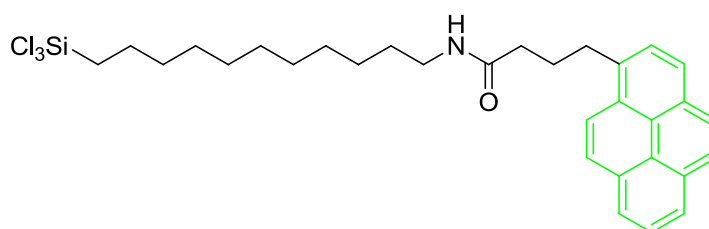


Figure 3. Structure moléculaire du composé **P**.

Plusieurs études ont montré l'intérêt de l'utilisation du pyrène comme sonde fluorescente car elle renseigne sur son environnement.³¹⁻³⁴ Le pyrène est connu pour être un bon indicateur de l'état de surface greffé car sa fluorescence change en fonction de l'espèce fluorescente active c'est-à-dire monomère, dimère ou excimère. Il est, entre autre, utilisé pour déterminer la concentration micellaire critique en colloïde (CMC), ainsi que pour étudier le degré de pénétration de l'eau dans une des micelles et dans les bicouches ou bien pour déterminer la température de transition de phase dans les vésicules lipidique.³¹ En outre, dans le domaine des surfaces, certains auteurs³² ont montré l'effet de la polarité du solvant dans le procédé de greffage sur un oxyde métallique par la fluorescence du pyrène. Par ailleurs, d'autres auteurs³³ ont montré une détection d'acide dans une monocouche (sur un substrat de SiO₂) à base de pyrène, grâce au changement de fluorescence des différents états du pyrène (monomère et excimère). Le pyrène peut être également utilisé pour l'électronique organique et la fabrication de transistor organique aussi pour l'optique non linéaire.³⁴

3.1. Synthèse du composé **P :**

La synthèse de la sonde fluorescente **P** a été réalisée en trois étapes à partir de l'acide pyrène butyrique commercial. (Figure 4) Ainsi, la synthèse du précurseur insaturé **14** a été effectuée par couplage à partir de l'acide pyrène butyrique **13** et le 1-amino-undécène **4** (dont la synthèse est décrite dans la chapitre II). Dans un premier temps, l'acide pyrène butyrique est d'abord transformé en chlorure d'acide à l'aide du chlorure d'oxalyle. Cette réaction a lieu dans du chloroforme anhydre. Les sous-produits de cette réaction sont le dioxyde de carbone, le monoxyde de carbone et de l'acide chlorhydrique qui sont donc très facilement éliminés du milieu réactionnel. Cependant, le chlorure d'acide intermédiaire n'a pas été isolé et l'étape suivante a été réalisée *in-situ*. Lors de l'introduction du 1-amino-undécène **4**, de la triéthylamine a été ajoutée simultanément, afin de capter l'acide chlorhydrique résiduel. Dans ces conditions, le composé **14** a été formé avec un rendement de 65%.

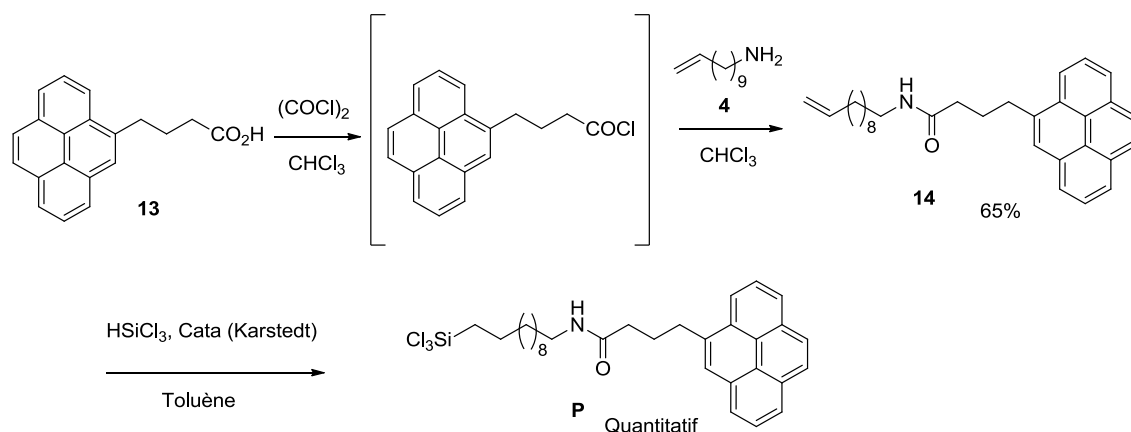


Figure 4. Synthèse du composé **P**.

L'étape suivante consiste en l'hydrosilylation du groupement éthylénique du composé **14**. Ce composé est mis en présence de silane (HSiCl_3) en large excès (16 éq) et du catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt) dans du toluène anhydre. La solution est agitée pendant 2 h à 40°C. Le taux de conversion de la réaction est de 100% (le suivi de la réaction est réalisé par RMN ^1H) et ne nécessite aucune étape de purification. L'excès de silane ainsi que le solvant sont évaporés à la fin de la réaction. Le mécanisme de la réaction a été décrit dans le chapitre II. L'obtention du produit **P** est confirmée par RMN ^1H et ^{13}C . Elle se traduit par une disparition des signaux associés aux protons et aux carbones liés du groupement éthylénique. Effectivement, en RMN ^{13}C , les carbones à 139,2 et 114,1 ppm correspondant respectivement aux carbones éthylénique disparaissent pour laisser apparaître deux nouveaux pics à 9,2 et 17,2 ppm correspondant aux carbones α - en β - et du Si (C sp_3).

3.2. Greffage du composé **P** sur les MNPs :

Nous avons fait le choix de greffer le composé **P** en milieu organique anhydre pour mieux contrôler la formation d'une couche mono-moléculaire (Figure 5).

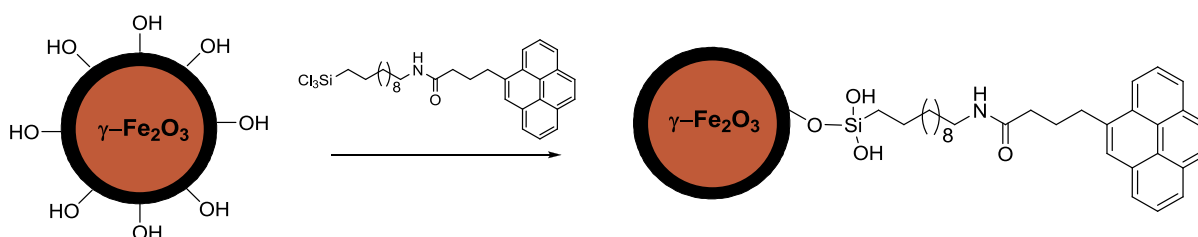


Figure 5. Réaction de greffage du composé **P**.

Nous avons choisi le toluène comme solvant qui est le plus souvent utilisé dans la littérature pour ce type de greffage. Le toluène permet d'une part, le contrôle de l'hydrolyse de $R-SiCl_3$ au contact de la surface et d'autre part, de solubiliser la molécule, ce qui n'est pas possible dans un milieu hydroalcoolique. En revanche, l'inconvénient de ce solvant est la mauvaise dispersion des MNPs. En effet, dans ce solvant, elles ont tendance à s'agréger et à former des floculations visibles à l'œil nu. Ce phénomène est dû au caractère hydrophile de la surface de silice (présence des fonctions silanol) et également à l'hydrophobicité du solvant utilisé qui est le toluène. Nous avons remarqué par ailleurs que les solvants organiques les plus polaires comme le méthanol, l'éthanol ou l'acétonitrile permettent d'améliorer la dispersion des MNPs. La quantité de MNPs mise en œuvre pour le greffage est de 30 mg dans 10 ml de toluène, or les MNPs sont initialement en solution dans de l'eau, il faut donc les faire passer en solution dans du toluène anhydre pour réaliser le greffage. Le changement de solution des MNPs doit être effectué progressivement pour avoir une bonne dispersion de ces dernières et pour éliminer le maximum d'eau physisorbée à la surface des MNPs. En effet, il est important de noter que les MNPs ne se dispersent pas parfaitement dans tous les solvants. De même, leur dispersion après greffage va dépendre du solvant et des molécules greffées à leur surface. Pour effectuer ce changement de solvant, de l'eau vers le toluène, nous avons donc choisi le THF qui est un solvant intermédiaire aprotique et qui est miscible avec l'eau et avec le toluène en même temps. Les MNPs sont lavées 3 fois avec un mélange (50% H_2O /50% THF) puis avec 100% THF, ensuite avec un mélange (50% THF/50% Toluène) et enfin avec 100% Toluène. Après les lavages, une suspension de 30 mg de MNP est préparée dans du toluène anhydre (concentration de 3 mg/ml de MNPs). Cette concentration a été choisie de manière à avoir le moins d'agrégats possible en solution car plus la concentration MNP augmente, plus il y a présence d'agréation. Une fois la solution de MNPs préparée, l'agent de couplage **P** est ajouté ; nous avons choisi trois concentrations différentes en agent de couplage : 1.10^{-4} M (1.10^{-6} mol pour 10 ml) ; 3.10^{-4} M (3.10^{-6} mol pour 10 ml) ; $2,5.10^{-3}$ M (1.10^{-5} mol pour 10 ml). Le greffage a eu lieu à température ambiante. Le milieu réactionnel est soumis à une agitation mécanique. Nous avons fixé le temps à 60 minutes. A la fin du greffage, la stabilité de la dispersion des MNPs dans les solvants organiques a été améliorée et par la même, la dispersion dans l'eau s'est détériorée (agréation puis sédimentation instantanée).

Les MNPs modifiées sont ensuite caractérisées en spectroscopie de fluorescence qui permet d'observer la signature moléculaire du pyrène sur la surface des MNPs, en

microscopie électronique à transmission à haute résolution (HR-TEM) pour vérifier l'intégrité morphologique des MNPs après le greffage et par zétamétrie afin de mesurer la charge de surface en fonction du pH de la suspension.

3.3. *Etude de fluorescence :*

La fluorescence est un phénomène correspondant au passage d'électrons d'un niveau excité à un niveau fondamental. Les transitions de fluorescence sont radiatives et se traduisent par une libération de photons.³¹



Cependant, la fluorescence du pyrène est assez particulière, elle a tendance à former des espèces appelées excimères et dimères en milieu concentré en plus de l'espèce monomère. Ils sont caractéristiques des composés polyaromatiques. Ce phénomène est dû aux interactions π - π entre différents noyaux polyaromatiques.³¹

La fluorescence des MNPs greffées avec le composé **P** à différentes concentrations a été réalisée en réflexion. Cependant, il a fallu les déposer sur un support réfléchissant la lumière, et nous avons choisi des miroirs d'or comme supports réfléchissants pour les solutions de forte concentration ou les solides. Selon cette technique, la lumière est réfléchie avec un angle de 22°30' par rapport à la lumière incidente, pour éviter les phénomènes d'interférence et de diffusion de la lumière. Pour les solutions à faible concentration, la lumière réfléchie est perpendiculaire par rapport à la lumière excitatrice. Au préalable, il est nécessaire de connaître les longueurs d'onde à laquelle l'échantillon absorbe afin de réaliser l'étude de fluorescence. De ce fait, nous avons d'abord enregistré le spectre d'absorption du précurseur éthylénique **14** dans le toluène en transmission. Une fois que les bandes excitatrices ont été identifiées, nous avons réalisé les spectres de fluorescence et d'excitation du même composé dans une solution diluée à 10^{-7} M. A cette concentration uniquement, la fluorescence du monomère pyrénique est observée ce qui n'est pas le cas dans une solution plus concentrée où les excimères et les dimères peuvent être observés. Le composé **14** a été étudié en solution au lieu du composé **P** afin de s'affranchir de l'hydrolyse et de la condensation de la fonction d'attache SiCl_3 . La lumière émise par la solution a été détectée avec un angle perpendiculaire par rapport à la lumière excitatrice.

Le dépôt des MNPs greffées avec le composé **P** sur le support (miroir d'or) a été mis au point par spin-coating. Ainsi, une suspension de MNPs greffées (6 mg/ml) dans l'éthanol a

été préparée. L'éthanol a été choisi car il permet d'avoir la meilleure dispersion des nanoparticules et il permet un mouillage total sur la surface d'or. Ces conditions ont permis l'obtention d'un film homogène de MNPs sur toute la surface du support. Un dépôt de 60 μl d'éthanol a permis de recouvrir la totalité du support d'une surface de 2,5 cm x 2,5 cm et ce, même avant la rotation de spin coating (Figure 6). Cette méthode permet d'obtenir un film homogène et aussi d'éliminer le surplus de MNPs par la force centrifuge.

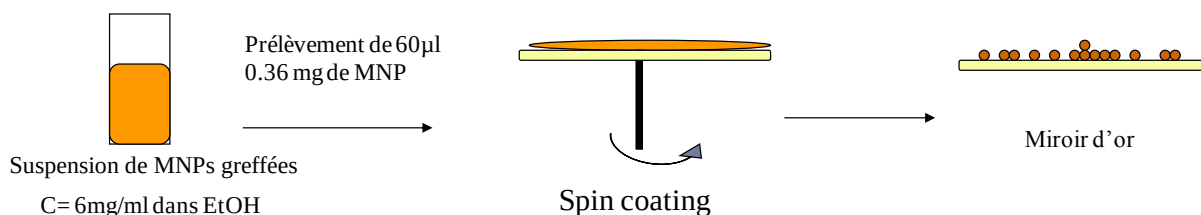


Figure 6. Schéma du mode opératoire du dépôt par spin coating.

Des images de microscopie optique ($226 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$) de la surface ont été enregistrées et ont montré l'homogénéité du film sur le miroir d'or comme illustré dans la Figure 7. Ce résultat a été vérifié pour les trois concentrations utilisées lors du greffage (1.10^{-4} M, 3.10^{-4} M, $2.5.10^{-3}$ M).

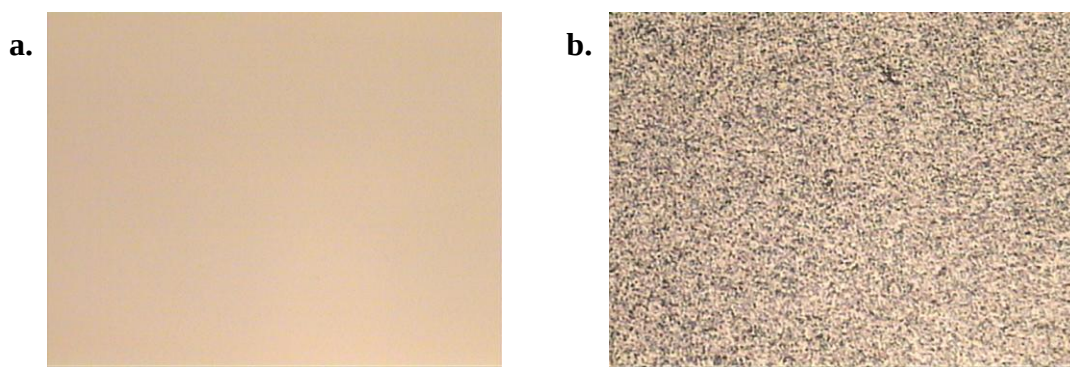


Figure 7. Images optiques ($226 \mu\text{m} \times 300 \mu\text{m}$) du dépôt de MNPs sur le miroir d'or : (a) avant dépôt ; (b) après dépôt (C : $2.5.10^{-3}$ M).

Une fois le dépôt réalisé, nous avons analysé les supports en spectroscopie de fluorescence. La comparaison entre la fluorescence en solution diluée et la fluorescence à l'état solide du groupement pyrénique greffé sur les MNPs est présentée dans la Figure 8.

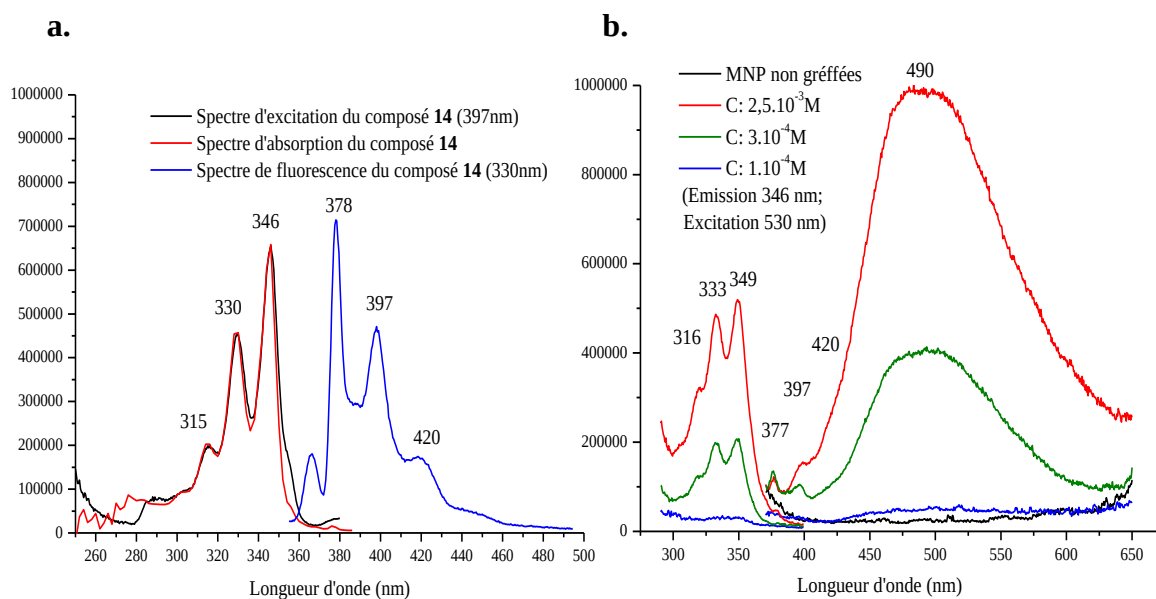


Figure 8. (a) Spectre d'absorption, d'excitation et d'émission du composé **14** ; (b) Spectre d'excitation et d'émission des MNPs greffé avec le composé **P**.

En solution à 10^{-7} M dans le toluène (Figure 8 a), les spectres d'absorption et d'excitation (397 nm) du composé **14** sont superposables et présentent trois raies à 315 nm, 330 nm et 346 nm. Tandis que le spectre de fluorescence présente trois autres raies à 378 nm, 397 nm et à 420 nm. Ces bandes correspondent à la signature moléculaire du monomère du motif pyrénique. A l'état solide dans le cas des MNPs greffées avec le composé **P**, nous retrouvons les bandes d'excitation du monomère pyrénique (Figure 8 b). De plus, nous constatons l'apparition d'une bande large à 490 nm (Figure 8 b) caractéristique des excimères. Ce résultat indique que les motifs pyrène dans ce cas sont proches les uns des autres et montre qu'il a bien eu greffage du composé **P** sur la surface des MNPs. Au niveau de l'intensité, nous constatons que plus la concentration est grande plus la fluorescence augmente, en particulier à 490 nm. Cependant, ce résultat ne nous renseigne pas sur l'état morphologique des MNPs modifiées mais confirme simplement la présence du pyrène sur la surface des MNPs.

Des mesures d'épi-fluorescence ont également été réalisées sur ces nanoparticules greffées avec le composé **P** à différentes concentrations de MNPs en suspension dans l'éthanol. Les images ont été enregistrées pour des solutions de billes greffées sans optimisation de l'état colloïdal des particules dans ce milieu (aucun traitement aux ultrasons). Des particules plus ou moins agrégées sont donc observées. Néanmoins, les images obtenues (Figure 9) montrent que toutes les nanoparticules émettent dans la gamme de fluorescence du

pyrène (λ_{exc} : 340-380 nm ; λ_{em} : 435-485nm). Ce résultat indique que le greffage est homogène sur l'ensemble des nanoparticules, quelque soit la concentration. Nous remarquons également que la taille des plus petits points lumineux, correspondant à un pixel de l'image, a été calculé et correspond à 300-400 nm ce qui est de l'ordre de grandeur de la taille d'une seule nanoparticule. Néanmoins, la résolution des images montre que nous sommes en limite de reconnaissance d'objet unique.

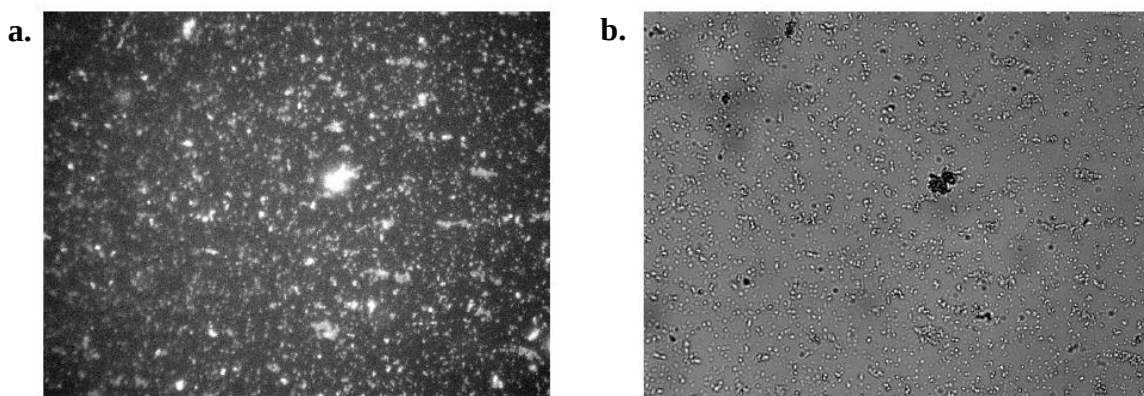


Figure 9. Images de microscopie à épi-fluorescence ($90 \times 67 \mu\text{m}$) des nanoparticules greffées par l'agent de couplage pyrénique **P** : (a) mode fluorescence, (b) mode optique.

3.4. Microscopie électronique à transmission :

Des analyses par microscopie HR-TEM ont été réalisées sur les MNPs greffées avec la molécule **P** aux trois concentrations précédemment décrites. Cette technique nous permet de déterminer la morphologie des nanoparticules après le greffage. Sur l'image de la Figure 10 (a), nous constatons qu'à faible concentration, que ce soit à 1.10^{-4} M ou à 3.10^{-4} M, l'intégrité de la couche de silice a été préservée et l'épaisseur de la coque n'a pas été modifiée (20 nm). Ce résultat semble indiquer que cette méthode de greffage (milieu organique anhydre) favorise la formation d'une couche mono-moléculaire. Cependant, lors du greffage à une concentration de $2,5.10^{-3}$ M, nous remarquons la présence de défauts (Figure 10 b et c). Ces défauts sont dus à la dégradation de la coque de silice qui se traduit soit par l'énucéléation du cœur magnétique comme montré dans la Figure 10 (b) soit par la formation de débris de silice (Figure 10 c). Cette dégradation est sans doute causée par le dégagement d'acide chlorhydrique, lors de l'hydrolyse, à proximité de la surface, ce qui engendre une concentration locale élevée en HCl. Une concentration de 3.10^{-4} M a été retenue car elle permet d'avoir le maximum de molécules greffées sans pour autant détériorer les nanoparticules.

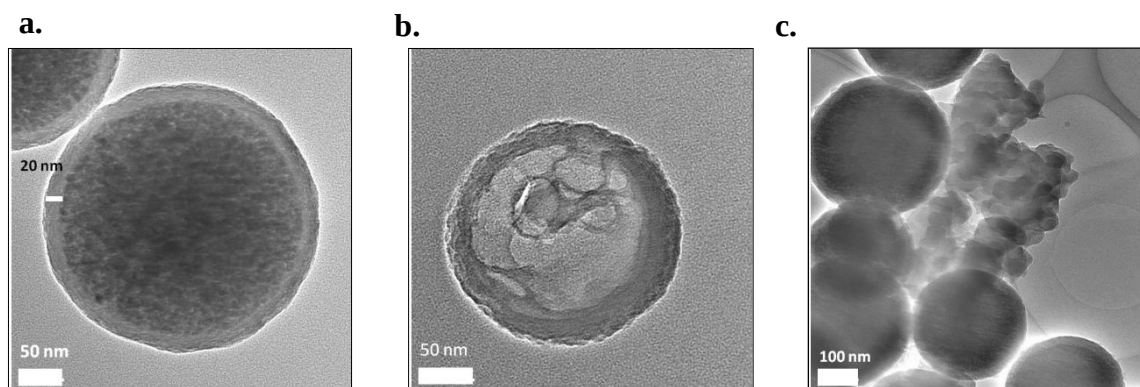


Figure 10. Images HR-TEM des MNPs modifiées. (a) Particule intègre (concentration en $P = 3 \cdot 10^{-4}$). (b) Particule ayant perdu le cœur Fe_2O_3 (concentration en $P = 2,5 \cdot 10^{-3} M$). (c) présence de gros agrégats à proximité des MNPs (concentration en $P = 2,5 \cdot 10^{-3} M$).

3.5. Potentiel zêta :

Le potentiel zêta d'une surface de particules immergées dans une solution reflète les propriétés électrostatiques des particules en fonction de leur environnement ionique (voir annexe 4).³⁵ Ainsi, il va permettre de quantifier la répulsion qui s'exerce entre les particules à un pH donné. Le potentiel zêta se détermine par la mesure des vitesses de déplacement des particules soumises à un champ électrique et il s'exprime en mV.³⁵ La valeur du potentiel zêta mesurée indique la force de répulsion présente et permet d'évaluer la stabilité colloïdale. La stabilité d'un système colloïdal est déterminée par un équilibre des forces répulsives et attractives auxquelles les particules sont soumises quand elles se rapprochent les unes des autres. Ainsi, si toutes les particules en suspension ont un potentiel zêta négatif ou positif important (inférieur à -30 mV et supérieur à $+30$ mV), elles tendent à se repousser mutuellement et vont rester dans un état dispersé. En revanche, si leur potentiel zêta est faible ou nul, aucune force ne les empêche de se rassembler et de flocculer. La suspension est alors instable, on observe donc la formation d'agrégats. D'une manière générale, plus la valeur absolue du potentiel zeta est forte, plus le système est stable. La mesure du potentiel zêta en fonction du pH nous renseigne sur la stabilité maximale de l'état colloïdal des particules. On doit donc observer un changement de profil des courbes de potentiel lorsque l'on passe des MNPs natives aux MNPs greffées. Nous avons enregistré les profils du potentiel zêta en fonction du pH des nanoparticules greffées à une concentration de $3 \cdot 10^{-4} M$ et nous l'avons comparé à celui des nanoparticules non greffées (Figure 11). Dans les deux cas, nous constatons que le potentiel reste positif, à des pH inférieurs à 3,5. Le point isoélectrique n'est que légèrement décalé dans le cas des MNPs greffées par rapport aux MNPs non greffées, il n'y a donc pas de changement important de charge de surface des particules. Dans la partie

négative des deux profils, nous remarquons une différence d'allure. Ceci serait dû à l'écrantage de la couche de silice du fait du greffage du composé **P**. En effet, nous constatons qu'à pH supérieur à 7 les nanoparticules greffées affichent un potentiel constant à environ -35 mV. Cette valeur est relativement faible et peut expliquer le phénomène de légère agrégation des MNPs dans l'eau pour une gamme de pH comprise entre 7 et 12. Cependant, dans le cas des MNPs non greffées, le potentiel zéta est de -40 mV à pH 7 et continue à décroître jusqu'à -70 mV à pH 11, ce qui explique la stabilité des nanoparticules en suspension dans l'eau à pH neutre et basique.

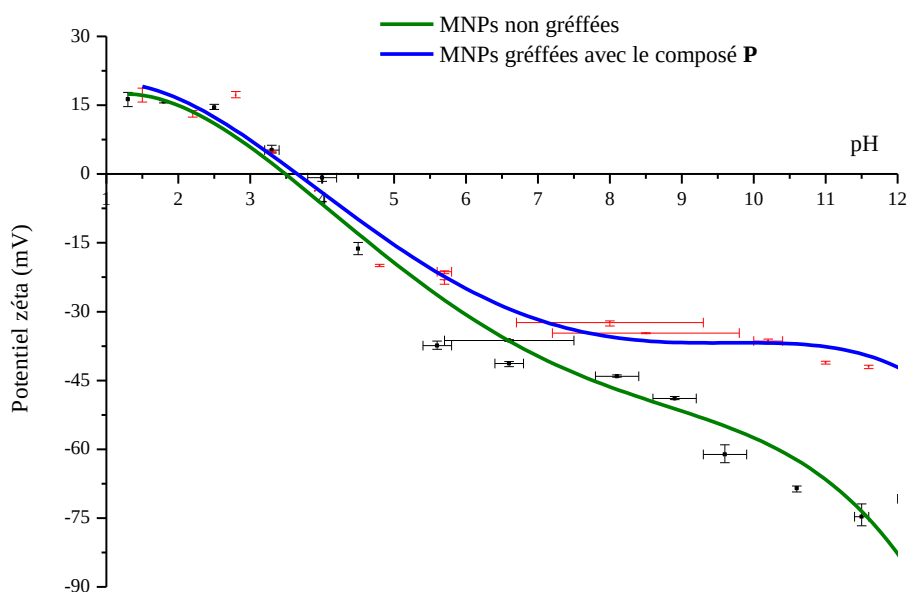


Figure 11. Profils de potentiel Zéta en fonction de pH des MNPs non greffées et MNPs greffées avec le composé **P** à une concentration de 3.10^{-4} M.

En conclusion, le greffage de la sonde fluorescente **P** nous a permis de déterminer les meilleures conditions de greffage des MNPs $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$ de 300 nm en milieux organique anhydre. Ainsi, en fluorescence nous avons observé que le greffage a bien eu lieu. Nous avons également montré une augmentation de la fluorescence en fonction de la concentration. En microscopie HR-TEM, nous avons montré qu'à faible concentration à 1.10^{-4}M et 3.10^{-4}M l'intégrité de la coque de silice a été préservée. En revanche, à forte concentration à $2,5.10^{-3}\text{M}$, une dégradation des MNPs a été observée. En zétamétrie, nous avons montré un léger changement de profil entre les nanoparticules natives et les nanoparticules greffées. Ainsi, à pH neutre ou basique, les valeurs du potentiel mesurées permettent d'expliquer l'agrégation des MNPs après leur greffage. A ce stade, les conditions de greffage retenus sont

donc : 3.10^{-4} M en agent de couplage chlorosilicié, dans le toluène pendant 1 heure, à température ambiante.

4. Immobilisation de biomolécules : 1^{ère} stratégie

Pour l'immobilisation de molécules biologiques, nous avons opté pour une stratégie d'immobilisation covalente grâce à un couplage peptidique, impliquant les fonctions acide situées sur la surface des particules et les fonctions amine de la protéine (issues des résidus lysine) (Figure 12). La première étape consiste à greffer un agent de couplage silicié contenant une fonction photolabile servant de protection de la fonction acide. La nature de la fonction d'attache avec la surface (SiCl_3 , $\text{Si}(\text{OMe})_3$, $\text{Si}(\text{OEt})_3$) sera choisie en fonction des conditions expérimentales que nous allons étudier. La deuxième étape sera la déprotection de la fonction acide par photoclivage de l'ester nitrobenzylique. Une fois la fonction acide obtenue, nous effectuerons une activation des groupements CO_2H afin d'obtenir un ester activé susceptible de réagir avec des fonctions amines. Enfin, la protéine A a été choisie comme molécule biologique modèle. Afin de confirmer l'immobilisation des protéines A sur les MNPs, nous avons utilisé des nanoparticules d'or (20 nm) recouvertes de protéines A (NP-pA) (Figure 12). Ces nanoparticules seront utilisées comme sonde détectables en imagerie HR-TEM.

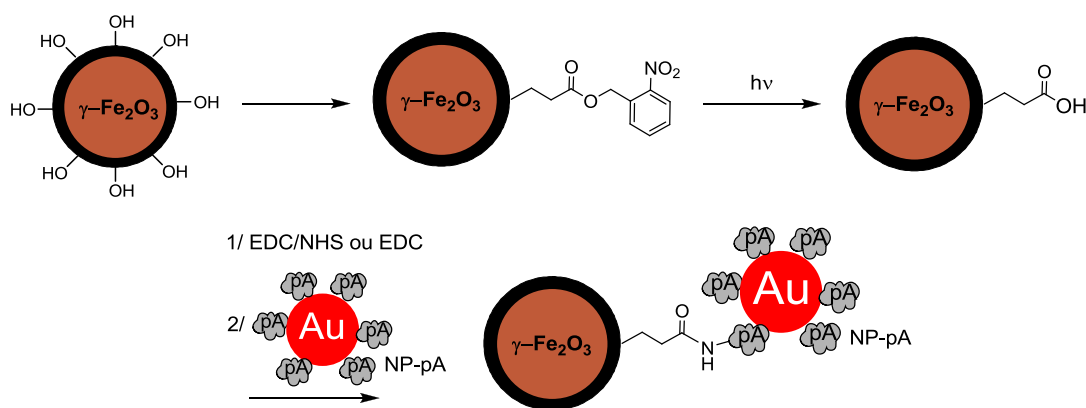


Figure 12. Représentation de la première stratégie employée pour l'immobilisation des biomolécules (NP-pA).

4.1. Greffage du composé D_1 :

L'agent de couplage silicié D_1 (Figure 13) est greffé sur les MNPs selon les mêmes conditions utilisées pour le composé P (voir §3). La synthèse de ce composé a été décrite dans le chapitre II. Les MNPs greffées par D_1 dans ces conditions, seront notées $MNP@D_1$. Le greffage a été effectué dans le toluène, avec une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M en agent de couplage pendant une heure à température ambiante, en présence de 30 mg de nanoparticules. A la fin du greffage, tout comme pour les MNPs greffées avec le composé P , l'état colloïdal des particules a évolué. Leur dispersion est devenue instable dans l'eau pure et elles ont tendance à s'agréger. L'éthanol est le solvant qui disperse le mieux les MNPs modifiées avec le composé D_1 .

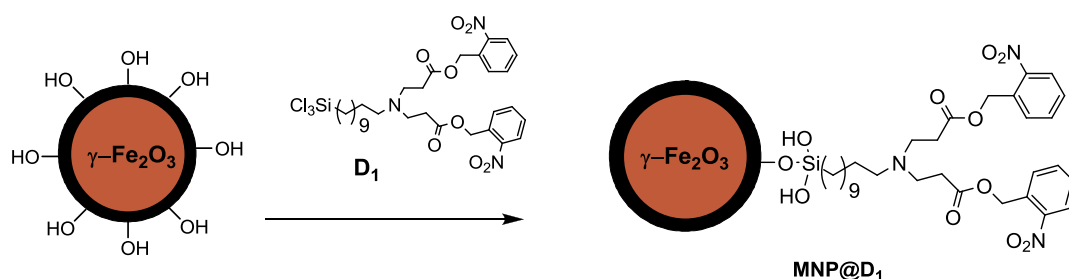


Figure 13. Réaction de greffage du composé D_1 .

Les MNPs ont été d'abord analysées en infrarouge en mode ATR sur diamant et l'état morphologique des MNPs a été analysé en imagerie HR-TEM (Figure 14).

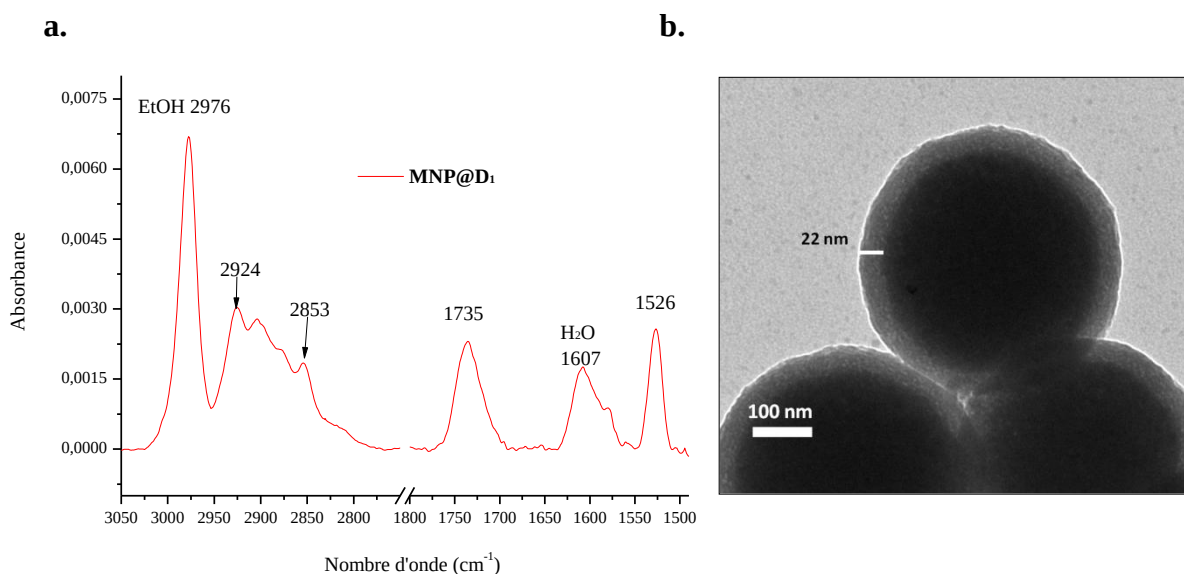


Figure 14. (a) Spectre IR-ATR de $MNP@D_1$; (b) Image HR-TEM de $MNP@D_1$.

Sur la Figure 14 (a), le spectre IR montre la présence à 1735 cm^{-1} d'une bande associée au ν_{co} du groupement ester ainsi qu'une bande à 1526 cm^{-1} caractéristique du groupement NO_2 (ν_{as}). Par ailleurs, nous notons également la présence des bandes associées aux groupements CH_2 à 2853 cm^{-1} (ν_{as}) et à 2924 cm^{-1} (ν_{s}). La présence de toutes ces bandes montre clairement la signature de la molécule **D₁** à la surface des MNPs.

L'image HR-TEM de la Figure 14 (b) montre que les nanoparticules et les coques de silice n'ont pas été détériorées. Cependant, nous n'avons pas noté d'augmentation remarquable de l'épaisseur de la taille de la coque (20-22nm). Ce résultat laisse penser qu'un greffage de monocouche a été réalisé.

La formation des **MNP@D₁@CO₂H** est réalisée par le photo-clivage de la fonction ester nitrobenzylique des **MNP@D₁** (Figure 15) et conduit à la formation d'un acide carboxylique suivant la réaction de Norrish II.³⁶ Le mécanisme de cette réaction a été décrit dans le chapitre III.

