



**HAL**  
open science

# Le diamant pour la bioélectronique : de la fonctionnalisation chimique à la modification physique par des nanotubes de carbone

Sébastien Ruffinatto

► **To cite this version:**

Sébastien Ruffinatto. Le diamant pour la bioélectronique : de la fonctionnalisation chimique à la modification physique par des nanotubes de carbone. Autre. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENI004 . tel-00721756

**HAL Id: tel-00721756**

**<https://theses.hal.science/tel-00721756>**

Submitted on 30 Jul 2012

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

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

*Université de Grenoble*

**THÈSE**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE**  
Spécialité : **Matériaux, Mécanique, Génie civil, Electrochimie**  
Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

**Sébastien Ruffinatto**

Thèse dirigée par **Pascal Mailley** et  
codirigée par **Franck Omnes**

Préparée au sein de :  
**l'Institut Néel au CNRS à Grenoble**  
**l'Institut Nanoscience et cryogénie au CEA à Grenoble**

Dans l'École Doctorale  
D'Ingénierie – Matériaux Mécanique Énergétique Environnement Procédés Production

**Le diamant pour la bioélectronique :  
De la fonctionnalisation chimique à la modification  
physique par des nanotubes de carbone.**

Thèse soutenue publiquement le **10 février 2012**,  
devant le jury composé de :

**Mr Ken Haenen**

Professeur à l'Université d'Hasselt, Rapporteur

**Mr Pascal Viel**

Ingénieur de Recherche au CEA Saclay, Rapporteur

**Mr Jean-Charles Arnault**

Chercheur au CEA Saclay, Examineur

**Mr Serge Cosnier**

Directeur de Recherche à l'UJF, Examineur

**Mr Pascal Mailley**

Maitre de conférences à l'UJF, Directeur de thèse

**Mr Franck Omnes**

Chercheur au CNRS Grenoble, Co-Directeur de thèse



## *Remerciements*

*Mes premières pensées se portent tout d'abord vers mes parents, ma famille et ma sœur qui, de par leur confiance, leurs conseils et leur soutien m'ont permis de concrétiser mon projet professionnel. Je ne vous serai jamais assez reconnaissant.*

*Mes remerciements vont ensuite à Pascal Mailley et Franck Omnes, respectivement directeur et co-directeur de ma thèse pour avoir cru en moi en m'offrant l'opportunité de piloter ce projet scientifique. Pascal, merci pour ton enthousiasme, ton dynamisme, ta spontanéité et ta franchise : ta vaste culture scientifique et ta force de proposition ont toujours été des atouts de poids lors de nos différentes réflexions scientifiques. Franck, je te suis également extrêmement reconnaissant pour ton calme, ta pondération, ta disponibilité, ainsi que pour avoir partagé ta grande expérience des matériaux et des plasmas. Pour toutes ces raisons et encore bien d'autres, vous avez fait de ces trois années une expérience captivante, passionnante et inoubliable ; je vous en serai à jamais reconnaissant.*

*Je tiens également à adresser ma reconnaissance à Thierry Livache, directeur de l'équipe du CREAB et Etienne Gheeraert, directeur de l'équipe SC2G, pour m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche.*

*Je remercie Loïc Leroy pour les diverses discussions relatives, entre autre, aux expériences d'impédance, Yanxia Hou-Broutin pour son avoir partagé son expertise des nanoparticules, Thierry Livache pour la précision de ses analyses dans le cadres des*

études biochimiques. J'ai une pensée particulière pour **André Roget** et toute l'aide qu'il m'a apporté en chimie organique et synthèse ainsi qu'à **Martial Billon** pour ses conseils en électrochimie, je leurs transmet à tous les deux toute ma gratitude. J'adresse également de sincères remerciements à **Etienne Bustaret** qui malgré un emploi du temps très chargé à toujours su mettre à disposition son insondable connaissance scientifique et expérimentale. J'adresse toute ma reconnaissance à un des plus grands spécialistes du **RAMAN** qui puisse exister : **Michel Mermoux**. Merci pour les expériences Raman réalisées sur le matériau composite ainsi que ses analyses pointues des spectres.

Je tenais également à remercier **Julien Pernot**, **Yoann Roupioz**, **Renaud Demadrille**, **Valerie reita**, **Névine Rochat**, **David Eon**, **Roberto Calemezuk** et tous les membres permanents que j'ai pu côtoyer durant ces trois ans pour leurs conseils et leur aide.

Je remercie l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai été amené à collaborer, je pense en particulier à **Philippe Bergonzo** qui m'a accueilli à plusieurs reprises dans son équipe du LCD au CEA Saclay ; à **Jean-Charles Arnault** pour les études XPS, au combien précieuses, que nous avons mené ensemble, pour son expertise et pour ses analyses pointues des spectres XPS. Je remercie également **Liviu Nicu** pour m'avoir reçu au sein de son équipe du NBA au LAAS. I also would like to thank particularly **Patrick Lemoine** to have welcomed me in the NCRG group of the NIBEC at the University of Ulster. He teaches me the LFM skills and tricks I needed for my study. My Acknowledgment also goes to **Jose Garrido** for his hearty welcome in the WSI at the University of Munich, he shared all his expertise and knowledge of the FETs, without these experiments we weren't be able to figure out the mechanism of the

*grafting method detail in this thesis. I also greet **Monitz Hauf** and **Roberta Caterino** for the time they devoted to me during my stay.*

*Un grand merci à **Sébastien Dumenil** pour la gestion des stocks et commandes, la préparation des solutions communes, ses conseils et l'aide qu'il apporte au quotidien à toutes les personnes du laboratoire ; à **Pierre Giroux** pour les travaux de maintenance des bâtis qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions possibles. Merci également à **Yann Kervella**, **David Jegouso**, **Bruno Fernandez** pour le temps qu'ils m'ont consacré à l'occasion de formations et de discussions.*

*Une pensée particulière à **Augustine Alessio** qui a toujours su gérer efficacement les différents problèmes administratifs rencontrés pendant ma thèse.*

*Je tiens à saluer et à exprimer toute ma reconnaissance à deux personnes en particulier : **Charles Agnes** et **Clément Hebert**. Charles, je te remercie pour tous les travaux que nous avons réalisés ensemble, pour les nombreuses discussions que nous avons eu et sans lesquelles il m'aurait été impossible d'obtenir une grande partie des résultats présentés dans ce manuscrit. Je remercie **Clément** avec qui j'ai partagé la plus grande partie de mon temps passé au **CNRS** dans le cadre d'une étroite collaboration associée à la conception d'un matériau composite. Une grande partie des résultats présentés dans la deuxième partie de ma thèse sont issues d'expériences et de réflexions communes, sans cette coopération il aurait été impossible d'obtenir un tel avancement des travaux en si peu de temps. Pour toutes ces raisons je vous remercie encore.*

*J'adresse une pensée particulière à Radek et Sihem pour toute l'aide et les conseils que vous m'avez apporté concernant le couplage, la purification des protéines mais également pour toutes les discussions concernant l'aspect 'biologie' de ma thèse.*

*Merci à Amel Bendali de l'institut de la vision pour les expériences d'Immunopanning qu'elle a réalisée et à Serge Picot pour m'avoir autorisé à utiliser les résultats dans ma thèse.*

*Je veux également saluer et remercier tous les stagiaires, thésards et post-docs que j'ai eu l'occasion de côtoyer durant ma thèse : Pierre-Nicolas, Emma, Malika, Hasan, Jie, Steffano, Camille, Maria, Thu-Nhi, les Alexandres, Laurent, Sarah, Anthony, Pradeep, Gautier, Jessica et tous ceux que j'oublie.*

*J'exprime mes remerciements à Serge Cosnier, Ken Haenen, Pascal Viel, Jean-Charles Arnault et Michel Mermoux d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Je remercie chacun des membres pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail ainsi que pour la précision et la qualité de leur examen.*

*Un grand merci à Adeline, Jean-Yves, Sylviane, Sylvain et Pascale pour avoir accepté de partir à la chasse aux coquilles éparpillées dans ce manuscrit.*

# GLOSSAIRE

## Laboratoires :

CEA : Commissariat à l'Energie Atomique

CMESSIE : Equipe des Couches Minces et Spectroscopie des Surfaces et des Interfaces Electrochimiques

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

CREAB : Chimie de la Reconnaissance et d'Etude des Assemblages Biologiques

IN : Institut Néel

INAC : Institut NANosciences et Cryogénie

LAAS : Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

LEPMI : Laboratoire d'Electrochimie et de Physicochimie des Matériaux

LIST : Laboratoire d'Intégration des Systèmes et des Technologies

LCD : Laboratoire Capteur Diamant

SPrAM : Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires

NIRIM : National Institute for Research in Inorganic Materials

## Procédés de Synthèse :

BEN : Bias Enhanced Nucleation

CVD : Chemical Vapour Deposition (dépôt en phase vapeur)

ECR-CVD : Electron cyclotron resonance CVD

HFCVD : Hot Filament CVD (CVD assistée par filament chaud)

HiPCO : High Pressure Carbon Monoxide

HPHT : Haute Pression Haute Température

MPCVD : Micro-Wave Plasma enhanced CVD (CVD assistée par plasma micro-onde)

PECVD : Plasma Enhanced CVD (CVD assistée par plasma)

PVD : Physical Vapor Deposition

RF : Radiofréquence

## Matériaux :

BDD : Boron Doped Diamond (diamant dopé bore)  
F-BDD : Fluorinated BDD (BDD avec une surface fluorée)  
CNT : Carbon NanoTubes  
DLC : Diamond-Like Carbon  
DWCNT : Double-Walled Carbon Nanotube  
ENFET : ENzyme Modified FET  
FET : Field Effect Transistor (transistor à effet de champ)  
FWCNT : Few-Walled Carbon Nanotube  
GC : Glassy Carbon (carbone vitreux)  
HOPG : Highly Oriented Pyrolytic Graphite (graphite hautement orienté)  
ISFET : Ion Sensitive FET  
MISFET : metal–insulator–semiconductor FET  
MOSFET : Metal Oxide Semiconductor FET  
MWCNT : Multi-Walled Carbon Nanotube (nanotubes de carbone multiparois)  
NCD : Nanocrystalline Diamond (diamant nanocristallin)  
NID-NCD : Non Intentionally Doped NCD (NCD non intentionnellement dopé)  
NND : Nitrogen doped Nanocrystalline Diamond  
NTC : NanoTubes de Carbone  
SGFET : Solution Gate FET  
SWCNT : Single-Walled Carbon Nanotube (nanotubes de carbone monoparoi)  
UNCD : Ultra-Nano Crystalline Diamond (diamant ultra-nanocristallin)  
 $\mu$ CD : microCrystalline Diamond (diamant microcristallin)  
B- $\mu$ CD : Boron doped  $\mu$ CD ( $\mu$ CD dopé au bore)  
NID- $\mu$ CD : Non Intentionally doped  $\mu$ CD ( $\mu$ CD non intentionnellement dopé)

### Caractérisations :

ATR : Attenuated Total Reflectance  
AFM : Atomic Force Microscopy (microscopie à force atomique)  
DPV : Differential Pulse Voltammetry (voltammétrie pulsée différentielle)  
FTIR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy (spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier)  
LFM : Lateral Force Microscopy  
MEB : Microscopie Electronique à Balayage

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire  
SIMS : Secondary Ion Mass Spectroscopy  
XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy  
UV : Ultra-Violet

### Molécules :

ACA : AminoCaproic Acid  
ACN : Acétonitrile  
AKP : Alkaline Phosphatase  
APDEMS : AminoPropylDiEthoxyMethylSilane  
APTES : AminoPropylTriEthoxySilane  
BSA : Bovine Serum Albumin (albumine de sérum bovin)  
BOP : Benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium  
DMF : DiMéthylFormamide  
DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DNA : DesoxyriboNucleic Acid (ADN : Acide DésoxyriboNucléique)  
ss DNA : single stranded DNA (simple brin d'ADN)  
ds DNA : double stranded DNA (double brin d'ADN)  
DNPH : DiNitroPhényl Hydrazine  
EDC : 1-Ethyl-3-[3-Diméthylaminopropyl]Carbodiimide hydrochloride  
EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique  
FAD : Flavine adenine dinucleotide  
GOx : Glucose Oxydase  
HRP : Horse Radish Peroxidase (peroxydase de raifort)  
Ig : Immunoglobuline  
MES : 2-(N-morpholino)ethanesulfonique acide  
NBu<sub>4</sub>BF<sub>4</sub> : Tétrabutylammonium (NBu<sub>4</sub>) tétrafluoroborate (BF<sub>4</sub>)  
NHS : N-Hydroxysuccinimide  
ODN : Oligomère DésoxyriboNucléique ou oligonucléotide  
OPD : Ortho-Phénylène Diamine  
PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate)  
PDMS : polydimethylsiloxane  
PMMA : Polyméthylmethacrylate

PSS : Poly(4-styrenesulfonic acid)  
PEG : PolyEthylène Glycol  
PTFE : PolyTétraFluoroEthylène  
PyA : PyridoAcridone  
SAM : Self-Assembled Monolayer (monocouche auto-assemblée)  
SAPE : StreptAvidine-R-PhycoErythrine  
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate  
Sulfo-NHS : sulfo-N-HydroxySulfosuccinimide  
TH : Tampon d'Hybridation  
THF : TétraHydroFurane  
TMB : TriMéthyl Borane  
TR : Tampon de Rincage

Autres :

DPN : Dip-Pen Nanolithography  
FIB : Focused Ion Beam  
rms : root mean square (valeur efficace)  
SAMs : Self-Assembled Monolayers (couche auto-organisée)  
SN : Substitution Nucléophile  
 $\mu$ CP : micro-Contact Printing

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : LE DIAMANT .....</b>	<b>6</b>
<b>I. Généralités - état de l'art.....</b>	<b>7</b>
I.A. Propriétés générales.....	8
I.A.1. Conductivité électrique et thermique.....	8
I.A.2. Stabilité chimique.....	9
I.A.3. Propriétés mécaniques .....	9
I.B. Propriétés optiques .....	9
I.C. Propriétés électroniques .....	10
I.D. Propriétés électrochimiques .....	10
I.D.1. Courant résiduel.....	10
I.D.2. Large fenêtre de potentiel.....	12
I.D.3. Résistance à l'obstruction .....	12
I.D.4. Stabilité.....	13
I.E. Synthèse	13
I.E.1. Le procédé HPHT.....	14
I.E.2. Les procédés CVD.....	15
I.E.3. Les bâtis de croissance.....	17
I.F. Le diamant pour la (bio)-détection.....	21
I.F.1. Détection électrochimique.....	23
I.F.2. Biocapteurs-Biopusces.....	24
I.F.3. Biocapteurs enzymatiques .....	29
I.F.4. Les transistors à effets de champ.....	33
I.G. Interface Cellule-Biocapteur .....	36
<b>CHAPITRE II : FONCTIONNALISATION ET APPLICATIONS.....</b>	<b>44</b>
<b>II. Techniques de caractérisations.....</b>	<b>45</b>
II.A. La microscopie électronique à balayage (MEB) .....	45
II.B. Raman .....	48
II.C. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS).....	55
II.D. X-ray Electron Energy Loss Spectroscopy (XEELS) .....	58
II.E. Spectroscopie Auger.....	60
II.F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).....	61
<b>III. La fonctionnalisation du Diamant.....</b>	<b>70</b>
III.A. Terminaisons chimiques de surface du Diamant .....	70
III.B. Etat de l'art.....	74
III.B.1. Fonctionnalisation via les groupements oxydés.....	74
III.B.2. Fonctionnalisation via les surfaces reconstruites .....	77
III.B.3. Fonctionnalisation via d'autres groupements de surface .....	78
III.B.4. Fonctionnalisation des surfaces hydrogénées.....	80
III.C. Greffage spontané des amines sur Diamant .....	84
III.C.1. Le modèle biologique : Biotine-Avidine .....	84
III.C.2. Le drop-casting.....	86
III.C.3. La microscopie de fluorescence .....	87
III.C.4. Conditions de greffage .....	90
III.C.5. Caractérisation du greffage .....	101
III.D. Mécanisme de greffage .....	121
III.E. Cinétique de greffage .....	131

<b>IV. Applications</b> .....	<b>141</b>
III.F. Greffage de molécules d'intérêt biologique .....	141
III.F.1. <i>Biopuce à ADN</i> .....	142
III.F.2. <i>Capture de double brin d'ADN par un « hameçon » intercalant</i> .....	144
III.F.3. <i>Cytochrome c</i> .....	149
III.G. Biocapteur au peroxyde d'hydrogène .....	155
III.H. Immobilisation directe de protéine .....	164
III.H.1. <i>Thyl</i> .....	166
III.H.2. <i>Immunoglobuline G</i> .....	170
III.I. Structuration du greffage.....	172
III.I.1. <i>Micro-contact printing</i> .....	173
III.I.2. <i>Bioplumes</i> .....	175
III.I.3. <i>Dip pen lithography</i> .....	179
III.J. Conclusion.....	187

## **CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEAU MATERIAU COMPOSITE NANOTUBES DE CARBONE/DIAMANT ..... 192**

<b>V. Croissance de Nanotubes de carbone sur diamant</b> .....	<b>193</b>
V.A. Nanotubes de carbone : Généralités .....	196
V.A.1. <i>Propriétés</i> .....	196
V.A.2. <i>Croissance</i> .....	200
V.A.3. <i>La technique de croissance HFCVD</i> .....	201
V.B. Gravure catalytique du diamant assistée par filament chaud .....	205
V.C. Croissance des nanotubes.....	214
V.D. Caractérisation des nanotubes par spectroscopie Raman.....	222
V.E. Caractérisation des nanotubes par XPS et XEELS.....	232
V.F. Propriétés électriques des nanotubes .....	238
V.F.1. <i>Greffage du ferrocène</i> .....	239
V.F.2. <i>Caractérisation électrochimiques des nanotubes</i> .....	243
V.G. Analyse qualitative de l'adhésion des nanotubes.....	252
V.G.1. <i>Etude électrochimique</i> .....	252
V.G.2. <i>Traitement des nanotubes par ultrasons</i> .....	254
V.H. Mise au point d'un biocapteur de troisième génération au peroxyde d'hydrogène .....	256

## **CONCLUSION GENERALE ..... 268**

## **ANNEXES..... 274**

<b>I. X-ray Photoelectrons Spectroscopy (XPS)</b> .....	<b>275</b>
<b>II. Spectroscopie des pertes d'Energie des Electrons</b> .....	<b>276</b>
<b>III. Spectroscopie Auger</b> .....	<b>278</b>
III.A. Principe .....	278
III.B. Caractérisation des nanotubes de carbone.....	281
<b>IV. FTIR</b> .....	<b>282</b>
IV.A. La spectroscopie infrarouge.....	282
IV.A.1. <i>Le spectre infrarouge du diamant</i> : .....	284
IV.A.2. <i>Défauts utilisés pour la classification des diamants par type</i> : .....	286
IV.A.3. <i>Les différents types de diamant</i> : .....	287
IV.A.4. <i>Absorption Infrarouge d'intérêts supplémentaires</i> : .....	289
IV.B. Accessoire ATR (Attenuated Total Reflectance).....	290





# ***INTRODUCTION GENERALE***

La bioélectronique est un domaine de recherche qui trouve des applications à travers un grand nombre de champs applicatifs et qui nécessite un interfaçage entre espèces biologique et la surface d'un matériau transducteur. L'interface matériau/espèce biologique apparait dans ces conditions comme un paramètre critique qui implique donc que l'état de surface du matériau soit parfaitement connu et maîtrisé. De plus, l'activité des espèces biologique complexes comme les protéines et les cellules est conditionnée par leurs environnements mais également par la biocompatibilité du substrat qui dépend elle-même de son état de surface. Enfin, La mise au point d'un dispositif fonctionnel, nécessite d'immobiliser de manière stable l'espèce biologique sur ou au voisinage de la surface du matériau.

Le choix du caractère isolant, semi-conducteur ou métallique du matériau dépendra du mode de détection requis par l'application envisagée. Dans le cas des applications in vivo, le mode de transduction électrique est le seul possible. Les matériaux isolants comme le quartz ou le verre affichent une bonne biocompatibilité mais ne présentent qu'un intérêt limité lorsqu'un mode de transduction électrique du signal est requis. Les métaux tels que le platine et l'or sont très souvent utilisés comme électrode pour l'électrochimie. De plus, certains de des métaux nobles tels que l'or ou l'argent sont biocompatibles. Une des limites des métaux est qu'ils sont sujets à la corrosion et deviennent toxiques en se dissolvant, ce qui exclut leur utilisation pour des applications nécessitant un contact prolongé avec un milieu vivant. Les semi-conducteurs (IV, III-V, II-VI) ont quant à eux l'avantage de pouvoir être dopé et adopter un comportement électrique métallique mais ils ne sont en revanche pas tous biocompatibles.

Les critères de sélection du matériau seront basés sur son caractère biocompatible, le mode de transduction choisi et sur l'état de l'art des techniques de fonctionnalisation. Néanmoins, il est possible d'assembler deux matériaux différents pour obtenir une structure hybride, appelée matériau composite, qui présente des propriétés différentes de celles des deux matériaux considérés séparément. Ces matériaux composites trouvent aujourd'hui un intérêt croissant dans des domaines d'applications comme l'électrochimie, le photovoltaïque, la bioélectronique ou encore l'électronique.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le domaine de recherche de la bioélectronique et consiste à développer des matériaux fonctionnels carbonés qui permettent de répondre aux attentes croissantes du domaine médical, du diagnostic clinique et de la neurologie. Pour ce faire, nous avons choisi d'exploiter les propriétés originales du diamant et des nanotubes de carbone.

Les études permettant de mener à bien ce projet de thèse se sont déroulées à Grenoble dans le cadre d'une collaboration entre deux laboratoires, qui sont :

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

Certaines études complémentaires ont nécessité les équipements de laboratoires extérieurs. Des études XPS ont été réalisées avec Jean-Charles Arnault au LIST (CEA Saclay) dont l'équipe est dirigé par Philippe Bergonzo. Des expériences sur transistor à effet de champ diamant ce sont déroulées avec Jose Garrido au Walter Schottky Institut (Université de Munich) dans l'équipe Experimental Semiconductor Physics dirigée par Martin Stutzmann. Des manipulations par Dip-Pen Lithography ont été réalisées au Nanotechnology and Integrated bioengineering Center (Université d'Ulster) dans l'équipe Nanolayers Characterization dirigée par Patrick Lemoine.

Dans un chapitre Introductif, je présenterai tout d'abord les techniques de synthèse et les caractéristiques du diamant en me focalisant plus particulièrement sur ses propriétés électrochimiques exceptionnelles. Je dresserai ensuite l'état de l'art des dispositifs diamant dans le domaine de la bio-détection, principalement dans celui des biocapteurs et des biopuces. Puis j'aborderai les aspects de biocompatibilité du diamant et décrirai l'état des

connaissances actuelles qui montrent que le diamant est un matériau hautement biocompatible offrant de nombreuses perspectives dans le domaine médical.