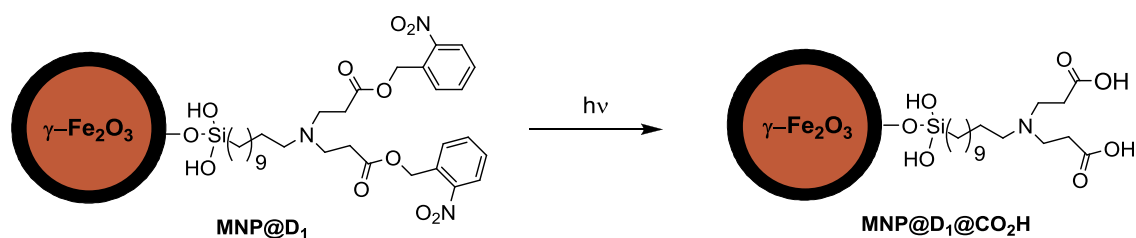


Figure 15. Réaction de photodéprotection des **MNP@D₁** en **MNP@D₁@CO₂H**.

D'un point de vue expérimental, les MNPs greffées avec le composé **D₁** ont été mises en suspension dans l'éthanol et irradiées sous une lampe UV pendant 3 h à travers une plaque Pyrex ® qui permet de laisser passer uniquement les longueurs d'onde supérieures à 300nm. Ces conditions sont suffisantes pour effectuer la photo-déprotection sans dénaturer le reste de la structure moléculaire. Le temps *optimum* de réaction de 3h a été déterminé par infrarouge en analysant les particules après différents temps d'irradiation.

Ces **MNP@D₁@CO₂H** fonctionnalisées par des fonctions CO_2H ont été analysées en IR-ATR et en HR-TEM (Figure 16).

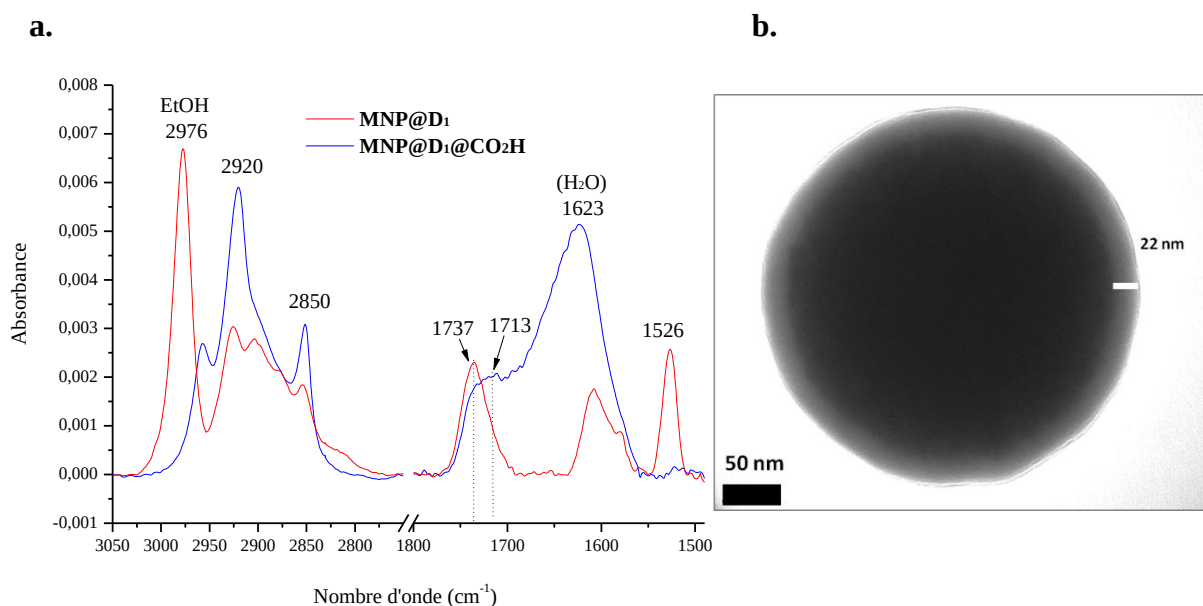


Figure 16. (a) Spectres IR-ATR de $MNP@D_1$ et $MNP@D_1@CO_2H$; (b) Image HR-TEM $MNP@D_1@CO_2H$.

En infrarouge, nous remarquons qu'après irradiation la bande NO_2 d'élongation asymétrique initialement à 1526 cm^{-1} a disparu et la bande d'élongation du carbonyle s'est décalée à 1713 cm^{-1} . Ce résultat nous montre que la photo-déprotection a bien eu lieu et nous confirme la présence des fonctions acide en surface.

L'analyse des MNPs en HR-TEM, nous montre que les particules n'ont pas été détériorées par le traitement UV. L'épaisseur de la coque de silice est restée inchangée (20 – 22nm).

Les fonctions acide carboxylique à la surface des MNPs sont alors activées avec une solution d'EDC et NHS dans un tampon MES à pH 6 (Figure 17). La formation de l'ester activé est réalisé au dernier moment juste avant l'incubation avec la biomolécule à cause de la sensibilité à l'hydrolyse de la fonction ester NHS.³⁷

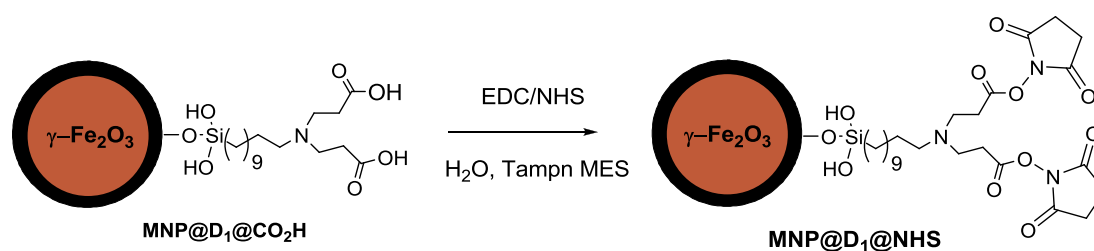


Figure 17. Réaction d'activation des fonctions acide carboxylique des $MNP@D_1@CO_2H$ en $MNP@D_1@NHS$.

Les **MNP@D₁@CO₂H** ont été mises en suspension en présence d'EDC et de NHS dans une solution de MES* pendant 3h (à température ambiante). A cette étape, les MNPs avec le groupement NHS (notées **MNP@D₁@NHS**) ont été analysées par Infrarouge en mode ATR (Figure 18). Nous observons sur le spectre IR l'apparition d'une nouvelle bande fine à 1731 cm⁻¹ pouvant être associée au ν_{CO} de l'ester activé ainsi qu'une bande de faible intensité à 1776 cm⁻¹, caractéristiques du groupe NHS. La présence de ces bandes associées aux groupements NHS semble donc indiquer l'activation des CO₂H accessibles en surface.

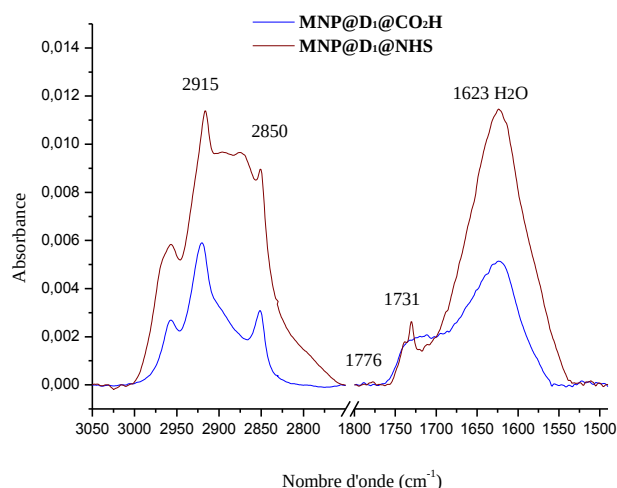


Figure 18. Spectres IR-ATR de **MNP@D₁@CO₂H** et **MNP@D₁@NHS**.

Enfin, les nanoparticules d'or colloïdal (20 nm), recouvertes de protéine A (NP-pA) ont été utilisées pour étudier l'immobilisation de molécules biologiques sur la surface des MNPs (Figure 19). Les particules d'or permettent une détection en imagerie HR-TEM. Les nanoparticules d'or de cette taille ont une couleur rouge à cause du phénomène de résonance de plasmon de surface,³⁸ on peut donc visualiser l'immobilisation par la décoloration des solutions.

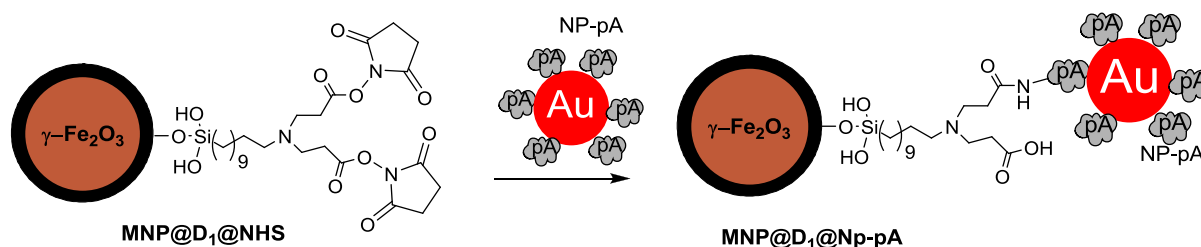


Figure 19. Réaction de couplages des **MNP@D₁@NHS** avec des NP-pA.

* MES : acide 2-morpholino éthanesulfonique.

Les nanoparticules d'or ont été mises en contact avec les MNPs ester activé (**MNP@D₁@NHS**) dans une solution aqueuse de PBS[†] (pH 8) et de tensioactif Triton (0,1%) qui aide la stabilité colloïdale. La quantité de protéines mise avec 1 mg MNPs est d'environ 0,8 µg. Au bout de deux heures, la solution récupérée est toujours rouge ce qui indique que la totalité des protéines A n'a pas été greffée sur les MNPs. Néanmoins, ces nanoparticules ont été observées en HR-TEM (Figure 20). Nous constatons qu'il y a peu de NP-pA à la surface des **MNP@D₁@NHS**, ce qui indique une faible fonctionnalisation de surface des MNPs en utilisant cette stratégie.

Une étude complémentaire dans le but de quantifier la biofonctionnalisation est reportée dans la partie §5.4. de ce chapitre.

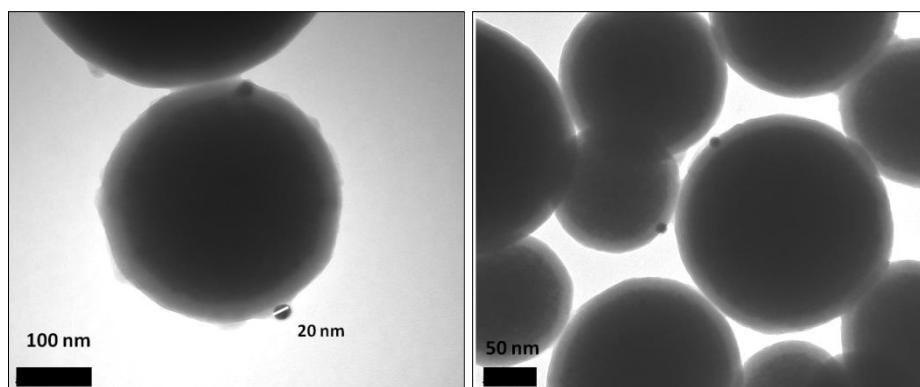


Figure 20. Images HR-TEM de **MNP@D₁@NP-pA**.

*En conclusion, dans cette partie, nous avons effectué un greffage covalent du dendron photolabile **D₁** sur les MNPs. L'infrarouge a mis en évidence la présence de la molécule **D₁** sur la surface et les images HR-TEM ont montré que la surface des MNPs a été préservée. Il faut noter que l'épaisseur de la coque de silice reste inchangée ce qui suggère l'établissement d'une monocouche moléculaire à la surface. La déprotection de la fonction acide a été réalisée après irradiation sous UV et a été mise en évidence en IR et HR-TEM. Ensuite, le traitement par EDC/NHS a permis d'obtenir un ester activé qui a permis l'immobilisation de la protéine A. Ainsi, les protéines A supportées sur des NP d'or ont été immobilisées sur les MNPs. Cependant, nous avons montré un faible accrochage des NP-pA résultant d'une faible fonctionnalisation initiale des MNPs. Cette fonctionnalisation faible peut s'expliquer par la mauvaise stabilité colloïdale des MNPs dans le toluène. Afin d'augmenter le taux de*

[†] PBS : tampon phosphate salin (phosphate buffered saline).

fonctionnalisation à la surface des MNPs, nous avons décidé de remplacer les fonctions d'accrochage SiCl_3 par des fonctions $\text{Si}(\text{OMe})_3$.

4.2. Greffage du composé $\mathbf{D}_2$:

La synthèse du composé $\mathbf{D}_2$ porteur d'une tête greffable $\text{Si}(\text{OMe})_3$ a été décrite dans le chapitre II, il s'agit d'un dendron à deux branches portant des groupements photolabiles nitrobenzyliques et d'une fonction d'attache $\text{Si}(\text{OMe})_3$. La stratégie qui est employée pour immobiliser des biomolécules est similaire à celle décrite pour le composé $\mathbf{D}_1$.

Dans la première étape, il s'agit de greffer le composé $\mathbf{D}_2$ (Figure 21) dans le but d'avoir une modification chimique de surface plus importante que celle obtenue avec $\mathbf{D}_1$. Nous avons donc choisi le THF comme solvant car il permet une meilleure dispersion des MNPs, comparé au toluène. De plus, il ne risque pas de réagir avec les fonctions silane car il est aprotique. Nous avons également augmenté la quantité d'agent de couplage à $2,5 \cdot 10^{-3}$ M dans le but d'augmenter le taux de fonctionnalisation. À la fin du greffage, les nanoparticules greffées présentent une mauvaise dispersion dans l'eau ce qui indique que le greffage a bien eu lieu car la stabilité colloïdale dans ce milieu a été modifiée.

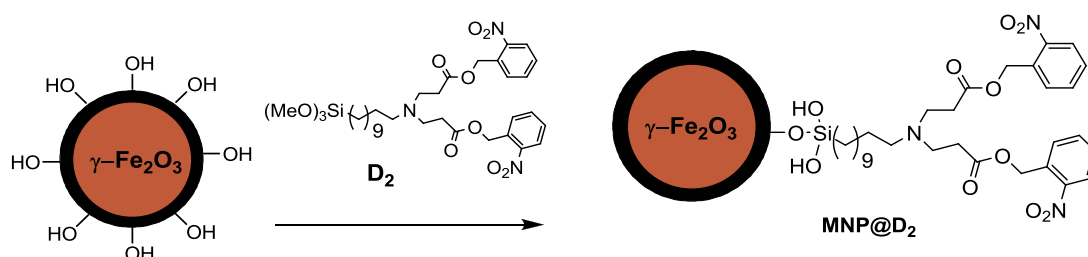


Figure 21. Réaction de greffage du composé $\mathbf{D}_2$.

Ces MNP@D_2 ont été caractérisées par IR-ATR et par HR-TEM (Figure 22). Les spectres IR-ATR (Figure 22 a) montrent la signature du composé $\mathbf{D}_2$ qui a donc bien été greffé à la surface des MNPs. En effet, on note la présence de la bande de vibration d'élongation de la fonction carbonyle de l'ester à 1736 cm^{-1} et la présence de la bande de vibration d'élongation asymétrique de la fonction NO_2 à 1527 cm^{-1} . Par contre, si on compare les intensités des bandes avec celles du greffage du composé $\mathbf{D}_1$ nous observons que nous avons greffé une quantité similaire de matière à la surface des MNPs.

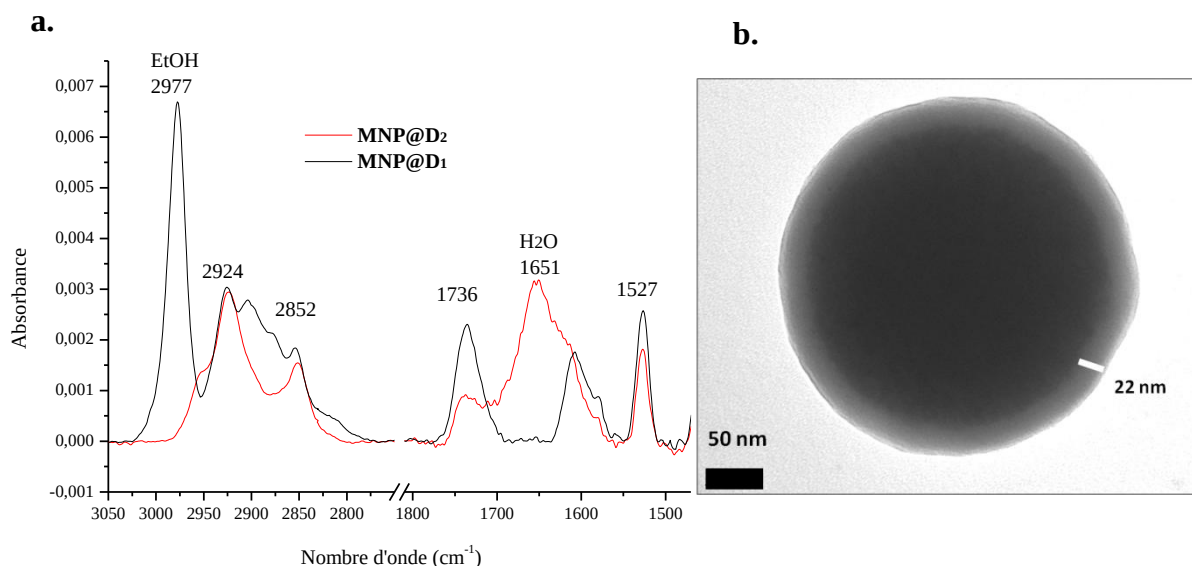


Figure 22. (a) Spectres IR-ATR de **MNP@D₁** et **MNP@D₂**, (b) Images HR-TEM de **MNP@D₂**.

Les images de HR-TEM (Figure 22 b) montrent que les **MNP@D₂** n'ont pas été détériorés ce qui semble confirmer que la dégradation de la coque de silice était due à la nature de la tête greffable (SiCl_3) pour les concentrations de l'ordre de 1.10^{-3}M . Cependant, la taille de la coque n'a pas augmenté significativement (20-22 nm) ce qui montre que nous avons une couche organique relativement fine.

L'étape suivante consiste en la déprotection des fonctions acide par irradiation des nanoparticules **MNP@D₂** (Figure 23). Pour ce faire, une suspension de ces nanoparticules dans l'éthanol a été exposée sous UV pendant 3 h. Ces nanoparticules seront notées **MNP@D₂@CO₂H**, elles ont été analysées en IR-ATR et en HR-TEM.

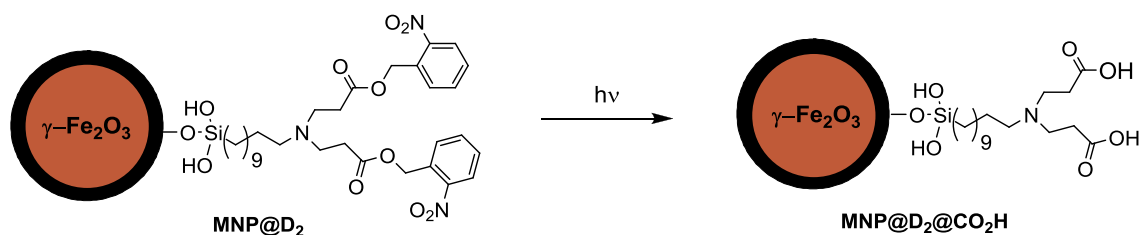


Figure 23. Réaction de photodéprotection des **MNP@D₂** en **MNP@D₂@CO₂H**.

Le spectre infrarouge de la Figure 24 (a) montre la disparition des fonctions NO_2 (ν_{as} : 1526 cm^{-1}) après irradiation. Cette disparition s'accompagne d'un décalage de la bande des carbonyles (ν_{co}) des esters à 1737 cm^{-1} à celle des acides à 1714 cm^{-1} . Ces changements dans le spectre indiquent clairement la présence de fonctions acide à la surface des

MNP@D₂@CO₂H. Par ailleurs, les bandes relatives aux groupements CH₂ (ν_{as} : 2913 cm⁻¹ ; ν_s : 2851 cm⁻¹) sont toujours présentes ce qui indique la conservation de la structure organique.

Les **MNP@D₂@CO₂H** ont été analysées par HR-TEM (Figure 24 b), nous avons observé que ces nanoparticules n'ont pas été dégradées après 3 heures de temps d'irradiation. L'épaisseur de la coque de silice n'a pas changé puisqu'elle est toujours de 20-22 nm.

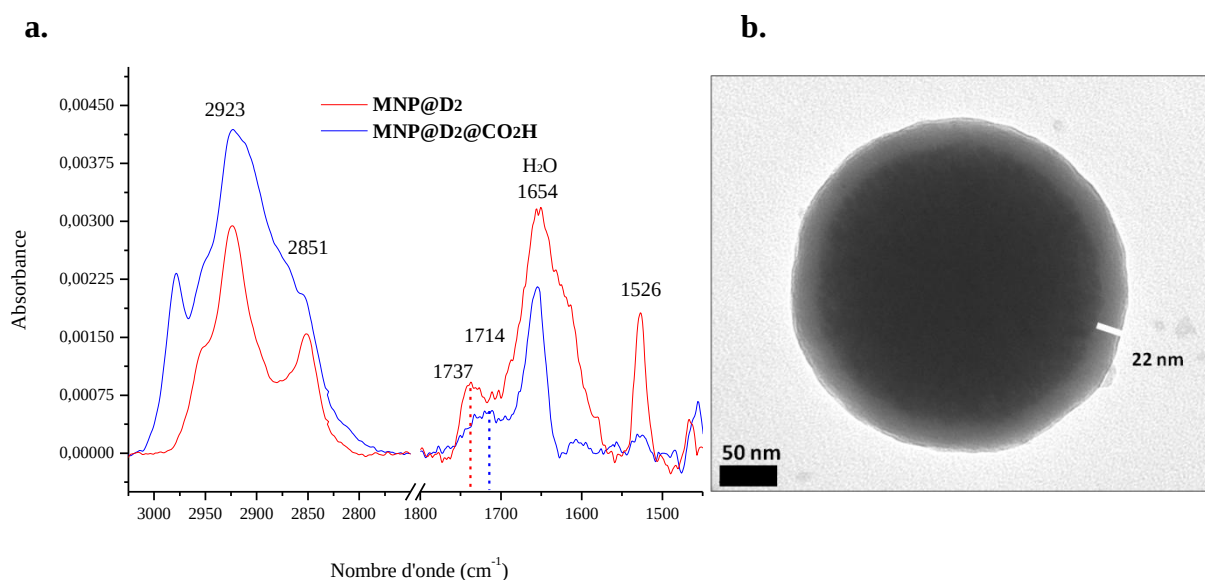


Figure 24. (a) Spectres IR-ATR de **MNP@D₂** et **MNP@D₂@CO₂H** ; (b) Image HR-TEM de **MNP@D₂@CO₂H**.

La dernière étape consiste à immobiliser les NP-pA sur la surface des **MNP@D₂** (Figure 25). Pour cette dernière étape, nous avons utilisé un protocole établi par Ademtech.

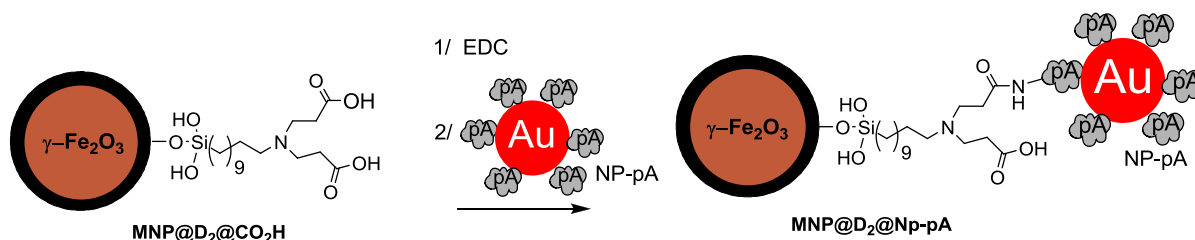


Figure 25. Réaction de couplages des **MNP@D₁@CO₂H** avec des NP-pA.

Tout d'abord, les fonctions acide de la surface des **MNP@D₂@CO₂H** sont activées à l'aide de l'EDC pendant 10 min. Ensuite, cette solution est remplacée par une solution contenant des NP-pA, et le mélange est agité pendant 2 heures. Ces MNPs sont ensuite lavées et analysées en HR-TEM (Figure 26). Comme lors du greffage de **D₁**, nous n'avons immobilisé qu'une faible quantité de NP-pA ce qui corrobore les données d'IR qui montrait un greffage similaire des composés **D₁** et **D₂**.

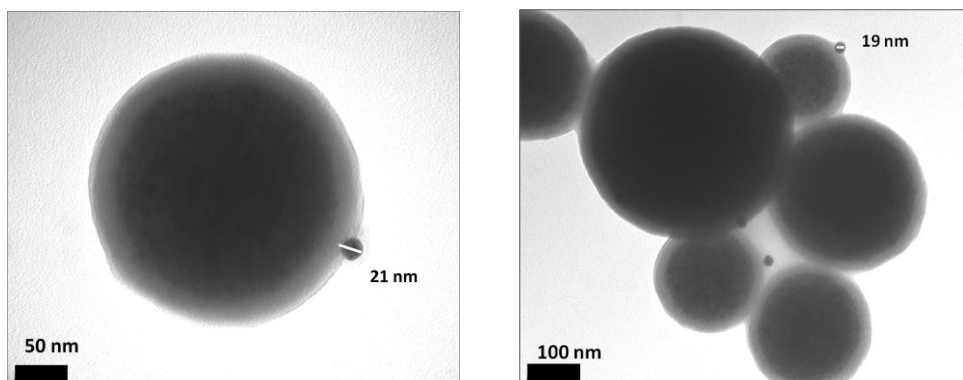


Figure 26. Images HR-TEM NP-pA immobilisées sur des $MNP@D_2@CO_2H$.

En résumé, le greffage du composé D_2 a été réalisé. Nous avons essayé d'améliorer les conditions de greffage en augmentant la concentration en précurseur silicié d'un facteur 10 grâce à l'utilisation du groupe $Si(OMe)_3$ et en utilisant un meilleur solvant de stabilisation des MNPs (THF). Malgré cela, le taux de greffage n'a pas été amélioré. L'utilisation de solvants organiques n'est donc pas adaptée au greffage de ces précurseurs sur les MNPs car ils ne permettent pas une stabilité colloïdale suffisante.

Par conséquent, en collaboration avec la société Ademtech, nous avons travaillé sur la mise au point d'un greffage en milieu hydroalcolique en catalyse basique. Ces conditions hydroalcoliques devraient être plus favorables pour maintenir une dispersion stable pendant le processus d'hydrolyse-condensation sol-gel et donc permettre une modification homogène et plus importante de la surface des MNPs. Dans ce cas, il ne s'agit pas de greffer une monocouche mais de former une seconde couche de silice hybride à la surface des particules.

4.3. Greffage du composé D_6 :

Nous avons donc choisi la fonction hydrolysable $Si(OEt)_3$ pour le greffage en milieu hydroalcolique (Figure 27). Ce groupement, moins sensible à l'hydrolyse (du fait de l'encombrement stérique imposé par les groupements éthoxysilanes permet de favoriser la formation d'une couche secondaire homogène sur la coque de silice native des MNPs.

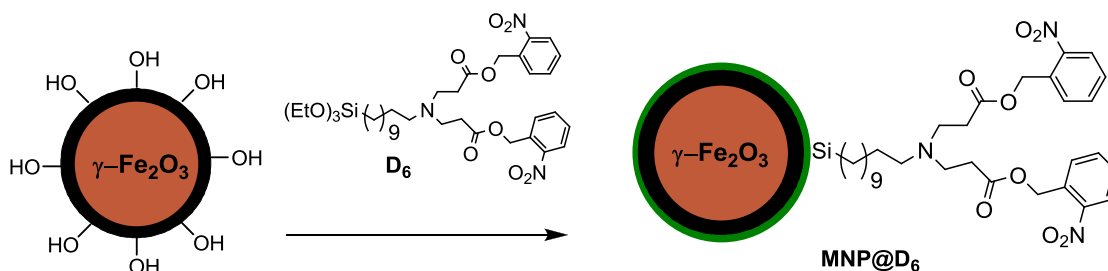


Figure 27. Réaction de greffage du composé **D₆**.

La synthèse de ce nouveau composé **D₆** est réalisée de la même manière que pour les composés **D₁** et **D₂**. Nous avons réalisé l'hydrosilylation du dérivé éthylénique (composé **7**) en présence d'un excès de triéthoxysilane et du catalyseur de Karstedt dans le toluène pendant deux heures. L'obtention du produit a été confirmée en RMN ^{13}C , avec une disparition des pics relatifs à la double liaison (139,2 et 114,1 ppm) et une apparition de nouveaux pics correspondants aux carbones sp_3 en α - et β - du Si (10,3 et 22,7 ppm).

Une fois le produit **D₆** obtenu, nous avons procédé au greffage (Figure 27) selon une méthode classique décrite initialement par Stobër c'est-à-dire en milieux hydro-alcoolique basique.¹⁸ Les MNPs sont préparées dans un mélange de solvant Ethanol/ H_2O (1/1 ; V/V) en présence d'un tensioactif (Triton 405 à 0,21% massique) et de l'ammoniaque (20% massique). Une solution d'agent de couplage silicié **D₆** dans l'éthanol est préparée pour avoir une concentration totale de 0,1 M. Cette quantité est ajoutée goutte à goutte pendant deux heures et demi (à 25°C). L'ajout lent durant cette période est très important. Il permet d'avoir un recouvrement homogène autour des MNPs et aussi d'éviter les agrégats dus à la polymérisation en solution d'une grande quantité d'agent de couplage. A la fin de l'addition, la température est portée à 40°C pendant 1 h dans le but d'achever la condensation. A la fin du greffage, nous observons que l'état colloïdal des MNPs est modifié car des agrégats sont observables dans l'eau, ce qui indique qu'une modification de la surface des MNPs a eu lieu. Après lavage des nanoparticules greffées (**MNP@D₆**), nous avons analysé ces MNPs en infrarouge par ATR et en HR-TEM. (Figure 28)

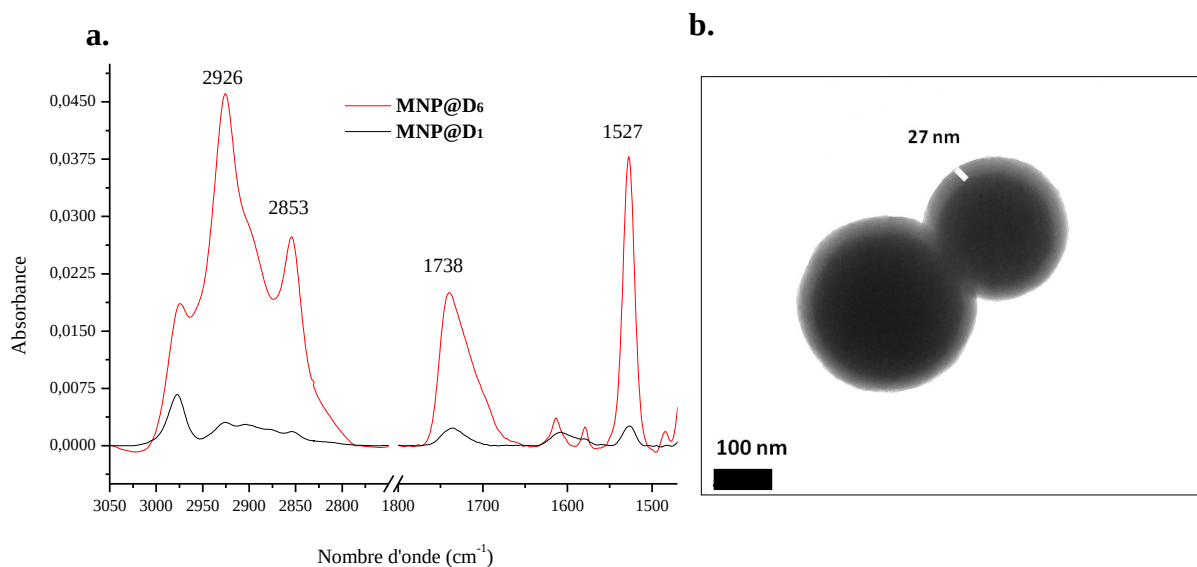


Figure 28. (a) Spectres IR-ATR de **MNP@D₁** et **MNP@D₆** ; (b) Image HR-TEM de **MNP@D₆**.

Les spectres infrarouges ATR (Figure 28 a) montrent la présence des bandes caractéristiques du composé **D₆**, c'est-à-dire des bandes correspondant aux modes de vibration d'élongation des CH₂ asymétriques et symétriques (2926 et 2853 cm⁻¹), de la fonction carbonyle (1740 cm⁻¹) et de la fonction NO₂ asymétrique (1527 cm⁻¹). Cependant, les intensités des bandes, pour le composé **D₆** sont largement supérieures à celles observées lors des greffages des composés **D₁** et **D₂**. Cette augmentation d'intensité indique le greffage d'une quantité beaucoup plus importante de **D₆** dans ces conditions hydroalcooliques.

L'analyse en HR-TEM (Figure 28 b) montre que le greffage est homogène sur la coque de silice. Nous remarquons également que l'épaisseur de la couche augmente de façon significative : sa taille est passée de 20 nm pour les MNPs natives à 27 nm et cela de manière homogène autour des **MNP@D₆**. L'analyse infrarouge, tout comme l'analyse par HR-TEM montrent que le greffage du composé **D₆** avec ces conditions expérimentales a permis d'augmenter la quantité de matière sur la surface des MNPs. Ceci nous indique également que le greffage dans un milieu hydroalcoolique en présence de catalyseur basique favorise la formation d'une couche hybride homogène d'une épaisseur de 5 à 7 nm.

L'étape suivante est la déprotection des fonctions acide de surface (Figure 29). Ainsi, les **MNP@D₆** ont été mises en suspension dans l'éthanol puis irradiées sous UV dans les mêmes conditions que pour les MNPs greffées avec les composés **D₁** ou **D₂**.

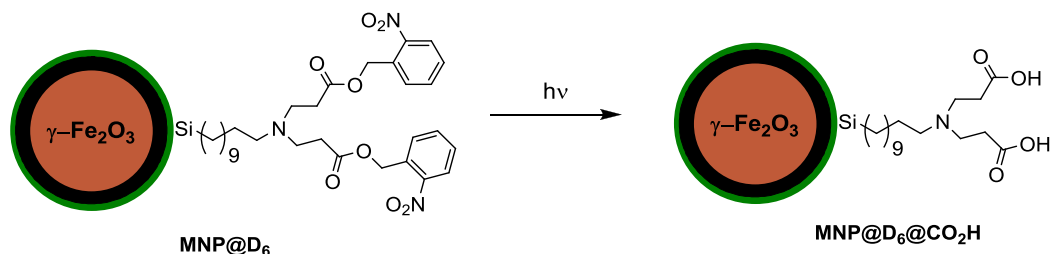


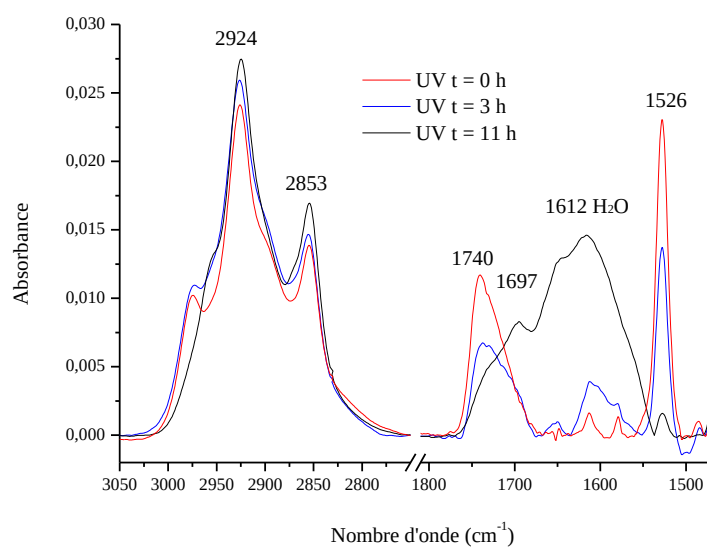
Figure 29. Réaction de photodéprotection des **MNP@D₂** en **MNP@D₂@CO₂H**.

Dans un premier temps, nous avons laissé les MNPs pendant 3 h sous UV. Il s'est avéré, après analyses infrarouge, que ce temps n'était pas suffisant pour une déprotection totale des fonctions ester nitrobenzyliques. Nous avons donc prolongé le temps d'irradiation jusqu'à 11 h ce qui nous a permis de déprotéger la totalité des fonctions nitrobenzyliques. Le temps de photo-déprotection plus long est cohérent avec l'épaisseur plus importante de la couche hybride.

L'analyse infrarouge sur des MNPs déprotégées (**MNP@D₆@CO₂H**) est présentée dans la Figure 30 (a). Nous remarquons que la bande de vibration relative à la fonction NO₂ (ν_{as}) à 1526 cm⁻¹ disparaît totalement après 11 h d'irradiation. La bande de vibration du carbonyle de l'ester à 1740 cm⁻¹ disparaît également pour laisser place à la bande carbonyle de l'acide à 1697 cm⁻¹. Les bandes relatives aux vibrations des groupes des CH₂ sont restées de même intensité.

Cependant, les analyses en HR-TEM montrent que les MNPs ont été dégradées après l'exposition prolongée aux UV. Après 11 h d'irradiation, l'intégrité morphologique n'est pas préservée comme le montrent les images de la Figure 30 (b). Cette dégradation serait due à l'échauffement du cœur d'oxyde de fer car la couche organique n'a pas été dégradée d'après l'analyse infrarouge.

a.



b.

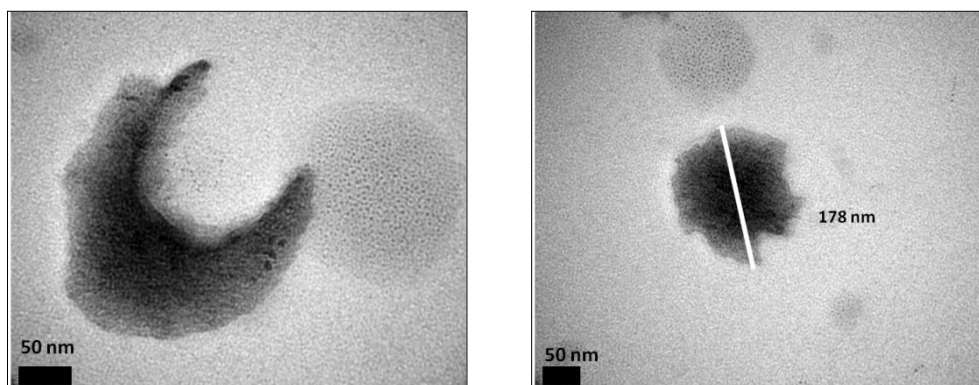


Figure 30. (a) Spectres IR-ATR de $\text{MNP@D}_6\text{@CO}_2\text{H}$ en fonction du temps ; (b) Image HR-TEM de MNPs greffées avec le composé D_6 après 11 h d'irradiation UV.

Dans cette partie, nous avons effectué le greffage du composé D_6 dans des conditions hydro-alcooliques. Ces conditions ont permis de réaliser une couche hybride homogène de 5 à 7 nm sur toute la surface des MNPs. Ce milieu permet une meilleure stabilité colloïdale des MNPs une modification de surface homogène. En revanche, après la photo-déprotection nous avons observé une dégradation des MNPs pour un temps d'irradiation élevé. Nous avons donc choisi de changer de stratégie en repensant les structures moléculaires des précurseurs organosilanes toujours dans le but d'obtenir une fonction COOH en surface.

5. Immobilisation de biomolécules : 2^{ème} stratégie

La seconde stratégie d'immobilisation de biomolécules (Figure 31) consiste à greffer sur la surface des MNPs des agents de couplage possédant des fonctions amines. Ensuite, à partir de la fonction amine nous générerons une fonction acide en les faisant réagir avec de l'anhydride succinique. Dès lors, la biomolécule sera immobilisée par liaison covalente entre ses fonctions amine et les fonctions acide libres à la surface des MNPs.

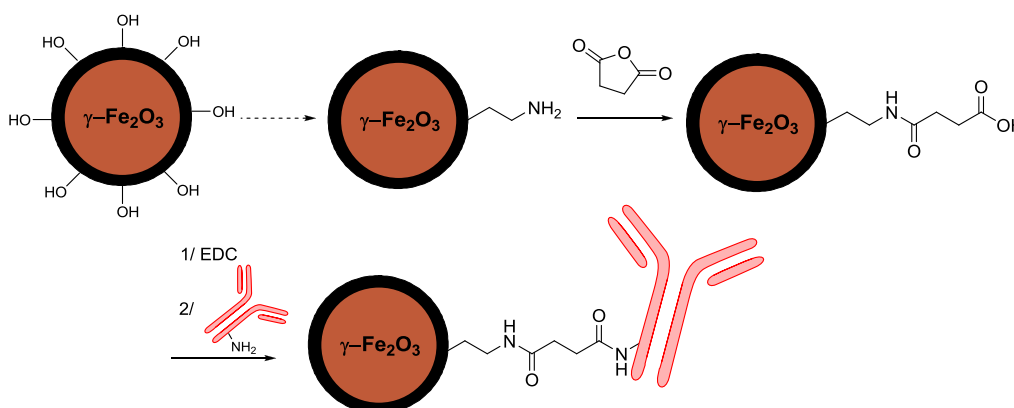


Figure 31. Schéma globale de la seconde stratégie d'immobilisation de biomolécules.

5.1. Synthèse et Greffage du composé **D₇** :

Le composé **D₇** est un dendron de première génération portant deux fonctions amine protégées et une fonction d'attache trichlorosilane (Figure 32). Les fonctions NH_2 terminale ont été protégées par des groupements phtalimides afin de prévenir leur réaction avec les groupements SiCl_3 .

Cette 2^{ème} stratégie a été étudiée en parallèle de la 1^{ère} stratégie avec des dendrons portant les groupements photolabiles ce qui explique l'utilisation du groupement silyle SiCl_3 , bien que nous ayons démontré dans la première partie de ce chapitre que ce groupement n'est pas favorable pour un greffage optimal.

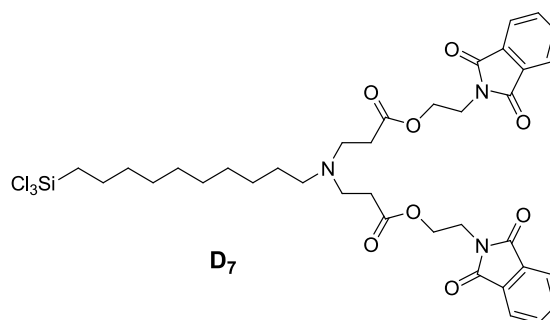


Figure 32. Structure moléculaire du composé **D₇**.

5.1.1. Synthèse du composé **D**₇ :

La synthèse du composé **D**₇ est représentée dans la Figure 33. Nous avons commencé par introduire la fonction phthalimide sur le bromoéthanol par une réaction de Gabriel³⁹ où un ion phthalimide (sous forme de sel : le phthalimide de potassium), réagit avec un halogénure d'alkyle (ici le bromoéthanol **15**), par substitution nucléophile, pour donner le *N*-(2-hydroxy-éthyl)phthalimide (**16**). Ce composé a été obtenu avec un rendement de 89%. La fonction alcool du composé **16** est alors estérifiée avec du chlorure d'acryloyle afin de former l'acrylate de *N*-(éthylène)-1-phthalimidyle (**17**) avec un rendement de 57%. L'ester **17** est couplé avec l'amine insaturée (**4**) par une double addition de Michael afin de former le dendron à deux branches de première génération (**18**), porteur de groupements phthalimides. Le composé **18** a été obtenu avec un rendement de 62% après une étape de purification sur colonne de silice. Le dendron **D**₇ a été synthétisé par réaction d'hydrosilylation qui permet l'insertion au point focal du groupe SiCl₃. L'hydrosilylation a été réalisée avec un excès de trichlorosilane et le catalyseur de Karstedt. L'obtention du produit avec un taux de conversion de 100% a été mise en évidence par RMN ¹H et ¹³C.

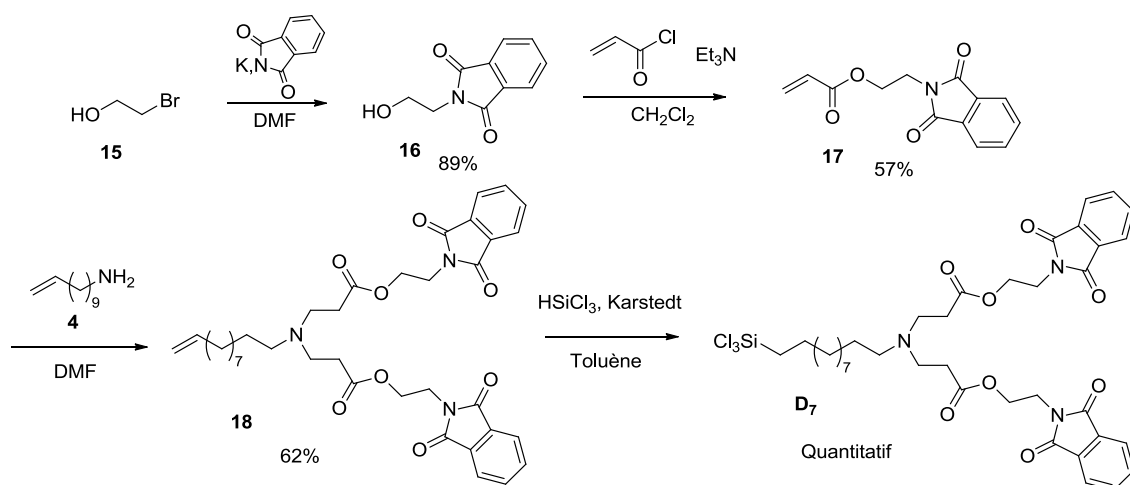


Figure 33. Synthèse du composé **D**₇.

5.1.2. Greffage et deprotection du composé **D**₇:

Nous avons procédé à l'étape de greffage du composé **D**₇ sur des MNPs en milieu anhydre (Figure 34). Les MNPs ont été dispersées dans le toluène anhydre après un passage progressif de l'eau vers le toluène anhydre. Le dendron **D**₇ est ajouté aux MNPs avec une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M à température ambiante. Cette concentration a été choisie par analogie à l'étude d'optimisation du greffage du composé **P** dans du toluène anhydre que nous

avons présenté au §3.2. Après une heure de réaction, l'état colloïdal des MNPs a évolué. En effet, elles sont devenues plus hydrophobes et donc plus facilement dispersables dans le toluène. Les MNPs obtenues (**MNP@D₇**) ont été analysées par infrarouge et par microscopie HR-TEM.

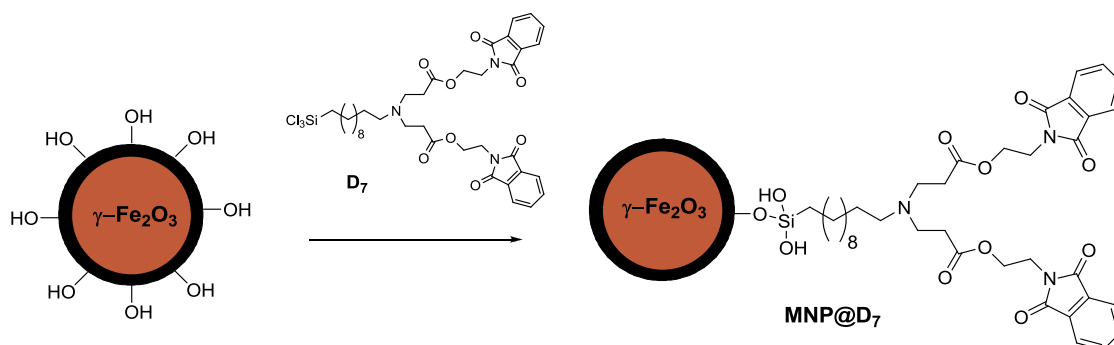


Figure 34. Réaction de greffage du composé **D₇**.

L'analyse infrarouge par ATR (Figure 35 a) montre le greffage de **D₇** avec la présence des bandes associées aux fonctions phthalimide et ester ainsi qu'aux groupes CH₂. En effet, l'apparition de deux bandes à 1773 cm⁻¹ et à 1713 cm⁻¹ correspond aux ν_{co} du phthalimide. De plus, à 1738 cm⁻¹, apparaît un épaulement qui correspond au ν_{co} de l'ester. Par ailleurs, nous notons également la présence des bandes associées aux vibrations des CH₂ à 2920 cm⁻¹ (ν_{as}) et à 2852 cm⁻¹ pour la (ν_s).

L'image de microscopie HR-TEM (Figure 35 b) montre que le greffage est homogène autour de la nanoparticule. L'épaisseur de la coque de silice reste inchangée à 22 nm ce qui montre que nous avons une monocouche moléculaire. Nous avons également démontré que la concentration en organosilane employée pour ce greffage est suffisante tout en permettant de garder l'intégrité de la coque de silice.

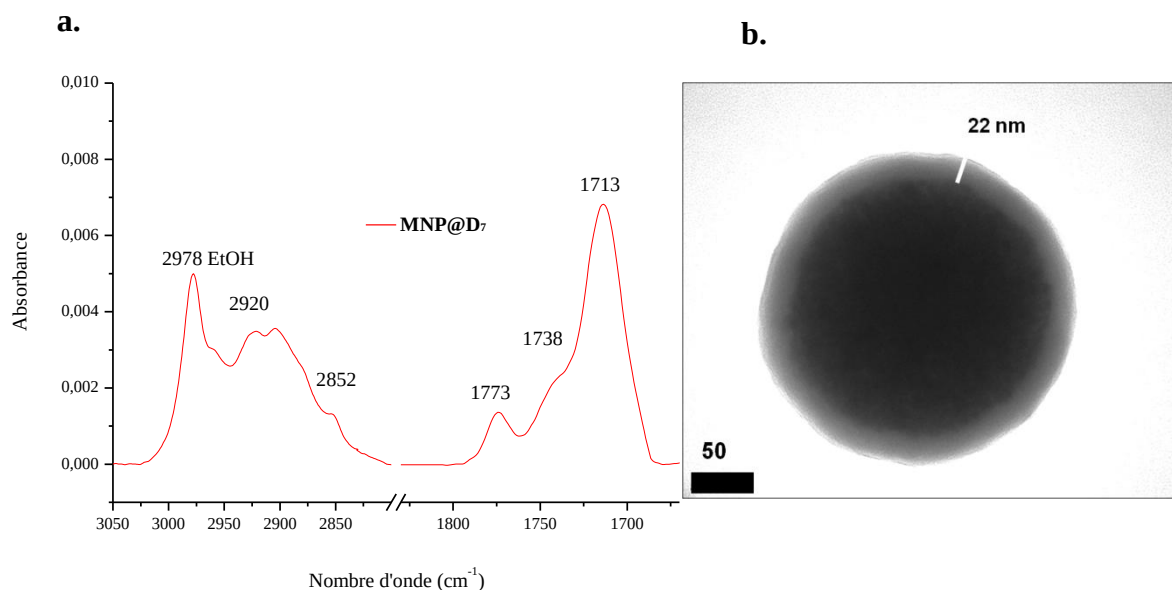


Figure 35. (a) Spectres IR-ATR de $MNP@D_7$; (b) Images HR-TEM de $MNP@D_7$.

La déprotection des groupements phthalimides, est réalisée par traitement avec de l'hydrazine (Figure 36).⁴⁰

Le produit secondaire formé au cours de la réaction (2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione), peut être éliminé par lavage basique ou acide. Dans le cas des MNPs, l'utilisation d'une base n'est pas recommandée car cette dernière risque d'endommager la monocouche formée sur la surface de silice.

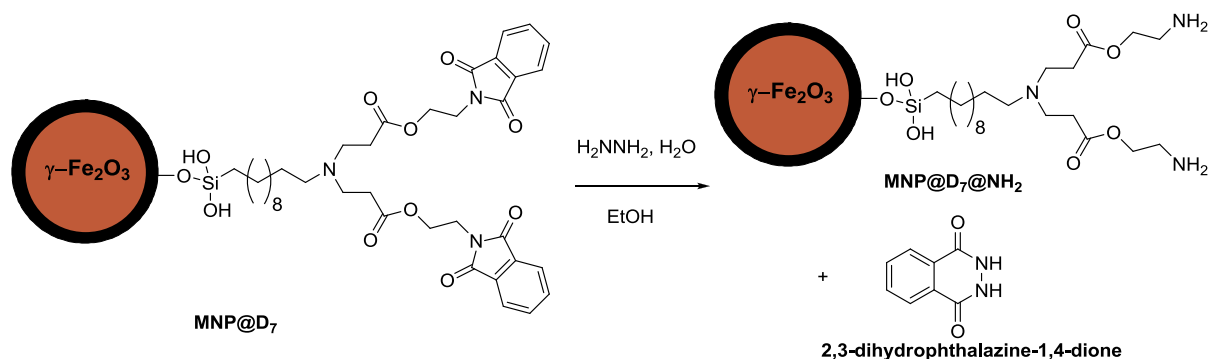


Figure 36. Schéma réactionnel de déprotection des $MNP@D_7$ en $MNP@D_7@NH_2$.

La déprotection du groupement phthalimide de $MNP@D_7$ a donc été réalisée par de l'hydrate d'hydrazine ($\text{N}_2\text{H}_4\text{-H}_2\text{O}$) puis de l'acide acétique dans les mêmes conditions que celles décrites par Martin et *al.*,⁴¹ à l'exception de la température, que nous avons réduite (de 70°C à 50°C ou 25°C ; Tableau 1) pour ne pas dégrader les MNPs. Nous avons donc fait

varier les paramètres de réaction pour déterminer les conditions optimales de déprotection (la quantité d'hydrazine, l'utilisation ou non de l'acide acétique).

Quantité d'hydrazine (en équivalent de silane)	Traitement acide	Température	Observation en IR des bandes à 1738 cm ⁻¹
3 éq		25°C	Aucun changement
3 éq	X	25°C	Aucun changement
30 éq		25°C	Aucun changement
30 éq	X	25°C	Aucun changement
300 éq		25°C	Légère dégradation
300 éq	X	25°C	Légère dégradation
3000 éq		50°C	Dégradation
3000 éq	X	50°C	Dégradation

Tableau 1. Tableau récapitulatif des conditions expérimentales de la réaction de déprotection du groupement phthalimide.

Les tests effectués sont rassemblés dans le Tableau 1. La quantité de dendron mise en jeu pour le greffage est de $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol (C : $2,5 \cdot 10^{-4}$ M) sur 30 mg de MNPs et le solvant utilisé est l'éthanol. Le nombre d'équivalents d'hydrazine indiqué dans le tableau est relatif à la quantité molaire de dendron **D₇** mise en jeu pour le greffage, calculée pour un taux théorique de greffage de 100%. Les observations répertoriées dans le tableau ont été reportées à partir de mesures infrarouge (Figure 37 a). Ainsi, on s'attend à ce que les bandes caractéristiques des ν_{CO} du phthalimide disparaissent tout en conservant la bande de vibration ν_{CO} de la fonction ester. Dans un premier temps, nous remarquons que le traitement avec l'acide acétique, lors de la déprotection, n'a aucun effet sur l'évolution de la réaction. Nous avons également noté qu'aucun changement n'est observé lors de l'utilisation de 3 et 30 équivalents d'hydrazine. En revanche, lors de l'utilisation de 300 équivalents nous observons une évolution du spectre infrarouge (Figure 37 a). En effet, les bandes relatives à la fonction ester à 1738 cm⁻¹ et celles du phthalimide à 1773 cm⁻¹ et 1713 cm⁻¹ baissent en intensité, néanmoins les bandes de vibrations du groupement CH₂ à 2920 cm⁻¹ (ν_{as}) et 2852 cm⁻¹ (ν_{s}) restent de même intensité au-delà de 3000 équivalent d'hydrazine, nous constatons une disparition complète des bandes de la fonction ester et de la fonction phthalimide ainsi qu'une conservation des bandes des groupements CH₂ en plus de l'apparition de nouvelles bandes à 3282 cm⁻¹, 3226 cm⁻¹, 1603 cm⁻¹ et 1577 cm⁻¹. Ce résultat est en opposition avec ce qui est attendu. A partir des analyses infrarouge nous concluons que l'hydrazine utilisée pour la déprotection de la fonction phthalimide attaque la fonction ester du dendrons **D₇** sans pour autant détériorer la couche organique à cause de la conservation des bandes relatives aux CH₂.

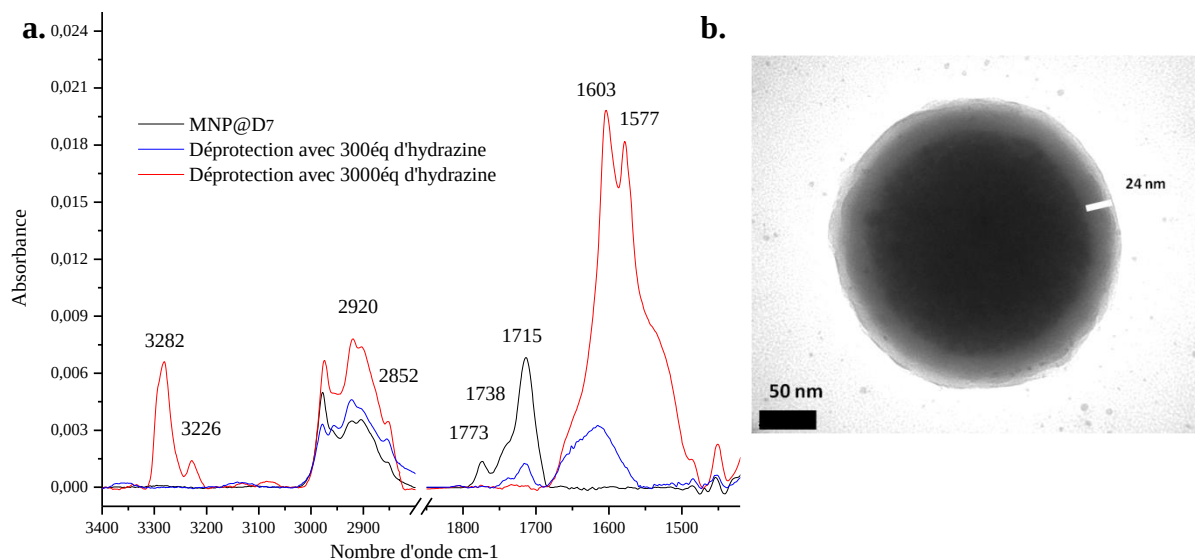


Figure 37. (a) Spectres IR-ATR de la déprotection des $MNP@D_7$;(b) Images HR-TEM $MNP@D_7$ déprotégé avec 3000 équivalents d'hydrazine.

L'analyse HR-TEM de la Figure 37 (b) vient confirmer cette analyse. En effet, l'image montre que l'intégrité des MNPs a été conservée. Nous pensons que l'hydrazine utilisée réagit avec les deux fonctions ester du composé D_7 pour former une fonction hydrazide comme cela est rapporté dans la littérature⁴² (Figure 38) ce qui se traduit par l'apparition des nouvelles bandes IR.

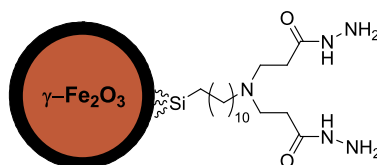


Figure 38. Représentation moléculaire des MNPs greffées par le dendron portant des fonctions hydrazides.

Ces nouvelles bandes paraissent correspondre à l'élongation des NH_2 à 3282 cm^{-1} et des NH à 3226 cm^{-1} et aux bandes amide I, amide II respectivement à 1603 cm^{-1} et 1577 cm^{-1} .⁴³ En conséquence, la fonctionnalité des MNPs qui est obtenue n'est pas celle que nous souhaitons. En revanche, cette fonctionnalité va être testée quand même pour l'immobilisation de molécule biologique (§5.4) car elle semble présenter des fonctions amine libres.

En résumé, dans cette partie nous avons synthétisé puis greffé en milieu anhydre, dans le toluène, un dendron de 1^{ère} génération portant d'une part, des fonctions amine protégées par des fonctions phthalimide et d'autre part par, des fonctions d'accroche trichlorosilylées.

Le greffage a été confirmé par Infrarouge et par l'imagerie HR-TEM. En revanche, lors de la déprotection des fonctions phthalimide par l'hydrazine, nous avons remarqué une fonctionnalisation inattendue mais néanmoins intéressante des dendrons par une fonction hydrazide.

5.2. Synthèse et greffage des composés APTES, AUTES, D₈ et D₉ : voie hydro-alcoolique

5.2.1. Synthèse d'AUTES, D₈ et D₉ :

Face aux difficultés rencontrées lors des greffages en milieu anhydre et à la déprotection des fonctions phthalimides, nous avons opté pour un greffage en milieu hydroalcoolique. Le greffage dans ce milieu ne nécessite pas la protection de la fonction amine. En revanche, il est nécessaire de modifier la fonction silane pour l'adapter au greffage dans ce milieu. Nous avons choisi le groupe triéthoxysilane car il a une cinétique d'hydrolyse/condensation plus lente que le groupe SiCl₃. De plus, pour étudier l'effet induit par les structures dendritiques, nous les avons comparées à des structures linéaires. Toutes les structures étudiées dans cette partie sont présentées dans la Figure 39. L'aminopropyl triéthoxysilane (**APTES**) ainsi que l'amino-undécyl triéthoxysilane (**AUTES**) ont une structure linéaire carbonée. Le composé **D₈** et le composé **D₉** ont des structures dendritiques polyamido-amine respectivement de 1^{ère} et de 2^{ème} génération et possèdent également un segment espaceur carboné. Nous étudierons également l'influence des différentes structures sur le greffage et sur l'immobilisation des biomolécules. La réaction de greffage ainsi que l'immobilisation des biomolécules ont été réalisées en collaboration avec la société Ademtech (Pessac).

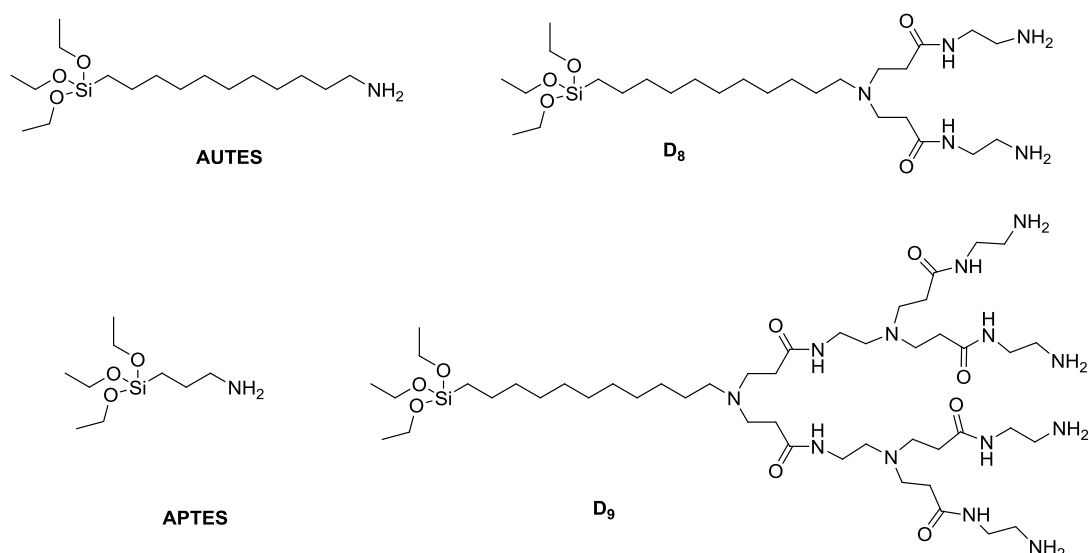


Figure 39. Structures moléculaires des composés **AUTES**, **APTES**, **D₈** et **D₉**.

Parmi ces composés, seul l'aminopropyle triéthoxysilane (**APTES**) n'a pas été synthétisé car il est commercial. Les autres composés sont issus d'une réaction d'hydrosilylation à partir des précurseurs éthyléniques correspondants. Cependant, les conditions expérimentales de cette réaction diffèrent légèrement d'un composé à l'autre. A chaque fois, un excès de silane (5 éq) et une quantité de Pt de (0,1) équivalent (catalyseur de Karstedt) sont mis en jeu pour la réaction. L'**AUTES** a été synthétisé à partir du composé **4** (1-amino-undécène) dans le toluène pendant 2 heures. Le composé **D₈** a été préparé à partir du composé **8** dont la synthèse a été décrite au chapitre II, dans le dichlorométhane à 30°C pendant 24 heures. Quant au composé **D₉**, sa synthèse a été réalisée en deux étapes à partir du composé **19** obtenu après amidation du composé **9** (décrit dans le chapitre II) à l'aide de l'éthylène diamine (Figure 40). L'hydrosilylation du composé **19** a été particulièrement difficile à mettre au point, en particulier pour le choix du solvant de réaction. Nous avons choisi l'éthanol anhydre comme solvant car il permet de solubiliser le composé **19**. Le composé **D₉** a été obtenu après 20 h à 60°C. Le bon déroulement de toutes ces réactions d'hydrosilylation ainsi que l'obtention des composés **AUTES**, **D₈** et **D₉** ont été suivis par la RMN ¹H et ¹³C.

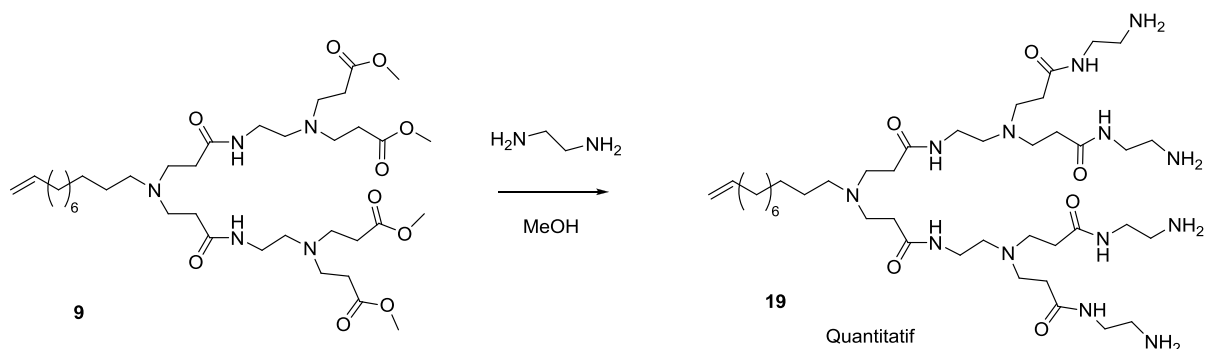


Figure 40. Synthèse du composé **19**.

5.2.2. Greffage de l'APTES, AUTES, **D₈** et **D₉** sur les MNPs:

La réaction de greffage des molécules sur les MNPs a été réalisée en collaboration avec la société Ademtech en milieu hydro-alcoolique. La procédure générale du greffage des composés **APTES**, **AUTES**, **D₈** et **D₉** est la même que celle employée lors du greffage du composé **D₆**. Les MNPs sont mises en suspension dans un mélange de solvant Ethanol/H₂O : 1/1 (V/V) en présence d'un tensioactif, le Triton 405 à 0,2% massique et d'ammoniaque à 20% massique. L'utilisation du Triton 405 permet une meilleure dispersion des MNPs et donc un greffage plus homogène. Une quantité d'agent de couplage est préparée pour avoir une concentration de 0,1 M dans le volume final. Cette quantité est ajoutée progressivement aux MNPs par un goutte à goutte lent soit sur une durée d'addition de 2h30 à 25°C. A la fin du greffage, nous avons observé des différences dans l'état colloïdal des MNPs dans l'eau en fonction de la nature des composés greffés. En effet, les MNPs greffées avec le composé **AUTES** présente un état d'agrégation plus important que les MNPs greffées par **APTES**, **D₈** et **D₉**. Ce comportement viendrait probablement de la faible polarité de ce composé car il présente une chaîne carbonée de longueur importante (11 carbones). Les MNPs greffées avec l'**APTES** et le composé **D₉** présentent les meilleurs états colloïdaux. Cependant, toutes les MNPs (**MNP@APTES**, **MNP@AUTES**, **MNP@D₈** et **MNP@D₉**) tendent à sédimenter après un certain temps (3-5 min). Ces dernières ont été analysées en infrarouge (en mode ATR), par microscopie HR-TEM, par Zétamétrie et par analyse thermogravimétrique.

Les résultats de l'analyse infrarouge sont présentés dans la Figure 41.

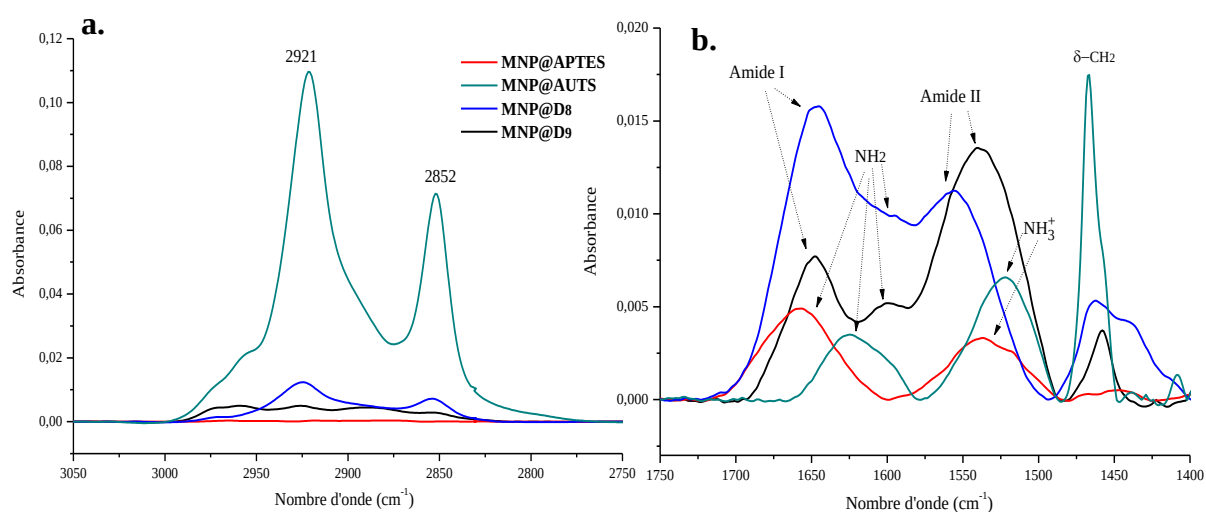


Figure 41. Spectres IR-ATR de **MNP@APTES**, **MNP@AUTS**, **MNP@D₈** et **MNP@D₉**. (a) région des méthylènes ; (b) région des carbonyles.

L'intensité des bandes d'élongation asymétrique des CH₂ à 2921 cm⁻¹ et symétrique à 2852 cm⁻¹, renseigne sur la quantité de matière. Une différence d'intensité importante entre les différents greffages a été observée. Le spectre où les pics sont les plus intenses concerne les **MNP@AUTS** puis respectivement **MNP@D₈**, **MNP@D₉** et **MNP@APTES**. Cette variation pourrait venir de la différence d'affinité des molécules avec le solvant hydro-alcoolique. Les positions des bandes entre 1750 et 1400 cm⁻¹ subissent un petit décalage d'une molécule à l'autre en raison des liaisons hydrogène qui sont plus ou moins fortes dans les différents systèmes.

Ainsi, concernant les **MNP@APTES** et **MNP@AUTS** qui présentent les mêmes bandes de vibration, nous retrouvons les bandes de déformation des NH₂ respectivement à 1655 cm⁻¹ et 1624 cm⁻¹. D'autres bandes sont également observées, respectivement à 1537cm⁻¹ et 1521cm⁻¹ et indiquent probablement la présence de la forme protonée de sel d'ammonium de la fonction amine. Le décalage entre les bandes de vibrations des deux composés est sûrement dû à une différence d'organisation et d'interaction des molécules sur la surface des MNPs.

Quant aux **MNP@D₈** et **MNP@D₉**, nous observons des bandes de vibrations aux mêmes nombres d'onde. La bande amide I apparaît à 1646 cm⁻¹ et la bande de déformation des amines à 1600 cm⁻¹. Par contre, concernant la bande amide II, nous relevons deux valeurs différentes entre les deux composés, elle est de 1556 cm⁻¹ pour **MNP@D₈** et de 1538 cm⁻¹ pour **MNP@D₉**.

Une analyse de l'état morphologique des MNPs après greffage a été faite par microscopie HR-TEM. Les images correspondantes sont présentées dans la Figure 42.

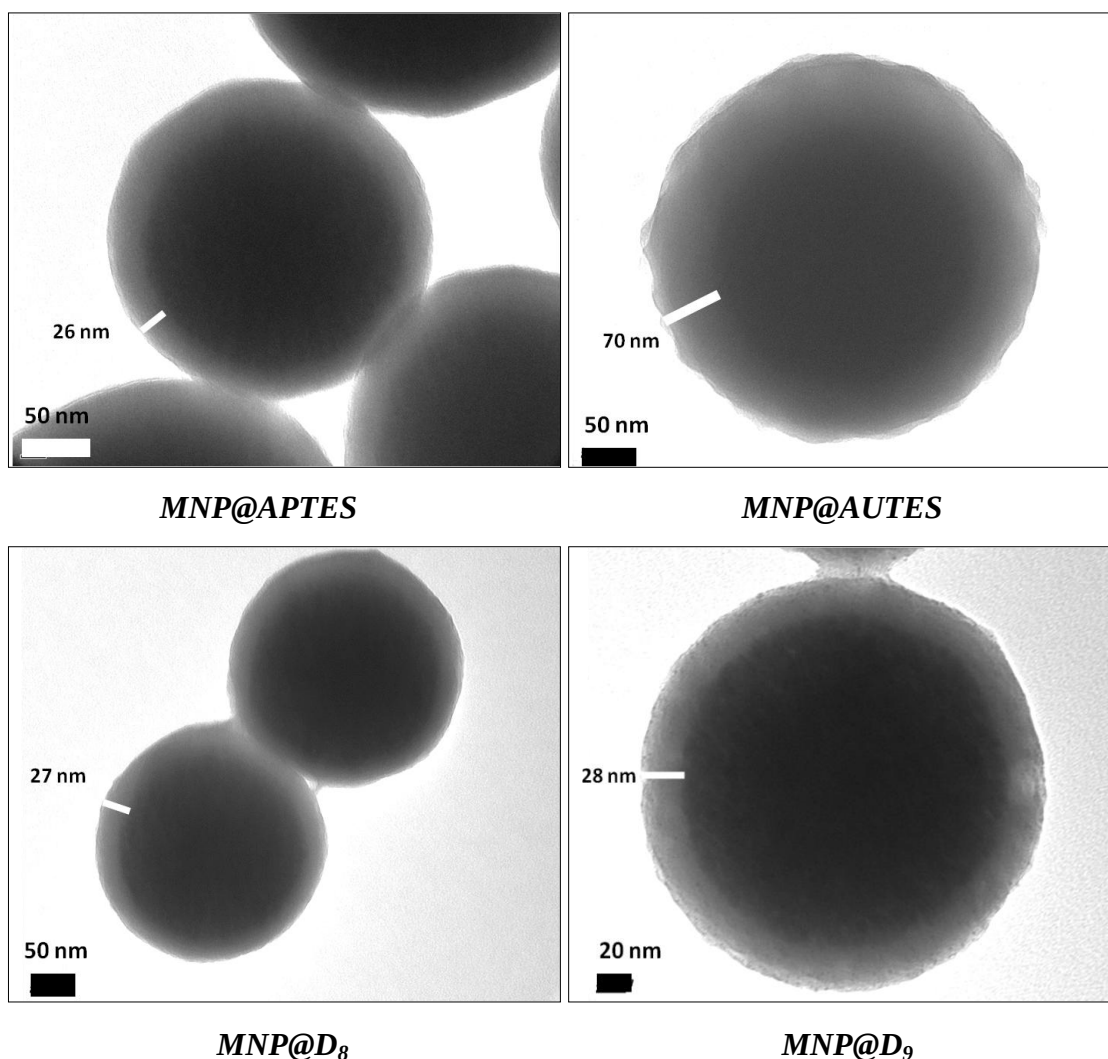


Figure 42. Images HR-TEM de *MNP@APTES*, *MNP@AUTES*, *MNP@D₈* et *MNP@D₉*.

Les images HR-TEM des particules *MNP@APTES*, *MNP@AUTES*, *MNP@D₈* et *MNP@D₉* (Figure 42), montrent que le greffage a eu lieu de manière homogène avec tous les composés utilisés. Nous remarquons également que la taille de la coque de silice a changé significativement. Pour mémoire, l'épaisseur de la couche de silice est de l'ordre de 20 nm sur les MNPs natives avant greffage. Nous notons que la couche la plus épaisse observée est celle de *MNP@AUTES* avec une épaisseur de 60-70 nm, les autres MNPs greffées présentent une couche de 25-30 nm. Ce résultat est cohérent par rapport aux résultats obtenus en infrarouge car l'intensité des bandes les plus fortes ont été enregistrées dans le cas de *MNP@AUTES*.