Le second chapitre sera axé sur la mise en œuvre d'une nouvelle technique de fonctionnalisation du diamant et sur le champ d'applications qu'elle recouvre. La première partie de ce chapitre sera consacrée à la caractérisation du diamant et de son état de surface par diverses techniques d'analyses. Les résultats s'avéreront cruciaux pour les études ultérieures, portant sur la fonctionnalisation du diamant et la conception du matériau composite Nanotubes de carbones/diamant. Je présenterai ensuite l'état de l'art des techniques de fonctionnalisation sur diamant avant de m'orienter vers la description de la nouvelle technique de greffage des amines mise au point. Le greffage sera caractérisé par différentes méthodes, comme la spectroscopie infrarouge mais j'aborderai aussi les aspects de la cinétique du greffage au travers d'une étude réalisée sur des transistors diamant à l'université de Munich. A l'issue de ces différentes études je démontrerai que cette technique de greffage aboutit sur la formation d'une liaison covalente carbone-carbone et proposerai un mécanisme de greffage associé. Enfin je mettrai en évidence l'apport majeur de cette méthode pour la réalisation de dispositifs dédiés à la bioélectronique en procédant à l'immobilisation de différentes (bio)molécules. J'utiliserai cette méthode pour réaliser une biopuce à ADN, à protéines mais également un biocapteur de troisième génération au peroxyde d'hydrogène. Enfin, dans le cadre d'un travail réalisé à l'Université d'Ulster, je montrerai que cette technique permet d'utiliser des outils de dépôt tel que le Dip-Pen Lithography pour immobiliser des (bio)molécules et structurer les dépôt à l'échelle de la centaine de nanomètres.

Le dernier chapitre portera sur la conception d'un nouveau matériau composite diamant/Nanotubes de carbones. Ce matériau devra par la suite pouvoir être utilisé pour mettre au point des dispositifs dédiés, en particulier, au domaine de la neurologie. Une première partie, non exhaustive, sera consacrée aux techniques de croissance et aux propriétés des nanotubes de carbones. Je détaillerai ensuite la mise au point d'une nouvelle technique de gravure du diamant catalysée par des nanoparticules et assistée par filament chaud. Je montrerai qu'il est possible après gravure de procéder à la croissance de nanotube à partir des particules de catalyseurs utilisées lors de la gravure. Je réaliserai ensuite une étude

comparative entre le matériau composite obtenue à partir de l'étape de gravure et ceux obtenus à partir des voies classiques. L'analyse des matériaux portera sur différents aspects, tout d'abord la qualité structurale des matériaux puis les caractéristiques électrochimiques et enfin sur les problèmes d'adhésion récurrent des nanotubes sur leurs substrat. En dernier lieu, j'utiliserai ce matériau composite pour concevoir un biocapteur de troisième génération au peroxyde d'hydrogène.

## ***CHAPITRE I : LE DIAMANT***

Le diamant synthétique est présent aujourd'hui dans de nombreuses applications industrielles. La quasi-totalité de la production industrielle de diamants synthétiques est assurée par la société Element Six, filiale du groupe De Beers et par Sumitomo Electric Industries. Les applications à l'échelle industrielle du diamant synthétique sont majoritairement liées à ses propriétés mécaniques. On trouve par exemple des revêtements en diamant pour les bistouris dédiés aux opérations chirurgicales qui requièrent une grande précision, pour des outils d'usinage résistant à l'abrasion, pour les têtes de foreuses ou encore le revêtement des pare-brise d'avion. On trouve également des membranes de diamant autosupportées dans des hauts parleurs. Enfin il existe des applications basées sur les propriétés électrochimiques, telles que des électrodes dédiées à la désinfection d'eau des piscines ou au traitement d'eaux usées par oxydation des produits organiques et inorganiques (cyanures, hypophosphite, sulfite, nitrate, phénols, alcools, aldéhydes, composés aromatiques ou chlorés, dioxines, pesticides...).

## I. Généralités - état de l'art

A la différence des autres formes allotropiques du carbone, le diamant est composé d'atomes de carbone dont les orbitales sont dans un état d'hybridation  $sp^3$ . Le diamant possède une structure cubique à face centrée où un site interstitiel tétraédrique sur quatre est occupé par un atome de carbone (conf. Figure I- 1). Son paramètre de maille est de 0,357 nm et la distance séparant deux atomes liés de manière covalente est de 0,154 nm. Cette structure compacte lui confère une densité de  $3,52 \text{ gr.cm}^{-3}$  et une rigidité exceptionnelle à la base de propriétés atypiques comme sa dureté,  $7000 \text{ kg.mm}^{-2}$  (dureté Knoop) et sa conductivité thermique,  $2000 \text{ W.m}^{-1}.\text{K}^{-1}$  à 273K.

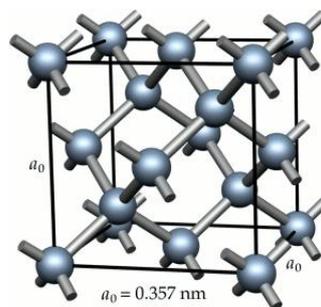


Figure I- 1 : Structure cubique du diamant

Le Tableau I- 1 dresse un comparatif succinct de quelques caractéristiques électroniques et physico-chimiques du diamant avec celles des autres éléments de la colonne quatre de la classification périodique utilisés couramment en microélectronique, à savoir le silicium et le germanium.

Propriétés	Diamant	Silicium	Germanium
Paramètre de maille à 300K	0.35668 nm	0.54311 nm	0.54311 nm
Concentration atomique à 300K	$1.763 \times 10^{23} \text{ cm}^{-3}$	$5.00 \times 10^{22} \text{ cm}^{-3}$	$4.42 \times 10^{22} \text{ cm}^{-3}$
Point de fusion (K)	3773 K	1683 K	1210 K
Conductivité thermique ( $\text{W} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )	20	1,48	0,6
Largeur de la bande interdite (eV)	5.47eV (indirecte)	1.1242eV (indirecte)	0.66eV (indirecte)
Mobilité des électrons à 300 K ( $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	1650	4500	3900
Mobilité des trous à 300K ( $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )	660	3800	1900
Champ de claquage ( $10^6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ )	5	0,3	0,1

*Tableau I- 1 : Tableau comparatif de quelques propriétés physico-chimiques et électroniques du silicium, du diamant et du germanium.*

Le diamant est principalement connu pour sa dureté et sa large bande interdite mais nous allons voir qu'aujourd'hui il concentre une grande diversité d'activités de recherche qui tentent d'exploiter toute la panoplie de ses propriétés originales.

## I.A. Propriétés générales

### I.A.1. Conductivité électrique et thermique

A la différence du graphite qui est hybridé  $sp^2$  et où l'on trouve des orbitales moléculaires  $\pi$  permettant la délocalisation des électrons, on ne trouve dans le cas du diamant que des orbitales moléculaires de type  $\sigma$ , interdisant toutes délocalisations électroniques. Cette saturation des couches électroniques externes, fait du diamant un excellent isolant. Cependant, il est plus correct de parler de semi conducteur à large bande interdite (5,5eV à 300K) [1]. Malgré la valeur élevée de son gap, nous verrons par la suite que le dopage du diamant ouvre des perspectives très intéressantes dans les domaines de l'électronique et de l'électrochimie. Il possède également une des meilleures conductivités thermiques ( $20 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ ) [2], faisant de lui un très bon candidat pour les applications en électronique de puissance.

### **I.A.2. Stabilité chimique**

Une autre propriété du diamant réside dans son exceptionnelle inertie chimique. Son excellente résistance aux traitements chimiques acides, basiques ou oxydants [3] est à la base de son utilisation pour certains revêtements. De plus, son très faible coefficient de dilatation interdit la formation de couches d'oxydes épaisses contrairement aux autres éléments de la colonne IV et pour la plupart des métaux. Enfin, le diamant affiche une résistance exceptionnelle vis-à-vis des rayonnements  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et neutroniques. Cette résistance peut être mise à profit pour la conception de dosimètres en radiothérapie ou encore de détecteurs pour les applications nucléaires [4].

### **I.A.3. Propriétés mécaniques**

La majeure partie des applications industrielles actuelles (outils de découpe, matériel médical...) s'appuient sur les propriétés mécaniques du diamant [5]. De récentes études [6], [7, 8] montrent que le diamant est un matériau biocompatible. En couplant ses propriétés mécaniques à sa biocompatibilité, le diamant est aujourd'hui l'un des meilleurs candidats pour la conception de prothèses médicales, en particulier de la hanche ou du genou.

## **I.B. Propriétés optiques**

Le diamant non dopé est transparent sur une fenêtre spectrale s'étendant de l'infrarouge aux ultraviolets à l'exception d'une bande d'absorption comprise entre 4000 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Cela fait de lui un excellent candidat pour les applications comme fenêtres optiques [9]. Nous verrons par la suite que les couches diamant contenant des impuretés (Azote, Hydrogène) ou dopées (Bore) présentent de nombreux pics d'absorption caractéristiques en infrarouge (4000-500 $\text{cm}^{-1}$ ). C'est d'ailleurs à partir de ces pics, que la nomenclature attribuée au diamant est fondée [10]. Ainsi, le type de diamant est défini par son spectre infrarouge ; les différents types sont classés en fonction de leurs contaminants [11], ils sont détaillés en annexes. Plus particulièrement, les diamants de type I ne sont pas transparents au rayonnement UV du fait d'une teneur en impuretés d'azote significative. Comparativement, les diamants de type II sont transparents au rayonnement UV jusqu'à 230 nm [12] et ne contiennent de l'azote qu'en quantité infime. Les diamants semi-conducteurs,

donc faiblement dopés, sont classés comme type IIb. Cette classification rend également compte de la présence d'impureté (en quantité significative) en azote dans le diamant de type I. Les diamants du type II ne contiennent de l'azote qu'en quantité infime.

## I.C. Propriétés électroniques

Les applications basées sur les propriétés électroniques [13] du diamant nécessitent l'utilisation de couches monocristallines de bonne qualité cristalline. Du fait de sa large bande interdite, le champ de claquage du diamant est le plus élevé des semi-conducteurs. Associé à la grande mobilité des porteurs [14], il se positionne comme l'un des meilleurs candidats pour les applications impliquant de hautes températures, pour l'électronique de puissance et pour la réalisation de diodes Schottky [15]. Sa large bande interdite combinée à ses propriétés de diffuseur thermique laisse présager l'apparition dans un futur proche de projets visant à incorporer le diamant aux technologies silicium actuelles afin d'en accroître les performances.

## I.D. Propriétés électrochimiques

Pour que le diamant puisse être utilisé comme électrode il faut qu'il ait un comportement métallique, ce qui implique de doper lourdement le diamant au bore. L'apparition du diamant dans le domaine de l'électrochimie [16] a donc été liée aux développements des procédés de dopage du diamant [17]. Depuis, le diamant s'est imposé comme étant un matériau phare dans le domaine de l'électrochimie [18] avec des applications visant l'analyse [18], le diagnostic [18], la bioanalyse [19-21] ou les procédés de dépollution [22-24]. Cet engouement tient aux propriétés électrochimiques exceptionnelles du diamant alliant faible courant de fond, large fenêtre de potentiel en milieu aqueux et bonne résistance à l'obstruction.

### I.D.1. Courant résiduel

Les courants résiduels observés sur les électrodes diamants sont très faibles [25], typiquement de l'ordre de dix fois inférieurs à ceux d'une électrode métallique conventionnelle. Les voltampérogrammes présentés sur la Figure I-2 permettent de comparer

les courants résiduels du platine, de l'or, du carbone vitreux et du diamant. Le courant résiduel présente deux origines, une partie faradique et une partie de nature capacitive. La composante faradique est majoritairement due à l'électrolyse de l'eau et à la réduction de l'oxygène [26]. Cet effet vient du fait que le diamant est insensible aux réactions cinétiquement lentes de type « inner » sphere [27], et plus particulièrement aux réactions d'évolution de l'oxygène et de l'hydrogène. Contrairement aux processus « outer » sphere qui s'effectuent par un mécanisme de type effet tunnel, le transfert d'électron « inner » sphere nécessite la formation d'une liaison entre l'espèce redox et le substrat. La faible composante capacitive est quant à elle associée à la faible capacité double couche du diamant [3]. Toutefois, si cette faible amplitude de la composante capacitive est bien connue, son interprétation est toujours sujette à discussion. Quoiqu'il en soit, ce faible courant résiduel améliore considérablement la sensibilité des électrodes en augmentant le rapport signal sur bruit. Cet avantage est également renforcé par la stabilité et la reproductibilité de l'amplitude du courant résiduel [18]. La sensibilité et la reproductibilité des mesures confèrent au diamant un avantage majeur par rapport aux électrodes usuelles pour les applications dans le domaine des capteurs ampérométriques.

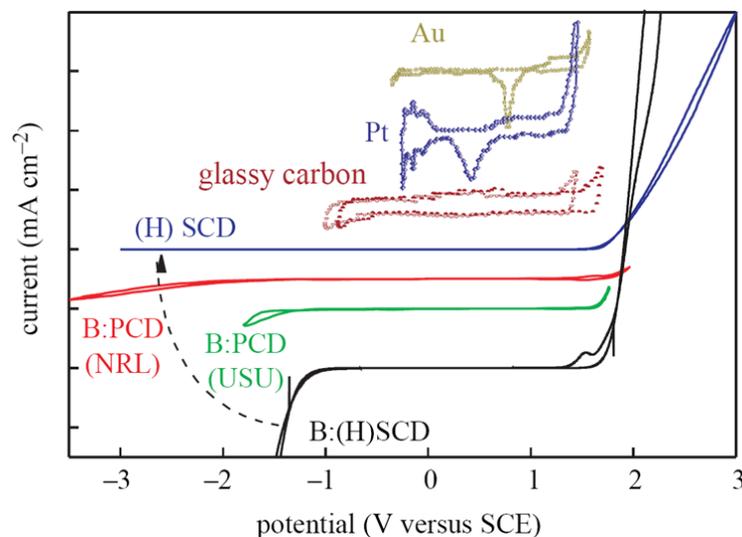


Figure I-2 : Evolution de la fenêtre de potentiel de différents types d'électrodes diamant. En bleu : film monocristallin intrinsèque hydrogéné. En rouge : film polycristallin dopé,  $[B] = 5.10^{19} \text{ B.cm}^{-3}$ . En vert : film polycristallin dopé,  $[B] = 5.10^{20} \text{ B.cm}^{-3}$  et en noir : film monocristallin dopé,  $[B] = 3.10^{20} \text{ B.cm}^{-3}$ . Les domaines électroactifs des électrodes usuelles (or, platine, carbone vitreux) sont présentés à titre de comparaison. [20]

### **I.D.2. Large fenêtre de potentiel**

La très large fenêtre électrochimique du diamant en milieux aqueux [28] représente un atout majeur pour de nombreuses applications (diagnostique, analyse, dépollution...). Sur la Figure I-2 sont représentées les fenêtres électrochimiques de différentes électrodes usuelles lors de l'électrolyse d'une solution aqueuse d'acide sulfurique [20], on peut voir que le diamant permet l'exploration de plages de potentiels inaccessibles aux autres électrodes. Les propriétés des électrodes diamants sont néanmoins dépendantes de différents facteurs comme les terminaisons de surface [29], [30], le taux de dopage [31], l'orientation cristalline [32] ou encore la quantité de phase non diamant [33]. Comme on peut le voir sur la Figure I-2, une bonne qualité cristalline associée à une forte concentration de bore augmente l'efficacité d'hydrolyse (la réactivité de l'électrode) et donc réduit de fait la fenêtre de potentiel. Dans le cas des capteurs faradiques, la réactivité électrochimique de l'électrode est un facteur essentiel. Il n'est dans ce cas d'aucune utilité d'avoir une large fenêtre de potentiel si l'électrode affiche une faible réactivité. On peut donc en fonction de l'application visée, modifier la concentration en bore dans la couche pour favoriser la fenêtre électrochimique ou la réactivité de l'électrode. Comme dans le cas des faibles courants résiduels, l'état de surface du diamant influe grandement sur la fenêtre de potentiel [34] et sur la constante de transfert de charge [35]. Toutefois, le facteur crucial diminuant fortement la plage électrochimique et la réactivité des électrodes est la présence de phase  $sp^2$  dans les couches [22]. Il est donc important pour les applications dans le domaine de l'analyse, de contrôler tous ces paramètres pour assurer une bonne reproductibilité des mesures.

### **I.D.3. Resistance à l'obstruction**

Le diamant, en particulier dans son état hydrogéné, est de manière générale très peu enclin à l'adsorption d'espèces à sa surface. Il n'est donc pas sujet à l'encrassement par des produits réactionnels ou par des molécules présentes dans le milieu environnant ; c'est la propriété d'anti « fouling ». Comparativement aux électrodes qui voient leurs propriétés chuter avec le temps (à cause de l'accumulation d'espèces sur leurs surfaces) et particulièrement dans les milieux organiques complexes, les électrodes diamant conservent leurs attributs plus longtemps. De plus, les métaux sont sujets à la formation d'une couche d'oxyde native entraînant une perte significative de leurs propriétés électrochimiques. L'oxydation du diamant engendre uniquement la formation d'une couche monoatomique

partielle sur sa surface. Il arrive toutefois que des dépôts, comme par exemple lors de réactions de polymérisations, obstruent la surface du diamant. On peut dans ce cas procéder à une oxydation poussée qui entraîne la génération de radicaux OH $\cdot$  qui dégradent toutes les espèces adsorbées en surface [24].

#### I.D.4. Stabilité

L'hybridation sp<sup>3</sup> du diamant, et donc la saturation des couches électroniques externes, confère au diamant une grande stabilité chimique et électrochimique. En fait, très peu de méthodes permettent d'endommager en profondeur les films de diamant, la plus utilisée étant le plasma d'oxygène [36]. Ainsi, le diamant est très peu sensible à la corrosion [37]. Cependant, il est important de noter que les groupements de surface du diamant s'oxydent partiellement spontanément à l'air ou par immersion en milieu aqueux [38]. Il est bon de souligner que même si cette oxydation de surface est partielle, elle impacte de manière sensible le transfert électronique lors de réactions électrochimiques [39]. Afin d'oxyder complètement la surface extrême du diamant, des traitements dans des milieux fortement oxydants (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ou/et HNO<sub>3</sub> à chaud [35], oxygène singulet [40] ou par voie électrochimique [41] peuvent être envisagés. Quoiqu'il en soit, la grande stabilité du diamant rend possible la mise en œuvre de procédés électrochimiques extrêmes nécessitant soit de fortes densité de courant, soit des surtensions élevées comme l'électrosynthèse [3], ou encore la dépollution via l'oxydation de polluants organiques[23] ou la réduction de composés inorganiques tels que les nitrates [Deneuvillee] sans que cela n'entraîne de passivation de l'électrode ou/et sa dégradation.

#### I.E. Synthèse

Lorsque le mot diamant est prononcé, on pense immédiatement au diamant naturel peu compatible en termes de coût et de composition avec un développement à grande échelle de dispositifs mécaniques, électroniques ou électrochimiques. Ce minéral se forme dans le manteau terrestre à des pressions et températures très élevées puis remonte en surface lors d'éruptions volcaniques. Dans ces conditions, il est la forme allotropique thermodynamiquement stable du carbone, alors que dans les conditions standards, il s'agit du graphite Figure I- 3. On trouve des diamants naturels de toutes les couleurs, chaque couleur

étant due à la présence d'impuretés. C'est à partir des diamants naturels et de l'incorporation de différentes impuretés dans le réseau qu'une nomenclature a pu être établie. Les différents types de diamant sont ainsi succinctement détaillés en annexes. Afin de promouvoir les caractéristiques physico-chimiques du diamant dans des applications industrielles et/ou de recherche, deux stratégies permettant d'obtenir du diamant synthétique ont été développées : la méthode Haute Pression Haute Température (HPHT) et le dépôt chimique en phase vapeur (Chemical Vapor Deposition (CVD)).

### I.E.1. Le procédé HPHT

Le procédé HPHT reproduit les conditions de formation du diamant naturel et permet d'obtenir des diamants monocristallins. Ainsi, en 1955, la compagnie General Electric a breveté le procédé décrit par Bundy et al. [42]. Cette technique repose sur la conversion du graphite en diamant par exposition à de hautes températures et pressions. Par la suite, diverses publications sont venues compléter la compréhension du mécanisme et donc du procédé, jusqu'à ce que les réactions et mécanismes en jeu soit totalement maîtrisés [43].

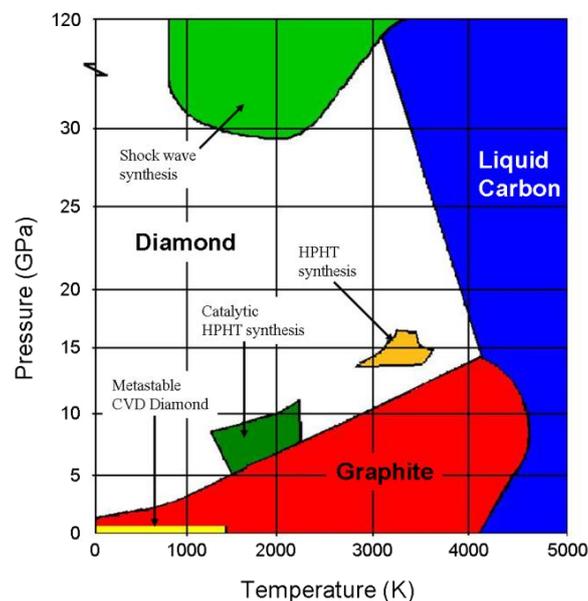


Figure I- 3 : Diagramme de phase du carbone. [44]

Les diamants issus de ce procédé sont aisément reconnaissables par leur couleur jaune, due à l'incorporation dans les échantillons d'une quantité importante d'azote, contaminant majeur issu de l'air ambiant. La limite principale de ce procédé réside dans le fait qu'il ne permet d'obtenir que des cristaux de quelques millimètres carrés. Il faut tout de même

remarquer que ces cristaux sont très utilisés comme substrat dans le domaine de l'électronique en raison de leur bonne qualité cristalline. On remarque sur la Figure I- 3 une zone de croissance notée Catalytic HPHT, qui apparaît dans des gammes de pressions et de températures plus basses que la HPHT classique. Cette technique est basée sur l'utilisation d'un mélange de carbone graphitique et de catalyseurs métalliques par germination puis croissance.

## I.E.2. Les procédés CVD

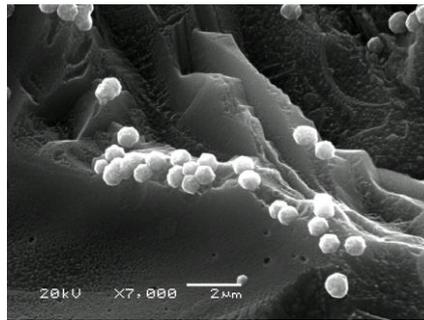
Le développement des techniques CVD a permis de simplifier la synthèse, de diminuer les coûts de production et de diversifier les applications du diamant synthétique. Ainsi, des croissances de diamants mono et polycristallins sont réalisées sur des substrats de différentes natures (diamant, silicium, métaux, polymère...). L'avantage majeur de cette technique réside dans la très faible quantité d'impuretés incorporées dans les couches lors de la croissance mais aussi dans la maîtrise de cette impureté en termes de nature et de concentration. Notons toutefois que les matériaux générés via cette voie de synthèse sont obtenus sous forme de films plus ou moins fins. Les croissances par CVD permettent d'obtenir des films de diamants de très grande pureté car elles s'effectuent à des valeurs moyennes de pressions ( $10^{-1}$ - $10^{-3}$  Bar), précédées par des pompes poussés ( $10^{-9}$  Bar) avant croissance permettant de s'affranchir du contaminant azote, et utilisent des précurseurs gazeux d'une très grande pureté. D'autre part, comme mentionné précédemment, il est possible d'introduire des impuretés de manière contrôlée et en particulier du bore. Celui-ci s'incorpore en position substitutionnelle dans la couche diamant jusqu'à une concentration limite pour laquelle la structure diamant obtenue est désorganisée, il apparaît alors une séparation de phase ( $[B] > 10^{23} \text{ cm}^{-3}$ ). L'introduction du bore trivalent lors de la synthèse permet de doper les couches de diamant par injection de porteurs de charges majoritaires (trous) dans la bande de valence, diminuant ainsi le gap en rapprochant le niveau de Fermi du diamant de celui de la bande de valence et rendant le diamant semi-conducteur. Il existe même une concentration en bore ( $10^{21} \text{ atome.cm}^{-3}$ ) à partir de laquelle le diamant adopte un comportement métallique dû à l'apparition d'un continuum de niveaux énergétiques.