Des mesures de potentiel Zéta en fonction du pH ont été réalisées sur les différentes MNPs greffées. Ces mesures nous renseignent sur les charges de surface et nous apportent des

informations sur la stabilité colloïdale des suspensions des MNPs dans l'eau. Les différentes courbes de potentiel enregistrées sont présentées dans la Figure 43. Nous remarquons dans un premier temps que seules les MNPs qui ne sont pas greffées ont un profil complètement négatif dans la gamme de pH étudiée ce qui est dû au caractère acide de la silice nue. A pH neutre et basique, ces MNPs natives ont des valeurs de potentiel zéta assez importantes (inférieures à -70 mV) ce qui engendre une stabilité dans l'eau grâce aux répulsions électrostatiques. La valeur absolue maximale du potentiel zéta désigne la meilleure stabilité colloïdale des MNPs. Elle se situe à pH 10 avec une valeur de potentiel zéta de 88,9 mV pour les MNP natives. Par ailleurs, nous notons que le point isoélectrique (le pH à potentiel zéta nul) de ces MNPs est à pH 3.5.

Les **MNP@APTES**, **MNP@AUTES**, **MNP@D₈**, **MNP@D₉** ont un profil différent de celui des MNPs natives, ce qui confirme la modification de surface. Le point isoélectrique de ces différentes MNPs est compris entre un pH de 5,4 et 7,8 (**MNP@AUTES**: 5,4 ; **MNP@APTES**: 6,2, **MNP@D₉**: 7,2, **MNP@D₈**: 7,8). Ce résultat montre le caractère basique des MNPs en raison de la présence des fonctions amine. En revanche, les valeurs de potentiel zéta à pH basique ou neutre des MNPs modifiées sont relativement faibles. Ces faibles valeurs de potentiel engendrent une faible répulsion électrostatique entre les MNPs ce qui explique leur sédimentation assez rapide (2 à 5 min) que nous avons observée.

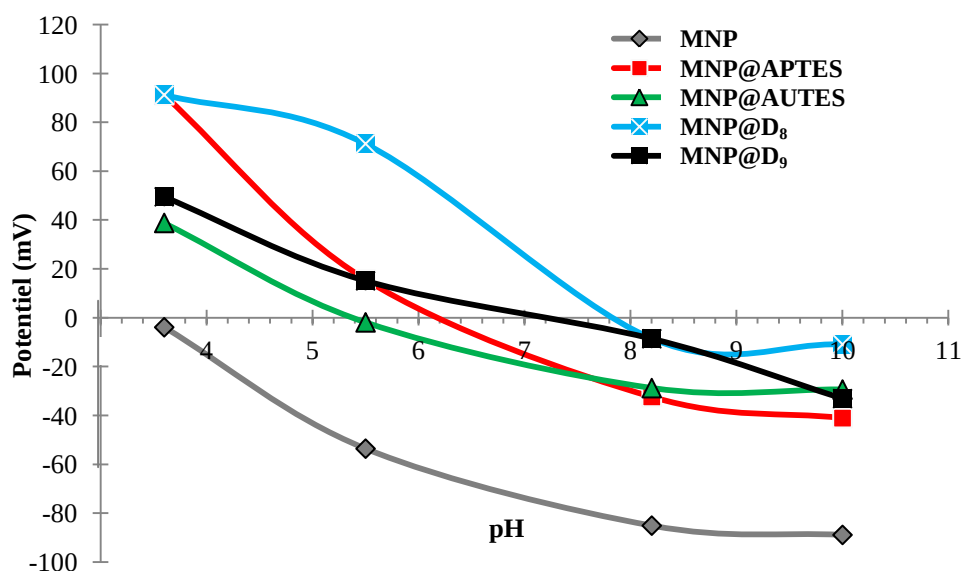


Figure 43. Potentiel zéta en fonction du pH des **MNP@APTES**, **MNP@AUTES**, **MNP@D₈**, **MNP@D₉** et de MNPs natives.

Une étude de thermogravimétrie (ATG) a été réalisée sur les MNPs (Figure 44) natives et modifiées par les différents précurseurs (**APTES**, **AUTES**, **D₈** et **D₉**). Cette analyse a été

réalisée sous atmosphère inerte (argon) avec une vitesse de chauffage de 5°C/min. Nous avons limité l'analyse entre 30°C et 650°C. Nous notons que les MNPs non modifiées subissent une perte de masse totale de 6,9 % entre ces deux températures. Cette perte serait due au phénomène de déshydratation de la silice (différentes couches d'eau physisorbées et les fonctions silanols cf. Chapitre II.2) et autres désorptions des solvants du cœur magnétique. Quant aux MNPs modifiées **MNP@APTES**, **MNP@D₉**, **MNP@D₈**, **MNP@AUTES**, elles subissent respectivement une perte de masse totale de 7,6%, 14,8%, 15,0% et 26,5% entre 30° et 650° C. Entre 30 et 150°C, il s'agit de la désorption d'eau physisorbée qui correspond à une perte de masse de 1 à 3% (**MNP@AUTES**: 0,9%, **MNP@D₈**: 1,6%, **MNP@D₉**: 2,2%, **MNP@APTES**: 2,7%). La dégradation de la partie organique commence à partir de 150°C. Entre 150° et 650°C, la perte de masse enregistrée est de 4,9% pour les **MNP@APTES**, 12,6% pour les **MNP@D₉**, 13,4% pour les **MNP@D₈** et 25,6% pour les **MNP@AUTES**. Cette différence de quantité de masse perdue est due à la différence de matière organique greffée sur les MNPs. Ces mesures sont en accord avec les différentes analyses d'infrarouge et microscopie HR-TEM. En effet nous avons noté que la quantité de matière la plus importante correspondait au greffage du composé **AUTES** et la quantité de matière la moins importante correspondait au greffage de l'**APTES**.

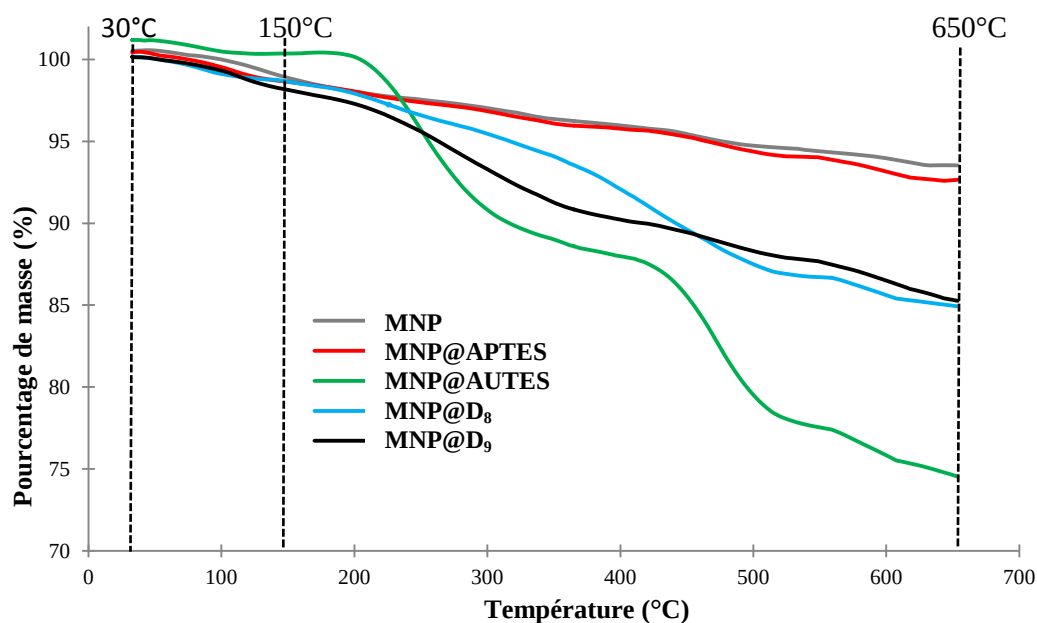


Figure 44. Etude thermogravimétrique des **MNP@APTES**, **MNP@AUTES**, **MNP@D₈**, **MNP@D₉** et de MNPs natives.

En résumé, le greffage des composés aminés a été réalisé en milieu hydroalcoolique dans les mêmes conditions expérimentales. Nous avons pu caractériser les différentes MNPs modifiées : en infrarouge, en microscopie HR-TEM, en analyse thermogravimétrique et en potentiel zêta. Nous avons confirmé la présence des fonctions amine sur les surfaces des MNPs modifiées. L'étape suivante consiste à générer des fonctions acide à partir des fonctions amine de surface

5.3. Introduction des fonctions COOH :

Nous avons généré des fonctions acide à la surface des MNPs en faisant réagir les fonctions amine primaires de **MNP@APTES**, **MNP@AUTES**, **MNP@D₈** et **MNP@D₉** avec de l'anhydride succinique en large excès dans le DMSO (Figure 45).

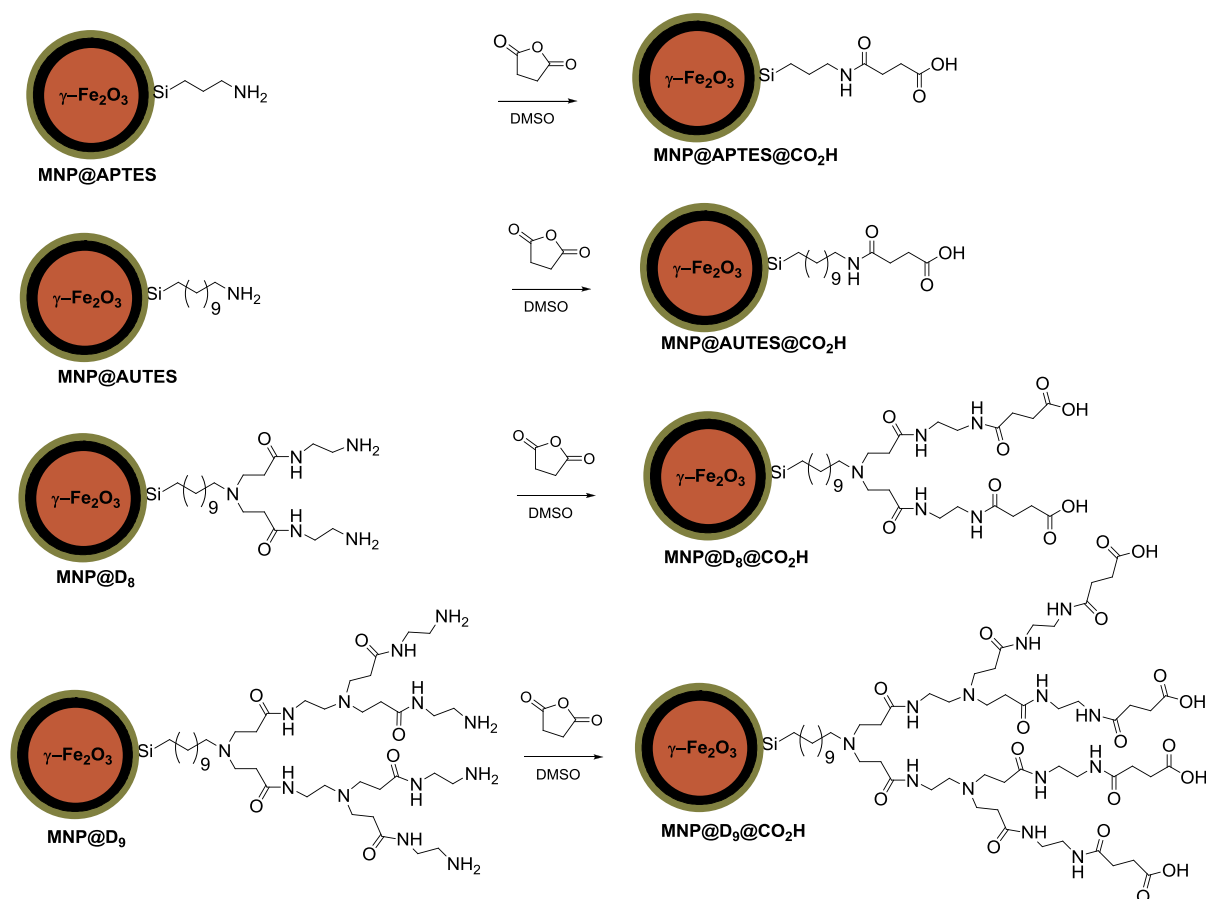


Figure 45. Réaction d'addition d'anhydride succinique sur les **MNP@APTES**, **MNP@AUTES**, **MNP@D₈**, **MNP@D₉**.

Cette réaction d'amidation provoque une ouverture de cycle de l'anhydride succinique. Elle permet la formation d'une liaison amide et d'une liaison acide libre. Pour éviter la cyclisation et la formation du succinimide, nous avons réalisé la réaction à

température ambiante pendant 15 h. Après ce traitement, nous remarquons que l'état colloïdal des MNPs dans l'eau a changé, leur suspension est devenue plus stable. Pour confirmer la modification de surface, les MNPs ont été caractérisées par infrarouge, microscopie HR-TEM et par potentiel zêta.

Les spectres infrarouges présentés dans la Figure 46 ont été réalisés après l'étape d'addition de l'anhydride succinique sur les MNPs, elles sont notées **MNP@APTES@CO₂H**, **MNP@AUTES@CO₂H**, **MNP@D₈@CO₂H** et **MNP@D₉@CO₂H**. Sur ces spectres, nous observons des intensités du même ordre que lors de l'étape précédente pour les bandes de vibration d'élongation des CH₂ à 2923 cm⁻¹ et à 2852 cm⁻¹. Nous remarquons également l'apparition d'une nouvelle bande à 1717 cm⁻¹ associée au ν_{CO} ce qui démontre la présence d'une fonction acide à la surface des MNPs. Cette bande n'a pas la même intensité sur les différents MNPs. Elle est plus intense dans le cas de **MNP@AUTES@CO₂H** et moins importante dans le cas **MNP@D₈@CO₂H**, **MNP@D₉@CO₂H** et **MNP@APTES@CO₂H**. Nous observons aussi la présence d'une bande amide I à 1664 cm⁻¹ et d'une bande amide II à 1556 cm⁻¹. La présence des bandes amide I et amide II dans le cas des **MNP@AUTES@CO₂H** et **MNP@APTES@CO₂H** montrent que l'addition de l'anhydride a bien eu lieu car avant cette réaction d'amidation, ces structures ne possédaient pas de fonction amide.

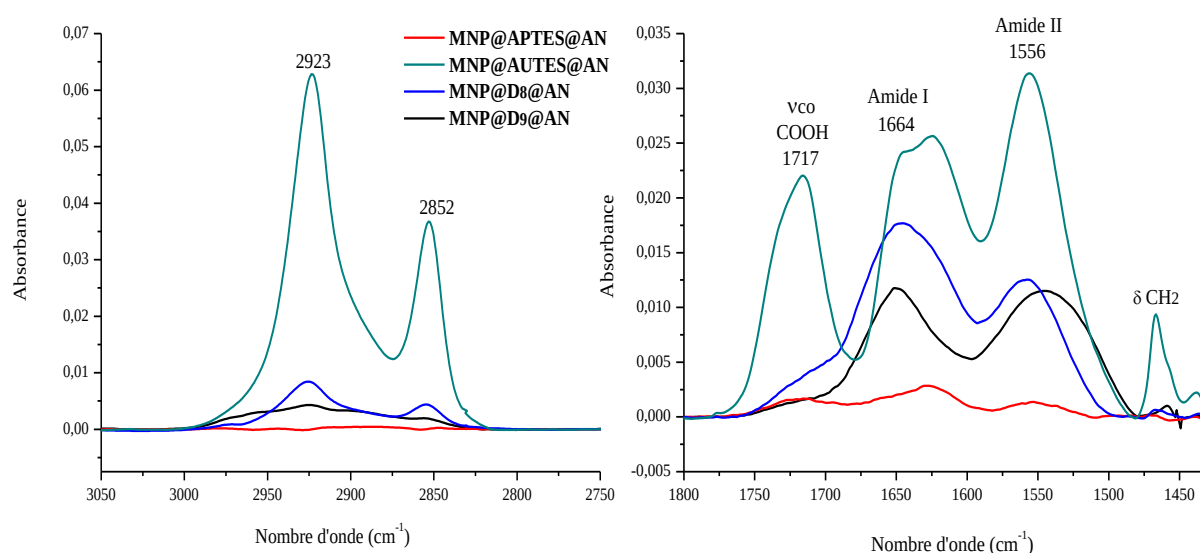


Figure 46. Spectres IR-ATR de **MNP@APTES@CO₂H**, **MNP@AUTES@CO₂H**, **MNP@D₈@CO₂H**, **MNP@D₉@CO₂H**. (a) Région des méthylènes, (b) région des carbonyles.

Des caractérisations par microscopie HR-TEM ont été également réalisées. Les images sont présentées dans la Figure 47. Elles révèlent une bonne conservation de l'intégrité des

billes. De plus, nous remarquons que l'épaisseur de la coque n'a pas changé avant et après le traitement avec l'anhydride. En effet, elle est de l'ordre de 60 nm dans le cas des **MNP@AUTES@CO₂H** et de 30 nm pour **MNP@D₈@CO₂H**, **MNP@D₉@CO₂H** et **MNP@APTES@CO₂H**.

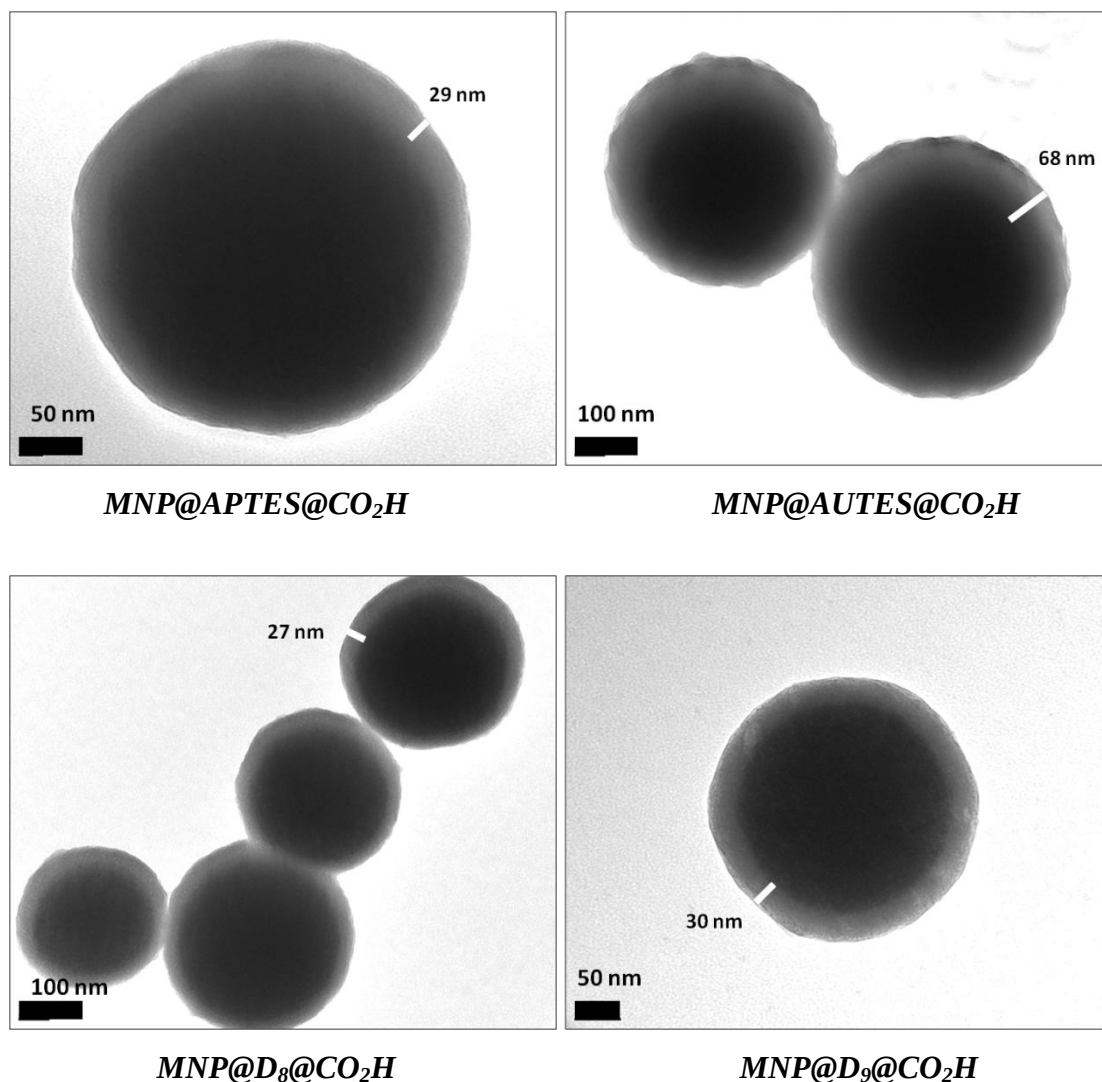


Figure 47. Images HR-TEM de **MNP@APTES@CO₂H**, **MNP@AUTES@CO₂H**, **MNP@D₈@CO₂H**, **MNP@D₉@CO₂H**.

Des mesures de potentiel zêta ont été réalisées et sont présentées dans la Figure 48. Nous observons un changement significatif de profil entre les MNPs avec des fonctions amine (Figure 43) et les MNPs avec des fonctions acide (Figure 48). En effet, en présence de fonctions acide, les MNPs présentent un profil avec des potentiels zêta négatifs sur presque toute la gamme de pH. Les valeurs absolues du potentiel sont toutes assez importantes de l'ordre de -80 mV à pH neutre et basique. Ce résultat montre le caractère acide des surfaces des MNPs. Nous notons aussi que l'état colloïdal des MNPs après ce traitement est assez

stable dans l'eau (la sédimentation n'apparaît qu'après plusieurs jours). Ceci est dû à la répulsion électrostatique des charges négatives présentes autour des MNPs. Nous notons cependant une différence entre les différents profils des différentes MNPs. Ainsi, les deux profils les plus négatifs correspondent aux structures linéaires **MNP@AUTES@CO₂H** et **MNP@APTES@CO₂H** contrairement aux **MNP@D₈@CO₂H** et **MNP@D₉@CO₂H**. Cette différence entre les différents profils est peut être due à la présence d'amine tertiaire sur les dendrons qui peuvent capter des protons libres. Ainsi, les MNPs se chargent positivement diminuant légèrement le potentiel négatif engendré par les fonctions acides.

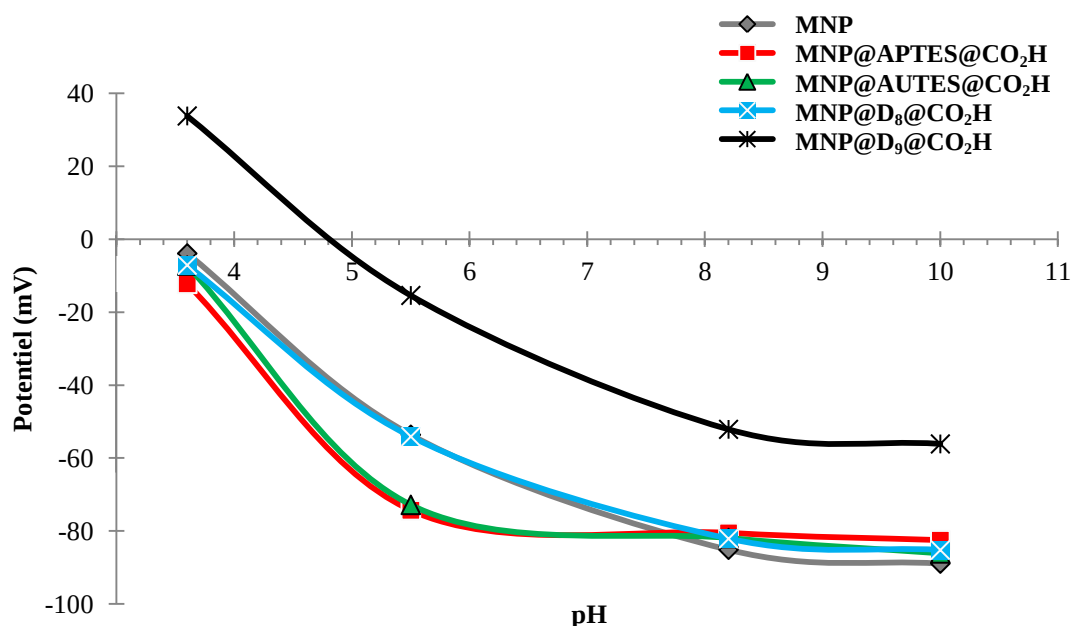


Figure 48. Potentiel zêta en fonction du pH de **MNP@APTES@CO₂H**, **MNP@AUTES@CO₂H**, **MNP@D₈@CO₂H**, **MNP@D₉@CO₂H** et de MNPs natives.

En conclusion, nous avons obtenu des MNPs avec des fonctions acide en surface qui ont été caractérisées par différentes techniques d'analyses. En effet, l'infrarouge nous a montré la présence de la bande ν_{co} associée aux acides, les images de microscopie HR-TEM nous ont montré une bonne conservation de l'état morphologique des billes. De plus, le potentiel Zêta nous a renseignés sur le caractère acide des MNPs et la bonne stabilité colloïdale des MNPs dans l'eau.

5.4. Immobilisations de biomolécules :

Dans cette partie nous allons étudier l'immobilisation de biomolécules à la surface des MNPs portant des fonctions acide. Afin de mener à bien cette étude et en particulier la

caractérisation des différentes immobilisations, nous avons utilisé des nanoparticules d'or colloïdal (20 nm), recouvertes de protéine A (NP-pA). Ces nanoparticules NP-pA nous ont servi de modèle d'étude pour l'immobilisation de molécules biologiques sur la surface des MNPs car nous pourrions visualiser ces immobilisations par HR-TEM. Dans un premier temps, nous avons commencé par tester l'immobilisation des NP-pA sur les **MNP@D₈@CO₂H** (Figure 49 a). La première étape est une activation des fonctions acide de **MNP@D₈@CO₂H**. Les MNPs ont été mises en suspension dans un tampon (pH : 6 ; à 37°C) en présence d'EDC pendant 10 minutes. Ensuite, après avoir retiré la solution d'EDC, 0,8 µg de protéine A sont incubées avec 1 mg de **MNP@D₈@CO₂H** activées pendant 2 h à 37°C. Après aimantation des MNPs, la couleur rouge a disparu de la solution de greffage, ce qui montre que la totalité de ces NP-pA d'or a été greffée sur la surface des MNPs. Une analyse de ces MNPs a été réalisée en microscopie HR-TEM (Figure 49 b).

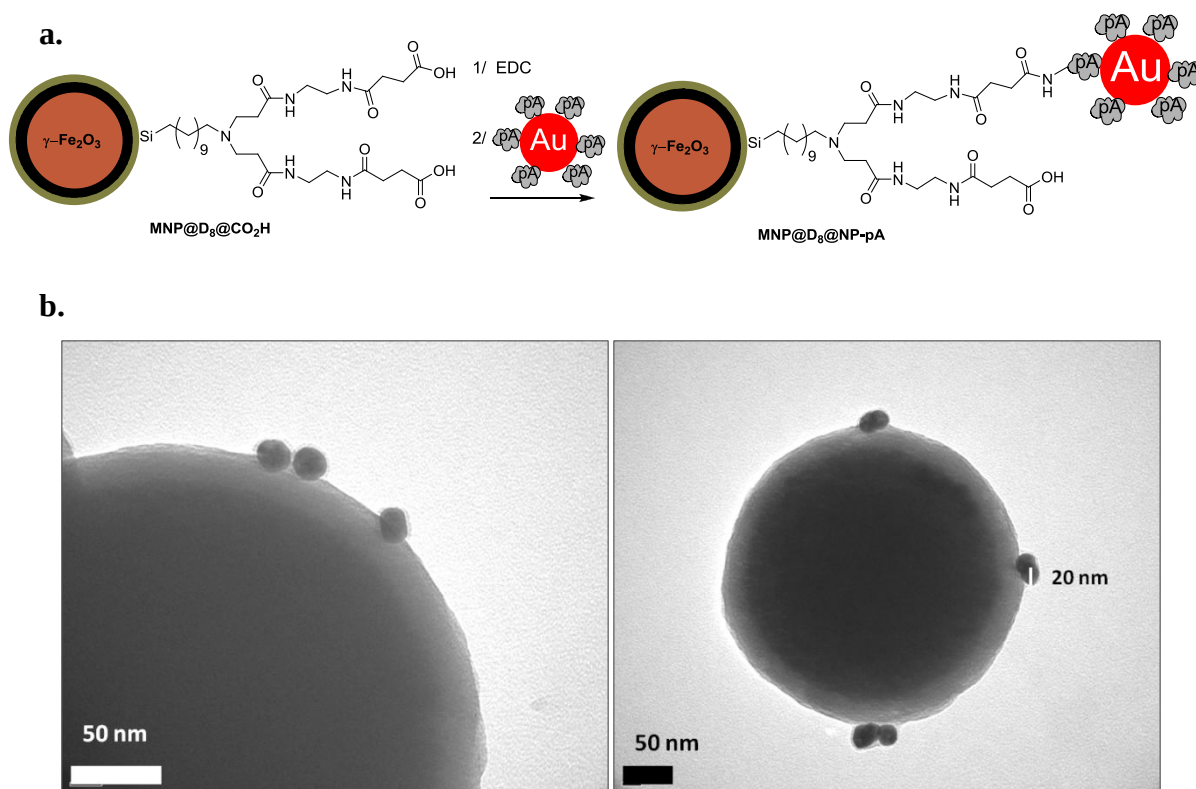


Figure 49. (a) Schéma réactionnel d'immobilisation de NP-pA sur **MNP@D₈@CO₂H**. (b) Images HR-TEM des **MNP@D₈@CO₂H** avec des NP-pA immobilisées sur leurs surfaces.

Sur les images HR-TEM nous observons la présence d'une quantité importante de nanoparticules d'or (NP-pA).

Nous avons donc, par cette première immobilisation montré l'accessibilité des fonctions acide de surface des **MNP@D₈@CO₂H** pour l'immobilisation de biomolécules.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu quantifier la quantité de biomolécules immobilisable sur les différentes MNPs greffées. Pour cela, nous avons greffés des anticorps de lapin (Immunoglobuline G (IgG) ; anticorps primaires (Ac I)) sur la surface des MNPs. L'Ac I est ensuite reconnu spécifiquement par un anticorps secondaire (Ac II) fluorescent (anticorps de chèvre anti-lapin FITC). La Figure 50 illustre le principe de cette étude. Grâce à une courbe étalon de fluorescence, il sera possible de connaître la quantité d'Ac I initialement immobilisé. Il est à noter que cette technique est basée sur la reconnaissance entre les deux anticorps. En effet, l'Ac II reconnaît la partie constante de l'Ac I. Cette étude ne va donc pas nous renseigner sur l'activité immunologique de l'anticorps mais uniquement nous permettre la quantification de la bio-fonctionnalisation.

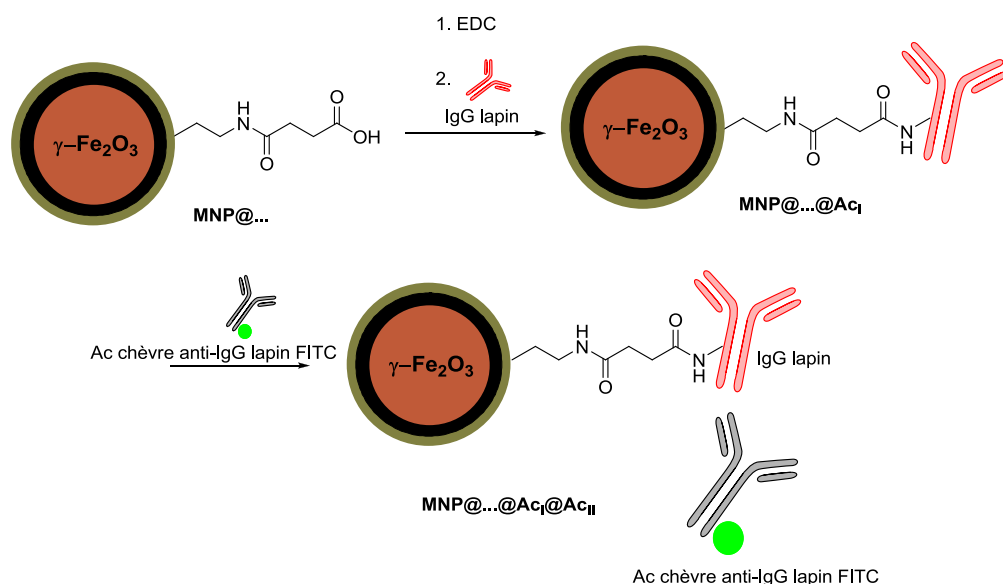


Figure 50. Schéma réactionnel d'immobilisation d'IgG lapin (Ac I) ainsi que leur reconnaissance avec l'Ac II chèvre anti IgG lapin FITC.

Des anticorps de lapin (IgG Ac I) ont donc été greffés sur toutes les surfaces acides (MNP@APTES@CO₂H, MNP@AUTES@CO₂H, MNP@D₈@CO₂H, MNP@D₉@CO₂H). Pour ce faire, ces nanoparticules ont été activées à l'aide de l'EDC et en présence d'un tampon et d'un tensioactif (Ademtech activated buffer). Ensuite, les anticorps primaires sont ajoutés aux MNPs activées après avoir retiré la solution d'EDC. Une incubation a eu lieu pendant 1h à 37°C. Le dosage des Ac I greffés est obtenu à l'aide de l'Ac II, introduits en large excès (150µg/mg de MNPs) par rapport au premier anticorps (Ac I) pendant 30 min à température ambiante. La lecture de la fluorescence est réalisée directement sur les MNPs à l'aide d'un lecteur microplaque fluorescent (Fluoroskan) et la quantité d'Ac I captée est déterminée à l'aide d'une courbe étalon préalablement enregistrée. En parallèle, une étude sur

la spécificité de l'immobilisation d'anticorps (IgG lapin) est réalisée. Dans ce cas, l'expérience est réalisée sans activation (sans EDC) et en présence Ac I. L'objectif est de quantifier l'effet de l'adsorption non spécifique sur les différentes surfaces étudiées. Dans la Figure 51, sont répertoriés les résultats de couplage d'anticorps sur les 4 surfaces présentées précédemment (**MNP@APTES@CO₂H**, **MNP@AUTES@CO₂H**, **MNP@D₈@CO₂H**, **MNP@D₉@CO₂H**) ainsi que les résultats relatifs au couplage non spécifique. Dans ce graphe (Figure 51 a) sont ajoutés les résultats de l'immobilisation des anticorps sur les surfaces **MNP@D₁@CO₂H** (§4.1.) et **MNP@D₇@NH₂** (§5.1.). Les **MNP@D₇@NH₂** ont été traitées au préalable avec de l'anhydride succinique pour générer des fonctions acides (**MNP@D₇@CO₂H**). Pour rappel, les **MNP@D₁** et **MNP@D₇** ont été préparées dans un milieu organique anhydre.

Dans la Figure 51 (a), sont montrés les résultats de l'immobilisation de 10 µg d'anticorps primaires sur les surfaces de (**MNP**, **MNP@APTES@CO₂H**, **MNP@AUTES@CO₂H**, **MNP@D₈@CO₂H**, **MNP@D₉@CO₂H**, **MNP@D₁@CO₂H**, **MNP@D₇@CO₂H**). Nous constatons qu'en présence d'EDC (couplage covalent) les MNPs natives n'immobilisent pas d'anticorps contrairement aux MNPs modifiées. Ceci indique que toutes les surfaces acide des différentes MNPs sont fonctionnelles. Cependant, les **MNP@D₁@CO₂H**, **MNP@D₇@CO₂H** présentent un taux de fonctionnalisation très faible. Ceci confirme les limites du greffage en milieu organique anhydre. En l'absence d'EDC (couplage non spécifique), nous remarquons une adhésion non spécifique très importante dans le cas des **MNP@AUTES@CO₂H**. Ce couplage non spécifique est probablement dû au caractère hydrophobe de l'**AUTES**. Il est montré dans la littérature, que des surfaces hydrophobes peuvent favoriser l'adsorption physique des biomolécules.⁴⁴ Les autres surfaces ne présentent pas de couplage non spécifique que ce soit les molécules dendritiques **MNP@D₈@CO₂H** et **MNP@D₉@CO₂H** ou la molécule linéaire **MNP@APTES@CO₂H**. Ceci est peut être dû à leur caractère plus hydrophile.

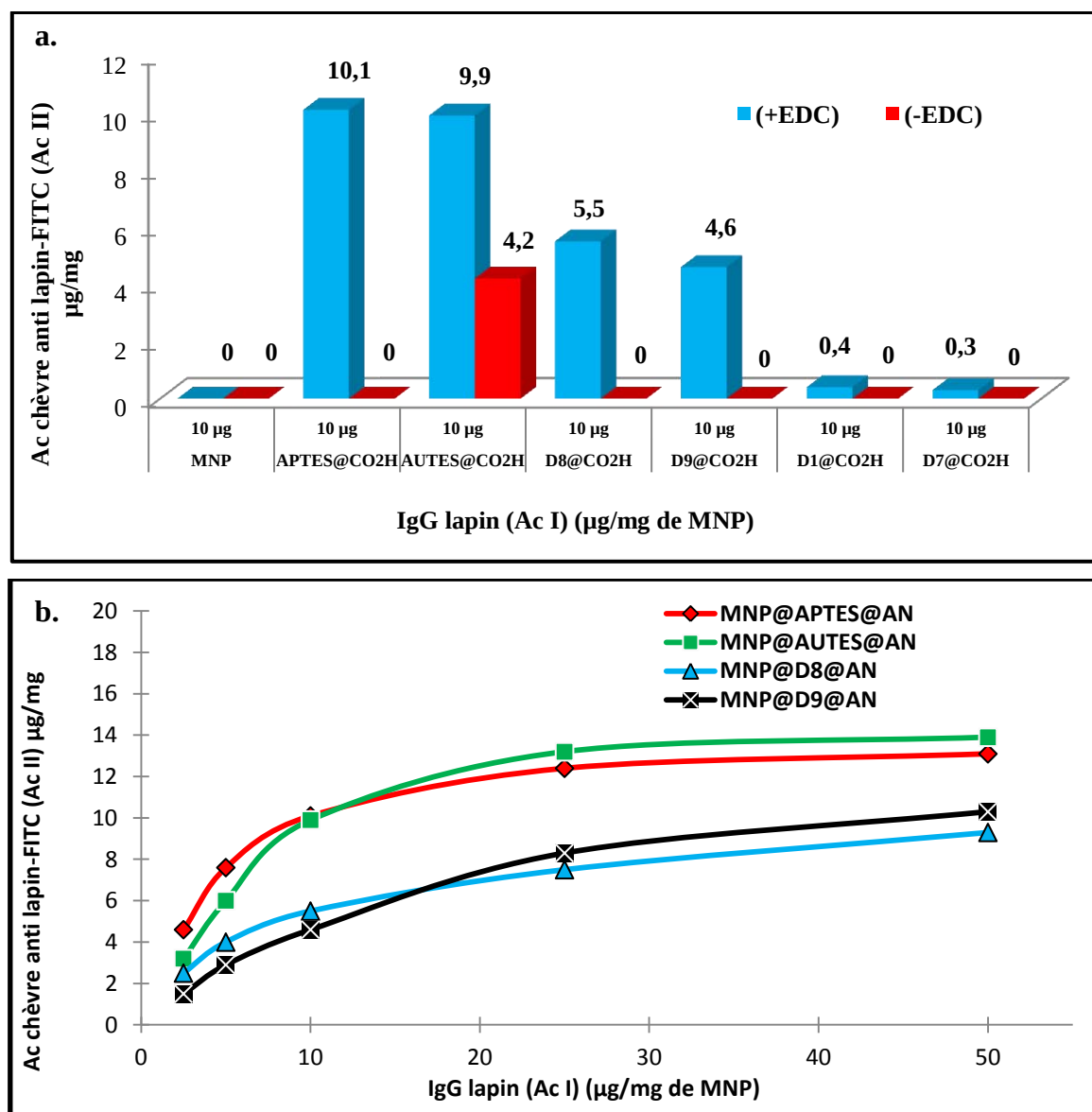


Figure 51. (a) Etude de spécificité (+EDC ; - EDC) d'immobilisation d'Ac I sur les MNPs ; (b) Etude de l'immobilisation d'Ac I sur les MNPs en fonction de la quantité.

Dans le graphe b de la Figure 51, nous avons montré l'immobilisation des anticorps secondaires sur 1mg de MNPs (MNP@APTES@CO₂H, MNP@AUTES@CO₂H, MNP@D₈@CO₂H, MNP@D₉@CO₂H) en fonction de la quantité d'anticorps primaire introduits. Ainsi, différentes quantités d'anticorps dans le milieu d'incubation sont ajoutées après l'étape d'activation (2,5 µg, 5 µg, 10 µg, 25 µg et 50 µg). Pour les quatre systèmes de MNPs étudiées, on observe la formation d'un plateau de l'intensité de fluorescence pour les quantités d'anticorps de lapin supérieures à 25 µg/mg de MNP. La valeur de ce plateau se situe entre 9 et 13 µg Ac II/ mg. On peut en conclure qu'à partir de ces valeurs, on a saturé les surfaces de MNPs en Ac I. A ce stade, nous n'observons pas d'effet dendritique sur la quantité d'anticorps immobilisés sur la surface des MNPs. Il sera donc nécessaire d'effectuer

des mesures complémentaires d'activité biologique des anticorps immobilisés ainsi que des mesures d'accessibilité des anticorps à la surface des MNPs afin d'examiner un éventuel effet dendritique.

Une étude en microscopie HR-TEM a également été menée afin de mettre en évidence par imagerie l'immobilisation de l'anticorps de lapin (Ac I) que nous avons réalisées. Nous savons que les anticorps seuls ne seront pas visibles par la microscopie TEM. Nous avons remplacé l'Ac II fluorescent de l'étape précédente par des nanoparticules NP-pA de 20 nm de diamètre. Il est à noter que de la même manière que l'Ac II, les protéines A reconnaissent la partie constante de l'Ac I greffé de manière covalente sur les MNPs. Nous avons choisi les **MNP@APTES@CO₂H** pour cette étude. Les NP-pA ont été incubées avec les **MNP@APTES@CO₂H** greffées Ac I et l'ensemble a été analysé en microscopie optique et en microscopie HR-TEM (Figure 52).

En microscopie optique (Figure 52 a), nous remarquons un phénomène d'agrégation des MNPs après l'introduction des NP-pA. Ce phénomène est dû à la reconnaissance entre la protéine A et l'anticorps greffé (Ac I) sur les MNPs. Les images HR-TEM correspondantes (Figure 52 b) montrent en effet la présence d'une grande quantité de nanoparticule d'or à la surface des MNPs, ce qui montre que le greffage homogène des anticorps sur la surface. En revanche, nous n'avons pas saturé la surface car la quantité de NP-pA mise en jeu n'était pas suffisante pour arriver à la saturation des surfaces des MNPs. Nous constatons néanmoins que les nanoparticules d'or ne s'agrègent pas entre elles, elles se positionnent régulièrement à la surface des MNPs. L'agrégation physique observée en microscopie optique provient donc de la reconnaissance de deux MNPs par une particule NP-pA (Figure 52 c). Les images HR-TEM confirment cette hypothèse puisque nous observons que les NP-pA se trouvent souvent à l'interface de deux MNPs.

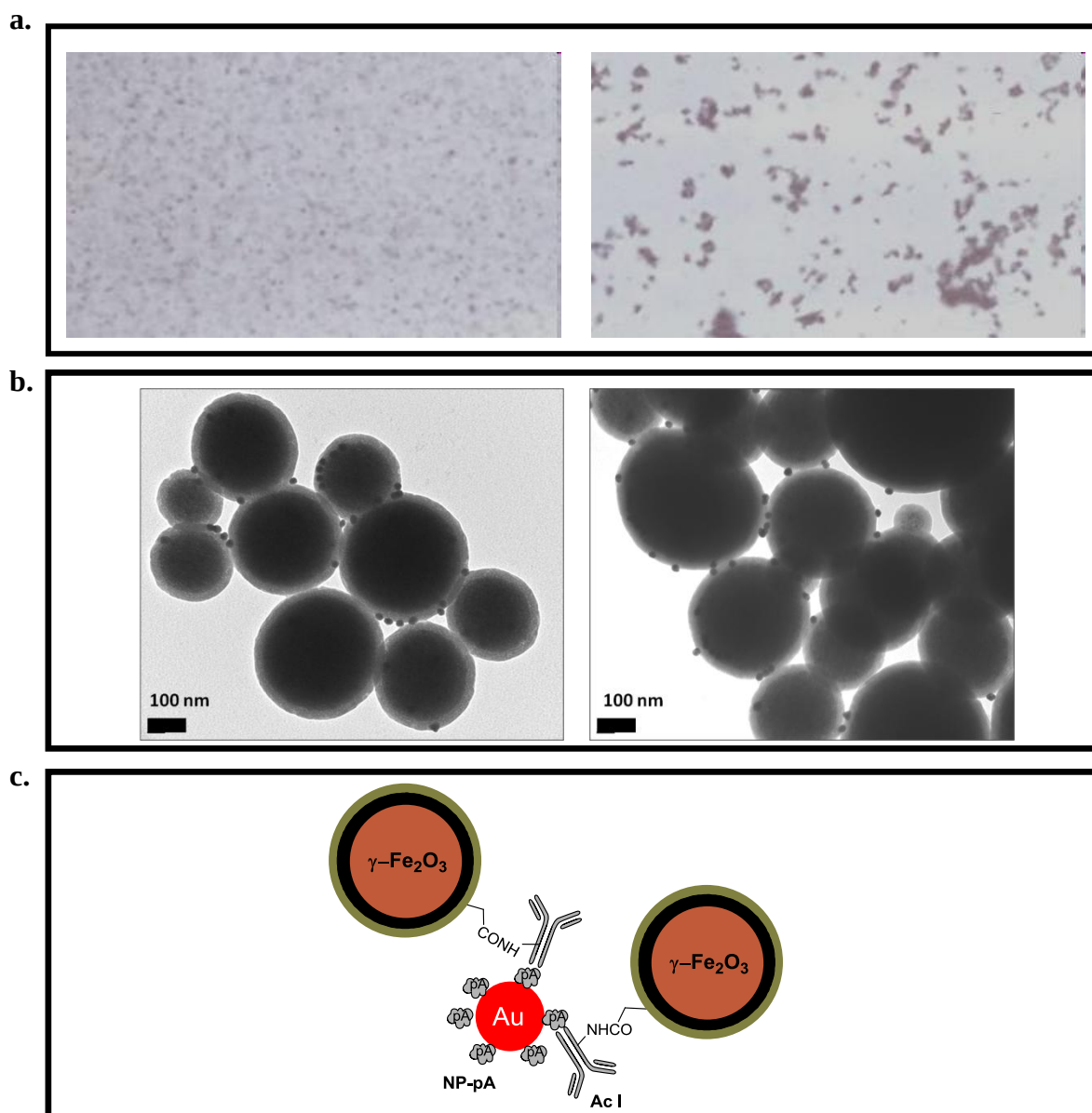


Figure 52. (a) Images optique $\times 100$ de **MNP@APTES@CO₂H** en interactions avec les **Np-pA** (à gauche), **MNP@APTES@AcI** en interactions avec les **NP-pA** (à droite) ; (b) Images HR-TEM après interaction des **MNP@APTES@CO₂H@AcI** avec **NP-pA**; (c) Représentation des images HR-TEM obtenues.

6. Conclusion :

Dans ce chapitre, nous avons examiné la possibilité d'utiliser les MNPs ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$) pour l'immobilisation de molécules biologiques pour une application en protéomique. La surface SiO_2 doit être modifiée pour permettre une immobilisation covalente des biomolécules. L'objectif était donc de fonctionnaliser ces surfaces avec des groupes CO_2H , ce qui permet, en utilisant la chimie des carbodiimides, de générer des esters activés qui réagiront finalement avec les NH_2 des résidus lysines des biomolécules.

Deux principales voies ont été utilisées pour le greffage :

- la méthode en milieu organique anhydre compatible avec la présence des groupements SiCl_3 ou $\text{Si}(\text{OMe})_3$ sur l'agent de couplage silicié. L'utilisation de ces deux groupements silyle a permis d'obtenir une monocouche moléculaire inhomogène sur la surface des MNPs. En effet, ces MNPs ne présentent pas de stabilité colloïdale en milieu organique lors de l'étape de fonctionnalisation. Il en résulte une faible quantité CO_2H utilisable pour l'immobilisation de molécules biologiques.
- La méthode hydroalcoolique qui a permis une modification homogène de la surface des MNPs, conduisant à une couche hybride de silice de 5 à 70 nm en fonction des molécules.

L'utilisation de dendrons avec des groupements protecteurs photolabiles pour obtenir des fonctions CO_2H n'a pas abouti. En effet, l'étape de photodéprotection qui nécessite une irradiation prolongée a conduit à une dégradation des MNPs.

Nous avons donc envisagé une nouvelle stratégie pour générer des groupements CO_2H en surface des MNPs. Des molécules dendritiques et linéaires présentant des fonctions NH_2 ont été greffées. Les fonctions CO_2H ont été ensuite générées en utilisant de l'anhydride succinique. Ainsi, nous avons pu greffer différentes structures : des molécules linéaires portant une chaîne longue (**AUTES**) et une chaîne courte (**APTES**), des structures dendritiques ayant 2 branches (**D₈**) et 4 branches (**D₉**). A la suite des greffages, nous avons étudié l'effet de la structure sur l'immobilisation de biomolécules. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests de reconnaissance immunologique afin de quantifier la quantité de biomolécules immobilisées sur les MNPs. Nous avons remarqué que l'utilisation d'une chaîne hydrophobe (**AUTES**) engendrait une immobilisation non spécifique importante sur les MNPs. Ce couplage non spécifique est inexistant lors de l'utilisation de structures dendritiques. Nous avons également remarqué que la densité de biomolécules immobilisées sur les MNPs était similaire quelque soit la structure linéaire ou dendritique, ce qui montre que les surfaces sont bien toutes fonctionnelles. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet dendritique positif sur la quantité biomolécules immobilisée. Une étude plus approfondie de l'activité biologique et de l'accessibilité des biomolécules immobilisées sur ces systèmes permettrait peut être d'observer un effet dendritique des structures greffées à la surface de MNPs.

Bibliographie :

- [1] (a) R. G. Chaudhuri, S. Paria, *Chem. Rev.*, **2010**, 112, 2373. (b) S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L. V. Elst, R. N. Muller, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 2064. (c) A. H. Lu, E. L. Salabas, F. Schüth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, 6, 1222. (d) Y. Zhu, L. P. Stubbs, F. Ho, R. Liu, C. P. Ship, J. A. Maguire, N. S. Hosmane, *Chem. Cat. Chem.*, **2010**, 2, 365.
- [2] (a) O. V. Salata, *J. Biotechnol.*, **2004**, 2, 1. (b) C. C. Berry, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2009**, 42, 224003. (c) Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **2003**, 36, R167. (d) R. F. Rezai, *Biomedical Engineering : Frontiers and challenges*, 2011, Intech (e) D. Horák, M. Babič, M. J. Beneš, *J. Sep. Sci.*, **2007**, 30, 1751.
- [3] R. Westermeier, T. Naven, H. R. Höpker, *Proteomics in Practice: A Guide to Successful Experimental Design*, 2008, Wiley-VCH.
- [4] H. J. Lee, K. S. Jang, S. Jang, J. W. Kim, H. M., Yang, Y. Y. Jeong, J. D. Kim, *Chem. Com.*, **2010**, 46, 3559.
- [5] R. M. Cornel, U. Schwertnau, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*, 2003, Wiley-VCH.
- [6] A. K. Gupta, M. Gupta, *Biomaterials*, **2005**, 26, 3995.
- [7] Y. Sahoo, A. Goodarzi, M. T. Swihart, T. Y. Ohulchanskyy, N. Kaur, E. P. Furlani, P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 3879.
- [8] N. Fauconnier, A. Bee, J. Roger, J. N. Pons, *Progr. Colloid. Polym. Sci.*, **1996**, 100, 212.
- [9] (a) R. Zhu, W. Jiang, Y. Pu, K. Luo, Y. Wu, B. He, Z. Gu, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 5464. (b) Y. Sahoo, H. Pizem, T. Tcipi, D. Golodnitsky, L. Bustein, C. N. Sukenik, G. Markovich, *Langmuir*, **2001**, 17, 7907.
- [10] C. Yee, G. Kataby, A. Ulman, T. Prozorov, H. White, A. King, M. Rafailovich, J. Sokolov, A. Gedanken, *Langmuir*, **1999**, 15, 7111.
- [11] (a) A. D. Angheluta, A. Dascalu, A. Fifere, A. Coroaba, L. Pricop, H. Chiriac, V. Tura, P. Pinteala, B. C. Simionescu, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2012**, 324, 1679. (b) F. Gao, B. F. Pan, W. M. Zheng, L. M. Ao, H. C. Gu, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2005**, 293, 48.
- [12] (a) R. Zhu, W. Jiang, Y. Pu, K. Luo, Y. Wu, B. He, Z. Gu, *J. Mater. Chem.*, **2011**, 21, 5464. (b) C. Duanmu, I. Saha, Y. Zheng, B. M. Goodson, Y. Gao, *Chem. Mater.* **2006**, 18, 5973.

- [13] J. K. Oh, J. M. Park, *Prog. Polym. Sci.*, **2011**, 36, 168.
- [14] (a) L. Wang, H. Y. Park, S. I. Lim, M. J. Mark, J. Schadt, D. Mott, J. Luo, X. Wang, C. J. Zhong, *J. Mater. Chem.*, **2008**, 18, 2629. (b) A. H. Latham, M. E. Williams, *Acc. Chem. Res.*, **2008**, 41, 411.
- [15] X. Teng, D. Black, N. J. Watkins, Y. Gao, H. Yang, *Nano Letters*, **2003**, 3, 261.
- [16] H. K. Xu, C. M. Sorensen, K. J. Klanbunde, G. C. Hadjipanayis, *J. Mater. Res.*, **1992**, 7, 712.
- [17] N. O. Núñez, P. Tartaj, M. P. Morales, P. Bonville, C. J. Serna, *Chem. Mater.*, **2004**, 16, 3119.
- [18] W. Stöber, A. Fink, *J. Coll. Interf. Sci.* **1968**, 26, 62.
- [19] S. H. Im, T. Herricks, Y. T. Lee, Y. Xia, *Chem. Phys. Lett.*, **2005**, 401, 19.
- [20] (a) P. Tartaj, C. Serna, *Chem. Mater.*, 14, 4396. (b) P. Tartaj, J. Serna, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 15754.
- [21] X. Liu, Z. MA, J. Xing, H. Liu, *J. Magn. Magn. Mater.*, **2004**, 270, 1.
- [22] www.Ademtech.com
- [23] Thèse Université de Bordeaux 1, D. AMORIN ROSARIO, **2009**, n°3953.
- [24] (a) K. Heuzé, D. R. Amorin, S. Nlate, M. Gaboyard, A. Bouter, *N. J. Chem.*, **2008**, 32, 383. (b) D. R. Amorin, X. Wang, M. Gaboyard, R. Clérac, S. Nlate, K. Heuzé, *Chem. Eur. J.* **2009**, 15, 12636. (c) D. R. Amorin, M. Gaboyard, R. Clérac, S. Nlate, K. Heuzé, *Dalton Trans.*, **2011**, 40, 44. (d) D. R. Amorin, M. Gaboyard, R. Clérac, L. Vellutini, S. Nlate, K. Heuzé, *Chem. Eur. J.*, **2012**, 11, 3305.
- [25] (a) R. L. Jones, N. C. Pearsall, J. D. Batteas, *J. Phys. Chem. C*, **2009**, 113, 4507. (b) F. Xu, J. H. Geiger, G. L. Baker, M. L. Bruening, *Langmuir*, **2011**, 27, 3106.
- [26] (a) C. H. Less, S. H. Park, W. Chung, J. Y. Kim, S. H. Kim, *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.*, **2011**, 384, 318. (b) N. Garcia, E. Benito, J. Gurzman, R. Fransisco, P. Tiemblo, *Langmuir*, **2010**, 26, 5499.
- [27] C. Pathmamanoharan, P. Wijkens, D. M. Grove, A. P. Phylipse, *Langmuir*, **1996**, 12, 4372.
- [28] R. S. Stoll, S. Hecht, *Org. Lett.*, **2009**, 11, 4790.
- [29] D. K. Behringer, J. Blümel, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, **1996**, 19, 2753.
- [30] (a) N. Chekina, D. Horak, P. Jendelova, M. Trochova, M. J. Benes, M. Hruby, V. Herynek, K. Turnovcova, E. Sykova, *J. Meter. Chem.*, **2011**, 21, 7630. (b) I. J. Bruce,

- T. Sen, *Langmuir*, **2005**, 21, 7029. (c) L. Chu, M. W. Daniels, L. F. Francis, *Chem. Mater.*, **1997**, 9, 2577.
- [31] B. Valeur, *Molecular Fluorescence : Principles and applications*, 2002, Wiley-VCH.
- [32] M. Dominska, P. Ktysinski, G. J. Blanchard, *J. Phys. Chem. B*, **2005**, 109, 15822.
- [33] L. Gao, Y. Fang, X. Wen, Y. Li, D. Hu, *J. Phys. Chem. B*, **2004**, 108, 1207.
- [34] (a) D. Vuillaume, *J. Nanosci. Nanotech.* 2002, 2, 267. (b) B. J. H. Schön, H. Meng, Z. Bao, *Adv. Mater.*, **2002**, 14, 323.
- [35] T. Doane, C. H. Chuang, R. J. Hill, C. Burda, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, 45, 317.
- [36] C. G. Bochet, *J. Chem. Soc. Perkin. Trans. 1*, **2002**, 2, 125.
- [37] M. R. Lockett, M. F. Phillips, J. L. Jarecki, D. Peelen, L. M. Smith, *Langmuir*, **2008**, 24, 69.
- [38] S. K. Ghosh, T. Pal, *Chem. Rev*, **2007**, 107, 4797.
- [39] J. C. Sheehan, W. A. Bolhofer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 2786.
- [40] C. S. Sheehan, W. A. Bolhofer, *J. Am. Chem. Soc.*, **1950**, 72, 2786.
- [41] P. Martin, S. Marsaudon, L. Thomas, B. Desbat, J. P. Aimé, B. Bennetau, *Langmuir*, **2005**, 21, 6934.
- [42] R. F. Smith, A. C. Bates, A. J. Battisti, P. G. Byrnes, C. T. Mroz, T. J. Smearing, F. X. Albrecht, *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 2921.
- [43] D. Lin-Vien, N. B. Colthup, W. G. Fateley, J. G. Grasselli, *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*, 1991, ACADEMIC PRESS, INC.
- [44] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, G. M. Whitesides, *Langmuir*, **2001**, 17, 5605.

Conclusion générale

Conclusion générale :

L'immobilisation de molécules biologiques sur une surface solide est souvent l'étape déterminante pour des applications dans le domaine de la biotechnologie. L'objectif de ce travail de recherche a été de préparer des nanofilms (monocouche ou couche hybride) à bases d'organosilanes dendritiques sur des surfaces de SiO₂ (substrats plan et MNPs γ -Fe₂O₃/SiO₂) pour immobiliser des molécules biologiques.

La première partie de ce travail a été consacrée à la synthèse de dendrons et de leur greffage sur des substrats SiO₂ plans. Ainsi, nous nous sommes intéressés à des dendrons type AB₂ polyamido-amine de première et de deuxième génération (**D₁-D₅**). Ils portent au point focal des groupements silyle (Si-Cl₃, Si-(OMe)₃ et Si-(CH₃)₂Cl) et en périphérie des fonctions acide protégées par des groupements photolabiles. La synthèse de ces dendrons a été obtenue avec un rendement global très satisfaisant de 70%. Ensuite, leur greffage a été étudié à l'aide de plusieurs techniques d'analyses de surface : angle de contact, infrarouge (PM-IRRAS) et AFM. Différents paramètres ont été étudiés pour le greffage des structures dendritiques de première génération : la nature du silane, le temps de greffage, la température et le solvant. Ainsi, nous avons démontré que le composé **D₁** (dendron de première génération, Si-Cl₃) permettait d'avoir, après optimisation des paramètres expérimentaux, la couche la plus dense. La qualité du greffage a encore pu être améliorée en utilisant un système mixte composé d'un mélange de silanes **C10** et **D₁**. En fonction des conditions expérimentales, il a été montré qu'il est possible d'obtenir des couches mixtes de structures différentes : une couche homogène ou une couche présentant des nano-domaines en îlots. Enfin, le greffage du dendron de deuxième génération (**D₅**) a montré un état surface à la fois dense et de faible rugosité.

La deuxième partie de ce travail a été consacré à la biofonctionnalisation des surfaces SiO₂ modifiées obtenues dans le chapitre II. Dans un premier temps, nous avons utilisé comme modèle l'immobilisation de nanoparticules d'or recouvertes de protéine A (NP-pA) pour une détection en AFM. Nous avons observé une immobilisation covalente de NP-pA sur la surface **SiO₂@D₁**, et une immobilisation non covalente sur les surfaces **SiO₂@D₁C10** et sur les surfaces **SiO₂@C10**. Cette adsorption physique vient sans doute des interactions hydrophobes non spécifiques dues à la présence du composé **C10**. Afin de limiter cette adsorption physique et s'assurer de la réactivité des fonctions terminales, nous avons immobilisé sur la surface des nanoparticules NP-PEG-NH₂. Les caractérisations de surface

ont montré que toutes les surfaces étaient fonctionnalisables. De plus, l'immobilisation des NP-PEG-NH₂ sur **SiO₂@D₁C10/H** (homogène) a montré un taux de fonctionnalisation plus élevé que la même immobilisation sur les couches **SiO₂@D₁** ou **SiO₂@D₅**. Ceci est probablement dû à la meilleure accessibilité des fonctions de surface. Pour les couches mixtes présentant des îlots (**SiO₂@D₁C10/I**), nous avons montré une immobilisation des NP-PEG-NH₂ principalement au niveau des îlots, ce qui nous permet de résoudre la composition chimique des îlots qui constituent cette surface c'est à dire principalement du dendron **D₁**.

La troisième partie de ce travail a été consacré au greffage de structures dendritiques sur des MNPs (γ -Fe₂O₃/ SiO₂) ainsi que leur biofonctionnalisation pour une application en protéomique. Le greffage a été réalisé suivant deux approches : la méthode en milieu organique anhydre et la méthode hydroalcoolique, cette dernière ayant permis une modification homogène de la surface des MNPs. L'utilisation de dendrons avec des groupements protecteurs photolabiles pour obtenir des fonctions CO₂H n'a pas abouti (**D₆**). En effet, l'étape de photodéprotection qui nécessite une irradiation prolongée a conduit à une dégradation des MNPs. Par conséquent, une autre stratégie pour générer des groupements CO₂H en surface des MNPs a été envisagée. Des molécules dendritiques et linéaires présentant des fonctions NH₂ ont été greffées. Les fonctions CO₂H ont été ensuite générées en utilisant de l'anhydride succinique. Ainsi, différentes structures ont pu être greffées : des molécules linéaires (**AUTES**) et (**APTES**), des structures dendritiques (**D₈**) et (**D₉**). A la suite des greffages, nous avons étudié l'effet de leurs structures sur l'immobilisation de biomolécules. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests de reconnaissance immunologique afin de quantifier les biomolécules immobilisées sur les MNPs. Nous avons remarqué que l'utilisation d'une chaîne hydrophobe (**AUTES**) engendrait une immobilisation non spécifique importante sur les MNPs. Ce couplage non spécifique est inexistant lors de l'utilisation de structures dendritiques. Nous avons également remarqué que la densité de biomolécules immobilisées sur les MNPs était similaire quelque soit la structure linéaire ou dendritique, ce qui montre que les surfaces sont bien toutes fonctionnelles. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet dendritique positif sur la quantité de biomolécules immobilisée.

A l'issue de ces travaux, il pourrait être envisagé de modifier la structure des dendrons afin d'augmenter l'hydrophilie des agents de couplage et l'accessibilité des fonctions en périphérie. Des chaînes éthylène glycol pourraient être introduites dans les branches et dans la partie centrale de la structure dendritique. Les motifs éthylène glycol permettront, d'une part

de diminuer le phénomène d'adsorption physique, et d'autre part d'augmenter la flexibilité des branches, ce qui pourrait être un avantage pour exploiter un effet dendritique pour l'immobilisation de molécules biologiques. Ces structures pourront être utilisées aussi bien sur les surfaces planes que sur les MNPs.

Le travail exploratoire sur le greffage de MNPs (Chap. IV) par des systèmes dendritiques peut être mis à profit pour l'immobilisation ciblée de biomolécules. Par exemple, entre les fonctions thiol des résidus cystéine d'une molécule biologique et un groupement maléimide d'une surface. Ce travail est actuellement en cours, au Laboratoire. Pour une immobilisation contrôlée de protéines, il serait également intéressant d'étudier l'immobilisation par affinité biologique (Chap. II. 1.), notamment entre des protéines marquées par des segments histidine et un groupement NTA-Ni greffé à la surface.

Dans le cas des surfaces planes (Chap. II.), l'obtention contrôlée d'îlots de taille nanométrique sans l'utilisation de masque, représente un résultat important méritant plus d'investigations. En effet, il serait intéressant de contrôler la taille et la distribution des îlots sur les surfaces, par exemple, en modulant la proportion des deux composants du système mixte **D₁/C10**.

Partie expérimentale

1. Solvants et réactifs :

Les manipulations sous atmosphère inerte ont été effectuées sous argon à l'aide d'une rampe à vide. Les produits commerciaux utilisés proviennent pour la plupart, des sociétés Sigma-Aldrich, Alfa Aesar et Fisher Acros et ont été utilisés sans purification préalable. Des solvants anhydres nécessaires pour certaines réactions ont été séchés sur des agents déshydratants et distillés sous atmosphère inerte :

Toluène : Na/ benzophénone

CH₂Cl₂ : CaH₂

MeOH: CaH₂

THF : Na/ benzophénone

2. Appareillages :

Les spectres ¹H, ¹³C, ²⁹Si ont été enregistrés sur les spectromètres suivant :

- Spectromètre Bruker DPX 200 FT (¹H : 200, ¹³C : 50 MHz)
- Spectromètre Avance 300 FT (¹H : 300.13, ¹³C : 75, ²⁹Si : 59 MHz)
- Spectromètre Bruker DPX 400 FT (¹H : 400, ¹³C : 100 MHz)
- Spectromètre Bruker DPX 600 FT (¹H : 600, ¹³C : 150 MHz)

Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en partie par million (ppm) et sont calibrés sur les signaux des solvants deutérés.

Les spectres de masse ont été effectués par le CESAMO (Centre d'Etude structurale et d'Analyse des Molécules Organiques, Bordeaux) sur un spectromètre de masse QStar Elite équipé d'une source d'ionisation ESI. Les spectres de masse MALDI-TOF ont été enregistrés sur un spectromètre Voyage équipé d'un laser à N₂ 337 nm. Les spectres ont été enregistrés en mode réflectron positif et une tension d'accélération de 20 kV.

Les analyses élémentaires des différents produits ont été effectuées par le Service Central Analyse du CNRS à Lyon-Vernaison.

Les mesures d'angle de contact et d'énergie de surface des substrats SiO₂ ont été réalisées sur un goniomètre Krüs DSA 100. Plus de détails sur le mode de fonctionnement est reporté en annexe 3.

Les analyses d'AFM sur les substrats wafer de silicium ont été réalisées sur deux appareils : ThermoMicroscope Auroprobe CP Research et Agilent 5000. Le principe de la technique est décrit en annexe 2.

Les spectres infrarouges par le mode PM-IRRAS et par le mode ATR ont été enregistrés sur un spectromètre NEXUS 970 (Thermos Optec). (Voir annexe 1)

Les images HR-TEM ont été enregistrées sur les microscopes suivant :

- Microscope électronique JOEL JEM 2000FX fonctionnant à 200 kV du CREMEM (Centre de Ressources en Microscopie Electronique et Microanalyse).
- Microscope électronique HITACHI H7650 fonctionnant à 80-120 kV du BIC (Bordeaux Imaging Center).

Les échantillons ont été préparés par dépôt de suspension diluée de MNPs dans l'éthanol sur des grilles Cu/C. Les grilles sont séchées à l'air avant l'analyse.

Les mesures de potentiel zêta ont été effectuées sur un appareil Zetasizer 3000 HS du LCPO (Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques). La description de cette technique est reportée en annexe 4. Pour les mesures, une suspension aqueuse de MNPs diluée a été préparée à différents pH. Deux méthodes de préparation ont été entreprises :

- Pour les MNPs greffées avec le composé **P** (§IV.3.5.) : 15 suspensions ont été préparées à différents pH. Les MNPs ont été mises en solution aqueuse, le pH de ces solutions a été modifié (pH : 1,3-12,2) à l'aide des solutions d'HCl (0,1 M et 1 M) et de NaOH (0,1 M et 1 M).
- Pour les **MNP@APTES-D₉** et les **MNP@APTES-D₉@CO₂H** : 4 suspensions ont été préparées à différents pH (3,5 ; 5,5 ; 8,1 ; 10). Les MNPs ont été mises en solution aqueuse en présence de tampons à 1mM (pH 3,5 : tampon acétate ; pH 5,5 ; 8,1 ; 10 : tampon tris).

Les spectres d'émission et d'excitation ont été enregistrés sur un spectromètre Spex Fluorolog-2 1680/1 de marque Jobin Yvon – Spex. Une fonction de correction de la réponse instrumentale est appliquée aux spectres enregistrés. Les spectres d'absorption ont été enregistrés sur un spectromètre HITACHI U-3300.

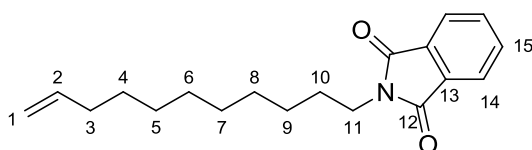
Les mesures de thermogravimétrie (ATG) sur les **MNP**, **MNP@APTES**, **MNP@AUTES**, **MNP@D8**, **MNP@D9** (14 mg) ont été réalisées à l'aide d'une

thermobalance STA-409 couplée à un spectromètre de masse ThermoStar de Balzers Instruments.

3. Synthèse des composés organiques:

a. Synthèse des précurseurs éthyléniques :

Synthèse du composé (2) :



Formule : $C_{19}H_{25}NO_2$ (MM : 299,4g/mol)

Rendement : 99%

Aspect : solide blanc

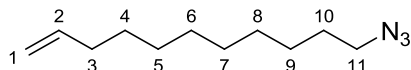
Dans un schlenk, sont placés 5 g (21,3 mmol ; 1 éq) de 11-Bromoundécène **1**, 40 mL de DMF et 4,76 g (25 mmol ; 1,2 éq) de phthalimide de potassium. Le mélange est agité pendant la nuit à température ambiante. En fin de réaction, le bromure de phthalimide est filtré. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décanter puis lavé à l'eau distillée (3x100 mL), et la phase aqueuse est extraite avec du pentane (3x100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est obtenu avec un rendement de 99% (6,34 g ; 21,1 mmol).

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 7.81-7.63 (m, 4H, **14**, **15**) ; 5.74 (m, 1H, **2**) ; 4.88 (m, 2H, **1**) ; 3.62 (t, 2H, **11**, $^3J_{HH}=10Hz$) ; 1.95 (m, 2H, **3**) ; 1.6-1.2 (m, 14H, **4-10**).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 168.2 (**12**) ; 139.0 (**2**) ; 133.66 (**15**) ; 132.0 (**13**) ; 123.0 (**14**) ; 114.0 (**1**) ; 37.9 (**11**) ; 33.66 (**3**) ; 29.2-26.7 (**4-10**)

SM-ESI (m/z) : 322.17 [M+Na]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 76.22, H 8.42, N 4.68 ; trouvée. C 75.39 H 8.22, N 5.10

Synthèse de composé (3) : 11-azido-1-undécèneFormule : $C_{11}H_{21}NO_3$ (MM : 195,3g/mol)

Rendement : 90%

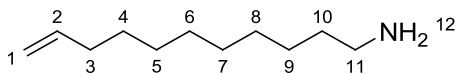
Aspect : liquide légèrement jaune

A une solution de 5 g du 11-bromo-1-undécène **1** (21,3 mmol ; 1 éq) dans du DMF (40 mL), est ajouté 2 g d'azoture de sodium (30 mmol ; 1,4 éq). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant la nuit, puis le solvant est évaporé sous vide, à 60°C, pendant 3 heures. Après évaporation du solvant, le solide contenu dans le shlenk est dissous dans du pentane et le mélange est filtré sur papier filtre. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décanter puis lavé à l'eau distillée (3x100 mL), et la phase aqueuse est extraite avec du pentane (3x100 mL). Les phases organiques sont rassemblées, séchées sur $MgSO_4$, filtrées et le solvant est évaporé sous pression réduite. Le composé **3** est obtenu avec un rendement de 90% (3,77 g ; 19,3 mmol)

RMN 1H (200 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 5.83 (m : 1H, **2**) ; 4.94 (m : 2H, **1**) ; 3.27 (t : 2H, **11**, $^3J_{HH}=10,2$ Hz) ; 2.04 (m : 2H, **3**) ; 1.59 (m : 2H, **10**) ; 1.31 (m, 12H, **4-9**).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 139.2 (**2**) ; 114.1 (**1**) ; 51.5 (**11**) ; 33.8 (**3**) ; 29.4 ; 29.3 ; 29.1 ; 29.0 ; 28.9 ; 28.9 ; 26.7 (**4-10**).

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 67.65, H 10.84, N 21.52 ; trouvée. C 68.89 H 11.17, N 20.67.

Synthèse de composé (4) : 11-amino-1-undécèneFormule : $C_{11}H_{23}N$ (MM : 169,3g/mol)

Rendement : 80%

Aspect : liquide incolore

Dans un ballon bicol de 250 mL sont introduits, 3,79 g d'azidoundécène **3** (19,4 mmol ; 1 éq), 2,5 g de chlorure d'ammonium (46,6 mmol ; 2,4 éq), 50 mL d'éthanol, 18 mL d'eau distillée et 1,78 g de zinc en poudre (27,2 mmol ; 1,4 éq). Le mélange est chauffé à 90°C, pendant 6 heures. En fin de réaction, le mélange réactionnel est ramené à température

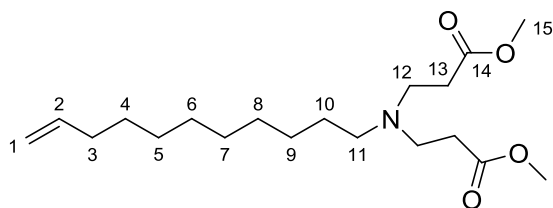
ambiante. 26 mL d'ammoniac à 28% et 135 mL d'acétate d'éthyle y sont ajoutés. Puis la solution est filtrée sur papier filtre pour éliminer les restes de zinc. Cette solution est transvasée dans une ampoule à décanter et la phase organique est ensuite lavée à l'eau distillée (3x100 mL), séchée sur MgSO_4 , filtrée et concentrée sous pression réduite. L'amine **4** brute sous forme d'une huile jaune est obtenue. Cette dernière est purifiée par distillation sous pression réduite à l'aide d'un four à boules. Le composé **4** pur sous forme d'une huile incolore est obtenu avec un rendement de 80% (2,63 g ; 15,5 mmol).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5.77 (m, 1H, **2**) ; 4.91 (m, 2H, **1**) ; 2.63 (t, 2H, **11**, $^3J_{\text{HH}}=7,1\text{Hz}$) ; 2.00 (m, 2H, **3**) ; 1.45-1.2 (m, 14H, **4-10**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 139.1 (**2**) ; 114.1 (**1**) ; 42.1 (**11**) ; 33.8 (**3**) ; 29.6 ; 29.5 ; 29.4 ; 29.4 ; 29.1 ; 28.9 ; 26.8 (**4-10**).

SM-ESI (m/z) : 170,1899 [M+1]

Synthèse du composé (**5**) :



Formule: $\text{C}_{19}\text{H}_{35}\text{NO}_4$ (MM : 341,5g/mol)

Rendement : quantitatif

Aspect : huile légèrement jaune

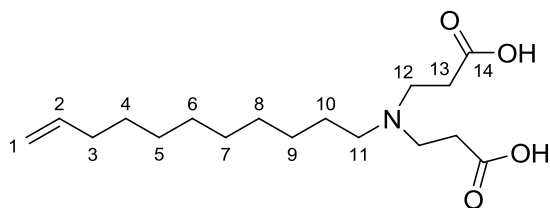
Dans un schlenk sont placés, 2 g (11,8 mmol) de 11-amino-1-undecène **4**, 9,4 g (10 mL ; 93,1 mmol) de méthacrylate de méthyle, 35 mL de méthanol distillé. Le mélange est maintenu sous agitation à 50°C pendant 3 jours sous azote. En fin de réaction, le solvant et l'excès d'acrylate de méthyle sont évaporés sous vide pendant 16 heures.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 5.78 (m, 1H, **2**) ; 4.91 (m, 2H, **1**) ; 3.62 (s, 6H, **15**) ; 2.72 (t, 4H, **12**, $^3J_{\text{HH}}=7,2\text{ Hz}$) ; 2.4 (t, 4H, **13**, $^3J_{\text{HH}}=7,2\text{ Hz}$) ; 2.35(t, 2H, **11**, $^3J_{\text{HH}}=7,2\text{ Hz}$) ; ,2.02 (m : 2H, **3**) ; 1.34 (m : 2H, **10**) ; 1.28 (m, 12H, **4-9**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 172 (**14**) ; 139 (**2**) ; 114.4 (**1**) ; 52.8 (**11**) ; 51 (**15**) ; 49 (**12**) ; 33 (**3**) ; 32 (**13**) ; 29-26 (**4-10**).

SM-ESI (m/z) : 342.26 [M+1].