Diverses techniques de CVD ont été développées pour la synthèse de films de diamant, leurs dénominations étant liées à la nature de la source d'énergie utilisée. Bon nombre d'entre elles, regroupées sous le terme générique de PE-CVD (Plasma Enhanced

CVD) font intervenir un plasma qui peut être généré par des microondes (Microwave plasma-assisted CVD, MPCVD), par radiofréquence, par filament chaud (Hot Filament CVD, HFCVD) ou encore par résonance cyclotron (Electron cyclotron resonance CVD, ECRCVD). Le mélange gazeux utilisé lors de la croissance est un mélange de méthane et de dihydrogène, la dissociation des espèces gazeuses entraîne la formation de radicaux méthyles et d'hydrogène atomique. Ce dernier est présent au minimum à 95% dans le mélange et joue un rôle primordial dans la croissance. Dans les conditions des dépôts CVD, les phases diamant et graphitique se forment simultanément, la phase graphitique étant attaquée préférentiellement par l'hydrogène atomique généré dans le plasma. Cette attaque préférentielle réside en fait plus précisément dans un différentiel marqué entre la cinétique de gravure du diamant, lente, et celle du graphite beaucoup plus rapide. Les vitesses de croissance des couches sont donc contrôlées par le rapport  $\text{CH}_4/\text{H}_2$ , les taux élevés augmentent la vitesse de dépôt au détriment de la qualité cristalline [45]. Lors du dopage des couches au bore, différents précurseurs gazeux peuvent être utilisés additionnés aux gaz précurseurs : le tri-méthyle borane (TMB), le diborane ( $\text{B}_2\text{H}_6$ ). Le modèle le plus communément utilisé pour décrire le mécanisme de croissance du diamant polycristallin sur un substrat non-diamant est celui de Volmer-Weber. Il fait intervenir deux étapes : une première étape de nucléation durant laquelle apparaissent des nuclei sur le substrat et une étape de croissance pendant laquelle ces nuclei vont croître dans les trois dimensions, puis ensuite coalescer pour former une couche compacte de diamant. Durant ma thèse, seul des croissances d'échantillons polycristallins sur substrat silicium ont été réalisées. Si les échantillons microcristallins ont tous été synthétisés à l'institut Néel, certains échantillons nanocristallins proviennent quant à eux du CEA LIST-LCD. La différence entre les échantillons nano et microcristallins réside dans la taille des grains qui les constituent. Les films de diamant nanocristallins ont des tailles de grains de l'ordre d'une centaine de nanomètres alors que celles des dépôts microcristallins sont de l'ordre du micromètre à quelques micromètres.

Lors de la synthèse d'échantillons polycristallins, l'étape de nucléation nécessite une préparation préliminaire du substrat silicium appelée « scratching ». Celle-ci consiste à dépolir le substrat silicium utilisé comme support à l'aide d'une pâte diamantée, introduisant ainsi des irrégularités sur la surface hôte. La densification des lignes de champ due à l'effet de pointe que génèrent ces irrégularités constitue ainsi des zones de nucléation préférentielles (conf. Figure I- 4 : Image MEB d'un échantillon diamant en phase de nucléation mettant en évidence les sites préférentiels de nucléation. [7].)

Il existe une autre méthode permettant de générer des nuclei sans avoir recours à l'étape de « scratching ». Il s'agit de la technique BEN, Bias Enhanced Nucleation [46], qui consiste en l'application d'un champ électrique d'orientation normale par rapport à la surface du matériau support au début du procédé. Cette technique induit ainsi la formation de germes sur la surface du substrat mais implique l'utilisation de substrats conducteurs. C'est la méthode que nous avons utilisée dans le cas des croissances de diamant nanocristallins à l'institut Néel. Nos partenaires du CEA LIST-LCD quant à eux, ne procèdent pas via une étape de nucléation mais font appel au « seeding » pour introduire directement des germes de diamant sur le substrat. Le « seeding » consiste à déposer sur le substrat des nanoparticules de diamant d'un diamètre moyen d'une dizaine de nanomètres. Différentes méthodes de « seeding » sont décrites dans la littérature afin de déposer uniformément des germes de diamant dont la sonication, le spray-coating, le spin-coating ou encore le dip-coating. L'équipe du CEA LIST-LCD utilise la technique du spin-coating pour étaler uniformément une solution de nanoparticules de diamant en suspension [47]. Il s'ensuit une étape de croissance classique de ces nuclei exogènes qui se développent, puis coalescent.



*Figure I- 4 : Image MEB d'un échantillon diamant en phase de nucléation mettant en évidence les sites préférentiels de nucléation. [7]*

### **I.E.3. Les bâtis de croissance**

Durant ma thèse, j'ai procédé à la croissance d'échantillons microcristallins à l'institut Néel en utilisant la technique de « scratching ». J'ai également eu recours à l'utilisation de deux types d'échantillons nanocristallins dont une partie a été synthétisée par Clément Hebert Doctorant à l'Institut Néel. L'autre partie nous a été fournie par l'équipe de Philippe Bergonzo (LIST-LCD) du CEA Saclay dans le cadre d'une collaboration. Ils ont été synthétisés par Charles Agnes, Post-Doctorant au LIST.

- Les échantillons diamant de l'institut Néel

Les échantillons de diamants microcristallins dopés utilisés dans le cadre de ma thèse proviennent tous de l'Institut Néel. La méthode de croissance employée est la technique de dépôt vapeur en phase chimique assistée par plasma microonde (MPCVD). Les substrats de silicium dopé p utilisés ont été préparés par la technique de « scratching » et toutes les couches de diamant polycristallin ont été lourdement dopées au bore ( $[B] > 10^{21}$ ). Le réacteur de croissance utilisé a été mis au point par Etienne Gheeraert en 1992 [48] à partir d'un modèle japonais du National Institute for Research in Inorganic Materials (NIRIM) [49] (Figure I- 5).

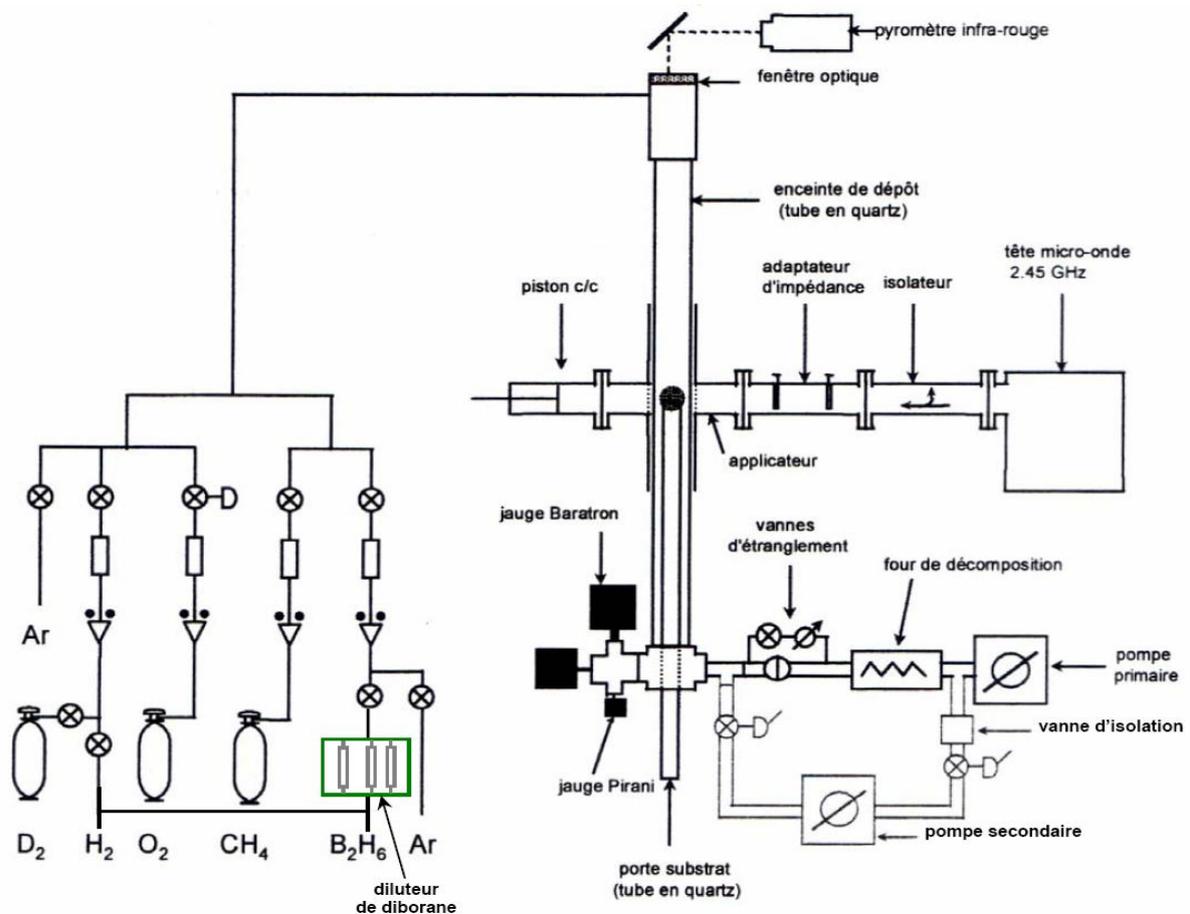


Figure I- 5 : Schéma de principe du bâti de croissance MPCVD de type NIRIM de l'Institut Néel.

La chambre de réaction est constituée d'un tube en quartz dans lequel transite le mélange des précurseurs gazeux qui croisent un guide d'onde dans le lequel se propage une onde électromagnétique d'une fréquence de 2,45Ghz. La puissance transportée par cette dernière peut être ajustée entre 0 et 2000W. Les conditions de températures requises pour la synthèse sont de l'ordre de 800°C et correspondent à des valeurs de puissances appliquées comprises entre 200 et 400W. En effet, la température est contrôlée au travers de la puissance microonde injectée et de la pression régnant dans l'enceinte. La mesure de cette dernière

s'effectue à l'aide d'un pyromètre positionné en haut du tube de quartz. La température, qui est elle-même reliée à la pression, influe sur la physico-chimie des espèces. C'est donc un paramètre crucial lors de la croissance du diamant.

Le flux des gaz (hydrogène, méthane, diborane) à l'intérieur du tube est contrôlé à l'aide de débitmètre massique, il joue un rôle important. Les concentrations de diborane requises dans le mélange gazeux final sont infimes (6000ppm), ce qui a nécessité la conception d'une ligne de dilution spécifique pour ce dernier. La pression est quant à elle régulée par une vanne d'étranglement située en amont du système de pompage primaire utilisé lors de la croissance.

On peut également noter la présence d'une pompe secondaire sur la Figure I- 5. Cette pompe est dédiée à l'étape de « dépollution » précédent le processus de croissance. Avant l'introduction des gaz, on procède systématiquement à une étape de mise sous vide secondaire du bâti ( $10^{-9}$  Bar) pendant une dizaine d'heures. Cette purge de l'enceinte permet d'évacuer une quantité maximale d'espèces résiduelles adsorbées sur les parois et l'échantillon. Afin d'assurer une pureté du mélange gazeux optimale, nous utilisons un purificateur d'hydrogène situé en amont de la chambre d'arrivée des gaz. L'association du pompage secondaire, effectué avant la croissance, et du dispositif de purification de l'hydrogène assure une grande pureté des couches diamant déposées. La seule impureté détectable réside dans une quantité infinitésimale de silicium arraché du tube en quartz par le plasma. Notons ici que le dopage au bore dans l'enceinte de synthèse induit une pollution rémanente du réacteur qui ne permet pas alors de synthétiser des films de diamant intrinsèques. De fait, les échantillons non dopés seront définis comme étant NID pour Non Intentionnaly Doped du fait de cette pollution résiduelle qui induit un faible dopage au bore ( $[B] < 10^{17} \text{cm}^{-3}$ )

Les conditions de croissance des échantillons polycristallins dans le réacteur de croissance de type NIRIM sont résumées dans le Tableau I- 2:

Vide secondaire	t = 12h
Pré-plasma hydrogène	T = 890°C ; P = 30torr ; t = 30min
Croissance de diamant	T = 890°C ; P = 30torr ; C/H = 0,5% ; t = 24h
Post-plasma hydrogène	T = 750°C ; P = 30torr ; t = 1h

Tableau I- 2 : Conditions de croissance des échantillons diamant microcristallins à l'Institut Néel.

Les croissances des échantillons nanocristallins dopés effectuées à l'Institut Néel se déroulent dans les mêmes conditions et dans le même bâti de croissance. La seule différence

réside dans l'étape de nucléation qui est réalisée par BEN dans un réacteur commercial Seki. Ce bâti utilise également le procédé MPCVD mais la géométrie de sa chambre de réaction est différente et ses parois sont en métal et refroidies. De plus, la température du porte-substrat est gérée indépendamment. Ce qui à la différence des bâtis de type NIRIM ou la température du substrat est contrôlée par celle du plasma, donne la possibilité de faire varier séparément la température du mélange gazeux et celle du substrat. La grande taille de la chambre permet de générer des plasmas de grande dimension et donc de synthétiser des échantillons diamant sur des surfaces de quelques pouces. Dans le cas des échantillons nanocristallins dopés, la germination a donc été réalisée par BEN dans le bâti Seki. Ce bâti n'intégrant pas de lignes de gaz dopant, la croissance est assurée subséquentement dans le bâti de type NIRIM. Le Tableau I- 3 présente les conditions de nucléation par BEN utilisées dans le réacteur Seki

:

Vide secondaire	quelques heures
Nucléation par BEN	T = 700°C ; P = 17torr ; C/H = 5% ;
Post-plasma hydrogène	-

*Tableau I- 3 : Conditions de nucléation par BEN.*

Les échantillons ainsi nucléés sont ensuite transférés dans le réacteur de synthèse NIRIM pour l'étape de croissance qui se déroule alors dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour la croissance des échantillons microcristallins. Cette méthodologie sous-tend ainsi que les conditions de nucléation, notamment la densité de nucléi et la morphologie du support, sont les paramètres majeurs influant la structure finale des films entre nano et microcristallins.

- Les échantillons diamant du CEA LIST

Les échantillons nanocristallins dopés provenant du CEA LIST-LCD sont aussi synthétisés par des procédés MPCVD. Nos collaborateurs possèdent plusieurs réacteurs de croissance, certains sont dédiés aux dépôts d'échantillons dopés au bore et d'autre aux échantillons intrinsèques. Il faut noter qu'utiliser du bore dans un bâti est irréversible et ne permet plus par la suite d'obtenir des couches intrinsèques. Le bore se dépose sur chaque partie avec lesquelles il est en contact, c'est pourquoi on retrouve du bore dans chaque croissance effectuée par la suite. La seule option consiste à remplacer certaines parties par des neuves. Le bâti consacré aux couches dopées a été conçu par l'équipe LCD, il a des caractéristiques semblables au bâti Seki utilisé à l'institut Néel et permet le dépôt de couches

diamant dopées sur de larges surfaces. Les précurseurs gazeux utilisés sont le méthane, l'hydrogène et le triméthylborane (TMB). Les conditions de croissance des couches nanocristallines réalisés au CEA LIST-LCD sont résumées dans le Tableau I- 4.

Vide secondaire	quelques heures
Croissance de diamant dopé bore	T = 760°C ; P = 40torr ; C/H = 0,8% ; t = 7h TMB/CH <sub>4</sub> =98ppm
Post-plasma hydrogène	T = 760°C ; P = 40torr ; t = quelques minutes

Tableau I- 4 : Conditions de croissance des échantillons diamant nanocristallins au LIST.

## I.F. Le diamant pour la (bio)-détection

La panoplie de propriétés physico-chimiques remarquables du diamant peut être exploitée pour l'élaboration de dispositifs bioélectroniques à vocations analytiques ou implantables. Ainsi, les propriétés électrochimiques exceptionnelles du diamant lourdement dopé le placent comme un matériau d'électrode idéal pour les applications bioanalytiques ou le design d'implants neuroprothétiques. De plus, le diamant présente un comportement « anti-fouling », l'anti-fouling d'une électrode représentant sa capacité à ne pas voir son signal électrochimique se dégrader dans le temps du fait de l'accumulation d'espèces, présentes en solution ou générées lors d'un processus électrochimique, sur la surface. D'autre part, les propriétés de conductivité de surface du Diamant hydrogéné intrinsèque peuvent être mises à profit pour l'élaboration de SGFET (Solution Gate Field Effect Transistor). Les propriétés mécaniques sont utilisées pour la mise au point de réseaux de  $\mu$ -levier dont les gammes fonctionnelles sont équivalentes à celles des QCM (Quartz Crystal Microbalance). Enfin, le diamant affiche une inertie chimique remarquable, offrant la possibilité de travailler dans des milieux corrosifs, acides ou basiques.

De nombreux dispositifs destinés au diagnostic et/ou à la détection de molécules ou d'objets cibles ont été élaborés sur diamant. Ce dernier peut alors être un simple support associé à une méthodologie de détection extrinsèque ou alors un outil de transduction. Les différentes techniques de détection et transduction rapportées dans la littérature pour des

dispositifs à base de diamant sont reportées ci-dessous avec pour certaines leur limite de détection:

- La Microscopie de Fluorescence permet de détecter de manière extrinsèque (sans faire appel aux propriétés du diamant) la présence de quelques  $10^{-15}$  mol.l<sup>-1</sup>. Cette technique est pseudo-quantitative mais permet d'être sensible à de très petites quantités. Elle représente une méthodologie de détection robuste utilisée comme référence dans des mesures de reconnaissance biomoléculaire (hybridation de l'ADN, couplage antigène-anticorps...) [50].

- Les techniques électrochimiques font appels aux remarquables propriétés du diamant lourdement dopé au bore. Compte tenu du faible courant de fond et de la large fenêtre électrochimique du diamant en milieu aqueux, des limites de détection de l'ordre de  $10^{-12}$  mol.l<sup>-1</sup> peuvent être atteintes avec certaines techniques [51]. De plus, l'électrochimie permet l'analyse quantitative des espèces redox détectées qu'elles soit adsorbées/immobilisées à la surface du diamant ou présentes en solution.

- Les transistors à effet de champs de type SGFET élaborés sur diamant ont une gamme sensible du même ordre de grandeur que la technique de voltampérométrie cyclique. Néanmoins son mode de fonctionnement est basé sur la sensibilité de la conductivité de surface au taux de recouvrement, ce qui ne permet pas d'établir une lecture directe de la quantité d'espèce en solution sans l'établissement préalable, dans des conditions de mesure définies (temps d'interaction, température...), d'une courbe de calibration. Un avantage important de cette méthodologie tient à la possibilité de détecter des espèces ne présentant pas d'activité redox [52].

- Les micro-leviers en diamant offrent de réelles perspectives en termes de transduction. Plus particulièrement, les caractéristiques mécaniques du diamant pourraient permettre leur utilisation en mode dynamique, poutre vibrante, dans des milieux électrolytiques. Malgré des limitations équivalentes à celles relevées pour les SGFET (effets de surface), des limites de détection voisines de l'électrochimie peuvent être attendues tout en permettant le suivi des phénomènes de reconnaissance biologique en temps réel [53].

-

Les paragraphes suivants reprennent les différentes réalisations rapportées dans la littérature sur la base des méthodologies de détection/transduction précédemment citées.

## I.F.1. Détection électrochimique

### *I.F.1.a Composés inorganiques*

La large fenêtre électrochimique du diamant en solution aqueuse, couplée aux faibles courants résiduels a permis de procéder à la détection de nombreuses espèces inorganiques et métaux à l'état de trace. Parmi celles-ci on peut citer les nitrates, les nitrites et les ions azotures [54, 55] ou encore les ions sulfates [56]. Concernant les métaux, l'argent et l'étain [57], le cadmium, le cuivre, le zinc et le plomb [51], ainsi que le mercure [58] ont pu être détectés en très faibles concentrations par électrochimie sur diamant. Dans certains cas [56], des microélectrodes ont été utilisées pour accroître les performances des électrodes diamant en termes de limites de détection.

### *I.F.1.b Espèces organiques*

De la même manière un nombre considérable d'équipes se sont intéressées à la détection de substances organiques très faiblement concentrées sur électrodes diamant. Par exemple, les détections de dérivés du phénol [59], de composés chlorés [55], de bases azotées [41], de neurotransmetteurs [60], de polyamines [61] ou encore de Xanthines [62] ont été menées avec succès. Cette liste d'exemples est loin d'être exhaustive mais illustre parfaitement les potentialités électroanalytiques du diamant utilisé comme simple électrode. La détection de ces composés peut être effectuée sur de nombreuses électrodes mais la plupart de ces molécules sont aromatiques et sujettes à polymériser ou réagir directement avec le substrat. Les avantages du diamant tiennent alors dans sa haute sensibilité et dans son comportement anti « fouling » permettant d'effectuer de nombreuses mesures sans que sa sensibilité ne soit dramatiquement affectée.

### *I.F.1.c Traitement de l'eau*

Comme nous l'avons vu, la large fenêtre électrochimique du diamant autorise l'application de potentiels anodiques très élevés permettant de générer des radicaux  $\text{OH}^\bullet$  [24] très réactifs. Ceux ci sont alors mis à profit pour la dégradation de substances organiques au voisinage de l'électrode. Ce procédé de purification de l'eau par oxydation des substances organiques à l'aide de radicaux est appelé procédé d'oxydation avancé. Il existe différentes voies chimiques permettant de générer ces radicaux en solution, la plus connue étant le procédé Fenton [63]. Le diamant constitue ainsi une alternative aux procédés chimiques en

produisant de manière continue ces radicaux aux voisinages de l'électrode. Il existe toutefois certaines limitations à cette méthode : ces radicaux étant très réactifs, se dismutent rapidement pour former du peroxyde d'hydrogène lors de leur diffusion vers la solution. Il faut donc que les substances à détruire soient acheminées au voisinage de l'électrode durant le processus d'oxydation avancé et ce, en repoussant les limites imposées par la diffusion des espèces cibles. De plus, ces dernières doivent être solubles en milieux aqueux. A titre d'exemple, le traitement électrochimique d'eaux polluées par des biocides [64], des chlorophénols [65], des acides organiques associés à des composés aminés et l'ETDA [66] ou encore des herbicides [23] a été expérimenté avec succès sur électrode diamant. Il est également possible de dégrader des composés inorganiques tels que les cyanures [67], les sulfates [56] ou les nitrates [66]. Enfin, ce même traitement permet la désinfection des eaux de consommation. Ainsi, Furuta et al. [68] ont démontré la désactivation de légionelloses par traitement électrochimique sur diamant. Il a été ainsi possible d'implémenter des électrodes de diamant pour le traitement de l'eau potable et pour l'entretien des piscines. On trouve aujourd'hui plusieurs sociétés commercialisant ce type de dispositif de traitement.

### **I.F.2. Biocapteurs-Biopuces**

Les biocapteurs et les biopuces sont des dispositifs analytiques complexes faisant intervenir un support sur lequel sont immobilisés respectivement une ou plusieurs entités biologiques douées de reconnaissance moléculaire et nommées biorécepteurs. Différents travaux de recherche ont utilisé le diamant comme matériau support de ces dispositifs du fait de sa nature carbonée permettant un greffage direct du (des) biorécepteur. Dans le cas des biocapteurs, les propriétés physico-chimiques du diamant sont alors mises à profit pour la traduction du signal de reconnaissance en un signal électrique. Le diamant joue alors un rôle actif de transducteur parallèlement à son rôle passif de substrat. Les paragraphes suivants visent à introduire de manière exhaustive les différents biocapteurs et biopuces développées sur diamant dans la littérature.

### *I.F.2.a Biopuces*

L'expansion des thématiques de recherche dans les domaines des biotechnologies, du diagnostic médical, du contrôle alimentaire ou encore de l'analyse environnementale, a engendré un réel essor dans le développement des biopuces. L'intérêt d'une biopuce est de pouvoir mener, sur la base de la détection d'un phénomène de reconnaissance moléculaire, des études multiparamétriques sur le même support. Notons que la lecture de ces dispositifs peut être effectuée via des méthodes électrochimiques, microgravimétriques, micromécaniques ou optiques, la microscopie de fluorescence étant le mode de détection le plus répandu.

Toutefois, le multiplexage de l'information sur un même support d'analyse nécessite la miniaturisation des dispositifs et implique donc de greffer des espèces de manière localisée et à de petites échelles. Or, très peu de méthodes de fonctionnalisation de surface (Chapitre II, partie III.B) permettent une immobilisation localisée et directe des espèces d'intérêts sur le support. Elles impliquent classiquement plusieurs étapes chimiques et souvent font appels à des procédés de lithographie. Ce sont autant de facteurs qui rendent la conception des biopuces délicate, complexe et longue alors qu'une grande réactivité est aujourd'hui demandée dans ces domaines d'études. Toutes les méthodes de fonctionnalisation ou de modification de surface abordées pour la fonctionnalisation du diamant seront détaillées de façon exhaustive ultérieurement dans le Chap. II.1 plus particulièrement dédié à cette problématique centrale du design des biopuces. Sur la base d'une fonctionnalisation de surface adéquate, les quelques paragraphes suivants vont, quant à eux, se focaliser sur les applications du diamant pour la fabrication de biopuces et de biocapteurs.

#### **2.a.1 Biopuces à ADN**

Yang et al. ont été les premiers à réaliser une biopuce ADN en 2002. Ils ont immobilisé deux oligonucléotides (ODN) différents (S1, S2) de manière locale en réalisant des plots millimétriques. La conception de cette biopuce nécessite trois étapes distinctes de fonctionnalisation de surface par brin d'ODN. La première étape consiste en l'immobilisation sur le diamant d'un bras espaceur portant une fonction primaire de greffage par fonctionnalisation photochimique via un alcène terminal. Cette étape implique une insolation de l'espèce à greffer sous un rayonnement UV à 233 nm pendant 12 heures sous atmosphère contrôlée, elle est suivie de 2 étapes chimiques postérieures (aboutissant au greffage du brin sonde). La mise en évidence du greffage consiste en l'hybridation des brins sondes par leurs

brins d'ODN (F1 et/ou F2) complémentaires modifiés par un fluorophore. Le greffage est alors révélé par microscopie de fluorescence (Figure I- 6).

Cette biopuce affiche une excellente sélectivité ainsi qu'une grande stabilité. En revanche elle nécessite plusieurs étapes de greffage et implique des temps d'insolations longs qui limitent un multiplexage plus large de l'information biologique introduite sur le support diamant.

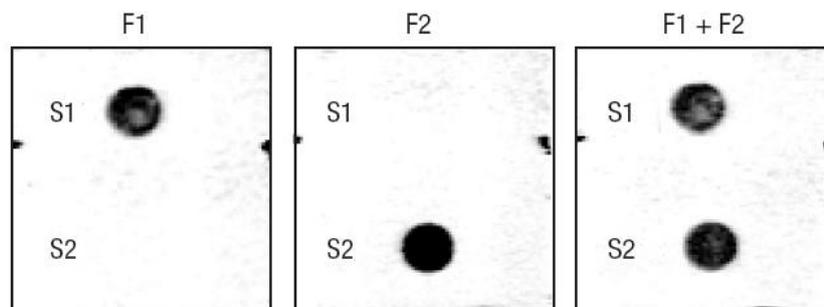


Figure I- 6 : Images de fluorescence obtenues après hybridation des brins complémentaires cibles (F1 et/ou F2) modifiés avec un fluorophore, des deux séquences d'ODN sondes immobilisées sur la surface du diamant. [69]

Zhang et al. [70], quant à eux, ont réalisé une biopuce en procédant à l'amination de surface par illumination UV dans un environnement d'ammoniac gazeux, les zones non aminées étant alors bloquées par des terminaisons fluorées via une modification de surface par plasma d'ocatfluoropropane. Il s'en suit une étape de couplage chimique entre les amines de surface, présentes sous forme de plots micrométrique, et les brins d'ADN sondes modifiés au travers de 5 étapes successives. Comme pour les travaux précédemment cités, la révélation du greffage s'effectue également par hybridation avec un brin d'ADN complémentaire modifié par un fluorophore et caractérisation par microscopie de fluorescence (Figure I- 7).

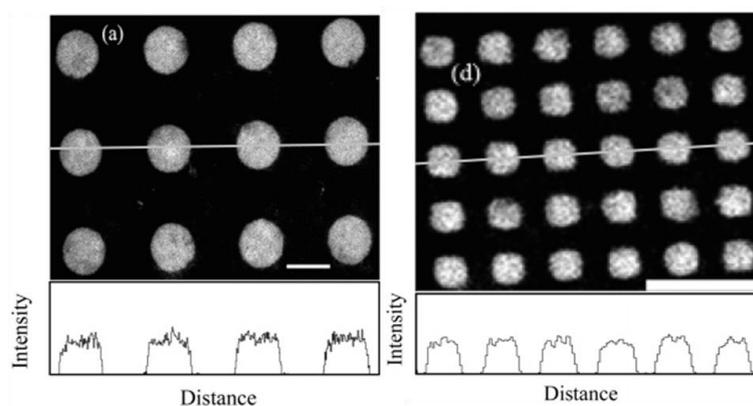


Figure I- 7 : Images de microscopie de fluorescence mettant en évidence l'hybridation du brin d'ADN cible modifié avec un fluorophore avec le brin d'ADN sonde complémentaire immobilisé sur la surface du diamant. [70]

Au regard du temps de couplage de la fonction primaire de greffage sur la surface via les méthodologies précédemment citées, la fonctionnalisation électrochimique de la surface a été développée du fait de sa capacité d'adressage et de sa rapidité (quelques cycles voltampérométriques ou l'application d'un champ de quelques secondes suffisent ici). Ainsi, Nebel et al. [71] ont mis au point une technique de micro-structuration du diamant permettant d'obtenir des zones conductrices de diamant lourdement dopé au bore de taille micrométrique, entourées de diamant intrinsèque. A la différence d'un réseau de microélectrodes, les zones conductrices sont ici toutes reliées et ont une taille de 15 $\mu$ m. Ils ont ensuite procédé au greffage des sels de diazonium par réduction électrochimique. Cependant plusieurs étapes chimiques sont encore nécessaires pour immobiliser de manière collective sur toutes les électrodes les brins d'Oligomère DésoxyriboNucléique (ODN) sondes.

Nebel et al. [72], en utilisant les mêmes échantillons de diamant microstructurés, ont pu procéder à la détection électrochimique indirecte d'ADN. Cette détection est en fait basée sur l'utilisation en solution du ferrocyanure comme sonde électrochimique Nernstienne. En comparant l'intensité des réponses obtenues en DPV (differential pulse voltametry) sur électrode nue, après immobilisation du brin d'ODN sonde et après hybridation du brin d'ODN complémentaire, il est possible de déduire la présence ou non du brin complémentaire. La limite de détection est atteinte pour une concentration en brin d'ODN sonde en solution de 10 pM. Bien que comparée à la microscopie de fluorescence, la révélation électrochimique soit plus rapide et ne nécessite pas de marqueur sur le brin cible, il ne peut y avoir avec ce type d'électrode d'études multiparamétriques du fait de l'interconnexion des réseaux d'électrodes et de la modification collective de la surface. Notons cependant que l'apport de la microstructuration des électrodes est nécessaire pour abaisser la limite de détection aux valeurs précédemment citées.

Clément Hebert de l'équipe SC2G à l'institut Néel a récemment mis au point des réseaux de microélectrodes sur diamant [travaux non publiés]. Avec ces microélectrodes, il serait possible d'envisager des détections d'ODN multiparamétriques par électrochimie. Néanmoins la fonctionnalisation de chaque électrode devrait se faire indépendamment. Avec les méthodes de fonctionnalisation actuelle, il faudrait alors envisager un temps de préparation du réseau total de microélectrode avoisinant la semaine.

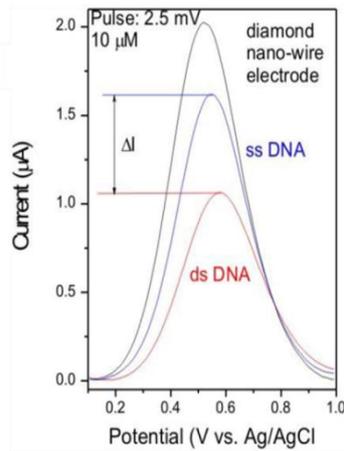


Figure I- 8 : Voltampérogrammes obtenus par Differential Pulse Voltametry (DPV, voltammétrie à impulsion différentielle) sur une électrode diamant microstructurée après greffage de l'ADN (ss DNA) et après hybridation du brin complémentaire (ds DNA). [72]

## 2.a.2 Biopuces à peptides et anticorps

Hormis l'immobilisation d'enzymes destinée à la mise en œuvre de biocapteur, il n'existe que très peu d'exemples d'immobilisation d'anticorps ou d'intégrines. Coffinier et al. [73] ont immobilisé des peptides FLAG modifiés sur diamant. La première étape consiste en une amination de surface d'un substrat diamant hydrogéné par plasma sous ammoniac. Il s'en suit une étape de couplage chimique aboutissant à l'introduction d'une fonction semicarbazide sur la surface du diamant. Le peptide FLAG est ensuite couplé chimiquement de manière locale par drop casting. La mise en évidence du greffage s'effectue par microscopie de fluorescence en introduisant l'anticorps anti-Flag marqué par un fluorophore (Figure I- 9). Les plots sont ici de l'ordre de quelques centaines de  $\mu\text{m}$ . Ils ont également mis en évidence la spécificité de la reconnaissance en immobilisant un peptide HA.

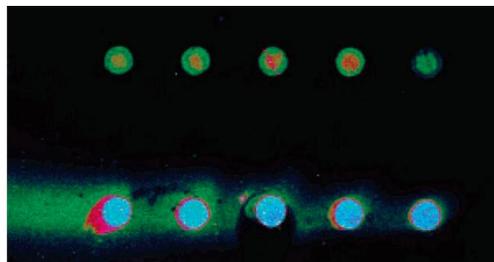


Figure I- 9 : Image en microscopie de fluorescence d'un réseau de plot du peptide FLAG greffé sur diamant après ajout de l'anticorps dirigé contre le peptide FLAG modifié par un fluorophore [74].

Hamers et al. [75] ont immobilisé l'anticorps E. Coli K12, en utilisant le greffage des alcènes par photochimie, il s'ensuit une série d'étapes chimiques permettant de coupler l'anticorps par une de ses fonctions amines disponibles (conf. Chapitre II, partie III.B.4, Figure III- 11). Ils ont caractérisé l'immobilisation de la protéine par spectroscopie infrarouge et ont déduit que la structure secondaire de l'anticorps avait été préservée pendant la fonctionnalisation.

### I.F.3. Biocapteurs enzymatiques

Un biocapteur est un outil analytique dédié à la détection d'un analyte, combinant un transducteur physicochimique et une espèce biologique. L'espèce biologique pourra être une enzyme, un anticorps, de l'ADN... Le transducteur quantifiera l'interaction entre l'analyte et l'espèce biologique en un signal optique, électrochimique, piézoélectrique...

Nous nous intéresserons ici au cas des biocapteurs enzymatiques ampérométriques. Considérons le cas bien connu de l'enzyme glucose oxydase (GOx) à titre d'exemple introductif. L'immobilisation de l'enzyme à la surface de l'électrode peut être menée de différentes façons. On peut ainsi envisager un greffage direct de l'enzyme sur le substrat diamant via un bras espaceur portant un groupement d'intérêt mais il est également possible d'encapsuler l'enzyme dans un film de polyélectrolytes cationiques tel que le PDDA du fait du point isoélectrique de la GOx au pH d'immobilisation. L'activité catalytique de l'enzyme s'exprime alors en présence de l'analyte cible, ici le glucose, mais requiert également la présence d'un co-substrat qui dans le cas de l'activité naturelle de la GOx est l'oxygène. Il existe plusieurs moyens de quantifier l'activité enzymatique de la protéine et donc la quantité d'analyte en solution. Chacune de ces méthodes a donné lieu à une génération de biocapteur différente. On trouve ainsi trois générations de biocapteurs illustrés sur la Figure I- 10:

- Les biocapteurs de première génération sont basés sur la détection directe de l'un des produits de la réaction enzymatique à l'électrode, en l'occurrence le peroxyde d'hydrogène. Ce type de biocapteur pose toutefois quelques problèmes car l'oxydation du peroxyde d'hydrogène nécessite l'application d'une surtension importante et se situe aux alentours de +0,65 V par rapport à l'ECS sur platine. Or, dans les milieux biologiques complexes tels que le sang, ils existent de nombreuses substances électroactives présentant un potentiel d'oxydation similaire voir plus faible (tels que par exemple l'acide ascorbique, l'acide urique, glutathion..) susceptibles d'interférer via la génération d'un courant « aspécifique » indépendant de la catalyse enzymatique.

- Les biocapteurs de deuxième génération permettent la détection du substrat de l'enzyme via l'utilisation d'un médiateur redox, en solution ou immobilisé, susceptible soit de connecter le centre actif de l'enzyme soit d'échanger des électrons avec le produit de la réaction enzymatique. Cette génération de biocapteur permet alors d'abaisser le potentiel de détection de l'espèce électroactive du fait d'une surtension mieux maîtrisée. On trouve une large gamme de médiateurs redox, le ferrocène étant le plus largement utilisé pour les oxydases.

Dans les deux générations précédentes, le transfert électronique entre l'électrode et l'enzyme se fait au travers d'au moins une espèce électroactive.

- Les biocapteurs de troisième génération sont basés sur un transfert électronique direct entre le centre prosthétique de l'enzyme et l'électrode. Cette génération de biocapteur comporte le premier avantage de pouvoir s'affranchir du co-facteur naturel de l'enzyme qui peut présenter, in vivo par exemple, des fluctuations sévères de concentration. Second avantage, cette connexion directe permet de s'affranchir de la présence d'un médiateur artificiel susceptible d'être nocif pour les milieux biologiques et pouvant interférer voir dégrader les espèces en solution dans les milieux biologiques complexes. Enfin, le potentiel d'oxydoréduction de la plupart des enzymes est proche de 0V. Cela permet de s'affranchir de tout problème d'interférence lors de mesures en milieux complexes. La seule limite d'utilisation de ce type de biocapteur est liée au positionnement du centre prosthétique de l'enzyme. Lorsque le centre actif de l'enzyme est profondément enfoui dans le complexe protéique, il est parfois impossible d'assurer une connexion directe avec l'électrode.

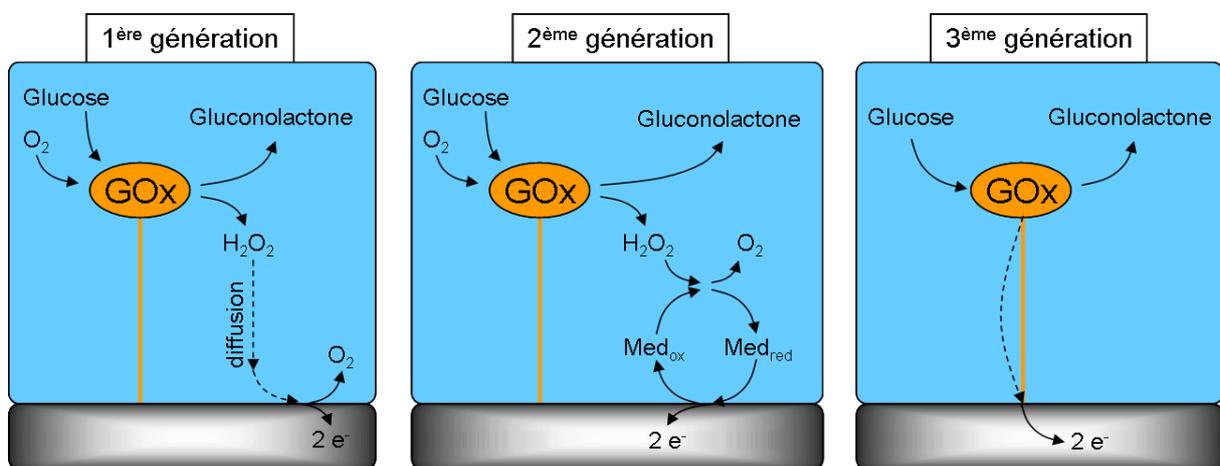


Figure I- 10 : Schéma de principe du mode de fonctionnement des biocapteurs ampérométriques enzymatiques à glucose.

Dans le cas de la GOx, la connexion électrique directe de son centre prosthétique Flavine Adénine Dinucléotide (FAD) avec l'électrode n'est pas envisageable car il est trop profondément enfoui dans la structure protéique de l'enzyme. Carlisle et al. [76] ont été les premiers à immobiliser la GOx sur diamant en procédant à la réduction électrochimique des sels de diazonium. Ils ont ainsi pu élaborer un biocapteur ampérométrique de première génération en détectant le produit de dégradation enzymatique qui est le peroxyde d'hydrogène. Les Figure I- 11.c et d montrent les voltampérogrammes caractérisant l'immobilisation de la GOx (insert) ainsi que la courbe de calibration au glucose obtenue à un potentiel de + 1,1V vs Ag/AgCl. On peut constater que cette courbe de calibration présente l'allure d'une cinétique de Michaelis-Menten (conf. Chap. II, partie III.G), la gamme dynamique du biocapteur étant comprise entre 0,5 et 5mM. Il est néanmoins important de souligner la faible réactivité des électrodes diamant vis-à-vis de l'eau oxygéné. Il faut en effet appliquer de hauts potentiels pour pouvoir oxyder cette espèce, ici de 1,1V vs Ag/AgCl, qui entraîneront à coup sur la mesure d'interférents présents dans les milieux complexes et qui, potentiellement, peuvent provoquer des dommages irréversibles.

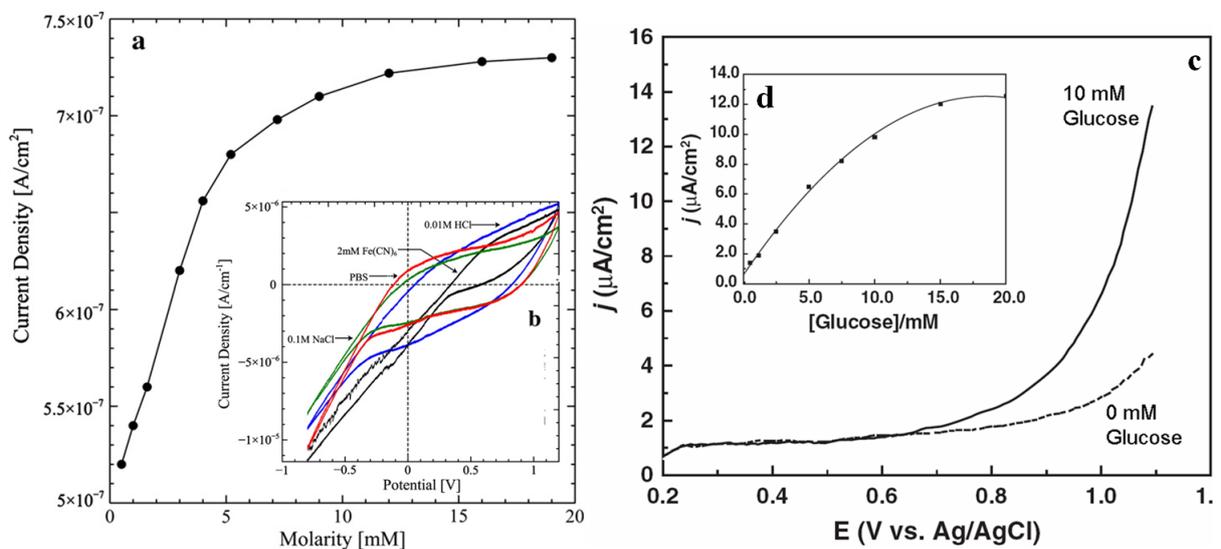


Figure I- 11 : a) Courbe de calibration du biocapteur réalisée sur un échantillon diamant dopé à l'azote sur lequel est déposé un film de PSS-GOx, b) Voltampérogrammes, réalisés à différentes vitesses de balayage, de l'échantillon diamant dopé à l'azote modifié par le film de PSS-GOx [77]. c) Voltampérogrammes d'une électrode de diamant fonctionnalisée par la glucose oxydase par voie électrochimique dans une solution de PBS saturée en oxygène et en présence ou pas de 10mM de glucose. Vitesse de balayage :  $50 \text{ mV.s}^{-1}$ , d) Courbe représentant l'évolution du courant anodique, pour une différence de potentiel de 1.1V, en fonction de la concentration en glucose [78].

Villalba et al. [77] ont récemment réalisé un biocapteur à Glucose en immobilisant la GOx dans un film de Poly(4-styrenesulfonic acid) (PSS) sur un substrat nanocristallin de diamant dopé à l'azote (NND pour Nitrogen doped Nanocrystalline Diamond). Les Figure I-11.a et b montrent les voltampérogrammes de cette électrode de diamant modifiée par la GOx immobilisée avant et après injection de glucose (une augmentation du courant d'oxydation associée à la détection du peroxyde d'hydrogène étant clairement visible à partir de 0.6 V *vs* Ag/AgCl.), ainsi que la courbe de calibration (insert) obtenue. Il faut ici noter que la détection du glucose par ampérométrie a été réalisée à un potentiel de + 0,6V *vs* Ag/AgCl. La gamme dynamique de ce biocapteur est alors de 1µM à 8 mM compatible avec la détection d'une phase d'hyperglycémie chez un patient diabétique. Dans le cas présent, contrairement au travail de Carlisle et collaborateurs, le courant catalytique mesuré n'est pas du à une monocouche d'enzyme mais à un film épais dans lequel sont encapsulées l'équivalent de multicouches enzymatiques, d'où une sensibilité accrue du dispositif. Notons toutefois les potentiels élevés requis pour la détection du peroxyde d'hydrogène qui compromettent l'utilisation de ces biocapteurs en milieux biologique réel. Olivia et al [79] ont partiellement levé cette limitation en introduisant à la surface de l'électrode de diamant des nanoparticules de platine permettant une détection du glucose à un potentiel moins anodique, 0,4 V *vs* Ag/AgCl, plus favorable à la sélectivité du biocapteur.

Garrido et al. sont les seuls à avoir mis en œuvre sur diamant des biocapteurs de troisième génération dédiés à la détection du peroxyde d'hydrogène. Pour le premier biocapteur [80], ils ont immobilisé la catalase via l'intermédiaire d'un bras espaceur introduit sur la surface par greffage photochimique de fonctions alcènes terminales. Le couplage électrochimique direct du centre héminique de la catalase a été mis en évidence par voltammétrie cyclique Figure I- 12.a. Les couples redox observés correspondent aux états d'oxydation  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$  caractéristiques du centre actif de l'enzyme. La gamme dynamique du biocapteur est comprise entre 1mM et 150 mM et il affiche une sensibilité de 70 A.mm<sup>-1</sup>.M<sup>-1</sup>.