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 67.81, H 10.34, N 4.10, O 18.75 ; trouvée. C 67.39, H 10.90, N 4.19, O 18.19

Synthèse du composé (6) :Formule : $C_{17}H_{31}NO_4$ (MM : 313,4 g/mol)

Rendement : 97%

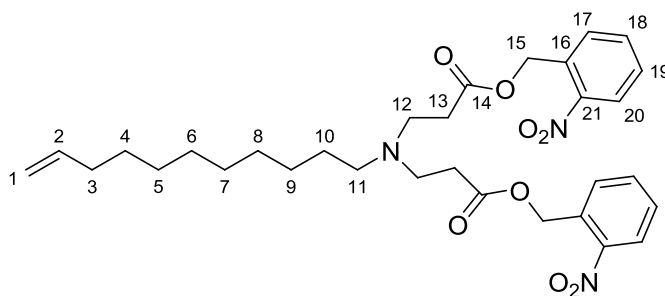
Aspect : huile très visqueuse légèrement jaune

Dans un schlenk sont mélangés, 2,56 g (7,5 mmol) de composé **5**, 20 mL de méthanol et 30 mL d'une solution de soude à 1 M. La réaction est agitée à 30 °C pendant 16 h. En fin de réaction, une solution de HCl à 1 M est ajoutée au mélange jusqu'à pH 3. Le produit est extrait de la phase aqueuse (3x100 mL) à l'aide de l'acétate d'éthyle. La phase organique est séchée sur $MgSO_4$ puis filtrée et concentrée sous pression réduite pour obtenir 2,3 g de produit **6** (7,34 mmol).

RMN 1H (300 MHz, MeOD, δ ppm) : 5.81 (m, 1H, **2**) ; 4.97 (m, 2H, **1**) ; 3.46 (t, 4H, **12**, $^3J_{HH}=6,6$ Hz) ; 3.21 (t, 2H, **11**, $^3J_{HH}=6,6$ Hz) ; 2.86 (t, 4H, **13**, $^3J_{HH}=6,6$ Hz) ; 2.07 (m, 2H, **3**) ; 1.77 (m, 2H, **10**) ; 1.29 (m, 12H, **4-9**).

RMN ^{13}C (75 MHz, MeOD, δ ppm) : 172.7 (**14**) ; 138.7 (**2**) ; 113.3 (**1**) ; 53.6 (**11**) ; 49.2 (**12**) ; 33.5 (**3**) ; 29-26 (**4-9**, **13**) ; 23.5 (**10**).

SM-ESI : 352.1899 [M+K].

Synthèse du composé (7) :Formule : $C_{31}H_{41}N_3O_8$ (MM : 583,7 g/mol)Rendement : 25% (1^{ère} stratégie) ; quantitatif (2^{ème} stratégie)

Aspect : huile légèrement jaune

i. Selon la première stratégie (Chapitre II.3.1.4) :

Dans un schlenk préalablement lavé et séché sont mis 1,57 g (5 mmol ; 1 éq) de composé **5**, 15 mL de DMF, 1,42 g (9 mmol ; 1,8 éq) de 2-Nitrobenzyl alcool, 0,122 g (1 mmol ; 0,2 éq) de 4-diéthylaminopyridine. Une solution de 9 mL de DMF contenant 1,85 g (9 mmol ; 1,8 éq) de *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel. La réaction est laissée pendant une nuit sous agitation et sous azote. Le solvant est ensuite évaporé, le produit est purifié par chromatographie sur gel de silice en éluant avec 100% de dichlorométhane et ensuite avec un mélange AcOEt/CH₂Cl₂ 50/50. 0,73 g de produit sont ainsi obtenus avec un rendement de 25% (1,25 mmol).

ii. Selon la seconde stratégie (Chapitre II.3.2.2) :

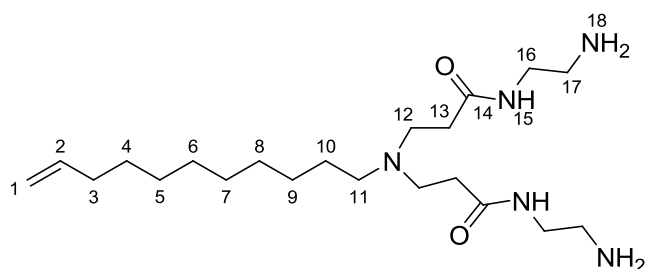
Dans un schlenk sont mélangés, 1 g du composé **4** (5,9 mmol ; 1 éq), 6 g du composé **12** (5 éq ; 28,9 mmol), 20 mL de DMF. Le milieu réactionnel est agité pendant 3 jours à 50°C. A la fin de la réaction, le DMF est évaporé. Le liquide jaune obtenu est purifié sur colonne de silice avec changement d'éluant : 100% CH₂Cl₂ pour récupérer le produit **12**, puis CH₂Cl₂/EtOAc (25%/75%) pour récupérer le produit **7** souhaité. Le composé **7** est alors obtenu avec un rendement quantitatif (3,4 g ; 5,82 mol).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8.06-7.46 (m, 8H, **17-20**) ; 5.78 (m, 1H, **2**) ; 5.48 (s, 4H, **15**) ; 4.93 (m, 2H, **1**) ; 2.84 (t, 4H, **12**, ³J_{HH}=6,9 Hz) ; 2.55 (t, 4H, **13**, ³J_{HH}=6,9 Hz) ; 2.41 (t, 2H, **11**, ³J_{HH}=6,9 Hz) ; 2.00 (m, 2H, **3**) 1.39-1.23 (m, 14H, **4-10**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 172 (**14**) ; 147.3 (**21**) ; 139.2 (**2**) ; 133.7-124.9 (**16-20**) ; 114.0 (**1**) ; 62.9 (**15**) ; 53.8 (**11**) ; 49.2 (**12**) ; 33.7 (**13**) ; 32.6 (**3**) ; 29.5-26.9 (**4-10**).

SM-ESI (m/z): 584.29 [M+1]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 63.79, H 7.08, N 7.20 ; trouvée. C 63.64, H 7.01, N 7.12

Synthèse du composé (8) :Formule: $C_{21}H_{43}N_5O_2$ (MM : 397,6 g/mol)

Rendement : quantitatif

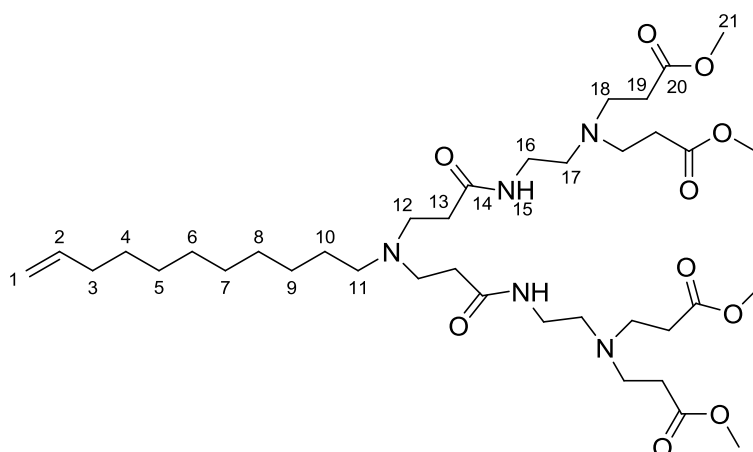
Aspect : huile orange très visqueuse

Dans un schlenk, sont placés 2,9 g (8,52 mmol) de composé **5**, 41 g (681 mmol ; 80 éq) d'éthylène diamine et 30 mL de méthanol. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant 5 jours. En fin de réaction, le solvant et l'excès d'éthylène diamine sont évaporés pendant 16 heures à l'aide de la rampe à vide. Le composé **8** est obtenu avec un rendement quantitatif (3,3 g ; 8,3 mmol).

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 7.79 (t : 2H, **15**) ; 5.80 (m : 1H, **2**) ; 4.94 (m : 2H, **1**) ; 3.27 (dd : 4H, **16**, $^3J_{HH}=11,7/5,8$ Hz) ; 2.82 (t : 4H, **17**, $^3J_{HH}=5,8$ Hz) ; 2.74 (t : 4H, **12**) ; 2.37 (m : 6H, **11**, **13**) ; 2.05 (m : 2H, **3**), 1.46-1.25 (m : 14H, **4-10**).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 173 (**14**) ; 138.9 (**2**) ; 113.9 (**1**) ; 53.4 (**11**) ; 49.7 (**12**) ; 41.7 (**16**) ; 41.2 (**17**) ; 33.5 (**3**, **13**) ; 29.4-26.3 (**4-10**).

SM-ESI (m/z): 398.35 [M+1]

Synthèse du composé (9) :Formule : $C_{37}H_{67}N_5O_{10}$ (MM : 741,9 g/mol)

Rendement : quantitatif

Aspect : huile orange visqueuse

3,3 g (8,3 mmol ; 1éq) de composé **8**, 7,1 g (83 mmol ; 10 éq) d'acrylate de méthyle, 50 mL de méthanol sont agités vigoureusement dans un schlenk pendant 5 jours à 50°C. En fin de réaction, le solvant et l'excès d'acrylate de méthyle sont évaporés pendant une nuit à l'aide d'une rampe à vide. Ainsi, le composé **9** est obtenu avec un rendement quantitatif.

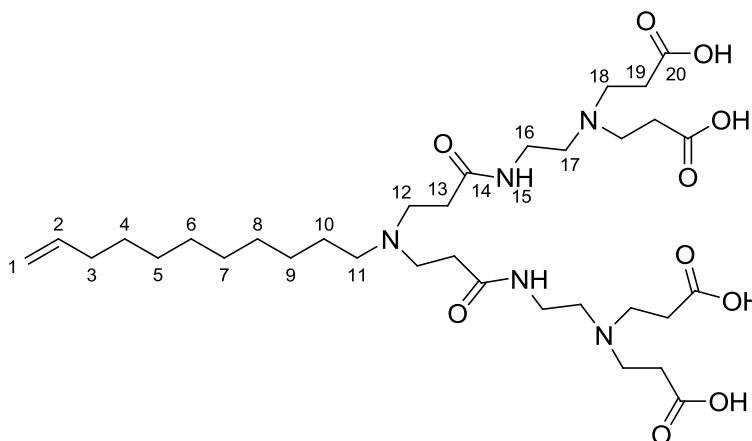
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7.21 (m, 2H, **15**) ; 5.79 (m, 1H, **2**) ; 4.92 (m, 2H, **1**) ; 3.64 (s, 12H, **21**) ; 3.27 (dd, 4H, **16**) ; 2.78 (m, 12H, **12**, **18**) ; 2.53 (t, 6H, **17**, **11**) ; 2.43 (t, 8H, **19**) ; 2.40 (t, 4H, **13**) ; 2.01 (m, 2H, **3**) ; 1.23 (m, 12H, **4-10**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 172.9 (**20**) ; 171.9 (**14**) ; 139.1 (**2**) ; 114 (**1**) ; 53.2 (**11**) ; 52.2 (**17**) ; 51.57 (**21**) ; 49.34 (**12**) ; 49 (**18**) ; 37 (**16**) ; 33.7 (**13**) ; 33.1 (**3**) ; 32.6 (**19**) ; 29-26 (**4-10**).

SM-ESI (m/z) : 742.49 [M+1]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 59.88, H 9.43, N 9.44, O 21.57 ; trouvée. C 58.67, H 9.43, N 9.38, O 22.64

Synthèse du composé (**10**) :



Formule : $\text{C}_{33}\text{H}_{59}\text{N}_5\text{O}_{10}$ (MM : 685,8 g/mol)

Rendement : quantitatif

Aspect : huile orange très visqueuse

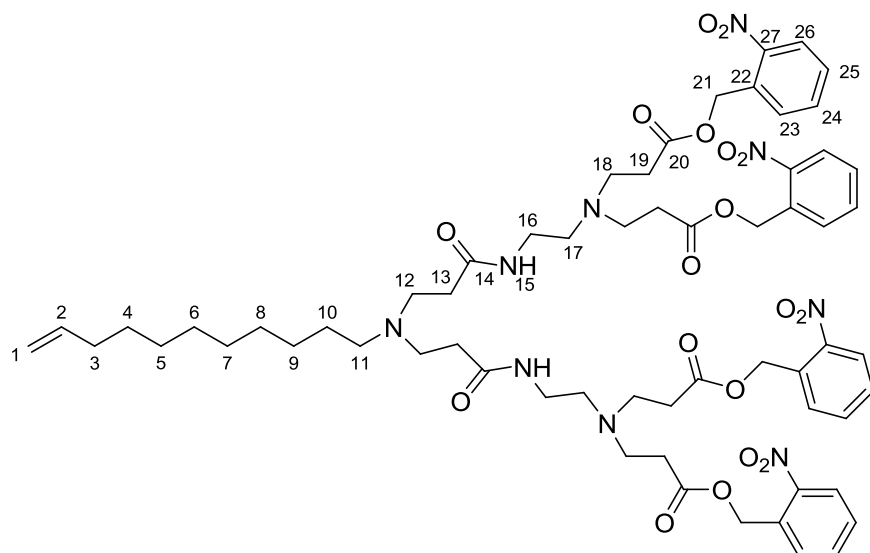
Dans un schlenk sont dissout, 1,5 g (2 mmol ; 1 éq) de composé **9** dans 40 mL de THF. 40 mL d'une solution de potasse à 1 M est ajoutée au milieu réactionnel. La réaction est laissée sous agitation pendant une nuit à température ambiante. En fin de réaction, le milieu est acidifié jusqu'à pH 2. Le milieu réactionnel est évaporé. Le produit est solubilisé dans le DMF puis filtré pour éliminer le KCl résiduel. Le DMF est évaporé puis le produit est récupéré.

RMN ^1H (400 MHz, DMSO, δ ppm, 75°C) : 8.12 (s, 2H, **15**) ; 5.80 (m, 1H, **2**) ; 4.99 (m, 2H, **1**) ; 3.38 (dd, 4H, **16**) ; 3.30 (t, 4H, **12**) ; 3.12 (t, 8H, **18**) ; 3.03 (t, 2H, **11**) ; 2.98 (t, 4H, **17**) ; 2.72 (t, 4H, **13**) ; 2.64 (t, 8H, **19**) ; 2.00 (m, 2H, **3**) ; 1.70 (m, 2H, **10**) ; 1.36-1.28 (m, 12H, **4-9**).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO, δ ppm, 75°C) : 172.7 (**20**) ; 170.1 (**14**) ; 139.3 (**2**) ; 115.1 (**1**) ; 52.9 (**11**) ; 51.9 (**17**) ; 48.8 (**12**, **18**) ; 35 (**16**) ; 33.6 (**3**) ; 29.7 (**13**, **19**) ; 29.2-26.53 (**4-9**) ; 23.4 (**10**).

SM-ESI (m/z): 686.43 [M+1]

Synthèse du composé (**11**) :



Formule : $\text{C}_{61}\text{H}_{79}\text{N}_9\text{O}_{18}$ (MM: 1226,3 g/mol)

Rendement : quantitatif

Aspect : huile jaune orangé

Dans un schlenk sont mis, 0,26 g (0,65 mmol ; 1 èq) de composé **8**, 3 mL de DMF et 1,2 g de composé **12** (5,8 mmol ; 9 èq). Le milieu réactionnel est agité pendant 5 jours à 50°C sous argon. A la fin de la réaction le solvant est évaporé sous pression réduite. Le produit est purifié à l'aide d'une chromatographie sur gel de silice en changeant d'éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 50/50 pour récupérer le composé **12** puis CH_2Cl_2 90/10 pour récupérer le composé **11**. Ainsi, le produit est obtenu avec un rendement quantitatif (0,81 g ; 0,65 mmol).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8.06-7.46 (m, 16H, **23-26**) ; 7.29 (t, 2H, **15**) ; 5.77 (m, 1H, **2**) ; 5.46 (s, 8H, **21**) ; 4.91 (m, 2H, **1**) ; 3.27 (q, 4H, **16**) ; 2.83 (t, 8H, **18**) ; 2.73 (t, 4H,

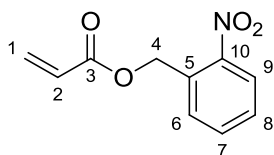
12) ; 2.53 (m, 12H, **17**, **19**) ; 2.41 (t, 2H, **11**) ; 2.31 (t, 4H, **13**) ; 2.00 (m, 2H, **3**) ; 1.46-1.23 (m, 14H, **4-10**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 172.0 (**14**, **20**) ; 147.5 (**27**) ; 139.2 (**2**) ; 133.8 (**22**) ; 131.9 (**24**) ; 129.3 (**25**) ; 128.8 (**23**) ; 125.0 (**26**) ; 114.1 (**1**) ; 63.0 (**21**) ; 53.0 (**11**, **17**) ; 49.5 (**12**) ; 49.2 (**18**) ; 37.1 (**16**) ; 33.8 (**3**) ; 32.6 (**13**, **19**) ; 29.6-27.5 (**4-10**).

SM-MALDI (m/z) : 1248,1 [M+Na]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 59.74, H 6.49, N 10.28 ; trouvée. C 59.20, H 6.62, N 8.20

Synthèse du composé (**12**) :



Formule : $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_4$ (MM : 207,2 g/mol)

Rendement : 90%

Aspect : huile jaune

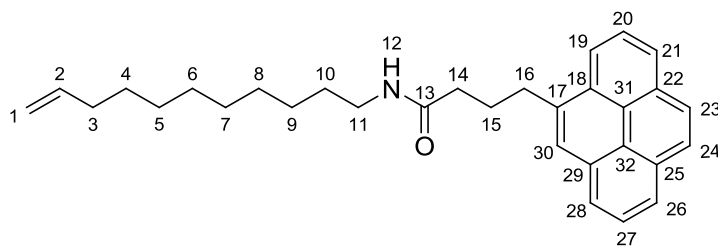
Dans un schlenk sortant de l'étuve sont introduits, sous argon et à 0°C, 5 g de l'alcool 4-nitobenzyle (32 mmol ; 1 éq), 6,25 g de triéthylamine (64 mmol ; 2 éq). Puis 3,82 g de chlorure d'acryloyle (41,6 mmol ; 1,3 éq) sont rajoutés au goutte à goutte rapide à l'aide d'une seringue. Le mélange réactionnel est alors agité à température ambiante pendant une nuit. Le mélange, en fin de réaction, est filtré sur papier filtre et rincé avec du CH_2Cl_2 . Le filtrat est lavé avec 3x100 mL d'une solution de NaOH à 0,5 M et on récupère la phase organique qui est séchée sur MgSO_4 , filtrée puis concentrée sous pression réduite. L'huile jaune obtenue est purifiée sur une colonne de silice avec comme éluant 50% CH_2Cl_2 50% pentane. On obtient ainsi le composé **12** sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 90% (6 g ; 28,9 mmol).

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 7.65-7.76 (m, 4H, **6-9**) ; 6.51-5.59 (m, 3H, **1**, **2**) ; 5.59 (s, 2H, **4**)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 165.4 (**3**) ; 147.3 (**10**) ; 133.8 (**5**) ; 132.1 (**7**) ; 131.9 (**1**) ; 128.9 (**8**) ; 128.8 (**6**) ; 127.7 (**2**) ; 125.0 (**9**) ; 62.9 (**4**)

SM-ESI (m/z): 230.04 [M+Na]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 57.97, H 4.38, N 6.76 ; trouvée. C 57.18, H 4.21, N 6.71

Synthèse du composé (14) :Formule : $C_{31}H_{37}NO$ (MM : 439,6 g/mol)

Rendement : 65%

Aspect : solide blanc

Dans un schlenk préalablement séché est mis sous atmosphère inerte sont placés 0,85 g (2,9 mmol ; 1 éq) d'acide 1-pyrène butyrique **13** dilué dans 20 mL de chloroforme anhydre. 0,26 mL (2,9 mmol ; 1 éq) de chlorure d'oxalyle sont additionnés gouttes à gouttes dans le schlenk refroidi grâce à un bain de glace. A la fin de l'ajout, le milieu est amené à température ambiante et laissé durant une heure. Ainsi un produit intermédiaire est formé (4-chlorure (1-pyrène) butanoyle). Le solvant est évaporé, le résidu est dissout dans 40 mL de chloroforme anhydre. Une solution contenant 0,5 g de composé **4** (2,9 mmol ; 1 éq), 0,8 mL de la triméthylamine (10 mmol ; 3,4 éq) dans 10 mL de chloroforme est ajoutée goutte à goutte au milieu réactionnel refroidi dans un bain de glace. Par la suite de l'ajout, le milieu est amené à température ambiante, la réaction est agitée pendant 16 heures. A la fin de la réaction, le solvant est évaporée, le produit est purifié à l'aide d'une chromatographie sur silice flash (éluant acétate d'éthyle). Le produit obtenu est un solide blanc avec un rendement de 65% (820 mg ; 1,86 mmol).

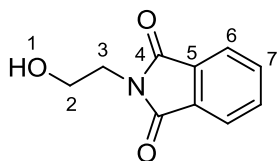
RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 8.31-7.84 (m : 9H, **19-21, 23, 24, 26-28, 30**) ; 5.80 (m : 1H, **2**) ; 5.35 (t : 1H, **12**) ; 5,00 (m : 2H, **1**) ; 3.38 (t : 2H, **16**, $^3J_{HH}=7,2$ Hz) ; 3.22 (dd : 2H, **11**, $^3J_{HH}=13/7$ Hz) ; 2.23 (m : 4H, **14, 15**) ; 2.02 (m : 2H, **3**) ; 1.44-1.25 (m : 14H, **4-10**).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 172.4 (**13**) ; 139.2 (**2**) ; 131.4-123.4 (**17-32**) ; 114.1 (**1**) ; 39.5 (**11**) ; 36.1 (**14**) ; 33.8 (**3**) ; 32.7 (**16**) ; 29.6-26.9 (**4-10, 15**).

SM-ESI (m/z) : 462.28 [M+Na]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 84.69, H 8.48, N 3.19 ; trouvée. C 84.16, H 8.50, N 3.17.

Synthèse du composé (16) :

Formule : $C_{10}H_9NO_3$ (MM : 191,2 g/mol)

Rendement : 87%

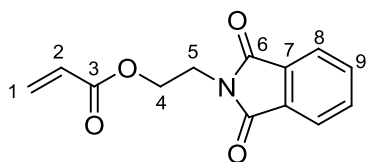
Aspect : solide blanc

5 g de bromoéthanol 15 (40 mmol ; 1 éq), 8,89 g de phthalimide de potassium (48 mmol; 1,2 éq) et 40 mL de DMF sont placés dans un schlenk de 100 mL. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 heures. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide, à 60°C pendant 4 h. Un solide blanc est obtenu puis dissout dans de l'acétate d'éthyle sous forte agitation pendant 30 min. La solution organique est lavée à l'eau (3x100 mL) et la phase aqueuse est extraite à l'acétate d'éthyle (3x100 mL). Les phases organiques sont récoltées puis séchées sur $MgSO_4$. La solution est filtrée et concentrée sous pression réduite. Le composé 16 est obtenu sous forme d'un solide blanc avec un rendement de 87% (6,811 g ; 35,62 mmol).

RMN 1H (300 MHz, DMSO, δ ppm) : 7.83 (m : 4H, 6,7) ; 3.60 (m, 4H, 2, 3).RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO, δ ppm): 168.8 (4) ; 135.1 (7) ; 132.6 (5) ; 123.7 (6) ; 58.5 (2) ; 40 (3).

SM-ESI (m/z) : 214.05 [M+Na]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 62.82, H 4.74, N 7.33 ; trouvée. C 63.04, H 4.44, N 7.38

Synthèse de composé (17) :Formule : $C_{13}H_{11}NO_4$ (MM : 245,2 g/mol)

Rendement : 57%

Aspect : solide blanc

Dans un schlenk sortant de l'étuve sont introduits, sous argon et à 0°C, 6,71 g de composé 16. Puis, 4,13 g de chlorure d'acryloyle (45,63 mmol ; 1,3 éq) sont rajoutés au goutte à goutte rapide à l'aide d'une seringue. Le mélange réactionnel est alors agité à température ambiante pendant 16 heures. Le mélange, en fin de réaction, est filtré sur papier

filtre et rincé avec du CH_2Cl_2 . Le filtrat est lavé avec 3x100 mL d'une solution de NaOH à 0,5 M et séché sur MgSO_4 , filtré puis concentré sous pression réduite. Un solide jaune-orange est obtenu. Ce solide est purifié sur une colonne de silice avec comme éluant 100% CH_2Cl_2 . Le composé **17** est ainsi obtenu avec un rendement de 57% (4,14 g ; 16,88 mmol).

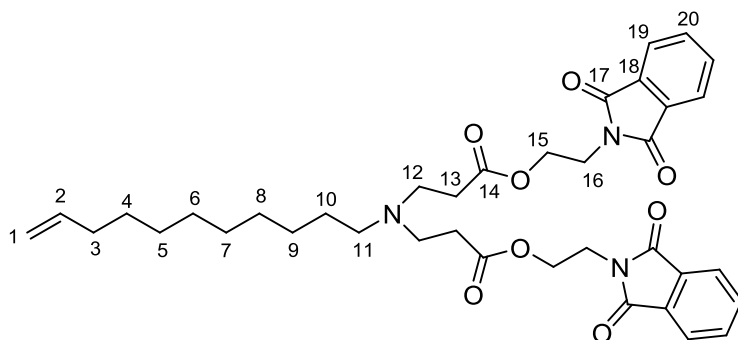
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7.85 (m : 2H, **8**), 7.73 (m : 2H, **9**) ; 6.36 (dd : 1H, **1**, $^3J_{\text{HH}}=1,5/17,3$ Hz) ; 6.05 (dd : 1 H, **2**, $^3J_{\text{HH}}=17,3/10,4$ Hz) ; 5.80 (dd : 1H, **1**, $^3J_{\text{HH}}=1,5/17,3$ Hz) ; 4.39 (t : 2H, **4**, $^3J_{\text{HH}}=5,6$ Hz) ; 4.0 (t : 2H, **5**, $^3J_{\text{HH}}=5,6$ Hz).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 168.2 (**6**) ; 165.9 (**3**) ; 134.2 (**9**) ; 132.2 (**7**) ; 131.5 (**1**) ; 128.1 (**2**) ; 123.5 (**8**) ; 61.8 (**4**) ; 37.1 (**5**).

SM-ESI (m/z) : 268.06 [M+Na]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 63.67, H 4.52, N 5.71 ; trouvée. C 63.83, H 4.46, N 5.74

Synthèse du composé (**18**) :



Formule : $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_8$ (MM : 659,8 g/mol)

Rendement : 62%

Aspect : huile jaune

Dans un schlenk de 50 mL sont placés, 1,042 g de composé **4** (11-amino-1-undécène) (6,15 mmol ; 1 éq), 7,546 g de composé **17** (30,77 mmol ; 5 éq) et 25 mL de DMF. Le mélange réactionnel est agité pendant 3 jours à 40°C. En fin de réaction, le DMF est évaporé pendant 4 h à la rampe à vide. Un solide jaune est obtenu puis purifié sur colonne de silice avec changement d'éluant : 100% CH_2Cl_2 pour récupérer le produit **17**, puis $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$

(50/50) pour récupérer le produit **18** souhaité. Après évaporation du solvant, le composé **18** est obtenu sous forme d'une huile jaune avec un rendement de 62% (2,516 g ; 3,81 mmol).

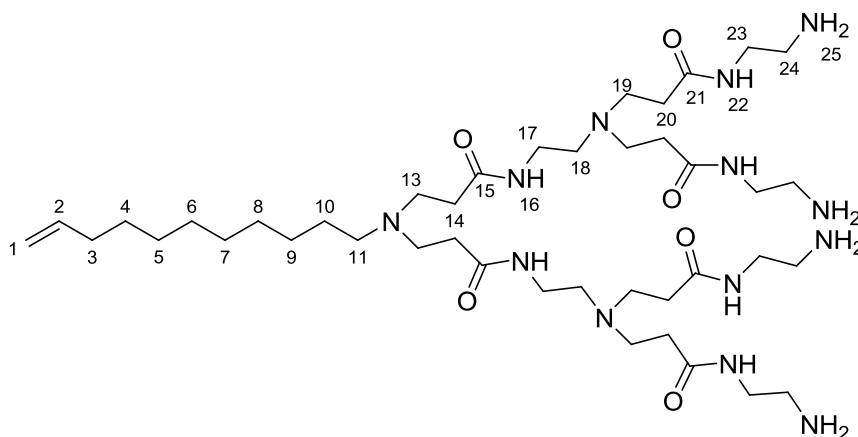
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7.81 (m : 4H, **19**) ; 7.70 (m : 4H, **20**) ; 5.77 (m : 1H, **2**) ; 4.91 (m : 2H, **1**) ; 4.27 (t : 4H, **15**, $^3J_{\text{HH}}=5,4$ Hz) ; 3.91 (t : 4H, **16**, $^3J_{\text{HH}}=5,4$ Hz) ; 2.65 (t : 4H, **12**, $^3J_{\text{HH}}=7,4$ Hz) ; 2.38-2.26 (m : 6H, **11**, **13**) ; 1.98 (m : 2H, **3**) ; 1.35-1.21 (m : 14H, **4-10**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 172.4 (**14**) ; 168.1 (**17**) ; 139.3 (**2**) ; 134.1 (**20**) ; 132 (**18**) ; 123.4 (**19**) ; 114.2 (**1**) ; 61.5 (**15**) ; 53.7 (**11**) ; 48.9 (**12**) ; 37 (**16**) ; 33.9 (**3**) ; 32.3 (**13**) ; 29.7-27 (**4-10**).

SM-ESI (m/z) : 682.31 [M+Na]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 67.36, H 6.87, N 6.37 ; trouvée. C 67.52, H 6.93, N 6.45

Synthèse du composé (**19**) :



Formule : $\text{C}_{41}\text{H}_{83}\text{N}_{13}\text{O}_6$ (MM : 852,2 g/mol)

Rendement : quantitatif

Aspect : huile orange très visqueuse

Dans un schlenk de 100 mL, nous avons placé : 2,7 g (3,6 mmol ; 1 éq) de composé **9**, 20 g (0,33 mol ; 92 éq) d'éthylène diamine, 15 mL de méthanol. Le milieu réactionnel est agité pendant 5 jours à température ambiante. A la fin de la réaction le méthanol et l'excès d'éthylène diamine sont évaporés pendant 24 heures à la rampe à vide. Le composé **19** est ainsi obtenu avec un rendement quantitatif.

RMN ^1H (600 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7.94 (t : 4H, **22**) ; 7.88 (t : 2H, **16**) ; 5.77 (m : 1H, **2**) ; 4.96 (m : 2H, **1**) ; 3.07 (q : 4H, **17**) ; 3.03 (q : 8H, **23**) ; 2.64 (t : 8H, **19**) ; 2.60 (t : 4H, **13**) ; 2.55 (t : 8H, **24**) ; 2.42 (t : 4H, **18**) ; 2.32 (t : 2H, **11**) ; 2.19 (t : 12H, **14**, **20**) ; 1.98 (m : 2H, **3**) ; 1.33-1.23 (m : 14H, **4-10**).

RMN ^{13}C (130 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 172.0 (**21**) ; 171.8 (**15**) ; 139.3 (**2**) ; 115,1 (**1**) ; 53.2 (**11**) ; 52.7 (**18**) ; 50.1 (**19**) ; 49.9 (**13**) ; 42.5 (**23**) ; 41.7 (**24**) ; 37.3 (**17**) ; 33.8-33.6 (**3**, **14**, **20**) ; 29.6-28.7 (**4-10**).

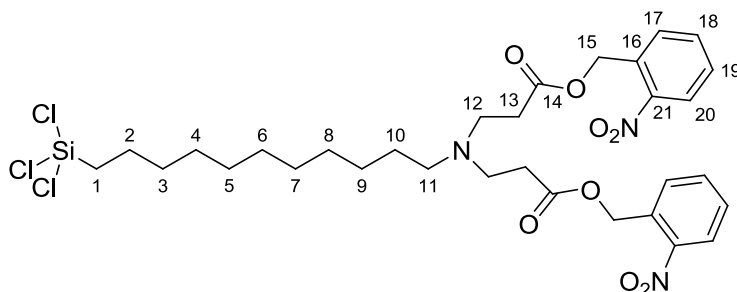
SM-ESI (m/z) : 854.66 [M+1]

Analyse élémentaire (%) : calculée. C 57.65, H 9.79, N 21.32 ; trouvée. C 55.01, H 10.36, N 20.01

b. Hydrosilylation :

Les réactions d'hydrosilylation sont réalisées au dernier moment avant l'étape de silanisation car les composés silylés ne sont pas stables dans le temps. Une hydrolyse de la fonction silane peut avoir lieu ce qui rend le greffage préjudiciable.

Synthèse du composé (D_1) :



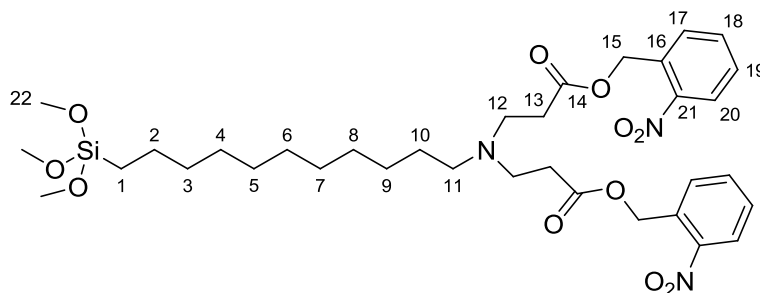
Formule : $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{Si}$ (MM : 719,1 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 15 mg de composé **7** (0,025 mmol ; 1 éq), 0,04 mL de trichlorosilane (16 éq ; 0,4 mmol) préalablement distillé à 40°C sous argon, 0,056 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol) et 0,4 mL de toluène anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 2h à 40°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. Le composé **D₁** est obtenu avec un taux de conversion à 100% en RMN ^1H .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8.09-7.47 (m : 8H, **17-20**) ; 5.53 (s : 4H, **15**) ; 3.58 (m : 4H, **12**) ; 3.31 (m : 6H, **11, 13**) ; 1.83 (m : 2H, **10**) ; 1.59-1.23 (m : 12H, **4-9**) ; 0.70 (t : 2H, **1**)
 RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 170.1 (**14**) ; 147.3 (**21**) ; 134.1 (**16**) ; 130.8 (**18**) ; 129.5 (**19**) ; 129.2 (**17**) ; 125.0 (**20**) ; 64.1 (**15**) ; 54.0 (**11**) ; 49.4 (**12**) ; 31.7 (**13**) ; 29.3-17.0 (**2-10**) ; 9.1 (**1**).

Synthèse du composé (D**₂) :**



Formule : $\text{C}_{34}\text{H}_{51}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{Si}$ (MM : 705,9 g/mol)

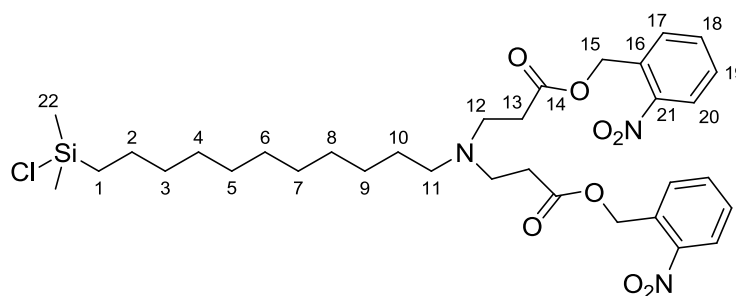
Rendement : quantitatif

Dans un schlenk d'hydrosilylation séché sous vide et mis sous argon, on y introduit 36,5 mg de composé **7** ($6,25 \cdot 10^{-5}$ mol ; 1 éq), 0,13 mL de triméthoxysilane (16 éq ; 1 mmol) préalablement distillé à 95°C sous argon, 0,14 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; $6,25 \cdot 10^{-6}$ mol) et 1 mL de toluène anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 40°C. En fin de réaction, le solvant et l'excès de silane sont évaporés sous vide pendant 2 h. On obtient le produit **D**₂ avec un taux de conversion évalué à 100% en RMN ^1H .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8.09-7.43 (m : 8H, **17-20**) ; 5.48 (s : 4H, **15**) ; 3.56 (s : 9H, **22**) ; 2.81 (t : 4H, **12**) ; 2.54 (t : 4H, **13**) ; 2.42 (t : 2H, **11**) ; 1.38-1.22 (m : 18H, **2-10**) ; 0.63 (t : 2H, **1**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 177.2 (**14**) ; 147.2 (**21**) ; 133.6 (**16**) ; 131.9 (**18**) ; 128.9 (**19**) ; 128.6 (**17**) ; 124.8 (**20**) ; 62.9 (**15**) ; 53.7 (**11**) ; 50.1 (**22**) ; 49.0 (**12**) ; 33.0 (**13**) ; 29.4-22.4 (**2-10**) ; 9.0 (**1**).

RMN ^{29}Si (59 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : -41.8

Synthèse du composé (*D*₃) :Formule : C₃₃H₄₈ClN₃O₈Si (MM : 705,9 g/mol)

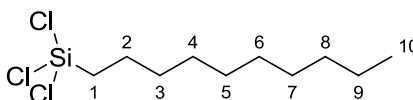
Rendement : quantitatif

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 36,5 mg de composé **7** ($6,25 \cdot 10^{-5}$ mol ; 1 éq), 0,11 mL de chlorodiméthylsilane (16 éq ; 1 mmol) préalablement distillé sous argon, 0,14 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; $6,25 \cdot 10^{-6}$ mol) et 0,4 mL de toluène anhydre. Le mélange est agité pendant 2 h à 40°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. On obtient le produit **D**₃ avec un taux de conversion évalué à 100% en RMN ¹H.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8.08-7.43 (m : 8H, **17-20**) ; 5.48 (s : 4H, **15**) ; 2.82 (t : 4H, **12**) ; 2.55 (t : 4H, **13**) ; 2.43 (t : 2H, **11**) ; 1.38-1.23 (m : 18H, **2-10**) ; 0.80 (t : 2H, **1**) ; 0.40 (s : 6H, **22**)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 171.9 (**14**) ; 147.3 (**21**) ; 133.6 (**16**) ; 132.2 (**18**) ; 128.9 (**19**) ; 128.6 (**17**) ; 124.9 (**20**) ; 62.8 (**15**) ; 53.8 (**11**) ; 49.2 (**12**) ; 32.8 (**13**) ; 29.5-22.8 (**2-10**) ; 18.9 (**1**) ; 1.6 (**22**).

RMN ²⁹Si (59 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 31.9

Synthèse du composé C10 :Formule : C₁₀H₂₁Cl₃ (MM : 275,7 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk d'hydrosilylation séché sous vide et placé sous atmosphère inerte, sont introduits 8,7 mg de décène ($6,25 \cdot 10^{-5}$ mmol ; 1 éq), 0,1 mL de trichlorosilane (16 éq ;

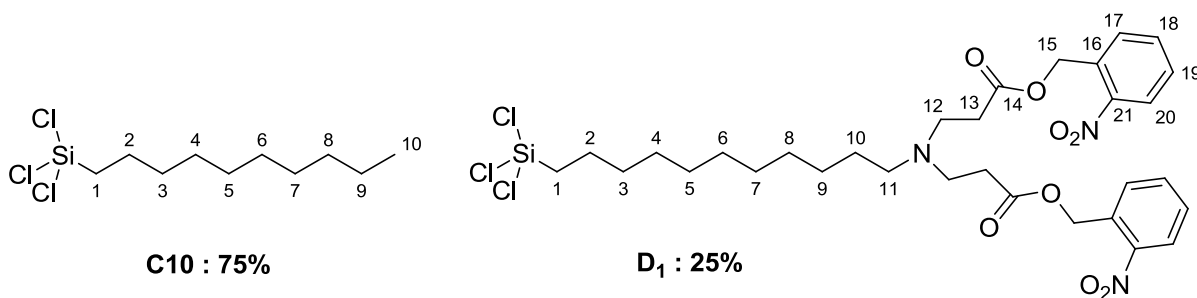
1 mmol) préalablement distillé sous argon, 0,14 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; $6,25 \cdot 10^{-6}$ mol) et 1 mL de toluène anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 40°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. Le produit **C10** est obtenu avec un taux de conversion évalué à 100% en RMN ^1H .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 1.57-1.28 (m : 16H, **2-9**) ; 0.89 (t : 3H, **10**) ; 0.70 (t : 2H, **1**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 31.9-17.1 (**2-9**) ; 14.1 (**10**) ; 9.2 (**1**).

RMN ^{29}Si (59 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 13.7

Synthèse du système mixte 75%C10, 25%D₁ :

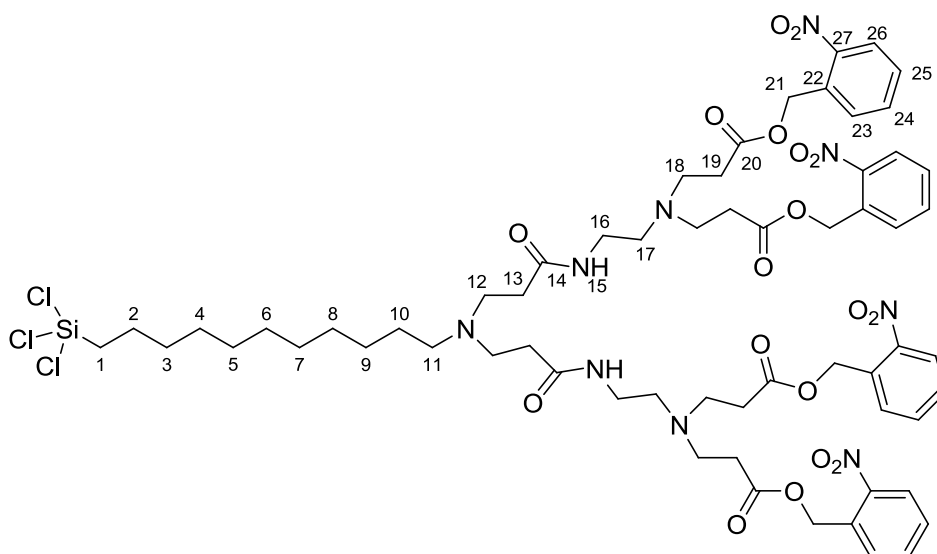


Formule : **C10**. $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{Cl}_3$ (MM : 275,7 g/mol) ; **D₁**. $\text{C}_{31}\text{H}_{42}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{Si}$ (MM : 719,1 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk préalablement séché sous vide puis mis sous argon, sont introduits 6,57 mg de décène ($4,68 \cdot 10^{-5}$ mol ; 0,75 éq), 9,25 mg de composé **D₁** ($1,56 \cdot 10^{-5}$ mol ; 0,25 éq), 0,1 mL de trichlorosilane (16 éq ; 1 mmol) distillé sous argon au préalable, 0,14 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; $6,25 \cdot 10^{-6}$ mol) et 1 mL de toluène anhydre. Il est à noter que le nombre de mole totale de composé éthylénique mis en jeu pour la réaction est de $6,25 \cdot 10^{-5}$ mmol. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 40°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à sous vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. Le bon déroulement de la réaction a été confirmé par la RMN ^1H .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8.15-7.53 (m : 8H, **17-20 D₁**) ; 5.63 (s : 4H, **15 D₁**) ; 4.14 (m : 4H, **12 D₁**) ; 3.61-3.30 (m : 6H, **11,13 D₁**) ; 2.03 (m : 2H, **10 D₁**) ; 1.61-1.27 (m : 32H, **CH₂ C10 et D₁**) ; 0.90 (t : 3H, **10 C10**) ; 0.72 (t : 8H, **CH₂Si, C10 et D₁**)

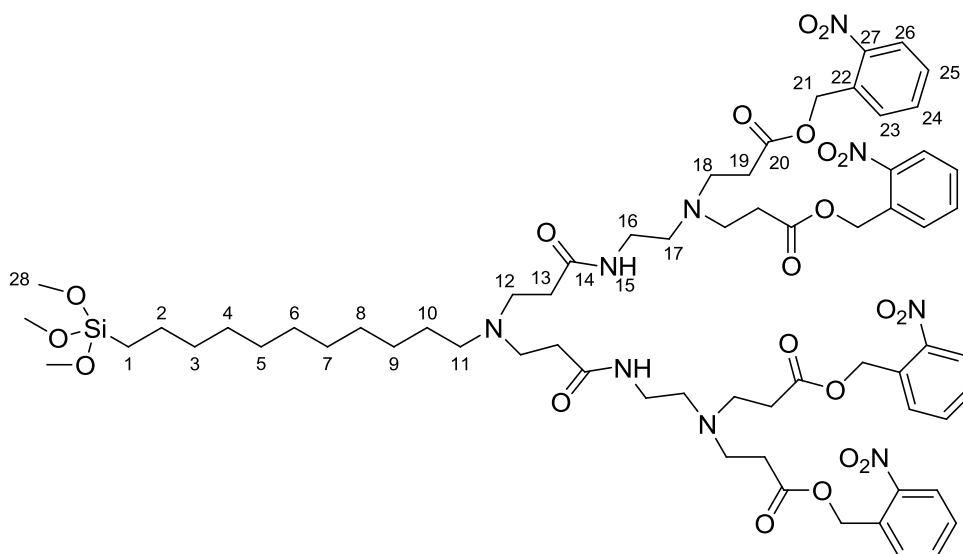
Synthèse du composé (*D*₄) :

Formule : C₆₁H₈₀Cl₃N₉O₁₈Si (MM : 1361,8 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 30,6 mg de composé **11** ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol ; 1 éq), 0,08 mL de trichlorosilane (32 éq; 0,8 mmol) préalablement distillé sous argon, 0,12 mL de catalyseur de Karstedt (0,2 éq en Pt; $5 \cdot 10^{-6}$ mol) et 0,4 mL de CH₂Cl₂ anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 16 h à 40°C. En fin de réaction, le solvant et l'excès de silane sont évaporés à la rampe à vide pendant 2 h. On obtient le produit **D₄** avec un taux de conversion évalué à 100% en RMN ¹H. De par la difficulté de solubilisation du composé **D₄** et la sensibilité du groupement SiCl₃ vis-à-vis de l'eau et des solvants polaires, il a été difficile d'interpréter les spectres. Néanmoins, nous nous sommes assurés que la réaction a bien fonctionné de part la disparition des protons éthylénique du composé **11**.

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8.23-7.55 (m : 16H, **23-26**) ; 5.44 (s : 8H, **21**) ; 3.47-2.6 (m : 26H, **11-13**, **16**, **17**, **18**, **19**) ; 1.6-1.1 (m: 18H, **2-10**) ; 0.8 (t : 2H, **1**).

Synthèse du composé (*D*₅) :

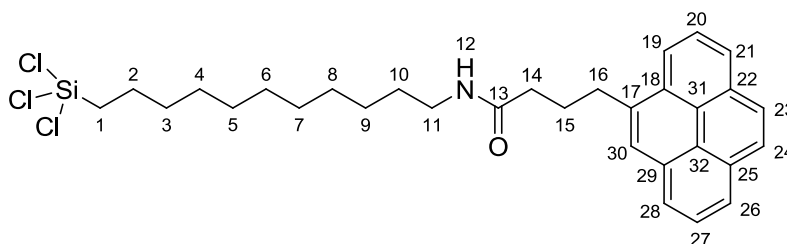
Formule : C₆₄H₈₉N₉O₂₁Si (MM : 1348,5 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk d'hydrosilylation préalablement séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 30,6 mg de composé **11** ($2,5 \cdot 10^{-5}$ mol; 1 éq), 0,051 mL de triméthoxysilane (16 éq ; 0,4 mmol) préalablement distillé sous argon, 0,056 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt; $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol) et 0,4 mL de dichlorométhane anhydre. Le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. On obtient le produit **D**₅ avec un taux de conversion évalué à 100% en RMN ¹H.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 8.10-7.44 (m : 16H, **23-26**) ; 5.47 (s : 8H, **21**) ; 3.57 (s : 9H, **28**) ; 3.28 (q : 4H, **16**) ; 2.81 (m : 12H, **12**, **18**) ; 2.58-2.40 (m : 18H, **11**, **13**, **17**, **19**) ; 1.4-1.21 (m : 18H, **2-10**) ; 0.63 (t : 2H, **1**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 172.0 (**20**, **14**) ; 147.5-125.0 (**22-27**) ; 63.1 (**21**) ; 50.8-49.2 (**11**, **12**, **17**, **18**, **28**) ; 37.2 (**16**) ; 33.4 (**13**, **19**) ; 32.6 (**26**) ; 29.5-19.7 (**2-10**) ; 9.2 (**1**)

Synthèse du composé (P) :Formule : $C_{31}H_{31}Cl_3NOSi$ (MM : 575,1 g/mol)

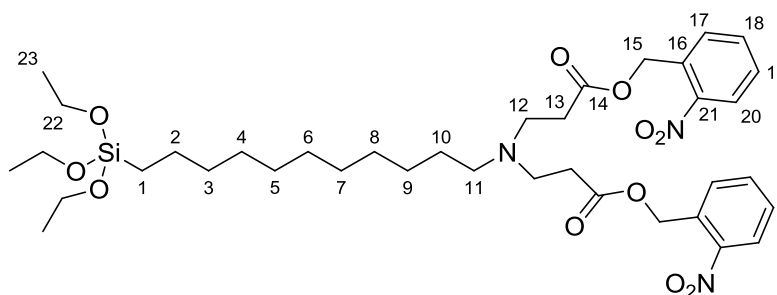
Rendement : quantitatif

Dans un schlenk de 10 mL séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 27,5 mg de composé **14** ($6,25 \cdot 10^{-5}$ mol ; 1 éq), 0,1 mL de trichlorosilane (16 éq; 1 mmol) préalablement distillé sous argon, 0,14 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; $6,25 \cdot 10^{-6}$ mol) et 1 mL de toluène anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 40°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. On obtient le produit **P** avec un taux de conversion évalué à 100% en RMN 1H .

RMN 1H (300 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 7.98-7.56 (m : 9H ; **19-21, 23, 24, 26-28, 30**) ; 3.08 (t : 2H, **16**) ; 2.82 (q : 2H, **11**) ; 1.93 (m : 4H, **14, 15**) ; 1.34-1.00 (m : 18H, **2-10**) ; 0.6 (t : 2H, **1**).

RMN ^{13}C (75 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 173.5 (**13**) ; 137.8-123.2 (**17-32**) ; 39.9 (**11**) ; 35.7 (**14**) ; 32.6 (**16**) ; 31.8-17.16 (**2-10, 15**) ; 9.2 (**1**)

RMN ^{29}Si (59 MHz, $CDCl_3$, δ ppm) : 13.8

Synthèse du composé (D₆) :Formule : $C_{36}H_{57}N_3O_{11}Si$ (MM : 747,9 g/mol)

Rendement : quantitatif

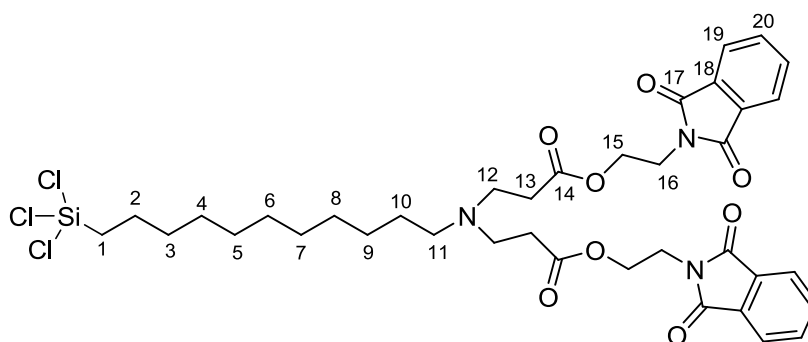
Dans un schlenk de 50 mL séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 0,7 g de composé **7** (1,2 mmol; 1 éq), 1,13 mL de triéthoxysilane (5 éq ; 6 mmol) préalablement

distillé sous argon, 1,3 mL de catalyseur de Karstedt (0,05 éq en Pt ; 6.10^{-5} mol) et 10 mL de toluène anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 20 h à 60°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. On obtient le produit **D₆** avec un taux de conversion évalué à 100% en RMN ^1H .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 8.10-7.25 (m : 8H, **17-20**) ; 5.49 (s : 4H, **15**) ; 3.84 (q : 6H, **22**) ; 2.82 (t : 4H, **12**) ; 2.54 (t : 4H, **13**) ; 2.42 (t : 2H, **11**) 1.34-1.26 (m : 27H, **23**, **2-10**) ; 0.58 (t : 2H, **1**)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 171.9 (**14**) ; 147.4-124.5 (**16-21**) ; 62.8 (**15**) ; 58.3 (**22**) ; 53.8 (**11**) ; 49.2 (**12**) ; 32.6 (**13**) ; 32.5-22.6 (**2-10**) ; 18.2 (**23**) ; 9.1 (**1**)

Synthèse du composé (**D₇**) :



Formule: $\text{C}_{37}\text{H}_{45}\text{Cl}_3\text{N}_3\text{O}_8\text{Si}$ (MM : 795,2 g/mol)

Rendement : quantitatif

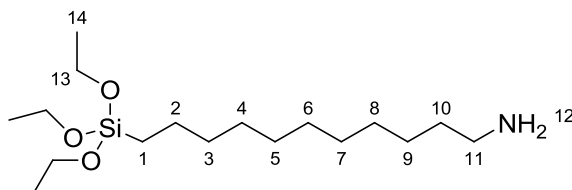
Dans un schlenk séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 100 mg de composé **18** (0,152 mmol ; 1 éq), 0,25 mL de trichlorosilane (16 éq ; 2,43 mmol) préalablement distillé sous argon, 0,34 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; $1,52.10^{-5}$ mol) et 2,43 mL de toluène anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 40°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. On obtient le produit **D₇** avec un rendement est évalué à 100% en RMN ^1H .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7.80 (m : 4H, **19**) ; 7.71 (m : 4H, **20**) ; 4.32 (m, 4H, **15**) ; 3.93 (m : 4H, **16**) ; 3.59 (m : 4H, **12**) ; 3.30 (m : 2H, **11**) ; 3 (m : 4H, **13**) ; 1.39-1.26 (m : 18H, **2-10**) ; 0.73 (m : 2H, **1**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 171.2 (**14**) ; 168.3 (**17**) ; 134.4 (**20**) ; 131.8 (**18**) ; 123.6 (**19**) ; 63.1 (**15**) ; 54.2 (**11**) ; 49.6 (**12**) ; 36.5 (**16**) ; 28.4 (**13**) ; 31.8-29, 26.5-22.3 (**3-10**) ; 17.1 (**2**) ; 9.1 (**1**).

RMN ^{29}Si (59 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 13.1

Synthèse du composé (AUTES) :



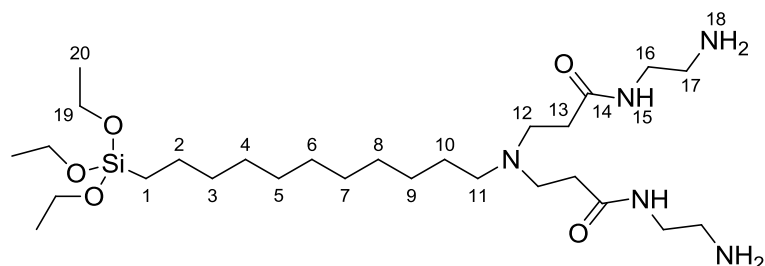
Formule: $\text{C}_{17}\text{H}_{39}\text{NO}_3\text{Si}$ (MM : 333,6 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 42,3 mg de composé **4** (0,25 mmol ; 1 éq), 0,23 mL de triéthoxysilane (5 éq ; 1,25 mmol) préalablement distillé sous argon, 0,28 mL de catalyseur de Karstedt (0,05 éq en Pt ; $1,25 \cdot 10^{-5}$ mol) et 2 mL de toluène anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 50°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane pendant 2 h. On obtient l'Amino-undécyltriéthoxysilane (**AUTES**) avec un taux de conversion évalué à 100% en RMN ^1H .

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 3.79 (q : 6H, **13**) ; 2.64 (t : 2H, **11**) ; 1.34-1.18 (m : 27H, **2-10**, **13**) ; 0.60 (t : 2H, **1**).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 59.1 (**11**) ; 58.32 (**13**) ; 33.1-22.7 (**2-10**) ; 18.2 (**14**) ; 10.3 (**1**).

Synthèse du composé (*D*₈) :

Formule: C₂₇H₅₉N₅O₅Si (MM : 561,9 g/mol)

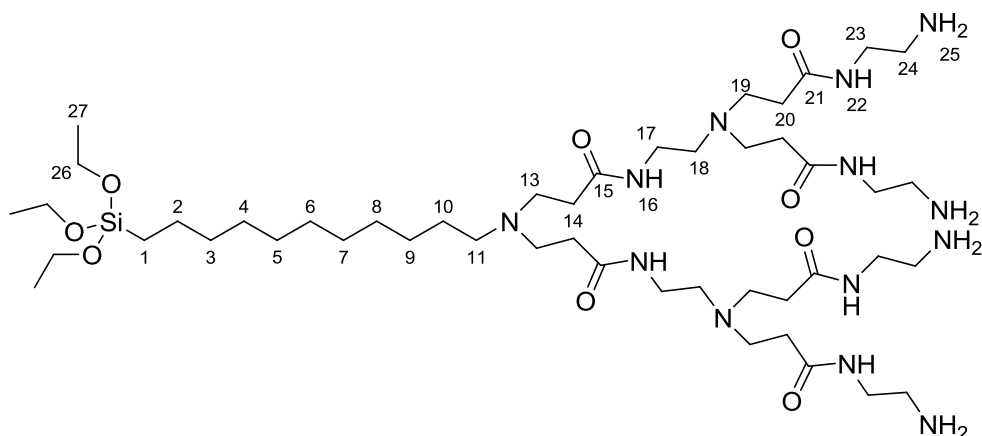
Rendement : quantitatif

Dans un schlenk de 100 mL, séché sous vide et placé sous argon, sont placés 50 mg de composé **5** (1,25 mmol ; 1 éq), 1,15 mL de triéthoxysilane préalablement distillé (5 éq; 6,25 mmol; 1,027 g), 2,78 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; 0,13 mmol ; 2,38g) et 12 mL de dichlorométhane anhydre. Le mélange réactionnel est agité à 30°C pendant 3 jours. En fin de réaction, le solvant et le triéthoxysilane en excès sont évaporés à la rampe à vide. On obtient une huile marron-orange très visqueuse.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7.72 (s : 1H, **15**) ; 3.70 (m: 6H, **19**) ; 3.18 (m: 4H, **16**) ; 2.72 (t: 4H, **17**) ; 2.62 (m: 4H, **12**) ; 2.30 (m : 6H, **11**, **13**) ; 2.10 (s : 2H, **18**) ; 1.12 (m: 27H **20**, **2-10**) ; 0.52 (m: 2H, **1**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 172.8 (**14**) ; 58.2 (**19**) ; 53.6 (**11**) ; 50 (**12**) ; 41.8 (**16**) ; 41.3 (**17**) ; 33.8 (**13**) ; 33.1 (**3**) ; 29.6-27.5 (**4-9**) ; 26.5 (**10**) ; 22.7 (**2**) ; 18.2 (**20**) ; 10.3 (**1**).

RMN ²⁹Si (59 MHz, CDCl₃, δ ppm) : -44.6

Synthèse du composé (*D*₉) :Formule: C₄₇H₉₉N₁₃O₉Si (MM : 1018,5 g/mol)

Rendement : quantitatif

Dans un schlenk séché sous vide et placé sous argon, sont introduits 2,5 g de composé **19** (2,7 mmol ; 1 éq), 2,22 mL de triéthoxysilane (5 éq ; 13,5 mmol) préalablement distillé sous argon, 6 mL de catalyseur de Karstedt (0,1 éq en Pt ; 0,27 mmol) et 30 mL d'éthanol anhydre. Le mélange réactionnel est agité pendant 20 h à 60°C. En fin de réaction, le solvant est évaporé à la rampe à vide tout comme l'excès de silane. On obtient le produit **D**₉ avec un rendement est évalué à 100% en RMN ¹H.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7.91-7.85 (m : 6H, **16**, **22**) ; 3.78 (q : 6H, **26**) ; 3.04 (m : 12H, **17**, **23**) ; 2.67-2.53 (m : **13**, **19**, **24**) ; 2.42 (t : 4H, **18**) ; 2.33 (t : 2H, **11**) ; 2.20 (m : 12H, **14**, **20**) ; 1.34-1.12 (m : 27H, **2-10**, **27**) ; 0.51 (t : 2H, **1**).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 171.8 (**15**, **21**) ; 58.9 (**26**) ; 52.8 (**11**, **18**) ; 50.2 (**13**, **19**) ; 42.7 (**23**), 41.8 (**24**) ; 37.3 (**17**) ; 33.8 (**14**, **20**) ; 31.7-22.8 (**2-10**) ; 18.2 (**27**) ; 10.3 (**1**).

4. Greffage et modification des surfaces SiO₂ (Chapitre II) :

Deux réacteurs à double enveloppe ont été utilisés afin de réaliser les réactions de silanisation (100 mL et 500 mL) sous atmosphère inerte et à température contrôlée. Ils sont préalablement nettoyés à l'aide d'une solution de potasse alcoolique, puis rincés à l'eau et à l'acétone et mis dans une étuve à 80°C pendant 16 heures.

Les substrats PM-IRRAS de (5 cm x 5 cm) sont découpés à la main en quatre (2,5 cm x 2,5 cm) à l'aide d'un coupe-verre. Ces substrats avec les substrats de wafer de silicium sont rincés à l'eau MilliQ (18 MΩ.cm), puis mis dans un bécher contenant du chloroforme. Ce bécher est mis dans un bain à ultrasons (Fisherbrand FB 11205 ; 37 kHz) pendant 15 min.

Ensuite, ces substrats sont séchés sous un jet d'azote sous une hotte à flux laminaire puis sont traités aux UV/O₃ ($\lambda = 185\text{-}254\text{ nm}$) pendant 30 min. Par la suite, ils sont directement introduits dans le réacteur à double enveloppe et mis sous vide pendant 1h30 à 25°C. Puis, le réacteur à double enveloppe est mis sous argon et amené soit à 5°C soit à 18°C en fonction des conditions expérimentales souhaité pour le greffage.

Greffage du composé D_1 : $\text{SiO}_2@D_1$

Dans le schlenk d'hydrosilylation fraîchement préparé, les $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol (pour avoir une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M) du composé D_1 sont solubilisés sous atmosphère inerte dans 2 mL soit de toluène (pour le greffage dans le toluène) soit de chloroforme (pour le greffage dans le chloroforme et dans le mélange de solvant $\text{CHCl}_3/\text{C}_6\text{H}_{12}$). Ces 2 mL contenant le composé D_1 sont transvasés dans 48 mL de solvant de greffage (le toluène ou le mélange de solvant $\text{CHCl}_3/\text{C}_6\text{H}_{12}$). Les 50 mL de solution sont mis dans le réacteur à double enveloppe contenant les substrats immergés dans 50 mL du même solvant de réaction à température contrôlée (5°C ou 18°C). Le volume total étant de 100 mL, la concentration en composé D_1 est de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Les substrats immergés dans la solution de silanisation sont laissés pendant le temps voulu (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min). Une fois les substrats retirés de la solution, ils sont nettoyés aux ultrasons successivement dans le toluène (5 min ; uniquement pour les greffages réalisés dans le toluène) le chloroforme (5 min) et l'eau MilliQ (5 min). Après 30 min sous vide, les substrats sont prêts à être analysés en angle de contact, IR et AFM.

Greffage du composé D_2 : $\text{SiO}_2@D_2$

Dans le schlenk d'hydrosilylation fraîchement préparé, $6,25 \cdot 10^{-5}$ mol du composé D_2 sont solubilisés sous atmosphère inerte dans 5 mL de toluène. $6,25 \cdot 10^{-6}$ mol (0,1 éq) d'acide trichloracétique (TCA) y sont ajoutés. Ces 5 mL contenant le composé D_2 et le catalyseur de greffage (TCA) sont transvasés à l'aide d'une seringue dans un plus grand schlenk (100 mL) contenant 120 mL de toluène. L'ensemble de la solution (125 mL) est mis dans le réacteur à double enveloppe de 500 mL contenant les substrats immergés dans 125 mL du même solvant à 18°C. Le volume total étant de 250 mL, la concentration en composé D_2 est de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Les substrats immergés dans la solution de silanisation sont laissés pendant le temps voulu (15 h, 18 h, 21 h). Une fois les substrats retirés de la solution, ils sont nettoyés aux ultrasons successivement dans le toluène (5 min) le chloroforme (5 min) et l'eau MilliQ (5 min).

Greffage du composé D₃ : SiO₂@D₃

Dans le schlenk du composé **D₃** fraîchement préparé, les $6,25 \cdot 10^{-5}$ mol sont solubilisés sous atmosphère inerte dans 5 mL de toluène. Ces 5 mL contenant le composé **D₃** sont transvasés dans un plus grand schlenk (100 mL) contenant 120 mL de toluène. L'ensemble de la solution (125 mL) est mis dans le réacteur à double enveloppe de 500 mL contenant les substrats immergés dans 125 mL du même solvant à 18°C. Le volume total étant de 250 mL, la concentration en composé **D₃** est de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Les substrats immergés dans la solution silanisation sont laissés pendant le temps voulu (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min). Une fois les substrats retirés de la solution, ils sont nettoyés aux ultrasons successivement dans le toluène (5 min) le chloroforme (5 min) et l'eau MilliQ (5 min).

Greffage du composé C10 : SiO₂@C10

Dans le schlenk, $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol du composé **C10** fraîchement préparés sont solubilisés sous atmosphère inerte dans 2 mL soit de toluène (pour le greffage dans le toluène) soit de chloroforme (pour le greffage dans le chloroforme et dans le mélange de solvant CHCl₃/C₆H₁₂). Ces 2 mL contenant le composé **C10** sont transvasés dans 48 mL de solvant de greffage (le toluène ou le chloroforme ou CHCl₃/C₆H₁₂ 25/75). Les 50 mL de solution sont mis dans le réacteur à double enveloppe contenant les substrats immergés dans 50 mL du même solvant de réaction à température contrôlée (5°C ou 18°C). Le volume total étant de 100 mL, la concentration en composé **C10** est de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Les substrats immergés dans la solution de silanisation sont laissés pendant le temps voulu (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min). Une fois les substrats retirés de la solution, ils sont nettoyés aux ultrasons successivement dans le toluène (5 min ; uniquement pour les greffages réalisés dans le toluène) le chloroforme (5 min) et l'eau MilliQ (5 min).

Greffage du système mixte D₁ et C10 : SiO₂@D₁C10/H et SiO₂@D₁C10/I

Dans le schlenk d'hydrosilylation, $4,68 \cdot 10^{-5}$ mol de composé **C10** et 1,56 mmol de composé **D₁** sont solubilisés sous argon dans 5 mL solvant anhydre (toluène pour le greffage dans le toluène ou chloroforme pour le greffage dans le mélange de solvant CHCl₃/C₆H₁₂ 25%/75%). Ces 5 mL contenant le mélange de 75% de **C10** et 25% de **D₁** sont transvasés dans 120 mL de solvant de greffage (100% toluène ou 25%/75% CHCl₃/C₆H₁₂). Les 125 mL de solution sont mis dans le réacteur à double enveloppe contenant les substrats immergés dans

125 mL du même solvant de réaction. La température de silanisation est contrôlée (5°C ou 18°C). Le volume total étant de 250 mL, la concentration en composé trichlorosilylé est de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Les substrats immergés dans la solution silanisation sont laissés pendant le temps voulu (5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 min). Une fois les substrats retirés de la solution, ils sont nettoyés aux ultrasons successivement dans le toluène (5min ; uniquement pour les greffages réalisés dans le toluène) le chloroforme (5 min) et l'eau MilliQ (5 min). Après 30 min sous vide, les substrats sont prêts à être analysés.

Greffage du composé D_5 : $SiO_2@D_5$

Les $2,5 \cdot 10^{-5}$ mol du composé D_5 issus de l'étape d'hydrosilylation sont solubilisés sous atmosphère inerte dans 2 mL de chloroforme. $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol (0,1 éq) d'acide trichloracétique (TCA) y sont ajoutés. Ces 2 mL contenant le composé D_5 et le catalyseur de greffage (TCA) sont transvasés dans 48 mL de mélange de solvant (50%CHCl₃ 50%C₆H₁₂). L'ensemble de la solution (50 mL) est mis dans le réacteur à double enveloppe de 100 mL contenant les substrats immergés dans 50 mL du même solvant à 18°C. Le volume total étant de 100 mL, la concentration en composé D_5 est de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M. Les substrats immergés dans la solution de silanisation sont laissés pendant 15h. Une fois les substrats retirés de la solution, ils sont nettoyés aux ultrasons successivement dans le chloroforme (5 min) et l'eau MilliQ (5 min). Après 30 min sous vide, les substrats sont prêts à être analysés en angle de contact, IR et AFM.

Photoclivage d'ester 4- nitobenzylrique greffé sur des substrats SiO_2 (Chapitre III) :

Les substrats $SiO_2@D_1$, $SiO_2@D_1C10/H$, $SiO_2@D_1C10/I$, $SiO_2@D_5$ sont irradiés à température ambiante pendant 30 min. L'irradiation est effectuée à l'aide d'une lampe au mercure haute pression à travers une plaque de Pyrex pour couper les longueurs d'onde inférieures à 300 nm. Les substrats sont placés à une distance de 2 cm de la plaque Pyrex et la plaque Pyrex à 3 cm de la lampe UV. Après irradiation les substrats sont nettoyés aux ultrasons à l'éthanol et au chloroforme pendant 10 min. Puis ils sont séchés sous jet d'azote sec.

Activation des acides carboxylique sur des substrats SiO₂ :

Après irradiation, des substrats SiO₂ sont mis dans une solution contenant, 20 mL d'eau MilliQ, 1 g d'EDC, 0,5 g de NHS et 1,2 g de MES (0,3 M ; pH 6) pendant 3 heures à température ambiante. Ensuite, les substrats sont rincés à l'eau MilliQ puis nettoyés aux ultrasons dans du chloroforme (10 min) et séchés sous jet d'azote sec.

5. Greffage et modification de surfaces des MNPs (Chapitre IV) :***Greffage du composé P : MNP@P***

Tout d'abord, il s'agit de préparer trois suspensions de 30 mg de MNPs dans 9 mL de toluène. Pour ce faire, à partir d'une solution mère de MNPs natives dans l'eau d'une concentration de 30 mg/mL sont prélevés, 3x 1 mL de MNPs. On les place dans trois eppendorfs différents de 1 mL et on les disperse à l'aide d'un doigt à ultrason (amplitude : 47%). Les particules sont ensuite aimantées et l'eau est retirée. Un changement de solvant est alors effectué de manière progressive. Pour chaque suspension on réalise le même processus : on introduit ensuite 1 mL d'une solution THF/ eau (50/50) dans l'eppendorf, on disperse les MNPs puis on les aimante à nouveau et on enlève la solution. L'opération de lavage est répétée deux fois de plus avec toujours 1 mL d'une solution THF/eau (50/50). De la même manière, les MNPs sont ensuite lavées avec 3x1 mL de THF, puis 3x1 mL d'une solution THF/toluène (50/50), 3x1 mL de toluène et on finit par laver avec 3x1 mL de toluène anhydre. Les MNPs sont donc en solution dans 1 mL de toluène anhydre. Elles sont diluées 9x dans un tube de 15 mL. Trois suspensions de 30 mg dans 9 mL de toluène sont alors obtenues.

Trois solutions de composé **P** dans 1 mL de toluène anhydre sont préparées (1.10^{-6} mol, 3.10^{-6} mol, $2,5.10^{-5}$ mol). Ces trois solutions sont ajoutées chacune dans un des trois tubes de suspension de MNPs (9 mL dans le toluène) pour avoir trois différentes concentrations (1.10^{-4} M, 3.10^{-4} M, $2,5.10^{-3}$ M). Le mélange réactionnel est agité pendant 1h à 20°C à l'aide d'un thermomixeur.

En fin de réaction, les MNPs greffées sont aimantées pour enlever le solvant. Elles sont lavées 3x1 mL au toluène pour éliminer les molécules non greffées. On concentre ensuite les MNPs dans un eppendorf de 1 mL : pour cela on prélève avec une pipette pasteur environ 1 mL de MNPs en solution dans le tube de 15 mL, on les place dans un eppendorf de 1 mL, puis on aimante les MNPs, on enlève le solvant et on recommence l'opération jusqu'à ce que

toutes les MNPs du tube de 15 mL soient transférées dans l'éppendorf de 1 mL. Pour finir, on les lave avec 6x1 mL d'éthanol. Les MNPs sont alors en solution dans 1 mL d'éthanol.

Greffage des composés D_1 et D_7 : $MNP@D_1$, $MNP@D_7$

Une suspension de 30 mg de MNPs dans 9 mL de toluène est préparée de la même manière que celle décrite pour le greffage du composé **P**.

A l'issue de l'hydrosilylation, $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol de produit (**D_1** ou **D_7**) sont dilués dans 1 mL de toluène anhydre. Cette solution est additionnée à la suspension de 30 mg de MNPs dans 9 mL de toluène pour avoir une concentration de $2,5 \cdot 10^{-4}$ M d'agent de couplage et 3 mg/mL de MNPs. Le mélange réactionnel est agité pendant 1 h à 20°C à l'aide d'un thermomixeur.

A la fin du greffage, les MNPs greffées sont concentrées lavées puis conservées dans l'éthanol comme décrit dans le cas du greffage du composé **P**.

Greffage du composé D_2 : $MNP@D_2$

Une suspension de 10 mg de MNPs dans 9 mL de THF anhydre est préparée par un changement progressif de solvant. D'abord, les MNPs sont lavées (par aimantation) 3x par une solution contenant un mélange de 50%THF 50% H₂O ensuite 3x avec 100% de THF et enfin 3x avec 100% de THF anhydre.

$2,5 \cdot 10^{-5}$ mol de composé **D_2** fraîchement synthétisés sont dissous dans 1 mL de THF anhydre. $2,5 \cdot 10^{-6}$ mol (10%) d'acide trichloracétique sont ajoutés à cette solution. Le mélange est additionné à la suspension de 10 mg de MNPs dans 10 mL de THF pour avoir une concentration de $2,5 \cdot 10^{-3}$ M d'agent de couplage et 1 mg/mL de MNPs. Le mélange réactionnel est agité pendant 23h à 30°C à l'aide d'un thermomixeur.

A la fin de la réaction, les MNPs modifiées sont lavées (par aimantation) 3x au THF et 2x à l'eau puis conservées dans l'eau MilliQ.

*Les modes opératoires des greffages des composés **D_6** , **AUTES**, **APTES**, **D_8** et **D_9** ont été établi par la société Ademtech.*

Greffage du composé D_6 : $MNP@D_6$

Dans un flacon de 15 ml sont ajoutés 50 mg de MNPs et mis en suspension dans 5 mL d'une solution aqueuse contenant un tensioactif (Triton X405) à 0.21% (massique) et un antimicrobien (proclin) à 0,05% (massique). A cette solution sont ajoutés, 5 mL d'éthanol et

1 mL d'ammoniaque (à 20% massique). Le mélange est maintenu à une température de 25°C et est agité mécaniquement (300 rpm). 0,4 g (0,53 mmol) de composé **D₆** sont dissous dans de l'éthanol et ajoutés goutte à goutte pendant 2h30. A la fin de l'ajout, la température du milieu réactionnel est portée à 40°C pendant 60 min. Les **MNP@D₆** sont récoltées et sont lavées deux fois (par aimantation) avec 10 mL d'une solution aqueuse contenant un tensioactif (Pluronic F-127) à 0,3% (massique) et une fois avec une solution aqueuse contenant 10 mM de tampon Tris à pH 9 et 0,05% (massique) de Proclin.

Greffage des composés APTES, AUTES : MNP@APTES, MNP@AUTES.

Dans un réacteur à double parois de 60 mL sont placés 400 mg de MNPs. Ces MNPs sont mis en suspension dans 20 mL d'une solution aqueuse contenant un tensioactif (Triton X405) à 0.21% (massique) et un antimicrobien (proclin) à 0,05% (massique). A cette solution sont ajoutés, 20 mL d'éthanol et 3,5 mL d'ammoniaque (à 20% massique). Le mélange est maintenu à une température de 25°C et est agité mécaniquement (300 rpm). 4,25 mmol de produit sont ajoutés goutte à goutte pendant 2h30. A la fin de l'ajout, la température du milieu réactionnel est portée à 40°C pendant 60 min. Les MNPs modifiées (**MNP@APTES**, **MNP@AUTES**) sont récoltées dans un tube à 50 mL. Elles sont lavées deux fois (par aimantation) avec 40 mL d'une solution aqueuse contenant un tensioactif (Pluronic F-127) à 0,3% (massique) et une fois avec une solution aqueuse contenant 10 mM de tampon Tris à pH 9 et 0,05% (massique) de Proclin.

Greffage des composés D₈ : MNP@D₈

Une suspension de 400 mg dans 20 mL d'une solution aqueuse contenant un tensioactif (Triton X405) à 0.21% (massique) et un antimicrobien (proclin) à 0,05% (massique) est mise dans un réacteur à double parois de 60 mL. A cette solution sont ajoutés, 20 mL d'éthanol et 3,5 mL d'ammoniaque (à 20% massique). Le mélange est maintenu à une température de 25°C et est agité mécaniquement (300 rpm). 0,2 g (0,36 mmol) de produit **D₈** sont dissous dans de l'éthanol et ajoutés goutte à goutte pendant 2h30. A la fin de l'ajout, la température du milieu réactionnel est portée à 40°C pendant 60 min. Les **MNP@D₈** sont récoltées puis lavées deux fois (par aimantation) avec une solution aqueuse contenant un tensioactif (Pluronic F-127) à 0,3% (massique) et une fois avec une solution aqueuse contenant 10 mM de tampon Tris à pH 9 et 0,05% (massique) de Proclin.