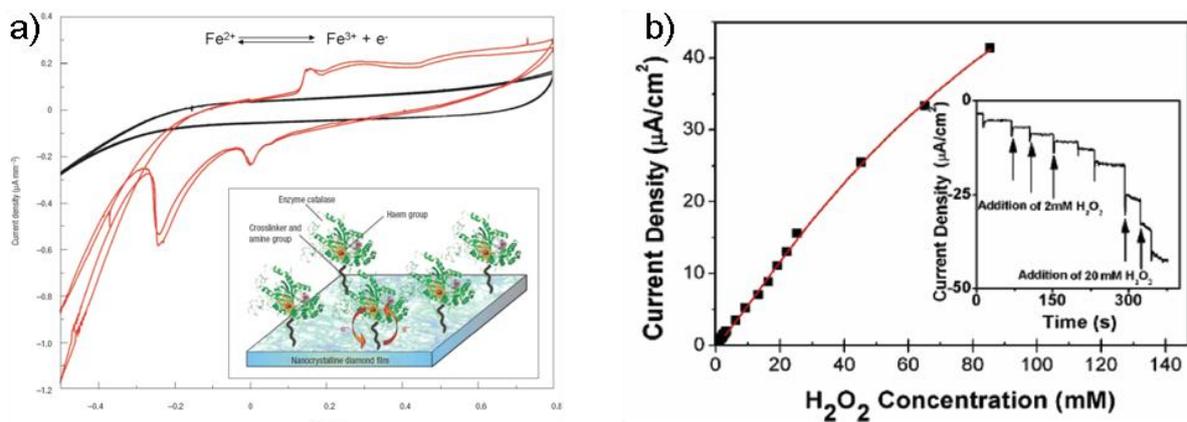


Figure I- 12 : a) Voltampérommes de l'électrode de diamant non traitée (en noir) et fonctionnalisée par la catalase (en rouge) [80]. b) Courbe de calibration du biocapteur obtenue à partir d'un échantillon diamant sur lequel la HRP est immobilisée. Chronoampéromme mettant en évidence la variation du courant cathodique en fonction de la concentration d' $H_2O_2$  [81].

Dans un deuxième article, ces mêmes auteurs ont également immobilisé la peroxydase de Raifort (HRP pour Horse Radish Peroxidase) [81]. Cette enzyme comporte elle aussi un groupement hémique suffisamment proche de l'enveloppe extérieure de la protéine pour pouvoir être connecté directement avec l'électrode diamant. On peut voir sur la Figure I- 12.b. la réponse ampérométrique du biocapteur élaboré faisant apparaître l'évolution du courant cathodique enregistré successivement à l'incrément de la concentration d' $H_2O_2$  du milieu d'analyse. A partir de ce chronoampéromme, la courbe d'étalonnage du biocapteur a été tracée. Elle affiche une allure typique d'une cinétique enzymatique pseudo Michaelienne. La gamme dynamique de ce biocapteur s'étend de 0,1 à 45 mM. Ce groupe a également immobilisé la HRP sur diamant oxydé via une silanisation [82], obtenant une gamme dynamique fortement réduite. Cela illustre l'influence de la méthode de fonctionnalisation choisie, ainsi que celle l'état de surface du diamant, sur ses propriétés électrochimiques.

#### I.F.4. Les transistors à effets de champ

Les transistors à effet de champ ou Field Effect Transistor (FET) sont des transistors basés sur l'utilisation d'un champ électrique permettant de contrôler la conductivité d'un canal semi-conducteur compris entre deux électrodes (la source et le drain) et recouvert d'une fine couche isolante. Il existe une grande variété de FETs, la plus connue étant le MOSFET (Metal Oxide Semiconductor FET). Les technologies développées sur silicium ont été adaptées sur diamant, elles ont permis le design des premiers metal–semiconductor field FET

(MESFET) en 1996 [83] et les premiers metal–insulator–semiconductor FET (MISFET) en 1998 [84]. Tout les FET réalisés sur diamant sont basés sur les propriétés de surface du diamant intrinsèque hydrogéné, ces propriétés seront développées dans le chapitre III. C’est à partir de ces caractéristiques que les SGFET (Solution Gate FET) ont pu être mis au point. Dans ce type de transistor (Figure I- 13.a) l’électrolyte est directement en contact avec la surface d’un film de diamant intrinsèque hydrogéné. La surface du diamant relie les deux électrodes (drain et source) et constitue le canal, alors que la solution aqueuse dans laquelle on trouve une électrode de référence représente la grille. C’est en 2001 que l’équipe de Kawarada [85] a mis au point ce nouveau type de transistor. En oxydant partiellement la surface du diamant intrinsèque hydrogéné, il est alors possible d’élaborer des capteurs pH-métriques capables de mesurer le pH de la solution d’analyse au travers d’une modulation de la conductivité de surface du diamant [86]. Plus particulièrement, c’est à travers la protonation ( $C-OH^{2+}$ ) et la déprotonation ( $C-O^-$ ) des fonctions hydroxyles de surface que la conductivité de surface du canal sera modifiée (Figure I- 13.b) de manière affine et linéaire avec le pH.

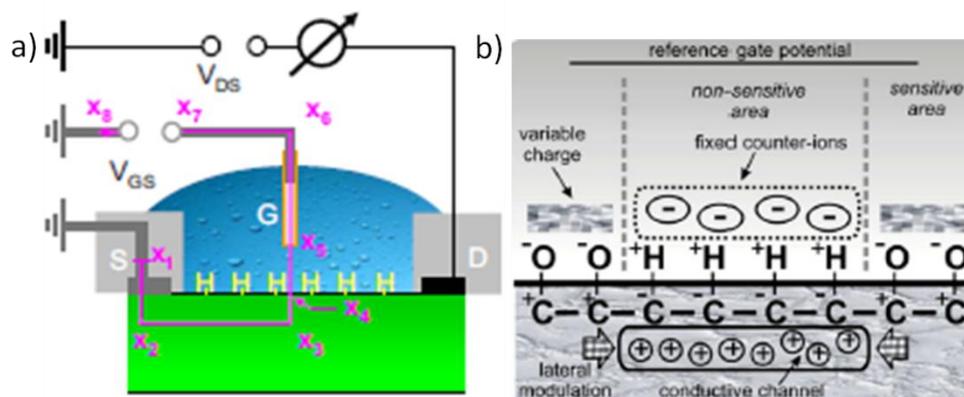


Figure I- 13 :a) Représentation schématique du montage électrique mise en place lors des expérimentations SGFET [87]. b) Représentation schématique d’une surface de diamant partiellement oxydé qui met en évidence les phénomènes de variation de charges locales induisant une modification de la conductivité de surface du diamant [86].

Il est également possible d’étendre le champ d’application de ces capteurs de pH afin de réaliser des biocapteurs enzymatiques (EMFET pour Enzymes Modified FET). L’équipe de kawarada [88] a mis au point le premier EMFET en 2004. Pour ce faire, elle a tout d’abord procédé à une amination primaire partielle de la surface suivie de l’immobilisation de la glucose oxydase ou de l’uréase sur ces groupements précurseurs (Figure I- 14.a). Préalablement à l’introduction des enzymes, les fonctions hydrogénées restantes ont été oxydées afin d’induire une sensibilité de la surface du diamant aux variations locales de pH.

Ainsi, lorsque le glucose ou l'urée sont introduits en solution, ils sont dégradés par leur enzyme respective, cette réaction générant respectivement des ions hydroniums ou ammoniums. La génération localisée de ces ions va ainsi induire une variation locale du pH et de manière concomitante un changement d'état des différents groupes de surface précédemment introduits ( $\text{C-OH}^{2+}/\text{C-O}^-$ ,  $\text{C-NH}_2/\text{C-NH}_3^+$ ) (Figure I- 14.b). Ces différentes modifications en cascade vont se traduire par une déplétion locale de charge en sub-surface, faisant ainsi varier la conductivité du canal. La gamme de concentration en substrat pour laquelle le courant drain-source diminue de façon linéaire est comprise entre 0,1 et 10 mmol/l pour le capteur à glucose et entre 1  $\mu\text{mol/l}$  et 10 mmol/l pour le capteur à urée. Les biocapteurs ainsi fabriqués présentent respectivement des sensibilités de 10mV/décade et de 30mv/décade.

Garrido et al. [89] ont quant à eux réalisé des EMFET sensibles à l'acétylcholine et la pénicilline en immobilisant l'acétylcholine estérase par différentes voies de fonctionnalisations et sur des terminaisons de surface différentes. Ils ont ainsi dressé un tableau complet des différentes sensibilités obtenues en fonction des voies de fonctionnalisation et des facteurs expérimentaux.

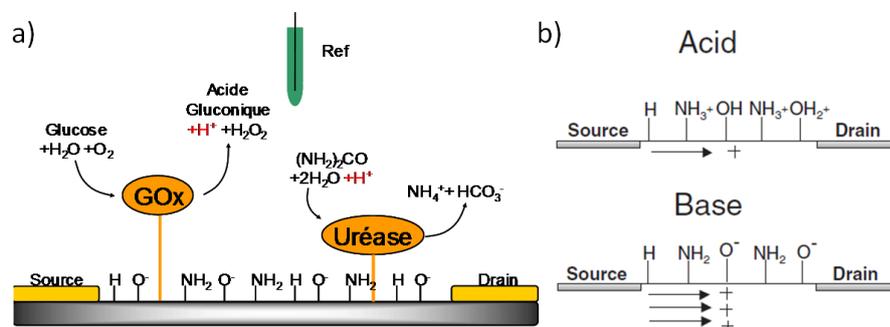


Figure I- 14 : a) Représentation schématique d'un SGFET modifié avec la glucose oxydase et l'uréase, b) Représentation schématique de l'effet de la variation du pH sur les différents groupements présents sur la surface du diamant.[88]

Enfin, des capteurs à ADN, utilisant des SGFET en diamant comme transducteur, ont également été mis au point [90-92]. Ces dispositifs nécessitent l'immobilisation préalable d'un brin d'ADN sonde sur des surfaces partiellement oxydées. Lorsque les brins complémentaires cibles s'hybrident avec leurs sondes respectives, les variations de charge et de pH induites par les groupements Phosphate au voisinage de la surface modifient ainsi la densité de porteurs en sub-surface du matériau et donc la conductivité du canal. Il est alors crucial que la distance entre les brins d'ADN sondes et le matériau soit plus petite que la

longueur de Debye pour éviter un écrantage par les contre-ions de la solution d'analyse. Dans ces conditions, les transistors ainsi élaborés affichent de très bons seuils de détection de l'ordre du picomolaire.

Nous avons donc vu que les SGFET sur diamant offrent une très bonne sensibilité, ainsi que de nombreuses perspectives en termes d'applications potentielles. Leur conception nécessite tout de même des étapes de lithographie et leur mécanisme de transduction n'est basé que sur des modifications de charges importantes ou des changements de pH.

## I.G. Interface Cellule-Biocapteur

Le caractère biocompatible du Diamant a été mis en évidence à travers différentes études. Le terme biocompatible reflète la propension d'un matériau à ne pas induire de modifications ou de perturbations notables d'espèces biologiques lors de sa mise en contact avec ces dernières. L'intérêt de ces biomatériaux réside dans la conception de dispositifs implantables dédiés au traitement ou à l'étude de pathologies nécessitant la mise en contact directe avec les régions anatomiques concernées. Le type d'application ciblée étant variable, les études de biocompatibilité visent à soumettre le matériau à des milieux physiologiques différents et évaluer l'impact du diamant sur ces différents milieux. On trouve différents types d'implants :

Les prothèses en contact avec le sang, avec par exemple les prothèses endocoronariennes ou vasculaires. Ce type de prothèse ne doit pas engendrer de phénomène de coagulation. Les matériaux utilisés actuellement pour ce type d'application sont le PTFE, le polyuréthane ou encore certains aciers. Le sang permet la diffusion du dioxygène, d'éléments nutritifs, de déchets azotés aux travers de tous les tissus du corps. On y trouve également des hormones et les molécules du système immunitaire. Cela fait du sang un milieu complexe transportant une multitude d'espèces. Les études de biocompatibilité visent à évaluer l'adhésion de globules blancs, de fibrinogènes, de plaquettes sur le matériau. Tang et al. ont testé *in vitro* et *in vivo*, l'adhésion de fibrinogènes et de macrophages par contact direct avec le sang. Le fibrinogène et les plaquettes sont impliqués dans le processus de coagulation sanguine et les macrophages dans les phénomènes de rejets. Dans les deux cas, par comparaison avec des matériaux biocompatibles (platine) ou non biocompatible (acier), ils ont constaté une très faible adsorption des macrophages et des fibrinogènes. Okroj et al. [93] ont évalué *in vitro* l'adhésion des plaquettes de sang humain. En effet plaquettes et

fibrinogènes sont impliqués conjointement dans le processus de coagulation. Ils ont comparé l'adsorption des plaquettes sur platine et sur diamant, ils ont constaté une adsorption très faible et comparable dans les deux cas. Ces deux études montrent que les risques de rejets liés à l'adhésion des macrophages, ainsi que les risques de thromboses dus aux fibrinogènes et plaquettes sont fortement réduits sur diamant. On peut donc considérer le diamant comme hémocompatible.

Les prothèses de la hanche et du genou doivent posséder de bonnes propriétés mécaniques car elles doivent permettre le transfert de la contrainte mécanique. Soumises à des forces de frottement importantes, ces prothèses doivent également avoir de bonnes qualités tribologiques. Il faut bien sûr qu'elles ne provoquent aucune réaction inflammatoire ou allergique. Lorsque l'on souhaite que des cellules se développent sur un substrat, il existe des paramètres communs à tous les types de substrat. Le caractère hydrophile/hydrophobe du matériau est un paramètre crucial pour l'adhésion des cellules sur ce dernier. Le diamant peut être hydrogéné ou oxydé et donc hydrophile ou hydrophobe. Il existe différentes techniques d'oxydation conduisant à des groupements de surface différents, cette partie est traitée dans la partie III.B du Chapitre II. Kalbacova et al. [94, 95] ont montré que les Ostéoblastes et fibroblastes adhèrent mieux aux substrats ayant une surface hydrophile et n'adhèrent pas sur les échantillons en diamant hydrogéné. Toutefois il semblerait que le caractère hydrophile ou hydrophobe ne soit pas suffisant pour expliquer l'adhésion cellulaire. Arima et al. [96] ont montré que selon le type de groupement de surface, l'adhésion cellulaire est différente. Il est également possible de fonctionnaliser la surface, pour contrer tout problème lié à l'évolution naturelle de l'état de surface du diamant. Il est possible de diminuer l'adhésion des cellules en fonctionnalisant la surface ou une partie de la surface avec des groupements Polyéthylène glycol (PEG) [97, 98]. Inversement, il est possible de promouvoir l'adhésion cellulaire en fonctionnalisant la surface avec de la laminine ou de la poly-lysine. L'état de surface du matériau n'est pas le seul facteur influant sur l'adhésion cellulaire. Kalbacova et al. [95] ainsi que Chong et al. [98] ont également mis en évidence l'influence de la rugosité du substrat. Les faibles rugosités permettent une meilleure adhésion des cellules, les NCD (Nanocrystalline Diamond) et UNCD (Ultra Nanocrystalline Diamond) sont de meilleurs candidats que les  $\mu$ CD (microcrystalline Diamond) et les diamants monocristallins. C. Agnès [7] a également confirmé ces résultats et a montré que la force d'adhésion cellulaire augmente quand la rugosité du substrat diminue. Il faut voir que derrière l'aspect de rugosité se trouve également la notion de taille de grain qui varie entre les différents types de diamant précédemment cités. Lorsque le nombre de grains augmente, cela crée autant de points

d'attaches supplémentaires pour la cellule augmentant en parallèle sa force d'adhésion. Les principales prothèses utilisées dans le domaine médical sont en titane, ou alliage de titane. De nombreux développements visent par ailleurs à recouvrir ces implants métalliques par des films biocompatibles favorisant la reprise des tissus biologiques comme les hydroxyapatites. Le diamant nanocristallin pourrait être utilisé à ces fins particulières.

Les électrodes utilisées pour la conception de biocapteur nécessitent l'immobilisation d'enzyme sur leurs surfaces, qui ne doivent pas être altérées par le contact avec le substrat. Dans la partie IV du Chapitre III, nous étudierons l'immobilisation d'enzyme et déterminerons si leur activité biologique est conservée après immobilisation. Pour l'étude fondamentale des neurones et de leurs interconnexions, il faut d'abord que les neurones puissent adhérer et croître sur le matériau, mais il est aussi intéressant d'organiser *in vitro* la croissance de ces neurones en réseaux pour des applications plus fondamentales visant à comprendre le fonctionnement de ces derniers. On trouve actuellement des électrodes de ce type en Platine ou en oxyde d'iridium. Cependant les cellules nerveuses sont extrêmement sensibles à leur environnement, et leur culture est délicate. Contrairement aux préostéoblastes et aux fibroblastes, les neurones adhèrent très peu, même sur des substrats hydrophiles. Il est donc nécessaire de déposer des molécules améliorant l'adhésion cellulaire. Cette étape permet également de déposer ces molécules de manière organisée et ainsi de créer des réseaux de croissance dirigés pour les neurones. Specht et al. [99] ont déposé localement par adsorption à l'aide d'un tampon PDMS de la laminine sur diamant monocristallin. Après une culture de neurones, ils ont observés que ceux-ci avait cru sur le réseau en laminine préalablement déposé. Il est également possible de déposer des polypeptides tels que la poly-lysine ou poly-ornithine. Ariano et al. ont [100] également mis en évidence la conservation de l'activité synaptique des neurones après leurs immobilisation. Concernant les électrodes implantables, elles ne doivent pas perturber leur environnement, permettre l'adhésion des neurones et ainsi assurer un contact intime entre le matériau et le tissu. De plus ces électrodes ne doivent pas voir leur activité électrique diminuer avec le temps. Ce qui renforce l'intérêt du diamant pour les applications biomédicales du fait de sa grande résistance à la corrosion en milieu agressif.

Toutes les études précédentes mettent en évidence le caractère biocompatible du diamant. Cependant, l'utilisation du diamant comme matériau d'électrode pour l'étude des neurones requiert des substrats lourdement dopés au bore. Or, toutes ces études ont été effectuées sur des diamants intrinsèques et ne prennent pas en compte la possible toxicité du bore présent à forte concentration dans les électrodes diamant. C. Agnés [7] a mené une étude sur tous types de diamant (monocristallin,  $\mu$ CD, NCD) lourdement dopés au bore ou

intrinsèques, pour évaluer l'impact du dopant sur la biocompatibilité du diamant. Il a pu ainsi mettre en évidence l'absence d'effet notable du bore sur la biocompatibilité des couches diamant lourdement dopées vis-à-vis de l'adhésion et de la croissance cellulaire de fibroblastes et de préostéoblastes. D'autres expériences menées conjointement par les équipes du LIST-LCD et de l'institut de la vision ont pu montrer l'innocuité du diamant pour les cultures neuronales.

Afin de diriger l'adhésion et la culture de cellules telles que les neurones, il est possible de localiser ces cellules via des protéines impliquées dans les phénomènes de reconnaissance ou d'adhésion cellulaire, telle que des immunoglobulines ou des intégrines. Dans la partie I.F.2.a du chapitre II, nous montrerons que postérieurement à leur immobilisation, ces protéines conservent leurs activités de reconnaissance et peuvent alors être utilisées pour capturer localement des neurones sur substrat diamant afin d'étudier des réseaux artificiels.

Enfin, en vue d'applications implantables, le caractère biocompatible du diamant est un pré requis nécessaire afin d'envisager son utilisation comme matériau d'électrode. Ainsi dans le cadre des applications liées au nouveau matériau composite diamant-Nanotube de carbone abordées au Chapitre V, la biocompatibilité du film de diamant support devra être avérée.

[1] J.S. Foord, R.G. Compton, F. Marken, *Electroanalysis*, **2003**. 15, (17).

- [2] D. Fournier, K. Plamann, E. Anger, A. Gicquel, *Diamond and Related Materials*, **1994**. 3, (4-6), 752-756.
- [3] G.M. Swain, *Journal of the electrochemical society*, **1994**. 141, (12), 3382-3393.
- [4] A. Brambilla, P. Bergonzo, D. Tromson, C. Mer, B. Guizard, F. Foulon, V. Amosov, *Diamond and Related Materials*, **2001**. 10, 631-638.
- [5] K.C. Hass, H. Holloway, M.A. Tamor, T.R. Anthony, W.F. Banholzer *Physical Review B*, **1991**. 44, (13), 7123-7126.
- [6] I Christian, G. Spechta, Oliver A. Williamsb, Richard B. Jackmanb\*, Ralf Schoepfera\*, *Biomaterials*, **2004**. 25 4073–4078.
- [7] C. Agnes, *Thèse de doctorat*, **2009**. Université Joseph fourier, Grenoble.
- [8] V. Baranauskas, A. A. Rodrigues\*, H. J. Ceragioli, A. C. Peterlevitz, W. D. Belangero *Diamond & Related Materials*, **2010**. 19, 1300–1306.
- [9] R.S. Sussmann, S.E. Coe\*, *Diamond and Related Materials*, **2000**. 9, 1726-1729.
- [10] A.M. Zaitsev, "*Optical Properties of Diamond*", **2001**. Ed. Springer.
- [11] (Ed.) J.E. Field, "*The properties of Natural and synthetic Diamond*", **1992**. Academic Press.
- [12] Scarratt K., Fritsch E., Collins A.T., *MRS International Conference Proceeding*, **1991**. MRS Pittsburgh 671-676.
- [13] M.L. Hartsell, B.A. Fox, D.M. Malta, H.A. Wynands, C.T. Kao, L.S. Piano, G.J. Tessmer, R.B. Henard, J.S. Holmes, A.J. Tessmer, D.L. Dreifus, *Diamond and Related Materials*, **1995**. 4, 612-627.
- [14] Julien Pernot, Pierre-Nicolas Volpe, Pierre Muret and Franck Omnès, *Applied Physics Letters*, **2009**. 94.
- [15] P.N. Volpe, *Thèse de doctorat*, **2009**. Université Joseph Fourier, Grenoble.
- [16] A.Y. Sakharova, Y.V. Pleskov, L.L. Bouilov and B.V. Spitsyn and M.D. Krotova, *J. Electroanal. Chem.*, **1987**. 228, 19-27.
- [17] H. Naruki, K. Okano, NARUKI, Y. Akiba, AKIBA, T. Kurosu, M.Iida, Y. Hirose, T. Nakamura, *Japanese Journal of Applied Physics*, **1989**. 28, (6), 1066-1071.
- [18] Y. Einaga, A. Fujishima, T.N. Rao, D.A. Tryk, *Diamond Electrochemistry*, **2005**. Chap. 25, 556-574.
- [19] Jorge Rubio-Retama\*, Jorge Hernando, Beatriz Lopez-Ruiz, Andreas Hartl, Doris Steinmuller, Martin Stutzmann, Enrique Lopez-Cabarcos, and Jose Antonio Garrido, *Langmuir* , **2006**. 22, 5837-5842.
- [20] B. Rezek, C.E. Nebel, D. Shin, H. Uetsuka, N. Yang, *Journal of Physics D-Applied Physics*, **2007**. 40, (20), 6443-6466.
- [21] Eric Vieil\*, Elodie Fortin, Pascal Mailley, Sabine Szunerits, and Thierry Livache, *Anal. Chem.*, **2007**. 79, 3741-3746.
- [22] N.A. Ndao, C.Levy-Clement\*, A.Katty, M.Bernar, A.Deneuville, C.Comninellis, A.Fujishima, *Diamond and Related Materials*, **2003**. 12 606–612.
- [23] Enric Brillas\*, Birame Boye, Beatrice Marselli, Pierre-Alain Michaud, Christos Comninellis, Giuseppe Farnia, Giancarlo Sandona, *Electrochimica Acta*, **2006**. 51, 2872–2880.
- [24] P.A. Michaud, J. Iniesta, M. Panizza, G. Cerisola, A. Aldaz, Ch. Comninellis\*, *Electrochimica Acta*, **2001**. 46, 3573–3578.
- [25] Q.Y. Chen, J.S. Xu, G.M. Swain, *Analytical Chemistry*, **1998** 70, (15), 3146-3154.
- [26] D.A. Tryk, T. Yano, K. Hashimoto, A. Fujishima, *Journal of the electrochemical society*, **1998**. 145, (6), 1870-1876.
- [27] Malgorzata Witek, Michael C. Granger, Jishou Xu, Jian Wang, Mateusz Hupert, Amy Hanks, Miles D. Koppang, James E. Butler, Guy Lucazeau, Michel Mermoux, Jerzy W. Strojek and Greg M. Swain\*, *Anal. Chem.*, **2000**. 72, 3793-3804.