Greffage des composés D_9 : $MNP@D_9$

Une suspension de 400 mg dans 20 mL d'une solution aqueuse contenant un tensioactif (Triton X405) à 0.21% (massique) et un antimicrobien (proclin) à 0,05% (massique) est mise dans un réacteur à double parois de 60 mL. A cette solution sont ajoutés, 20 mL d'éthanol et 3,5 mL d'ammoniaque (à 20% massique). Le mélange est maintenu à une température de 25°C et est agité mécaniquement (300 rpm). 2,21 g (2,17 mmol) de produit (D_9) sont dissous dans de l'éthanol et ajoutés goutte à goutte pendant 2h30. A la fin de l'ajout, la température du milieu réactionnel est portée à 40°C pendant 60 min. Les $MNP@D_9$ sont récoltées dans un tube à 50 mL. Elles sont lavées deux fois (par aimantation) avec 40 mL d'une solution aqueuse contenant un tensioactif (Pluronic F-127) à 0,3% (massique) et une fois avec une solution aqueuse contenant 10 mM de tampon Tris à pH 9 et 0,05% (massique) de Proclin.

Photoclivage d'ester 4- nitobenzyle greffé sur des MNPs : $MNP@D_1@CO_2H$, $MNP@D_2@CO_2H$, $MNP@D_6@CO_2H$

Une suspension de 20 mL de MNPs ($MNP@D_1$: 30 mg, $MNP@D_2$: 10 mg et $MNP@D_6$: 60 mg) dans l'éthanol est irradiée à température ambiante à travers une plaque de Pyrex (3 h : $MNP@D_1$, $MNP@D_2$; 11 h : $MNP@D_6$). La plaque de Pyrex est placée à une distance de 5 cm de la suspension et la lampe UV est placée à une distance de 3 cm de la plaque de Pyrex. Toutes les 30 min, les MNPs sont dispersées par ultrasons. A la fin de l'irradiation les MNPs sont lavées (par aimantation) 3x à l'éthanol (10 mL).

Déprotection de $MNP@D_7$: Déprotection de $MNP@D_7@NH_2$

Dans un tube de greffage de 15 mL, sont placés 10 mg de MNPs greffées, de l'hydrate d'hydrazine et 5 mL d'éthanol. Le mélange réactionnel est agité pendant 16 heures à température contrôlée. En fin de réaction, on rajoute de l'acide acétique et le mélange est agité pendant 1 h à 25°C (cette étape peut être enlevée, voir le tableau 1 récapitulatif). En fin de réaction, le solvant est éliminé et on lave les MNPs avec 6x1 mL d'éthanol. Après ce processus de lavage, les MNPs sont en solution dans 1 mL d'éthanol. Dans le tableau suivant sont répertoriées les différentes conditions de déprotection qui ont été réalisées.

Quantité d'hydrazine	Traitement acide	Température	Observation en IR
$2,5 \cdot 10^{-6}$ mol (3 éq ; 0,12 μ L)	-	25°C	Aucun changement
$2,5 \cdot 10^{-6}$ mol (3 éq ; 0,12 μ L)	$21,3 \cdot 10^{-6}$ mol ; 1,2 μ L	25°C	Aucun changement
$2,5 \cdot 10^{-5}$ mol (30 éq ; 1,2 μ L)	-	25°C	Aucun changement
$2,5 \cdot 10^{-5}$ mol (30 éq ; 1,2 μ L)	$21,3 \cdot 10^{-5}$ mol ; 12 μ L	25°C	Aucun changement
$2,5 \cdot 10^{-5}$ mol (300 éq ; 12 μ L)	-	25°C	Légère dégradation
$2,5 \cdot 10^{-5}$ mol (300 éq ; 12 μ L)	$21,3 \cdot 10^{-4}$ mol ; 120 μ L	25°C	Légère dégradation
2,5 mmol (3000 éq ; 120 μ L)	-	50°C	Dégradation
2,5 mmol (3000 éq ; 120 μ L)	$21,3 \cdot 10^{-3}$ mol ; 1,2 mL	50°C	Dégradation

Tableau 1. Conditions de déprotection de **MNP@D₇**.

Synthèse de MNP@APTES@CO₂H, MNP@AUTES@CO₂H, MNP@D₈@CO₂H, MNP@D₉@CO₂H, MNP@D₇@CO₂H :

Les **MNP@APTES**, **MNP@AUTES**, **MNP@D₈**, **MNP@D₉**, sont d'abord lavées au DMSO. Le volume de DMSO est ajusté pour avoir une concentration de 50 mg/mL. Cette solution est remplacée par le même volume d'une solution de DMSO contenant de l'anhydride succinique à 250 mg/mL. Les MNPs sont agitées alors pendant 16 heures à température ambiante. A la fin de la réaction, les MNPs sont lavées plusieurs fois au DMSO puis conservées dans l'eau pour avoir une concentration de 10 mg/mL.

6. Immobilisation de biomolécules :

6.1. Immobilisation de biomolécules sur des surfaces SiO₂ (Chapitre III) :

Immobilisation de nanoparticules d'or recouvertes de protéine A (NP-pA) :

Une solution contenant une suspension de NP-pA ($1,7 \cdot 10^{11}$ particules ; 0,8 μ g de protéine A) dans 0,25 mL de solution de tampon Tris pH 8.2 est diluée avec 2 mL d'eau puis centrifugée (5500 rpm ; 25 min). Cette solution est remplacée par le tampon PBS ajustée à pH 8 avec une solution de KOH (0,5 M). Ce processus est répété trois fois. Après centrifugation la solution est ajustée à 10 mL avec la solution de tampon PBS (pH 8). Les substrats sont immergés dans ce mélange de 10 mL pendant 2 heures à 37°C. À la fin de l'immobilisation, les substrats sont retirés puis rincés abondamment à l'eau MilliQ et mis aux ultrasons pendant 10 min. Les substrats sont séchés par la suite sous jet d'azote et 30 min sous vide avant d'être analysés.

Immobilisation de nanoparticules d'or PEG-NH₂ (NP-PEG-NH₂):

1 mL de solution aqueuse contenant $3,4 \cdot 10^{11}$ de NP-PEG-NH₂ est ajouté à 9 mL de solution de tampon PBS ajustée à pH 8 avec une solution de KOH à 0,5 M. Les substrats sont donc immergés dans ce mélange de 10 mL pendant 20 heures à 37°C. À la fin de l'immobilisation, les substrats sont retirés puis rincés abondamment à l'eau MilliQ et mis aux ultrasons pendant 10 min. Les substrats sont séchés par la suite sous jet d'azote et 30 min sous vide pour être prêts à être analysés.

6.2. Immobilisation de biomolécules sur des surfaces MNPs (Chapitre IV) :***Immobilisation de NP-pA sur MNP@D₁@CO₂H :***

1 mg de **MNP@D₁@CO₂H** sont mis dans une solution de 100 µL d'eau MilliQ, 180 µL de solution de MES (pH 6), 200 µL d'EDC (6 mg/mL dans l'eau), 200 µL de NHS (12 mg/mL dans l'eau). Le milieu réactionnel est agité pendant 20 h à 37°C. A la fin de la réaction, les MNPs sont lavées 3x à l'eau. Les **MNP@D₁@NHS** sont ainsi obtenues.

Les nanoparticules d'or recouvertes de protéines A ($1,7 \cdot 10^{11}$ particule ; 0,8 µg de protéine A) sont mises avec les 1 mg de **MNP@D₁@NHS** dans une solution aqueuse contenant le PBS comme tampon à pH 8 et le Triton 0,1% (massique). Le milieu réactionnel est agité pendant 2 h à 37°C. À la fin de la réaction les MNPs sont lavées 3x à l'eau.

Immobilisation de NP-pA sur MNP@D₂@CO₂H et MNP@D₈@CO₂H : (Protocole mis au point par la société Ademtech)

Une solution contenant un tampon (Ademtech Activation Buffer x10 ; ref :10101) est diluée dix fois. 1 mg de MNP est lavée (par aimantation) 2x avec cette solution à pH 6. A la fin du lavage, le volume de la solution est ajusté à 200 µL. 160 µL d'une solution d'EDC (4 mg/mL) dans l'eau sont ajoutés aux MNPs. Le mélange réactionnel est agité mécaniquement à 37°C à l'aide d'un thermomixer. La solution contenant l'EDC est éliminée par aimantation des MNPs. Elle est remplacée par 200 µL d'une solution contenant les nanoparticules d'or recouvertes de pA $1,7 \cdot 10^{11}$ particules ; 0,8 µg de protéine A) dans un tampon à pH 6 (Activated Buffer x10 de Chez Ademtech). Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 37°C. À la fin de l'immobilisation, les MNPs sont lavées (2x1 mL) avec une

solution contenant un tampon (Ademtech Storage Buffer x10 ; 10201) dilué dix fois au préalable. Les MNPs obtenues sont conservées dans la même solution.

Couplage d'anticorps de lapin (Ac I) sur les MNP@APTES@CO₂H, MNP@AUTES@CO₂H, MNP@D₈@CO₂H, MNP@D₉@CO₂H, MNP@D₁@CO₂H, MNP@D₇@CO₂H :

A partir de 1mg de MNPs dans l'eau, un lavage est réalisé avec une solution diluée dix fois au préalable contenant un Tampon à pH 6 (Ademtech Activation Buffer x10 ; ref :10101). Le volume est ajusté à 1 mL avec la même solution de lavage. 0,3 mg d'EDC sont ajoutés à cette solution avec la quantité voulue d'anticorps de lapin (IgG ; Ac I) (2,5 µg, 5 µg, 10 µg, 25 µg et 50 µg). Un temps d'incubation d'une heure à 37°C est appliqué au mélange réactionnel. A la fin de l'immobilisation, les MNPs sont lavées avec une solution contenant du tampon Tris afin de bloquer les fonctions acides encore activées. Un lavage avec une solution acide (HCl 10 mM) puis avec une solution basique (NaOH 10 mM) est réalisé. Les MNPs sont conservées dans une solution diluée dix fois au préalable de Tampon (Ademtech Storage Buffer x10 ; 10201).

Caractérisation des MNPs greffées par les anticorps de lapin :

50 µg de MNPs portant des anticorps de lapin (Ac I) sont mis dans une solution (1 mg/mL ; 50 µL) contenant du PBS comme tampon et un tensioactif (Tween 20 ; 0,65% massique). L'anticorps secondaire (anticorps de chèvre anti lapin-FITC ; Ac II) est ajouté aux MNPs. Le milieu est incubé à température ambiante pendant 30min. A la fin de l'incubation les MNPs sont lavées 2x avec une solution contenant du PBS et du Tween 20 à 0,65% (massique). Ces MNPs sont diluées puis analysées en fluorescence directement sur les billes à l'aide d'un lecteur microplaque fluorescent Fluoroskan. La quantité d'anticorps primaire est déterminée à l'aide d'une courbe étalon réalisée au préalable.

Annexes

Sommaire

Annexe 1. Spectroscopie infrarouge (p. 243)

Annexe 2. Microscopie à force atomique (p.247)

Annexes 3. Angle de contact et énergie de surface (p.249)

Annexe 4. Zétamétrie (p. 251)

Annexe 1. Spectroscopie infrarouge

La nature des fonctions chimiques à la surface des supports SiO₂ (plans ou MNPs) a été déterminée par les deux techniques infrarouges :

- infrarouge en réflexion PM-IRRAS (spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption par modulation de polarisation)
- infrarouge à réflexions internes multiples (ATR).

La spectroscopie vibrationnelle infrarouge permet d'obtenir des informations sur la nature chimique ainsi que sur l'organisation conformationnelle et structurale. L'avantage de cette technique est qu'elle ne détruit pas les matériaux analysés. Sous effet de rayonnements excitateur, les composés vont changer d'état vibrationnels à des fréquences caractéristiques pour chaque groupement moléculaire et en fonction de son environnement proche.

Par exemple, les fréquences associées aux modes de vibrations d'élongations des groupements CH₂ asymétrique (ν_{as}) et symétrique (ν_s), sont liées à la conformation et à l'organisation des chaînes alkyles (Tableau 1). En effet, sur un support les chaînes alkyles peuvent être complètement allongées (*trans*) dans le cas de monocouche auto-assemblées ou bien, elles peuvent présenter des défauts gauches dans le cas de monocouches désordonnées.

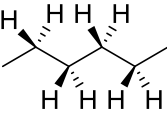
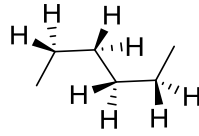
Bandes associées aux modes CH ₂	Chaînes ordonnées (Conformation <i>trans</i>)	Chaînes désordonnées
Schématisation des conformations <i>trans</i> et gauche		
ν_{as} (CH ₂)	2918 cm ⁻¹	2930 cm ⁻¹
ν_s (CH ₂)	2849 cm ⁻¹	2856 cm ⁻¹

Tableau 1. Nombre d'onde des bandes associées aux modes CH₂.

1. Spectroscopie infrarouge d'absorption-réflexion par modulation de polarisation :

La spectroscopie infrarouge d'absorption-réflexion (IRRAS) en lumière polarisée est très utilisée dans le cas des couches minces sur surface métallique. Cependant, la sensibilité n'est pas suffisante pour des films d'une couche inférieure à 10 nm. En effet, un temps de mesures très longs est nécessaire à cause d'une faible intensité des signaux. De plus, les

dérives et instabilité expérimentales (source, interféromètre, environnement de l'échantillon) viennent profondément affecter le rapport signal sur bruit du spectre de réflectivité IRRAS mesuré. Pour contourner ces inconvénients, nous avons utilisé pendant cette thèse une méthode beaucoup plus sensible appelée spectroscopie PM-IRRAS (Spectroscopie infrarouge d'absorption-réflexion par modulation de polarisation). Son principe est basé sur une modulation rapide de la polarisation du faisceau IR qui permet de mesurer, sous incidence rasante, un signal différentiel normalisé en temps réel. Cette méthode permet de réduire le temps d'acquisition et d'améliorer la qualité du spectre.

Le signal PM-IRRAS est en $1 - \frac{R_p}{R_s}$ R_p : Réflectivité polarisée parallèlement au plan d'incidence, R_s : Réflectivité polarisée perpendiculairement au plan d'incidence.

La spectroscopie PM-IRRAS permet également de remonter à l'orientation des moments de transition associés aux modes de vibration à partir d'une règle de sélection de surface.

Si une surface métallique est soumise à une onde électromagnétique incidente, seule la composante du champ électrique normale à la surface (E_z) est différente de zéro. Ainsi, l'intensité d'une bande d'absorption est directement reliée à l'angle (θ) que fait le moment de transition (M) avec le champ électrique en surface par la relation :

$$I \propto |\overrightarrow{M \cdot E}|^2 = M^2 \cdot E_z^2 \cos^2 \theta$$

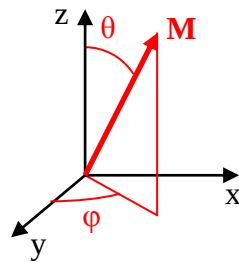


Figure 1. Orientation du moment de transition M par rapport à la normale à la surface.

La **règle de sélection**, spécifique au substrat métallique, est la suivante : les vibrations ayant un moment de transition parallèle à la surface présentent des intensités nulles, tandis que celles ayant un moment de transition perpendiculaire à la surface présentent des bandes dont l'intensité est maximale (Figure 2).

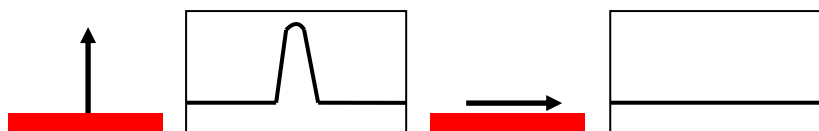


Figure 2. Règles de sélection pour une surface métallique.

Instrumentation :

Les spectres PM-IRRAS ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre FTIR ThermoNicolet Nexus 670. Les spectres ont été obtenus après 3 h, voire 4 h de temps d'acquisition avec résolution de 4 cm^{-1} . A la sortie de l'interféromètre, le faisceau infrarouge est dirigé vers un banc annexe à l'aide d'un miroir, puis il est focalisé sur l'échantillon à l'aide d'une lentille en séléniure de zinc (ZnSe de grande focale 190mm). Le faisceau passe par un polariseur en fluorure de baryum (BaF_2) puis à travers un modulateur photo élastique (PEM) en ZnSe. Il est réfléchi par l'échantillon avec un angle d'incidence de 75° . Ensuite, il est focalisé par une deuxième lentille (ZnSe de courte focale 40mm) sur un détecteur suffisamment rapide de type MCT (tellure de mercure-cadmium).

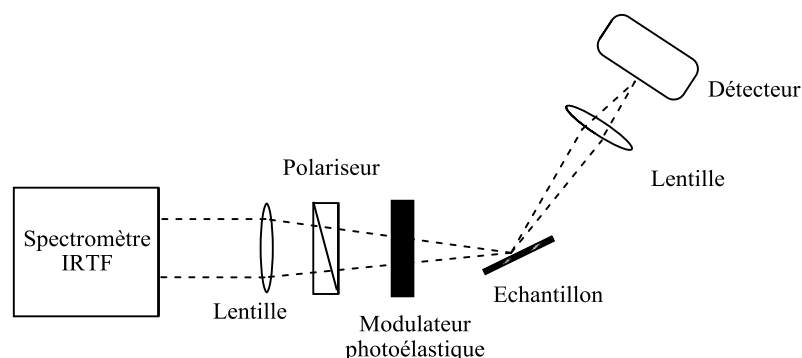


Figure 3 : Montage optique du dispositif PM-IRRAS.

2. Spectroscopie infrarouge à réflexions internes multiples (ATR) :

Les mesures infrarouges sur les MNPs modifiées (chapitre IV) ont été réalisées par le mode ATR. Le principe de l'ATR (réflexion totale atténuée) consiste à faire propager le rayonnement infrarouge dans un cristal de diamant dont les parois extérieures sont en contact avec l'échantillon à analyser. Lorsque le rayonnement arrive à l'interface cristal/échantillon, une partie de la lumière appelée onde évanescente se propage dans l'échantillon sur quelques micromètres. Ce rayonnement est absorbé par les molécules de l'échantillon. Un détecteur placé à l'autre extrémité du cristal collecte le faisceau modifié. Cette méthode a l'avantage de permettre une analyse directe d'un échantillon solide ou liquide sans préparation particulière.

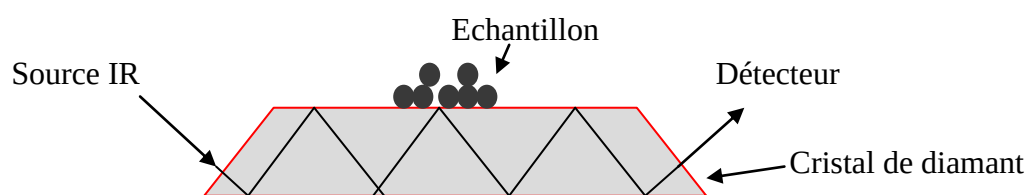


Figure 4. Schéma du principe de la spectroscopie infrarouge ATR.

Les spectres infrarouges ATR ont été enregistrés sur un spectromètre FTIR ThermoNicolet Nexus 670. Ils ont été obtenus après 500 scans avec une résolution spectrale de 4 cm^{-1} .

Annexe 2. Microscopie à force atomique

La topographie des surfaces fabriquées dans les chapitres II et III est réalisée par microscopie à force atomique (AFM) en mode intermittent.

La microscopie à force atomique (AFM) tout comme la microscopie à effet tunnel (STM) font partie des différentes techniques à sonde locale. Leur fonctionnement repose sur le principe de l'interaction entre une pointe de taille nanométrique et une surface. Le premier microscope créé est un microscope à effet tunnel par G. Binning et H. Rohrer d'IBM Zurich. Leur invention a fait l'objet d'un prix Nobel de physique en 1986. La STM ne fonctionne qu'avec des matériaux conducteurs contrairement à l'AFM qui peut étudier des surfaces différentes.

Principe général de fonctionnement : l'AFM sonde la surface d'un échantillon avec une pointe fine son rayon de courbure et de l'ordre de quelques nanomètres. Cette pointe est collée à l'extrémité d'un levier de 100 à 200 μm de longueur. En effet, les forces entre la pointe et l'échantillon induisent une déflexion du levier causées par les forces de van der Waals. Cette déflexion est détectée par un système optique constitué d'un faisceau laser et de quatre photodiodes. Dès lors, les informations collectées sont transmises par un système d'asservissement à la céramique d'un piézoélectrique afin d'ajuster la hauteur entre la surface de l'échantillon et la pointe afin de garder la même force de travail. Deux modes de travail peuvent être utilisés : mode contact et mode contact intermittent.

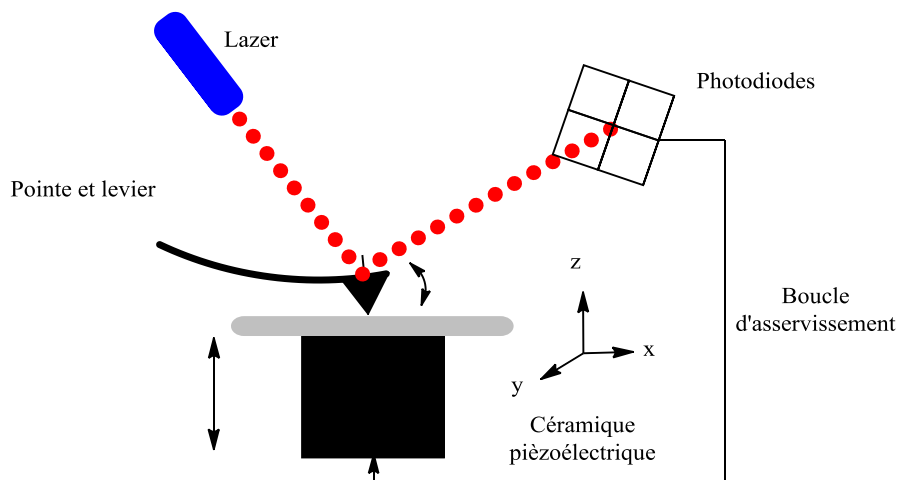


Figure 5. Principe de fonctionnement du microscope à force atomique.

Mode contact : dans le cas du mode contact, la pointe à l'extrémité du levier est en contact constant avec la surface d'un échantillon. A ce moment il existe deux modes de travail : mode hauteur constante, où l'image de topographie est construite à partir des informations sur la déflexion du levier. Mode force constante, où l'image de topographie est construite à partir des mouvements du scanner piézoélectrique pour garder la consigne d'une force constante.

Mode contact intermittent (tapping) : ce mode est souvent utilisé pour analyser des matériaux mous sans les dégrader contrairement au mode contact qui est plus utilisé pour des matériaux plutôt durs. En effet, en mode tapping, la pointe vient vibrer à proximité de l'échantillon en le touchant par intermittence. L'amplitude de la vibration est fixée (légèrement inférieure à sa fréquence propre) par la consigne. En conséquent, la topographie est construite grâce au mouvement du scanner piézoélectrique suivant l'axe z afin de grader la même consigne d'amplitude constante à l'aide de la boucle d'asservissement. Cependant, le mouvement d'oscillation de la pointe peut être déphasé par rapport à celui du piézoélectrique. Le déphasage se produit à la rencontre de la pointe avec des surfaces avec des régions de propriétés de surface différentes. De ce fait, le contraste de phase permet de mettre en évidence les inhomogénéités chimiques et les propriétés viscoélastiques à la surface d'un matériau.

Instrumentation :

Les analyses en microscopie à force atomique ont été réalisées avec deux appareils différents : le ThermoMicroscope Autoprobe CP Research (Park scientific instrument) et l'Agilent (5500).

Le traitement des images AFM a été réalisé par le logiciel Gwiddion v 2.20, Il permet de calculer la rugosité Rms (Root Mean Square) déterminé par la relation. C'est l'écart-type de la distribution de la hauteur :

$$Rms = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i^2}$$

Où Z et N sont respectivement les hauteurs par rapport à la moyenne à la surface et le nombre de point.

Annexes 3. Angle de contact et énergie de surface

Le caractère hydrophile ou hydrophobe des surfaces modifiées (chapitre II) est déterminé par des mesures d'angle de contact (mouillabilité).

La mesure de l'angle de contact rend compte de la mouillabilité, c'est-à-dire la capacité d'un liquide à s'étaler sur une surface. La méthode consiste à mesurer l'angle de la tangente du profil, d'une goutte déposée sur le substrat, avec la surface du substrat. Elle permet de mesurer l'énergie de surface du liquide ou du solide.

Le caractère hydrophile ou hydrophobe des surfaces modifiées est déterminé par des mesures d'angle de contact (mouillabilité). Sur chaque échantillon, trois mesures d'angles de contact sont réalisées et les valeurs données correspondent à la moyenne. L'incertitude est calculée à l'aide de l'écart type moyen des trois valeurs :

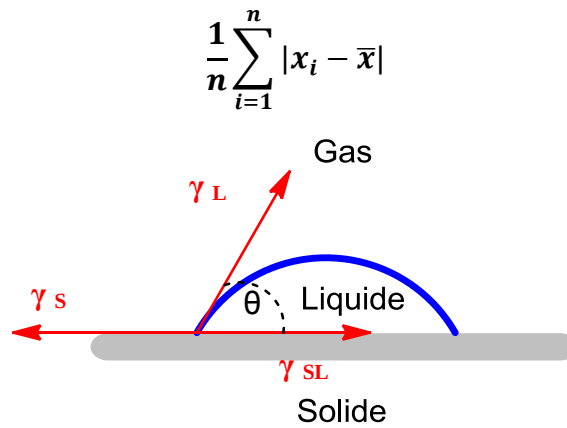


Figure 6. Représentation vectorielle de Young de l'équilibre d'une goutte sur une surface.

Trois paramètres régissent la forme d'une goutte sur un solide

La tension interfaciale solide liquide γ_{SL}

La tension interfaciale solide gas γ_{SG} (γ_S)

La tension interfaciale liquide gas γ_{LG} (γ_L)

Ces trois grandeurs sont reliées par l'équation de Young :

$$\gamma_L \cos \theta + \gamma_{SL} - \gamma_S = 0$$

Seules γ_L et l'angle θ sont mesurables, par conséquent, il est nécessaire d'avoir des relations supplémentaires pour estimer les inconnues γ_{SL} et l'énergie de surface γ_S . Plusieurs modèles ont été développés pour déterminer ces inconnues.

Dans le modèle d'Owens et Wendt (ou Owens, Wendt, Rabel, Kaelble), utilisé dans le cadre de cette thèse, l'énergie de surface s'exprime sous la forme : $\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p$

γ_s^d : Composante dispersive ; γ_s^p : Composante polaire.

L'équation reliant les composantes à l'angle de contact s'écrit :

$$\cos \theta = -1 + 2 \frac{\sqrt{\gamma_L^d \gamma_s^d}}{\gamma_L} + 2 \frac{\sqrt{\gamma_L^p \gamma_s^p}}{\gamma_L}$$

Dans cette équation, il y a deux inconnus γ_s^p et γ_s^d , donc il faut au minimum deux solvants différents pour déterminer l'énergie de surface γ_s . En général, les solvants utilisés sont l'eau (3 μ l), l'éthylène glycol (3 μ l) et le diiodométhane (1,5 μ l). Le tableau ci-dessous indique les valeurs de γ_L , γ_L^d et γ_s^p .

Solvant	γ_L (mN/m)	γ_L^d (mN/m)	γ_s^p (mN/m)
Eau (Rabel)	72,3	18,7	53,6
Ethylène glycol (Rabel)	47,5	29,3	8,3
Diiodométhane (Owens)	50,8	49,5	1,3

Tableau 2. Valeurs des tensions superficielles et de leurs composantes.

Instrumentation :

Les mesures d'angle de contact et d'énergie de surface ont été réalisées sur un goniomètre Krüs DSA 100. Sur chaque échantillon, trois mesures d'angles de contact sont réalisées et les valeurs données correspondent à la moyenne. De plus, l'incertitude est calculée à l'aide de l'écart type moyen des trois valeurs :

$$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |x_i - \bar{x}|$$

Annexe 4. Zétamétrie

Le potentiel zêta est une propriété physique associée à toute particule en suspension. Il peut être utilisé pour optimiser les formulations de suspensions et des émulsions. Le potentiel zêta est un bon indicateur des interactions entre particules et donc de la stabilité des colloïdes.

Stabilité colloïdale (selon la théorie DVLO) : les scientifiques Derjaguin, Verwey, Landau et Overbeek ont développé une théorie en 1940 sur la stabilité d'un système colloïdal. De cette théorie, il en sort que la stabilité d'une particule dans une solution est dépendante de l'énergie d'interaction totale V^T .

$$V_T = V_A + V_R + V_S$$

V_S est l'énergie potentielle due au solvant, cela ne constitue généralement qu'une contribution marginale à l'énergie d'interaction totale sur les quelques nanomètres de séparation. L'équilibre entre V_A et V_R est beaucoup plus important, ce sont les contributions d'attractions et de répulsions. Elles sont potentiellement plus grandes et agissent sur une plus grande distance.

$$V_A = -A/(12 \pi D^2)$$

«A» est la constante d'Hamaker et D la distance interparticulaire. Le potentiel de répulsion V_R est une fonction beaucoup plus complexe.

$$V_R = 2 \pi \varepsilon a \xi^2 \exp(-\kappa D)$$

«a» est le rayon de la particule, π est la permittivité du solvant, κ est fonction de la composition ionique et ξ le potentiel zêta.

Cette théorie énonce qu'une barrière énergétique résultant des forces répulsives empêchent deux particules de s'approcher l'une de l'autre et d'adhérer l'une à l'autre. Si les particules ont une répulsion suffisamment importante, la dispersion résistera à la floculation et le système colloïdal sera stable. Cependant si un mécanisme de répulsion n'existe pas, des phénomènes de floculation ou de coagulation pourront alors apparaître.

Donc pour maintenir la stabilité d'un système colloïdal, les forces de répulsion doivent être dominantes. Il y a deux mécanismes fondamentaux qui affectent la stabilité de la dispersion (Figure 7).

Répulsion stérique, cela implique que les polymères ajoutés au système, sont adsorbés à la surface des particules et interdisent une mise en contact des surfaces des particules. Si assez de polymère est adsorbé, l'épaisseur de la couche est suffisante pour garder les particules séparées par répulsion stérique entre les couches de polymères, et à ces séparations, les forces de van der Waals sont trop faibles pour faire adhérer les particules.

Stabilisation électrostatique, c'est l'effet sur l'interaction de la particule due à la distribution ou à la présence d'éléments chargés dans le système.

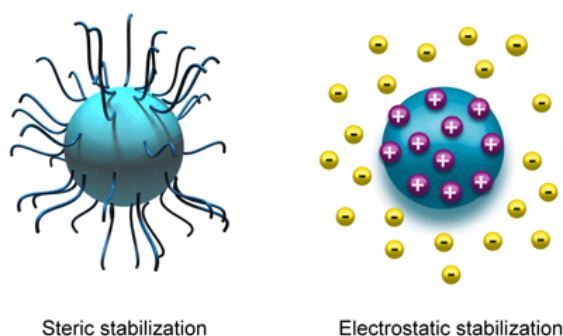


Figure 7. Représentation de la stabilisation stérique et électrostatique des nanoparticules.

En solution, autour d'une particule, il existe une double couche électrique (Figure 8). La première est celle située à proximité de la particule appelée la couche de Stern où les ions autour sont fortement liés à la particule. La couche extérieure appelée la couche diffuse où les ions autour sont moins fortement liés à la particule. Le potentiel à la frontière de cette couche diffuse est le **potentiel zêta**. C'est ce potentiel qui a été mesuré dans ce travail puisque nous nous sommes uniquement attachés à changer l'état de charge des surfaces de nos particules.

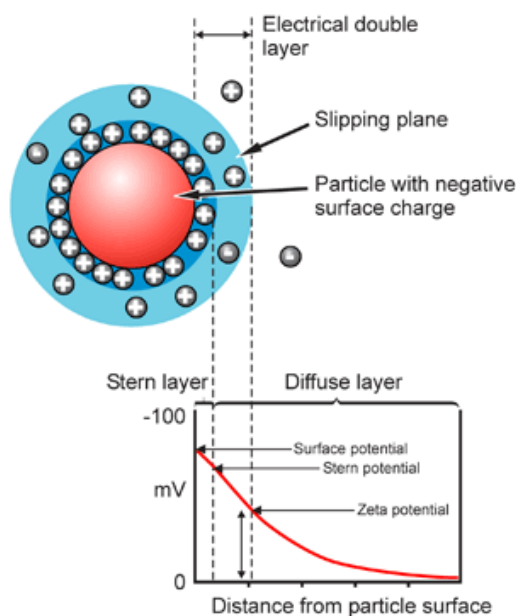


Figure 8. Représentation de la double couche électrique et du potentiel zêta.

Instrumentation :

Les mesures de potentiel zêta ont été réalisées sur un appareil Zetasizer 3000 HS. Le principe de cette mesure repose sur la mobilité électrophorétique des particules chargées dans un électrolyte. L'application d'un courant électrique entre deux électrodes plongées dans une solution entraîne les particules chargées vers l'électrode de charge opposée. La mobilité μ se définit par le rapport entre la vitesse des particules (V) et le champ électrique (E) appliqué ($\mu = V/E$). Si les particules sont sphériques et que la couche diffuse est mince par rapport aux rayons des particules, le principe de Smoluchowski permet d'atteindre le potentiel zêta des particules, $\mu = \epsilon\epsilon_0\eta^{-1}\xi$.

μ : Mobilité électrophorétique ($\text{m}^2.\text{V}^{-1}.\text{s}^{-1}$)

ϵ_0 et ϵ : Permittivité du vide et du solvant

η : La viscosité du fluide (Pa.s)

ξ : Le potentiel zêta (mV)

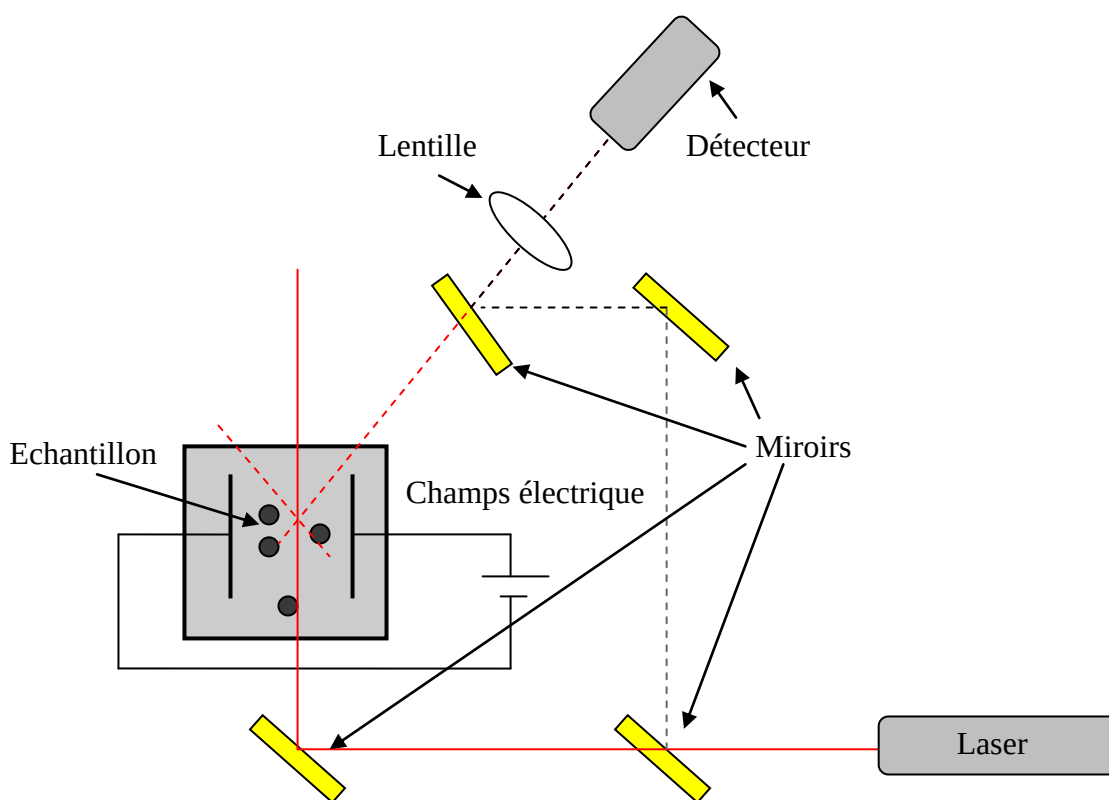


Figure 9. Montage de l'appareil pour la mesure du potentiel zêta.

Synthèse de nanofilms à greffons dendritiques pour l'immobilisation de biomolécules

Résumé

La biofonctionnalisation de surfaces de silice est une étape cruciale dans de nombreux domaines de biotechnologie tels que la biodétection ou la bioséparation. Le contrôle de l'état de surface entre les supports solides des matériaux et les espèces biologiques permet d'améliorer leurs performances de reconnaissance. Dans ce travail, nous avons développés des organosilanes fonctionnels dendritiques de première et de seconde génération pour la modification chimique de surface. Ces organosilanes dendritiques de type RSiX_3 ($\text{X} = \text{Cl}$ ou OMe_3 ou OEt_3) ont été greffés de manière covalente sur des surfaces de silice ou des surfaces de nanoparticules superparamagnétiques de type core-shell ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$). La qualité des greffages a été analysée par AFM et TEM. Ils ont également été caractérisés par infrarouge, angle de contact et zétamétrie. Ces surfaces modifiées par des molécules dendritiques ont montré une capacité à immobiliser des molécules biologiques comme la protéine A ou des anticorps de lapin.

Mots clés : dendrons, agents de couplage siliciés, modification de surface, biofonctionnalisation, silice, nanoparticules magnétiques, AFM, PM-IRRAS, zétamétrie.

Synthesis of nanofilms with dendritic grafts for biomolecules immobilization

Abstract

Biofunctionalization of silica surfaces represents a crucial step for many applications in biotechnology such as biosensing and bioseparation. Monitoring the surface modification of the materials supports can improve their performances for the recognition of biological species. In this work, we have developed functional dendritic organosilanes of first and second generation for chemical modification of surfaces. These dendritic organosilanes RSiX_3 ($\text{X} = \text{Cl}$ or OMe_3 or OEt_3) were covalently grafted on planar silica or on core-shell superparamagnetic nanoparticles surfaces ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3/\text{SiO}_2$). The grafted surfaces were analyzed by AFM and TEM. They were also characterized by Infrared, contact angle and zetametry. These modified surfaces by dendritic molecules have shown high ability to immobilize biological molecules such as protein A or rabbit antibodies.

Keywords: dendrons, silylated coupling agent, surface modification, biofonctionnalisation, silica, magnetic nanoparticles, AFM, PM-IRRAS, zétamétrie.