- [28] A.B. Anderson, G.M. Swain, J.C. Angus, *MRS Bulletin*, **1998**. 23, (9), 56-60.
- [29] T. Tatsuma, H. Notsu, A. Fujishima, *Eslevier*, **2005**. Chapitre 10, 218-237.
- [30] Sergio Ferro and Achille De Battisti\*, *J. Phys. Chem. B*, **2003**. 107, 7567-7573.
- [31] F. Zenia, C. Levy-Clement, N.A. Ndao, A. Deneuve, *New diamond and frontier carbon technology*, **1999**. 9, (3), 189-206.
- [32] Y. Einaga, T. Kondo, B.V. Sarada, T.N. Rao, D.A. Tryk, A. Fujishima, *Journal of the electrochemical society*, **2002**. 149, (6), 179-184.
- [33] Y.E. Evstefeeva, Y.V. Pleskov, M.D. Krotova, V.V. Elkin, V.M. Mazin, V.Y. Mishuk, V.P. Varnin, I.G. Teremetskaya, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1998**. 455, (1-2), 139-146.
- [34] K. Tsunozaki, D.A. Tryk\*, Tata N. Rao, A. Fujishima, *Diamond and Related Materials*, **2001**. 10, 1804-1809.
- [35] E. Vanhove, *Thèse de doctorat*, **2010**. Université Joseph Fourier Grenoble.
- [36] M. Yoshimura, K. Honda, R. Uchikado, T. Kondo, Tata N. Rao, D.A. Tryk a, A. Fujishima\*, M. Watanabe, K. Yasui, H. Masuda, *Electrochimica Acta*, **2002**. 47, 4373-4385.
- [37] M.F. Rose, R. Ramesham\*, *Diamond and Related Materials*, **1997**. 6, 17-27.
- [38] J. de Sanoit, E. Vanhove, J.C. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Nesladek, *Physica Status Solidi A-Applications and Materials Science*, **2007**. 204 (9), 2931-2939.
- [39] J. Chane-Tune, E. Fortin, D. Delabouglise, P. Bouvier, T. Livache, P. Mailley, B. Marcus, M. Mermoux, J.P. Petit, S. Szunerits, E. Vieil, *Electroanalysis*, **2005**. 17, (5-6), 517-526.
- [40] Bernadette Marcus, Didier Delabouglisse, Michel Mermoux, Pierre Bouvier, Jerome Chane-Tune, Jean-Pierre Petit, Pascal Mailley, Thierry Livache, *ChemComm*, **2003**. 2698-2699.
- [41] Jérôme Chane-Tune, Elodie Fortin, Pascal Mailley\*, Sabine Szunerits, Bernadette Marcus, Jean-Pierre Petit, Michel Mermoux, Eric Vieil, *Bioelectrochemistry*, **2004**. 63, 303– 306.
- [42] H.T. Hall, F.P. Bundy, H.M. Strong, R.H. Wentorf, *Nature*, **1955**. 176, (4471), 51-55.
- [43] W. A. Bassett, F. P. Bundy, M. S. Weathers, R. J. Hemley, H. K. Mao and A. F. Goncharov, *Carbon*, **1996**. 34, (2), 141-153.
- [44] F.P. Bundy, *Journal of Geophysical Research*, **1980**. 85, (NB12), 6930-6936.
- [45] C. Baron, *thèse de doctorat*, **2005**. Université Joseph Fourier, Grenoble.
- [46] X. Jiang and C.P. Klages, *Diamond and Related Materials*, **1993** 2, (5-7), 1112-1113.
- [47] Olivier Douhéret, Oliver A. Williams\*, Michael Daenen, Ken Haenen, Eiji Osawa, Makoto Takahashi, *Chemical Physics Letters*, **2007**. 445, 255–258.
- [48] E. Gheeraert, *Thèse de doctorat*, **1992**. Université Joseph Fourier, Grenoble.
- [49] Y. Sato, M. Kano, S. Matsumoto and N. Setaka, *Journal of Crystal Growth*, **1983**. 62, 642-644.
- [50] P. Guedon, T. Livache\*, C. Brakha, A. Roget, Y. Levy and G. Bidan, *Synthetic Metals*, **2001**. 2001, 1443-1444.
- [51] Elizabeth McGaw, Prerna Sonthalia, Yoshiyuki Show, Greg M. Swain\*, *Analytica Chimica Acta*, **2004**. 522, 35–44.
- [52] Barbara Baur, Andreas Hartl, Martin Stutzmann, and Jose A. Garrido\*, *Langmuir*, **2008**. 24, 9898-9906.
- [53] C. Agnes, A. Bongrain, L. Rousseau, E. Scorsone, J.C. Arnault, S. Ruffinatto, F. Omnes, P. Mailley, G. Lissorgues, P. Bergonzo, *Langmuir*, **2011**. 27, (19), 12226-12234.

- [54] M.E. Hyde, C.M. Welch, C.E. Banks, R.G. Compton, *Analytical Sciences*, **2005**. 21, (12), 1421-1430.
- [55] Jishou Xu, Michael C. Granger, Jerzy W. Strojek<sup>1</sup>, Greg M. Swain\*, *Analytica Chimica Acta*, **1999**. 397, 145–161.
- [56] Werner Haenni, Christophe Provent, Eduardo Santoli, Philippe Rychen\*, *Electrochimica Acta*, **2004**. 49, 3737–3744.
- [57] Richard Wiltshire, Arnab Chatterjee, Katherine B. Holt, Richard G. Compton, John S. Foord\*, Frank Marken, *Diamond and Related Materials*, **2002**. 11, 646–650.
- [58] K. Eaton, J.S. Foord, W. Hao, A. Crossley, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **2005**. 7, (14), 2787-2792.
- [59] S.A.S. Machado, L. Codognoto, L.A. Avaca\*, *Diamond and Related Materials*, **2002**. 11, 1670–1675.
- [60] T.N. Rao, B.V. Sarada, D.A. Tryk, A. Fujishima, *Analytical Chemistry*, **2000**. 72, (7), 1632-1638.
- [61] M. Witek, M.D. Koppang, J. Blau, G.M. Swain, *Analytical Chemistry*, **1999**. 71, (6).
- [62] B.V. Sarada, N. Spataru, D.A. Tryk, A. Fujishima, *Electroanalysis*, **2002**. 14, (11), 721-728.
- [63] Vincenzo Caprio, Roberto Andreozzi\*, Amedeo Insola, Raffaele Marotta, *Catalysis Today*, **1999**. 53, 51–59.
- [64] J. Farrell, J.K Wang, *Environmental Science & Technology*, **2004**. 38, (19), 5232-5237.
- [65] J. Garcia-Gomez, P. Canizares, C. Saez, M.A. Rodrigo, *Journal of applied electrochemistry*, **2003**. 33, (10), 917-927.
- [66] Manuela Stadelmann, Alexander Kraft\*, Manfred Blaschke, *Journal of Hazardous Materials*, **2003**. B103, 247–261.
- [67] M. Diaz, P. Canizares, J.A. Dominguez, J. Lobato, M.A. Rodrigo, *Journal of chemical technology and biotechnology*, **2005**. 80, (5), 565-573.
- [68] P. Rychen, T. Furuta, H. Tanaka, L. Pupunat, W. Haenni, Y. Nishiki, *Diamond electrochemistry*, **2005**. Chapitre 23, (Elsevier), 525-542.
- [69] O. Aucellio, W. Yang, J. E. Butler, W. Cai, J. A. Carlisle, J. E. Gerbi, D. M. Gruen, T. Knickerbocker, T. L. Lasseter, J. N. Russell, L. M. Smith AND R. J. Hamers\*, *Nature Materials*, **2002**. 1, 253–257.
- [70] K.S. Song\*, G.J. Zhang\*, Y. Nakamura, T. Ueno, T. Funatsu, I. Ohdomari and H. Kawarada, *Langmuir*, **2006**. 22, 3728-3734.
- [71] Hiroshi Uetsuka\*, Nianjun Yang, Eiji Osawa, and Christoph E. Nebel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**. 47, 5183 –5185.
- [72] N. Yang, C.E. Nebel\*, H. Uetsuka, E. Osawa, N. Tokuda, O. Williams, *Diamond & Related Materials*, **2009**. 18, 910–917.
- [73] Sabine Szunerits, Yannick Coffinier, Charafeddine Jama, Remi Desmet, Oleg Melnyk, Bernadette Marcus, Leon Gengembre, Edmond Payen, Didier Delabouglise and Rabah Boukherroub\*, *Langmuir*, **2007**. 23, 4494-4497.
- [74] S. Szunerits, Y. Coffinier, C. Jama, R. Desmet, O. Melnyk, B. Marcus, L. Gengembre, E. Payen, D. Delabouglise and R. Boukherroub\*, *Langmuir*, **2007**. 23, 4494-4497.
- [75] C. Stavis, R. J. Hamers\*, A. Pokhrel, R. Franking, R. E. Ruther, X. Wang, M. C. Cooperrider, H. Zheng, J. A. Carlisle, J. E. Butler, *Diamond & Related Materials*, **2011**. 20 733–742.
- [76] J. A. Carlisle, J. Wang\*, *Diamond & Related Materials*, **2006**. 15, 279 – 284.
- [77] M. K. Ram\*, P. Villalba, H. Gomez, A. Kumar, V. Bhethanabotla, A. Kumar, *Materials Science and Engineering C*, **2011**. 31, 1115–1120.

- [78] Munenori Degawa, Kwang-Soup Song, Yusuke Nakamura, Hirofumi Kanazawa, Hitoshi Umezawa and Hiroshi Kawarada, *Japanese Journal of Applied Physics*, **2004**. 43, (6B), 814–817.
- [79] B.V. Sarada, H. Olivia, K. Honda, A. Fujishima\*, *Electrochimica Acta* **2004**. 49, 2069–2076.
- [80] E. Schmich, A. Hartl, J. A. Garrido\*, J. Hernando, S.C.R. Catharino, S. Walter, P. Feulner, A. Kromka, D. Steinmuller and M.Stutzmann, *Nature Materials*, **2004**. 3, 736-742.
- [81] J. Hernando, J. Rubio-Retama\*, B. Lopez-Ruiz, A. Hartl, D. Steinmuller, M. Stutzmann, E. Lopez-Cabarcos, J. A. Garrido, *Langmuir*, **2006**. 22, 5837-5842.
- [82] Jorge Hernando, Tahmineh Pourrostami, Jose A. Garrido, Oliver A. Williams, Dieter M. Gruen, Alexander Kromka, Doris Steinmüller, Martin Stutzmann, *Diamond & Related Materials*, **2007**. 16, 138–143.
- [83] Hiroshi Kawarada, *Surface Science Reports*, **1996**. 26, 205-259.
- [84] T. Maki, Y. Yun, H. Tanaka, Y. Shirakawa, T. Kobayashi, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1998**. 37, 1293-1296.
- [85] H. Kawarada, Y. Araki, T. Sakai, T. Ogawa, and H. Umezawa, *phys. stat. sol.*, **2001**. 185, (1), 79–83.
- [86] A. Härtl, J. A. Garrido\*, S. Kuch, M. Stutzmann, O. A. Williams and R. B. Jackmann, *Applied Physics Letters*, **2005**. 86, 073504.
- [87] W. Zhang and L. Ley J. Ristein, *Physical Review E*, **2008**. 78.
- [88] M. Degawa, K.S. Song, Y. Nakamura, H. Kanazawa, H. Umezawa and H. Kawarada, *Japanese Journal of Applied Physics*, **2004**. 43, (6B), 814–817.
- [89] B. Baur, A. Hartl, M. Stutzmann, and J.A. Garrido\*, *Langmuir* **2008**. 24, 9898-9906.
- [90] G.J. Zhang, K.S. Song\*, Y. Nakamura, K. Furukawa, T. Hiraki, J.H. Yang, T. Funatsu, I. Ohdomari and H. Kawarada, *Physical Review E*, **2006**. 74.
- [91] J.H. Yang, S. Kuga, H. Takahashi, K. Hirama, T. Iwasaki and H. Kawarada\*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**. 130, 13251–13263.
- [92] S.E. Baker, B. Sun, J.E. Butler, H. Kim, J. N. Russell, L. Shang, K.Y. Tse, W. Yang, R.J. Hamers\*, *Diamond & Related Materials*, **2007**. 16, 1608–1615.
- [93] M. Kamińska, W. Okrój\*, L. Klimek, W. Szymański, B. Walkowiak, *Diamond & Related Materials*, **2006**. 15, 1535–1539.
- [94] M. Kalbac, M. Kalbacova, L. Dunsch, A. Kromka, M. Vanecek, B. Rezek, U. Hempel, S. Kmoch, *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics*, **2007**. 244, (11), 4356-4359.
- [95] L. Michalikova, M. Kalbacova, V. Baresova, A. Kromka, B. Rezek, S. Kmoch, *Physica Status Solidi B-Basic Solid State Physics*, **2008**. 245, (10), 2124-2127
- [96] H. Iwata, Y. Arima, *Journal Of Materials Chemistry*, **2007**. 17, (38), 4079-4087.
- [97] M.W. Albers, G.P. Lopez, S.L. Schreiber, R. Carroll, E. Peralta, G.M. Whitesides, *Journal Of The American Chemical Society*, **1993**. 115, (13), 5877-5878
- [98] K.P. Loh, K.F. Chong, S.R.K. Vedula, C.T. Lim, H. Sternschulte, D. Steinmuller, F.S. Sheu, Y.L. Zhong, *Langmuir*, **2007**. 23, (10), 5615-5621.
- [99] O.A. Williams, C.G. Specht, R.B. Jackman\*, R. Schoepfer\*, *Biomaterials*, **2004**. 25 4073–4078.
- [100] P. Baldelli, P. Ariano, E. Carbone, A. Gilardino, A. Lo Giudice, D. Lovisolò, C. Manfredotti, M. Novara, H. Sternschulte, E. Vittone\*, *Diamond & Related Materials*, **2005**. 14, 669–674.

## ***CHAPITRE II : FONCTIONNALISATION ET APPLICATIONS***

Avant de pouvoir mettre au point des dispositifs dédiés à la bioélectronique, il est nécessaire d'immobiliser des biomolécules sur le diamant. Mais cela implique également de maîtriser et de caractériser le greffage. Il est donc indispensable de faire appel à différentes techniques expérimentales qui nous permettront de caractériser les matériaux utilisés, leurs états de surface et les étapes de fonctionnalisation. Cette partie sera donc consacrée à la description des techniques de caractérisation qui seront utilisées pour les différentes études abordées dans cette thèse. On trouvera d'abord des techniques dites 'de routine' utilisées pour la caractérisation des couches diamant. En effet l'équipe des Semi-Conducteurs à Grand Gap (SC2G), a déjà référencé les techniques permettant de contrôler de manière rapide la qualité des couches diamant déposées. Les techniques de caractérisation usuelles sont la microscopie électronique à balayage qui permet de contrôler la continuité de la couche mais également la taille et l'aspect des cristallites diamant. La spectroscopie Raman nous permettra de vérifier la qualité cristalline et la quantité de phase non diamant à l'intérieur de nos couches. Concernant les échantillons dopés S. Ghodbane [1] a mené une étude approfondie permettant de quantifier le taux de dopage des échantillons par spectroscopie Raman. Quant à la partie traitant du matériau composite Diamant-Nanotube de Carbone, aucun type de matériau similaire n'a été développé auparavant. Nous avons donc dû trouver un ensemble de techniques de caractérisations pertinentes et complémentaires telles que la spectroscopie Auger et l'XPS. Enfin, parallèlement à ces méthodes utilisées pour des études axées sur l'aspect matériaux, nous avons fait appel à la Spectroscopie Infrarouge pour toutes les études portant sur les fonctionnalisations.

## **II. Techniques de caractérisations**

### **II.A. La microscopie électronique à balayage (MEB)**

La microscopie électronique à balayage est une technique permettant d'imager la surface d'un matériau. Elle permet d'obtenir une image topographique de la surface ou d'effectuer une analyse chimique qualitative à partir d'un contraste de phase. La microscopie électronique à balayage est basée sur les interactions électrons-matière. Un faisceau d'électrons incidents balaye la surface du matériau, l'interaction de ces électrons primaires avec la surface peut alors engendrer deux processus :

- L'émission d'électrons secondaires (Figure II- 1.a) provenant des couches superficielles du matériau. Ce mode permettra de mener des études topographiques haute résolution de la surface.

- La rétrodiffusion d'électrons primaires (Figure II- 1.b) via la diffusion quasi-élastique avec le matériau. L'énergie des électrons rétrodiffusés collectés dépendra du numéro atomique ( $Z$ ) de l'élément du matériau avec lequel ils ont interagi. Ainsi, plus  $Z$  sera élevé, plus l'énergie de l'électron rétrodiffusé sera élevée. Ce mode, peu adapté à la haute résolution spatiale, fait apparaître un contraste de phase lié à la nature chimique des éléments dans le matériau.

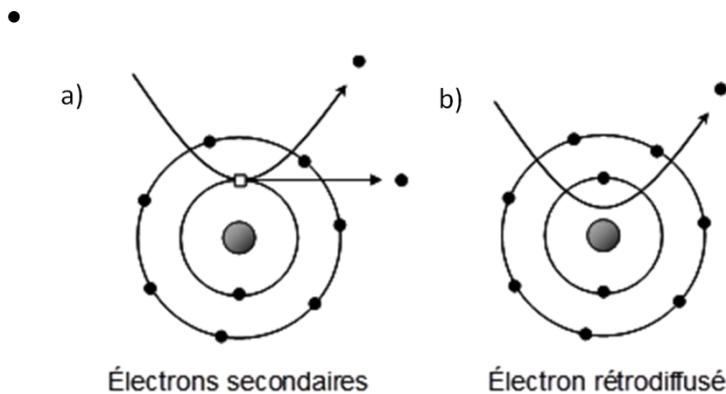


Figure II- 1 : Electron secondaire et rétrodiffusé émis par un atome soumis à un faisceau d'électrons incident.

Nous pouvons observer que le diamant polycristallin se compose d'un mélange de cristallites (grains), de tailles variables et de deux formes géométriques distinctes, séparées par des joints de grain (Figure II- 2.a, b et c). La taille des grains définira le type de diamant. Bien qu'il n'y ait pas de définition précise, on peut dire que lorsqu'elle est de l'ordre du micron il s'agit de diamant microcristallin (Figure II- 2.a) et quand elle est de l'ordre de la centaine de nanomètres de diamant nanocristallin (Figure II- 2.b). Les cristallites présentent des facettes carrées ou triangulaires caractéristiques des orientations cristallines (100) et (111) respectivement. En revanche, ces facettes ne sont pas présentées en quantité égale, les facettes triangulaires (111) prédominent. Cet effet est particulièrement visible pour le diamant  $\mu$ -cristallin (Figure II- 2.c) et provient des conditions de croissance (température du substrat  $890^\circ$ , et concentration de méthane dans la phase gazeuse de 0,5%) favorisant la croissance du diamant selon l'orientation (111) vis-à-vis de l'orientation (100) [2]. De plus, du fait de la croissance colonnaire du diamant polycristallin, les cristallites carrées (100) atteignent plus

difficilement la surface après 24 heures de dépôt et ces dernières sont souvent couvertes par des cristallites triangulaires (111). Nous pouvons également observer que ces facettes triangulaires sont plus sombres que les facettes carrées. Ce contraste provient de la meilleure conduction dans ces grains orientés selon l'orientation (111) liée à une incorporation du bore plus importante [3].

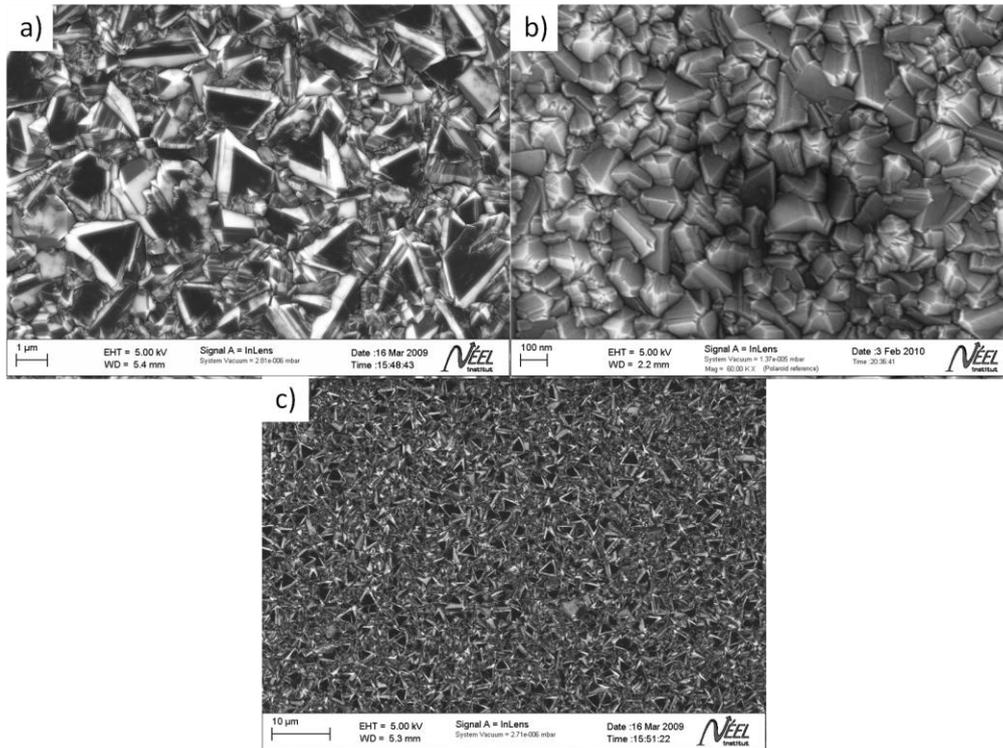


Figure II- 2 : Images MEB en électrons secondaires d'échantillons a), c) diamant microcristallin et c) nanocristallin.

Les cristallites sont entourées de joints de grain. Ils sont majoritairement constitués de phases de carbones hybridés  $sp^2$  ( $C=C$ ). Il est à noter que lorsque la taille des cristallites diminue, la quantité de joints de grain est alors plus importante, augmentant ainsi la quantité de phase non diamant. Ce phénomène sera vérifié et caractérisé par la spectroscopie à effet Raman en comparant un échantillon  $\mu$ -cristallin à un Nanocristallin. La microscopie électronique à balayage nous permet de vérifier la continuité des couches mais aussi d'évaluer rapidement la qualité cristalline de l'échantillon à partir de l'observation topographique des couches diamant.

## II.B. Raman

L'interaction photon-matière permet l'étude des modes rotationnels, vibrationnels, ainsi que d'autres modes basse fréquence d'un système moléculaire ou d'un matériau. Les photons incidents vont interagir avec la matière pour créer ou annihiler des vibrations moléculaires (pour les molécules) ou des phonons (pour les matériaux). L'interaction résultante peut alors induire un décalage de l'énergie des photons incidents (diffusion inélastique) dans le cas de la spectroscopie Raman ou une absorption dans le cas de la spectroscopie infrarouge. Ce décalage en énergie (Raman) ou absorption (Infrarouge) nous renseigne sur les différents modes de vibration actifs du système. Les règles de sélection de la spectroscopie Raman sont différentes de celle de la spectroscopie infrarouge. En effet, les vibrations d'un système sont actives par infrarouge (IR) lorsqu'elles entraînent une variation du moment dipolaire au cours du temps, alors qu'elles sont actives en Raman quand elles impliquent une variation de la polarisabilité du matériau. C'est la raison pour laquelle les spectroscopies IR et Raman sont complémentaires.

D'un point de vue quantique, l'interaction entre un photon d'énergie  $h\nu$  et un niveau d'énergie vibrationnelle donné  $E_v$ , engendre des transitions qui conduisent à différents phénomènes. :

- l'absorption infrarouge (Figure II- 3.a.a)
- la diffusion Rayleigh (Figure II- 3.a.b)
- la diffusion Raman Stokes (Figure II- 3.a.c)
- la diffusion Raman anti-Stokes (Figure II- 3.a.d)
- la fluorescence (Figure II- 3.a.e)

L'effet Raman est basé sur la diffusion inélastique de la lumière par la matière, d'un faisceau incident monochromatique de longueur d'onde  $\nu_0$  (Figure II- 3.b). Il peut être décrit à l'aide de la mécanique quantique, sur la base du modèle moléculaire pour lequel l'énergie vibrationnelle  $E_v$  des états excités d'une molécule est définie en niveaux d'énergie discret et vaut :

$$E_v = h\nu \left( \frac{1}{2} + v \right), \quad h \text{ est la constante de Planck, et } v \text{ le nombre quantique.}$$

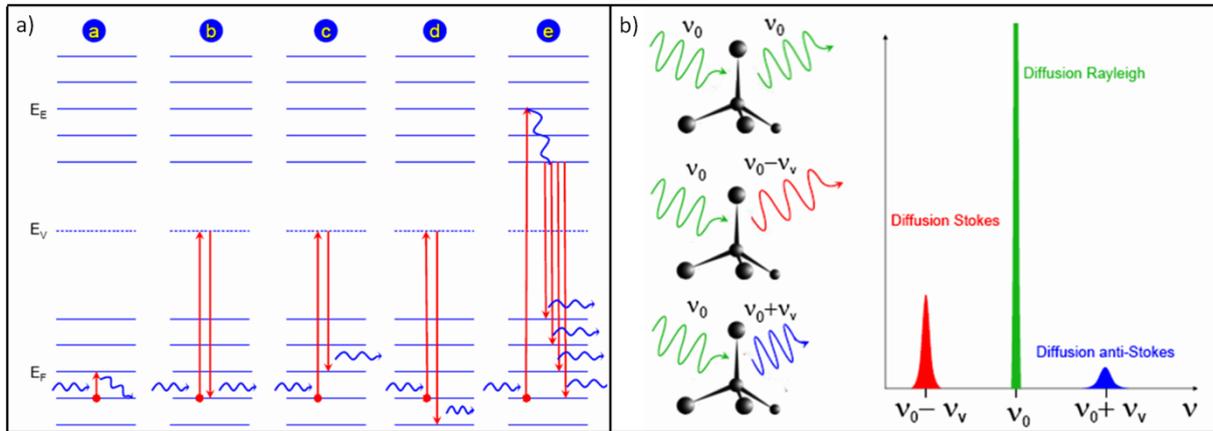


Figure II- 3 : a) transitions électroniques entre niveaux d'énergies d'une molécule donnée, b) représentation schématique de la diffusion d'un photon avec le réseau d'un matériau.

Si l'énergie du photon incident  $h\nu_0$  est de l'ordre de  $E_0$ , alors celui-ci induit des transitions vibrationnelles (et/ou rotationnelles)  $v \rightarrow v + 1$ . Il s'agit de l'absorption infrarouge (Figure II- 3.a.a). Consécutivement à cette excitation, le système retourne dans son état fondamental par relaxation vibrationnelle, sans émettre de photon. Si l'énergie du photon incident  $h\nu_0$  est très supérieure à celle du phonon  $h\nu_v$ , le système est alors excité transitoirement dans un état virtuel  $E_{vir}$  et revient dans l'état fondamental  $v$ , caractérisé par son niveau d'énergie  $E_{fond}$ .

La diffusion Rayleigh correspond à la diffusion élastique de photons d'énergie  $h\nu_0$  (Figure II- 3.a.b). Pour la diffusion Raman (inélastique), on montre que seuls les niveaux  $v - 1$  et  $v + 1$  sont possibles. La diffusion Stokes correspond à des photons d'énergie  $h(\nu_0 - \nu_v)$  (Figure II- 3.a.c) et la diffusion anti-Stokes à des photons d'énergie  $h(\nu_0 + \nu_v)$  (Figure II- 3.a.d). Il existe une équation reliant le rapport des intensités de raies stokes et anti-stokes à une température  $T$ , la fréquence de l'onde excitatrice  $\nu_0$  et la fréquence du phonon  $\nu_v$ . Celle-ci montre qu'à température ambiante, l'absorption d'un phonon (processus anti-stokes) est moins probable que l'émission (processus stokes). C'est pour cette raison que dans des conditions d'études classiques, seul le processus stokes est étudié. Enfin, si la fréquence excitatrice  $\nu_0$  est suffisamment élevée, le système est susceptible d'être élevé en énergie dans son premier état excité  $E_{exc}$ . En revenant dans son état fondamental, on peut alors assister à une relaxation radiative et donc à l'émission d'un photon. Il s'agit du processus d'émission par fluorescence ou photoluminescence auquel certains matériaux donnent lieu (Figure II-

3.a.e). Le spectre de ce processus est composé de bandes très larges, qui pourraient gêner l'observation du spectre Raman auquel il se superpose. On remarquera que pour qu'un processus de fluorescence soit possible sur diamant, il faut que la longueur d'excitation soit au minimum égale au gap diamant (5.45 eV). En revanche, la présence d'azote ou de défauts dans les couches diamant génère des bandes de photoluminescence qui posent problème lors de la caractérisation des échantillons diamant.

Dans ce travail, tous les spectres Raman ont été enregistrés à température ambiante et à pression atmosphérique sous un microscope optique faisant partie d'un appareillage Raman (modèle *Labram Infinity* et de marque *Jobin & Yvon*) à simple faisceau. Seule la source interne de cet appareil a été utilisée dans le cadre de cette thèse ; il s'agit d'un laser He-Ne émettant à une longueur d'onde de 632,8 nm. Une partie des études Raman a été réalisée par Michel Mermoux, Directeur de recherche au Laboratoire d'Electrochimie et de Physicochimie des Matériaux (LEPMI) et des Interfaces dans l'équipe des Couches Minces et Spectroscopie des Surfaces et des Interfaces Electrochimiques (CMESSIE).

La position des pics est caractéristique de la fréquence de vibration des atomes donc de la force des liaisons atomiques et par conséquent de la masse des atomes impliqués dans la liaison. Il sera donc possible d'avoir accès à la nature, au type d'hybridation ainsi qu'à la qualité cristalline du matériau sondé. Par ailleurs, la largeur à mi-hauteur (FWHM) des pics observés nous renseignera sur l'ordre dans le réseau (micro ou macro-déformation), ainsi que sur les défauts cristallographiques (structure cristalline, hétéroatomes...).

Les principaux pics d'intérêts observés pour des films synthétiques de diamant déposés sur substrat silicium ont été détaillés par S. Ghodbane [1] :

- 521,5  $\text{cm}^{-1}$ , pic correspondant au premier ordre Raman du silicium.
- 1332  $\text{cm}^{-1}$ , il correspond au premier ordre Raman du diamant [4]. Il résulte de la vibration rigide des 2 sous réseaux constitutifs du réseau diamant l'un par rapport à l'autre. Dans le cas du pic diamant une faible valeur de la FWHM ( $< 5 \text{ cm}^{-1}$ ), signifie que la couche comporte peu de défauts et affiche une bonne qualité cristalline.

Les autres pics sont reportés dans les travaux de Heise et al. [5], on y trouve :

- Bande D, correspondant au carbone désordonné (amorphe), dans lequel il n'y a pas d'ordre à grande échelle. Sa position varie en fonction de la fréquence de l'onde incidente. Cette position est :

- $1314\text{ cm}^{-1}$ , pour une source à 785 nm.
- $1352\text{ cm}^{-1}$ , pour une source à 532 nm.
- $1370\text{ cm}^{-1}$ , pour une source à 325 nm.

- Bande G, elle correspond au carbone hybridé  $sp^2$ . Elle reflète les mouvements de cisaillement des atomes de carbone hybridés  $sp^2$  qu'ils soient amorphes ou cristallins. Pour un cristal HOPG (Highly Oriented Pyrolytic Graphite) parfait, le pic associé à la bande G n'a pas de comportement dispersif et sa position est de  $1580\text{ cm}^{-1}$ . La présence de défauts dans la structure  $sp^2$  fait apparaître un deuxième pic appelé D2 à une position de  $1620\text{ cm}^{-1}$ . De plus la bande G adopte un comportement dispersif lors de la présence de ces défauts de structure. Cette dispersion sera proportionnelle au degré de désordre. Nous verrons également par la suite que dans le cas des nanotubes, les bandes G et D2 sont composées d'une série de pics, liés aux différents modes de vibration possibles.

Il y a ensuite une série de pics, liés au second ordre situés entre :

- $1800\text{-}2660\text{ cm}^{-1}$ . Ceci ne constitue pas une région d'intérêt dans le cadre de nos études.

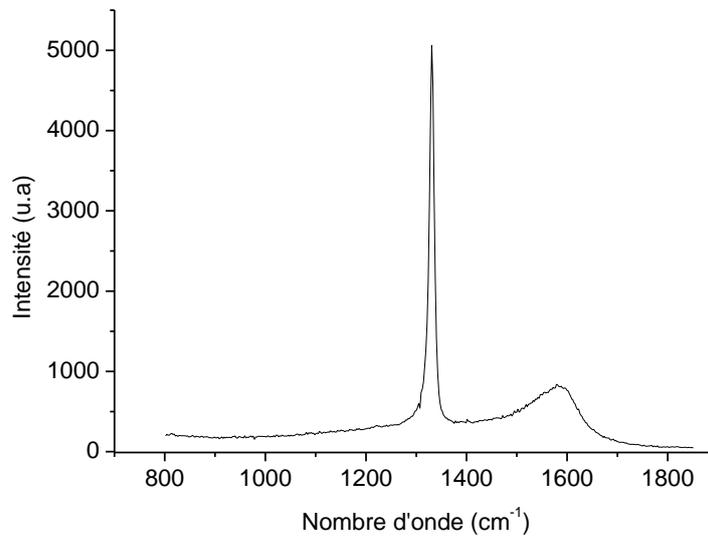
Nous trouvons pour les hauts nombres d'ondes une large zone située entre :

- $2600\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$ . Cette large bande, positionnée à de hauts nombres d'onde, inclut notamment une série de pics associés aux seconds ordres de la bande D2 mais également aux vibrations d'allongement (stretching vibration) des liaisons carbone-hydrogène [6]. Il n'est pas toujours évident d'arriver à dissocier les deux contributions. Elle n'apparaît pas pour les faibles énergies d'excitation mais seulement pour des excitations dans l'UV. Il faut noter que ces modes de vibrations sont beaucoup plus actifs en I.R.

Nous trouvons également dans cette gamme d'énergie le second ordre des bandes G et D2 respectivement à  $3175 \text{ cm}^{-1}$  et  $3250 \text{ cm}^{-1}$ . Le second ordre de la bande D, appelée bande G' est constituée de deux pics. Le caractère dispersif de cette bande implique qu'elle sera fortement dépendante de la longueur d'onde incidente. Sa position se trouve entre  $2600$  et  $2780 \text{ cm}^{-1}$ . Il existe enfin dans cette zone une dernière bande située à  $2450 \text{ cm}^{-1}$ , dont la position ne dépend pas de l'énergie et qui n'existe que pour le HOPG et les SWCNT (Single-Walled Carbon NanoTube).

Comme nous l'avons vu, certains pics dépendent fortement de la longueur d'onde de la source excitatrice et certaines bandes ne sont visibles que pour une gamme d'énergie incidente particulière. C'est pour cette raison que plusieurs sources laser ont été utilisées. L'excitation laser dans le rouge ou le proche infrarouge induit la luminescence de certains défauts dans le diamant comme l'incorporation de silicium dans le réseau [7]. Elle est également responsable du soulèvement de l'ensemble du spectre engendré par la présence de défauts ou de phase non diamant. Dans le cas des forts et lourds dopages, ce fond disparaît et on observe l'apparition de l'effet FANO [8] (Figure II- 6.a et b). En effet dans le cas des échantillons fortement dopés, le diamant adopte un comportement métallique. Cette conduction métallique se fait sur un continuum de niveaux. Plus précisément, l'effet Fano est dû à l'interférence quantique entre la diffusion des phonons de même énergie et des transitions électroniques du continuum de niveaux. Cet effet se traduit par un écrasement et un décalage de la bande diamant à  $1332 \text{ cm}^{-1}$  vers les bas nombres d'ondes, ainsi que par un épaulement décalé vers les hauts ou bas nombres d'ondes suivant la longueur d'onde excitatrice.

La Figure II- 4 montre le spectre Raman d'un échantillon Nanocristallin intrinsèque ou non intentionnellement dopé (NID), réalisé dans l'UV à une longueur d'onde de  $244 \text{ nm}$ . Comme détaillé précédemment, le spectre fait apparaître la raie diamant à  $1332 \text{ cm}^{-1}$ , ainsi que la bande G située à  $1580 \text{ cm}^{-1}$ . La largeur à mi-hauteur du pic diamant est de  $12 \text{ cm}^{-1}$ , cette valeur dénote une bonne qualité cristalline des grains de diamant. L'intérêt d'utiliser une source U.V est ici mis évidence, il nous permet d'isoler le pic diamant en nous affranchissant de la bande D. La bande G est principalement associée aux joints de grain. En effet, ceux-ci sont majoritairement composés de carbone  $\text{sp}^2$  mais également de carbone amorphe comme nous le montre la Figure II- 5.



*Figure II- 4 : Spectre Raman d'un échantillon Nanocristallin NID. La longueur d'onde de la source utilisée est 244 nm.*

La Figure II- 5 illustre des spectres Raman d'échantillons diamant  $\mu$ -cristallin NID et nanocristallin NID via une excitation dans le rouge (633nm). Comme nous l'avons vu précédemment, les spectres réalisés avec des sources dans le rouge ou proche IR exaltent la bande D. Conformément aux études menées par Heise et al. [5] cette bande, pour des excitations dans le rouge, se décale vers les bas nombres d'ondes ( $1308 \pm 8 \text{ cm}^{-1}$ ). On peut également noter la présence de la bande G pour les deux échantillons. La différence observée entre les deux spectres est due à la proportion de joints de grain qui est beaucoup plus importante dans les échantillons nanocristallins, du fait d'un rapport surface-périmètre des grains défavorable. A l'extrême, pour les Ultra-NanoCrystalline Diamond (UNCD) où la taille des grains est inférieure à 20 nm, la proportion des joints de grains est de l'ordre de 60 % et plus. On voit alors apparaître sur les spectres Raman [9] une bande G systématiquement supérieure au pic diamant et il n'est plus possible de discerner le pic diamant de la bande D.

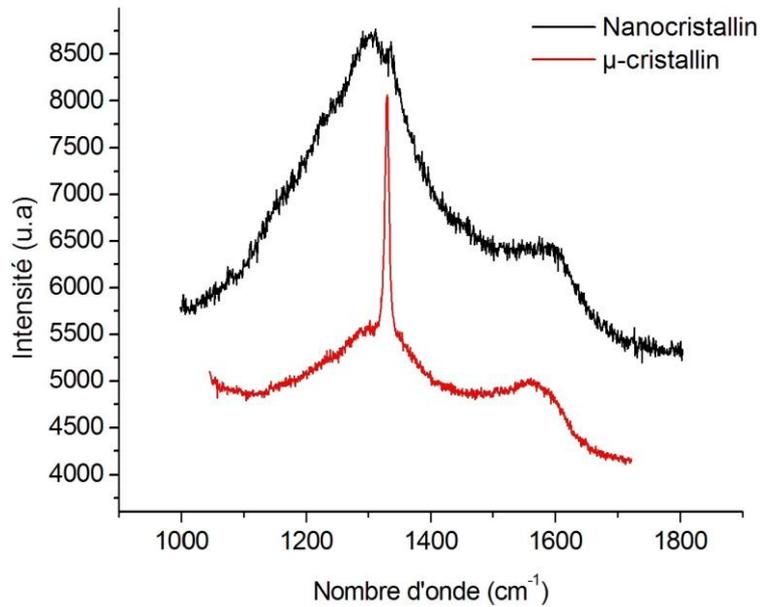


Figure II- 5: Spectres Raman d'échantillons microcristallin (en rouge) et nanocristallin (en noir) NID. La longueur d'onde de la source utilisée est de 633 nm.

La Figure II- 6 montre le spectre Raman d'un échantillon nanocristallin et  $\mu$ cristallin lourdement dopé au bore ( $2.10^{21}$  at/cm<sup>3</sup>). L'analyse Raman a été menée avec un laser à 633nm, car l'effet Fano est plus prononcé dans le rouge. Les spectres mettent ici en évidence l'effet Fano décrit auparavant. S. Ghodbane [1] et Gheeraert et al. [10] ont étudié en détail l'évolution des spectres Raman en fonction du taux de dopage des échantillons, ils ont montré qu'il existe une relation claire entre le taux de dopage du diamant et son comportement spectroscopique. De fait, la caractérisation Raman sera dans ce travail un outil systématique d'analyse permettant de remonter aux concentrations de dopant, cette caractéristique étant essentielle pour des applications électrochimiques des films de diamant.

La Spectroscopie Raman s'avère être une technique de choix pour une caractérisation approfondie des couches diamant. En faisant varier les longueurs d'ondes excitatrices, elle permet d'avoir accès à un grand nombre d'information, comme la qualité cristalline ou la quantité de  $sp^2$  dans les couches. Elle permet également de vérifier le taux de dopage en se reportant aux travaux de S. Ghodbane. D'autre part, elle sera utilisée comme technique de référence pour la caractérisation des nanotubes de carbone dans le chapitre III.

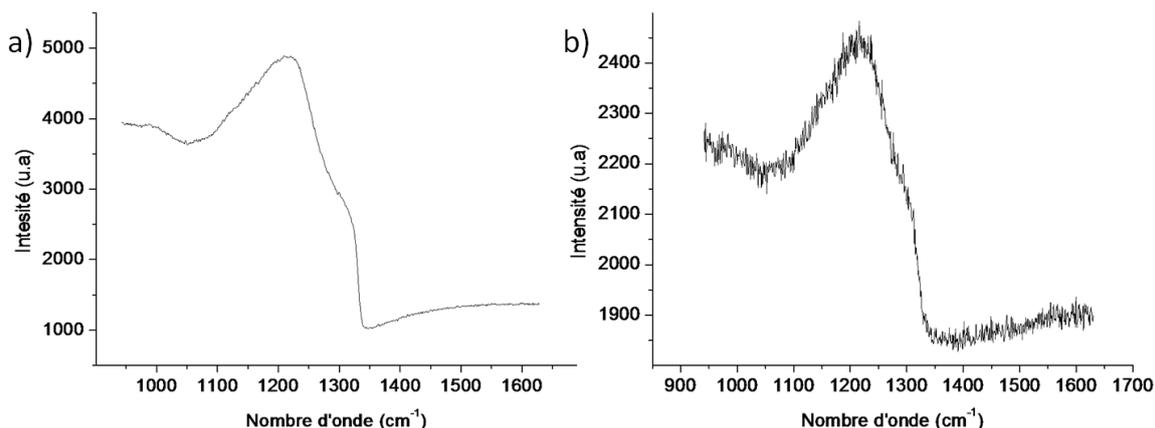


Figure II- 6 : Spectres Raman d'échantillons diamant, a) microcristallin, b) nanocristallin, lourdement dopés au bore. La longueur de la source utilisée est de 633 nm.

## II.C. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

La spectroscopie photoélectrique X est une technique d'analyse surfacique basée sur la détection des électrons de cœur des atomes du matériau, ionisés par l'intermédiaire d'un faisceau de rayon X incident. L'énergie cinétique des électrons éjectés sera alors caractéristique du niveau électronique de l'élément émetteur. C'est une technique non destructive et qui contrairement à la spectroscopie Auger, ne présente pas de risque de dégradation des matériaux carbonés durant l'analyse. De plus cette technique est particulièrement sensible à la surface des échantillons, la profondeur sondée étant comprise entre 3 et 10 nm. Le principe et les détails expérimentaux de cette technique sont détaillés en annexes.

La Figure II- 7 montre le spectre XPS global d'un échantillon nanocristallin lourdement dopé au bore, ayant été conservé sous air durant six mois avant analyse. L'angle d'incidence des rayons X incidents avec l'échantillon est de  $90^\circ$ , la profondeur sondée est donc de l'ordre de 6 - 8 nm.

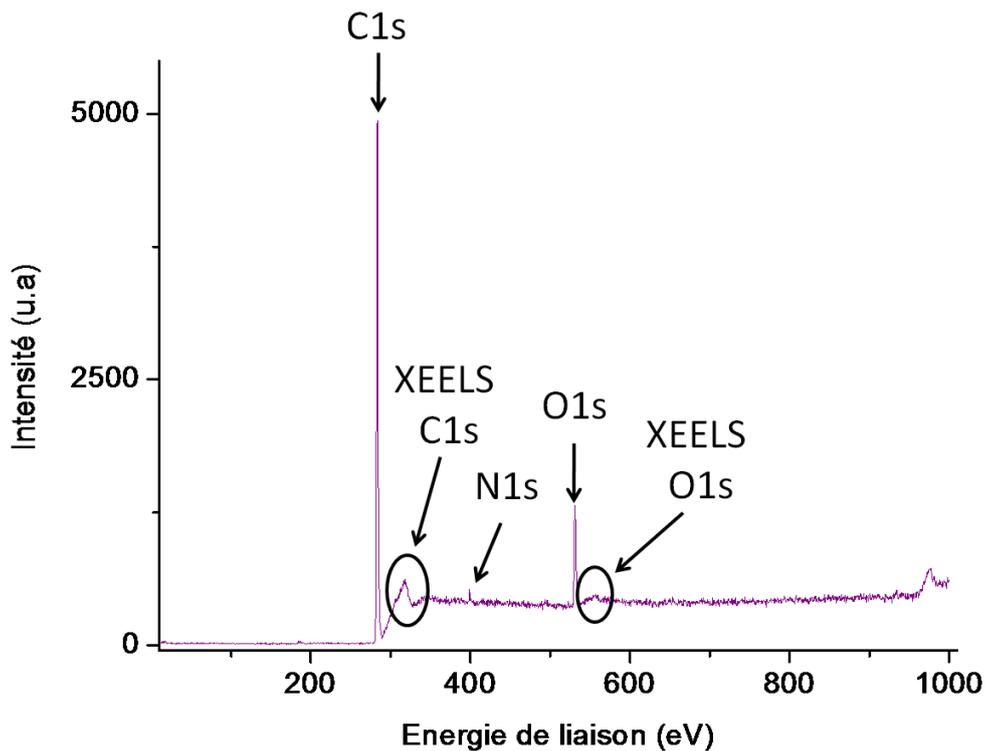


Figure II- 7 : Spectre XPS global d'un échantillon nanocristallin lourdement dopé au bore.

On peut observer très clairement le pic C1s du carbone centré en 283,8 eV, ainsi que le pic de l'oxygène O1s aux alentours de 530 eV. La présence du pic oxygène est lié à l'oxydation de surface du diamant, qui, conservé sous air, a atteint un niveau d'oxydation d'équilibre. On peut également remarquer le pic de l'azote vers 400 eV. Il est assez fréquent d'observer des traces d'azote sur la surface, elles proviennent de l'azote atmosphérique. On peut également remarquer, décalés vers de plus hautes énergies, des épaulements satellites des pics C1s et O1s associés aux « pertes d'énergie » des électrons issus de ces atomes respectifs. Cette région constitue une étude spécifique en soi qui sera détaillée dans la partie II.D et en annexes. Il s'agit des pertes d'énergie associées au carbone C1S.

La Figure II- 8 présente le spectre XPS focalisé sur la zone C1s de l'échantillon précédemment cité. La largeur à mi-hauteur de la lorentzienne utilisée dans le cas du diamant est de 0,42 eV. Nous pouvons observer six composantes résumées dans le Tableau II- 1. Toutes les assignations de pics relatives aux spectres XPS d'échantillons diamant réalisées dans le cadre de nos études ont été faites en se référant aux différents travaux menés au sein de l'équipe SC2G [1, 11, 12] et LCD [13, 14]. La première composante est observée à 282,5 eV et n'apparaît que pour les lourds dopages, elle est parfois assignée à la signature du

carbone  $sp^2$ . De récentes études menées par Ghodbane et al. [11] ont montré qu'il s'agirait en fait de dimère résiduel de bore en surface. La deuxième composante située à 283,7 eV est la composante principale du spectre diamant et met en évidence les carbones hybridés  $sp^3$ . Elle reflète également la présence d'atomes de carbone de surface monohydrogénés C-H, dont l'énergie est décalée de + 0,2 eV par rapport au pic des carbones  $sp^3$ . La résolution de l'appareil étant de 0,7 eV, il n'est donc pas possible de déconvoluer ces deux composantes. La troisième composante est associée aux carbones de surface multihydrogénés,  $CH_x$  (avec  $x = 2,3$ ), qui sont décalés d'environ + 0,5 eV par rapport au pic des carbones  $sp^3$ . On trouve ensuite une série de trois composantes à 284,9, 285,7 et 286,7 eV. Ces composantes sont associées aux atomes de carbone liés à un atome d'oxygène avec un nombre d'oxydation croissant. On trouvera les liaisons C-OH à 284,9 eV, ce groupement de surface du diamant est le meilleur candidat pour une fonctionnalisation utilisant les états de surface oxydés du diamant. Puis à 285,7 eV, on trouve les liaisons C-O-C, provenant des éthers ou de leurs ponts (époxydes). Il s'agit de la forme oxydée la plus représentée sur diamant. De plus ces fonctions sont extrêmement stables et non réactives. Finalement, le dernier pic d'intensité moindre à 286,7 eV est la signature des liaisons C=O des cétones ou aldéhydes. Il existe également un dernier type de groupements oxydés de surface que sont les carboxyles dont le pic apparaît autour de 287,7 eV, il est absent de nos spectres.

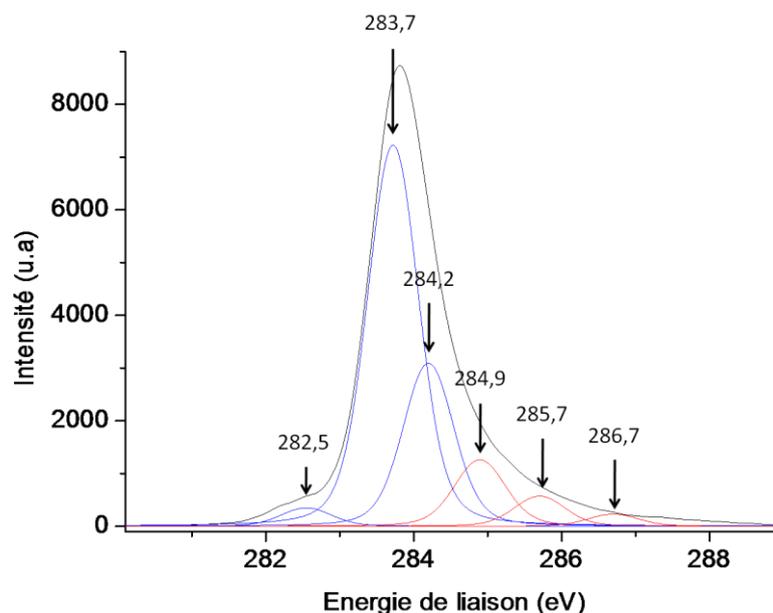


Figure II- 8 : Spectre XPS centré sur le pic carbone C1s d'un échantillon diamant nanocristallin lourdement dopé.

Après l'ajustement analytique des composantes avec les données expérimentales, il est possible de calculer la proportion de l'aire de chacun des pics par rapport à l'aire totale. Cela permet de remonter à la contribution des différentes composantes, associées aux différents groupements de surface, du pic C1s (Tableau II- 1).

C1s	E (eV)	Aire (%)
C dimère	282,5	2,7
C sp <sup>3</sup> , CH	283,7	56,7
C (CH <sub>x</sub> , x= 2, 3)	284.2	24,3
C (C-O-H)	284.9	10
C (C-O-C)	285.7	4.5
C (C=O)	286.7	1,8

Tableau II- 1 : Tableau récapitulatif de la position, de l'assignation et de la contribution des pics du carbone C1s d'un échantillon nanocristallin lourdement dopé.

Bien que l'XPS soit une technique d'analyse surfacique, bien adaptée à la caractérisation des matériaux fonctionnalisés, elle a principalement été utilisée pour caractériser nos matériaux.

## II.D. X-ray Electron Energy Loss Spectroscopy (XEELS)

La spectroscopie des pertes d'énergie est une technique de choix pour l'étude des matériaux carbonés. Il existe de nombreux matériaux carbonés, de compositions relatives variables, d'atomes de carbone hybridés sp<sup>2</sup> ou sp<sup>3</sup>. Ces états d'hybridations, souvent très proches en énergie de liaison, rendent parfois difficile la séparation de leurs composantes respectives en XPS. La spectroscopie des pertes d'énergie est basée sur l'étude des transitions électroniques interbandes qui possèdent des signatures énergétiques mieux différenciées et donc facilement séparables. La spectroscopie EELS, basée sur l'utilisation d'un faisceau d'électron comme source excitatrice, peut engendrer une dégradation des matériaux carbonés durant l'étude. De plus, ce n'est pas à proprement parler une technique de surface car les résultantes sont mesurées en transmission ou en réflexion. Dans cette étude, la source

excitatrice est un rayonnement X non destructeur. Les pertes d'énergie mesurées sont alors associées aux photoélectrons issus de la zone de croûte et ayant subi une interaction avec la matrice. Le principe de cette technique est détaillé en annexes.

La Figure II- 1 montre le spectre des pertes d'énergie des photoélectrons C1s du carbone d'un échantillon diamant nanocristallin lourdement dopé ainsi que le spectre d'un échantillon HOPG.

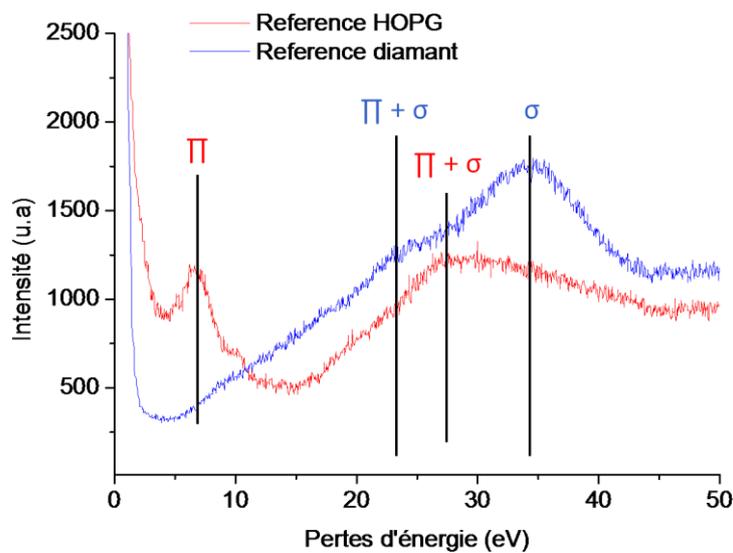


Figure II- 9 : Spectre des pertes d'énergies des photoélectrons C1s du carbone d'un échantillon nanocristallin lourdement dopé au bore (Bleu) et HOPG (en rouge).

L'échantillon HOPG affiche un premier pic situé à +7 eV par rapport au pic C1s. Ce pic est associé aux transitions  $\pi - \pi^*$  ou  $\pi$ -plasmon [15] et caractérise l'hybridation  $sp^2$  du carbone. On trouve également un pic à + 27 eV associé aux transitions inter-bandes  $\pi + \sigma$  [15]. Ces transitions vont apparaître dans tous les matériaux carbonés, leurs positions seront décalées en fonction du taux d'hybridation  $sp^2/sp^3$ . Elle sera ainsi utilisée pour déduire la quantité de phase de type graphitique dans les DLC (Diamond like carbon) ou les diamants polycristallins. Le spectre diamant fait clairement apparaître un pic situé à + 34 eV qui est attribué au transitions  $\sigma - \sigma^*$  ou  $\sigma$  plasmon [16]. Il caractérise l'hybridation  $sp^3$  du carbone. On observe également un pic situé à +24 eV dû aux transitions interbandes  $\pi + \sigma$  [17]. On le retrouvera pour les diamants polycristallins, mais plus particulièrement pour le nanocristallin pour lequel la proportion d'atomes de carbones hybridés  $sp^2$  se trouvant aux joints grains n'est

plus négligeable. On observera même l'apparition du pic  $\pi$  plasmon, associé à un décalage du pic  $\pi + \sigma$  caractéristique du carbone vitreux (GC pour Glassy Carbon), du carbone amorphe ou encore du DLC (Diamond Like Carbon).

Cette méthodologie de caractérisation sera particulièrement effective lors de l'étude des matériaux hybrides diamant-nanotubes constitués de deux variétés allotropiques distinctes du carbone que nous aborderons au Chap. IV.

## II.E. Spectroscopie Auger

La spectroscopie Auger est particulièrement bien adaptée aux éléments légers et donc au carbone, elle permet également de faire de l'imagerie de surface. De plus, comparativement à l'XPS ou à XEELS, elle constitue la technique la plus surfacique en ne récoltant que les électrons des premières couches atomiques. Les principes et détails expérimentaux de la spectroscopie Auger sont détaillés en annexes. La Figure II- 10 montre le spectre Auger carbone associé à la transition  $KL_1L_2$  d'un échantillon Diamant nanocristallin lourdement dopé au bore, ainsi que celui d'un échantillon HOPG.

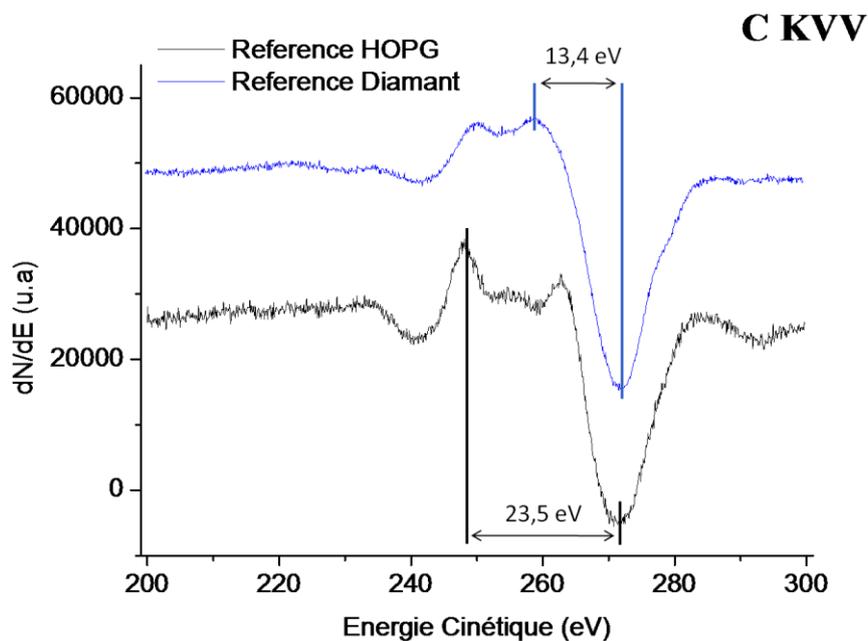


Figure II- 10 : Spectre Auger du carbone associé à la transition  $KL_1L_2$  d'un échantillon diamant nanocristallin lourdement dopé au bore (en bleu) et HOPG (en noir).

On remarque une série de pic sur chacun des spectres qui met en évidence la structure fine des atomes de carbone. Ces différents pics sont caractéristiques et correspondent aux valeurs que l'on trouve dans la littérature [18, 19]. La valeur d'intérêt lors de l'étude d'un spectre Auger est le paramètre D (« D-parameter ») (conf. Annexes). Pour l'échantillon HOPG, on remarque que cette valeur est de 23,5 eV. Elle dénote une très bonne qualité cristalline de l'échantillon HOPG. On différencie le graphite du HOPG grâce à cette valeur qui est supérieure à 22,8 eV pour le HOPG et inférieure à 22,5 eV pour le graphite [20]. En ce qui concerne le diamant, la valeur de D est de 13,4 eV. On remarque également que le pic est relativement large. Ce phénomène vient du fait que la structure fine du diamant est sensible à l'orientation cristalline des grains, or nous avons ici un mélange des différentes orientations. Il a été montré que D est compris entre 13 et 14,5 eV pour le diamant et que l'orientation cristalline (111) affiche la plus petite valeur de D [21]. Toutes les autres orientations ont des valeurs supérieures et les diamants naturels ont des valeurs comprises entre 14,2 et 14,3 eV. Ceci tend à confirmer que l'orientation cristalline préférentielle lors de la croissance des couches diamant dans les conditions de lourd dopage, induit une majorité de grains (111).

## II.F. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

La spectroscopie infrarouge est une technique puissante de caractérisation des molécules. Très utilisée en chimie organique, elle permet de mettre en évidence les modes de vibrations des molécules et fut longtemps mise en œuvre pour la détermination de structures moléculaires avant d'être supplantée par la RMN. La gamme infrarouge intéressante dans le cadre de nos études est le moyen infrarouge correspondant à des longueurs d'ondes comprises entre 3 et 20  $\mu\text{m}$ . Dans les modes de transmission et réflexion classiques, cette technique n'est pas la mieux adaptée aux caractérisations de surfaces. En revanche l'utilisation d'un accessoire ATR (Attenuated Total Reflectance) rend les caractérisations par spectroscopie infrarouge très sensible à la surface. Les principes de la technique et détails expérimentaux sont détaillés dans les annexes. L'assignation de pic a été faite à partir de l'ouvrage de Nakanishi [24] ainsi que celui de Colthup [25] mais aussi à partir de la publication de T. Jiang et al. [26]. Bien qu'avec l'utilisation d'un accessoire ATR la profondeur sondée de

l'échantillon diamant soit seulement de l'ordre de 500 nm, la composante du spectre liée au Bulk diamant est à prendre en compte. Les spécificités liées au spectre diamant et plus précisément à ses défauts sont également détaillées dans l'annexe. Les défauts présents dans le diamant peuvent être nombreux et varient selon le type de diamant utilisé. C'est pour cette raison que lorsque nous aborderons la partie III.C.5 portant sur la caractérisation de fonctionnalisation de surface, nous utiliserons comme spectre de référence celui provenant de l'échantillon avant fonctionnalisation. De plus l'état de surface du diamant durant l'acquisition de la référence devra être le même que celui requis pour la fonctionnalisation.

Le spectre d'une couche de diamant monocristallin (100) NID est présenté sur la Figure II- 2. La couche diamant a été déposée au CEA Saclay dans l'équipe du LIST sur un substrat Sumitomo Ib. Cet échantillon diamant a été hydrogéné par plasma chaud puis caractérisé en ATR sur cristal Germanium immédiatement après hydrogénation. Le spectre infrarouge, noté A, est représenté sur la Figure II- 11. Il y a plusieurs raisons au choix de l'échantillon présenté ici. Premièrement, les études ATR interdisent l'utilisation d'échantillons dopés car l'onde évanescente ne peut pas se propager dans les échantillons dopés. De plus nous utilisons ici un cristal ATR large surface permettant de sonder toute la surface des échantillons. Les expériences ATR nécessitent un contact intime entre l'accessoire et l'échantillon. Il est donc impératif d'utiliser des substrats plans pour améliorer la sensibilité et ne pas dégrader le cristal ATR. Nous utiliserons donc uniquement des échantillons monocristallins intrinsèques ou NID. De plus, l'utilisation directe de substrat diamant, n'ayant pas fait l'objet de croissance dans nos bâtis peut s'avérer problématique. En effet les substrats diamants monocristallins commerciaux sont polis mécaniquement et/ou chimiquement ; leurs états de surface est donc variable et de mauvaise qualité. Le polissage entraîne généralement une abrasion de la surface faisant apparaître une phase graphitique consécutive en surface. C'est pour cette raison qu'avant toutes homoépitaxies, nous procédons à un traitement chimique visant à éliminer cette phase. C'est pour ces raisons que le choix de l'échantillon s'est porté sur une couche diamant déposé par nos soins.

Les groupements de surface apparaissent sur le spectre en plusieurs zones d'intérêts. Une première zone située entre 2800 et 3100  $\text{cm}^{-1}$  est la signature des liaisons C-Hx. Une seconde zone se situant entre 1760 et 1680  $\text{cm}^{-1}$  révélera la présence de fonctions carboxyles sur la surface du diamant. Les bandes situées entre 1680 et 1600  $\text{cm}^{-1}$  refléteront le « stretch » des liaisons  $\text{sp}^2$  non conjuguées. Une zone comprise entre 1600 et 1200  $\text{cm}^{-1}$ , souvent compliquée à analysée laissera apparaître des liaisons  $\text{sp}^2$  de types aromatiques comprises

entre 1600 et 1400  $\text{cm}^{-1}$ , ainsi que les déformations de cisaillement des  $\text{CH}_x$  ( $\text{sp}^3$  et  $\text{sp}^2$ ) comprises entre 1500 et 1300  $\text{cm}^{-1}$ . On pourra également trouver entre 1400 et 1300  $\text{cm}^{-1}$  les cisaillements des groupements hydroxyles, puis entre 1300 et 1200  $\text{cm}^{-1}$  des groupements époxydes. La dernière zone se trouve entre 1200 et 1000  $\text{cm}^{-1}$  et correspond aux liaisons C-O associées aux alcools, ainsi qu'aux ponts éther. Il faut également noter qu'une série de défauts associés au diamant peut apparaître dans toute la zone 1 phonon (nombre d'ondes inférieurs à 1500  $\text{cm}^{-1}$ ). Tous les détails liés à ces défauts sont décrits dans les annexes.

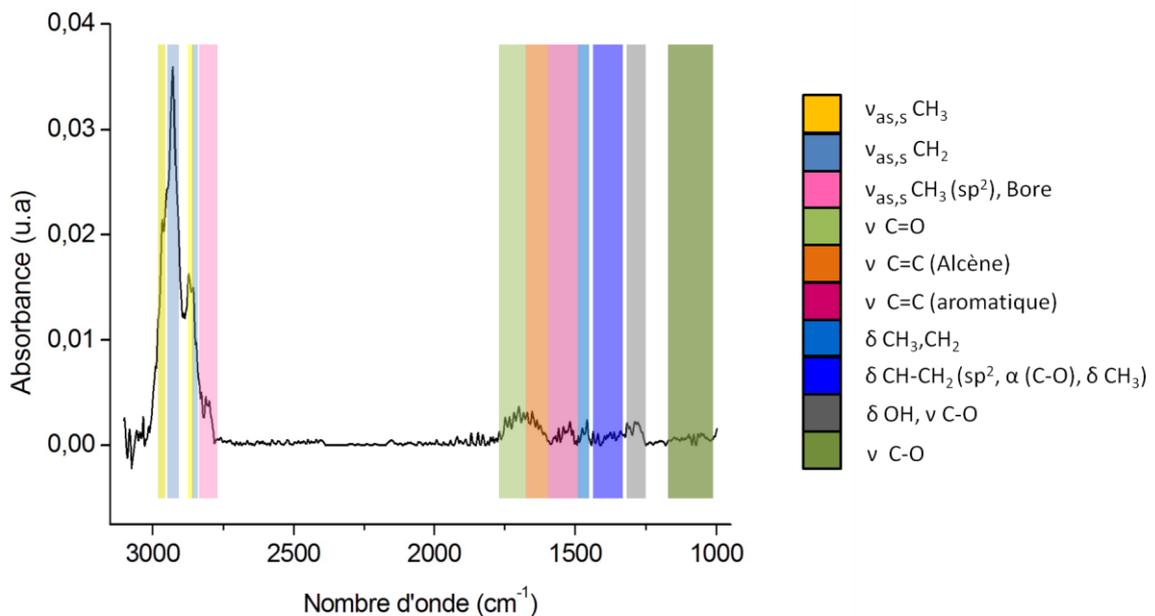


Figure II- 11 : Spectre infrarouge, réalisé en ATR avec un cristal germanium, d'une couche diamant monocristalline déposée par homoépitaxie (100) sur un substrat Sumitomo.

Hormis la signature des  $\text{CH}_x$  les autres pics sur diamant monocristallin hydrogéné sont de faible amplitude, voir non observables, du fait de la bonne qualité cristalline des couches synthétisées, de l'absence de joint de grains et de l'hydrogénation de surface. Dans le cas de cet échantillon, l'analyse détaillée du spectre porte donc uniquement dans la gamme des  $\text{CH}_x$  se trouvant entre 3100 et 2800  $\text{cm}^{-1}$ . Nous pouvons voir sur ce spectre la signature du « stretch » asymétrique et symétrique des groupements méthyle et méthylène situés respectivement à 2965, 2870 et 2928, 2857  $\text{cm}^{-1}$ . On remarque que l'intensité du pic associé au  $\text{CH}_2$  est supérieure à celle associée au  $\text{CH}_3$ . Cela est dû au fait que sur des échantillons orientés (100), les fonctions hydrogénées majoritaires seront les  $\text{CH}_2$ . Par ailleurs on retrouve le pic associé aux déformations des groupements méthyles, avec la déformation asymétrique

(bascule ou « rocking ») entre 1475 et 1450  $\text{cm}^{-1}$  et la déformation symétrique (cisaillement ou « scissoring ») entre 1385 et 1375  $\text{cm}^{-1}$ . De même, les groupements méthylènes présentent un mouvement de cisaillement générant un pic d'absorption entre 1475 et 1450  $\text{cm}^{-1}$ . L'épaulement situé aux alentours de 2900  $\text{cm}^{-1}$  peut être attribué à la déformation de fonctions monohydrogénées CH. Enfin, on peut remarquer un pic aux environs de 2810  $\text{cm}^{-1}$  qui peut être associé au bore résiduel en position substitutionnelle dans le réseau diamant (conf. annexes).

Il est important d'appréhender les différences spectrales existantes entre une surface de diamant monocristallin fraîchement hydrogénée et une surface oxydée afin d'identifier les pics susceptibles d'apparaître du fait d'une oxydation spontanée prenant place au cours d'un processus de fonctionnalisation de surface. La Figure II- 12 montre le spectre, noté B, d'un substrat diamant monocristallin (100) CVD Element-Six« optical grade », n'ayant subi aucune homoépitaxie.

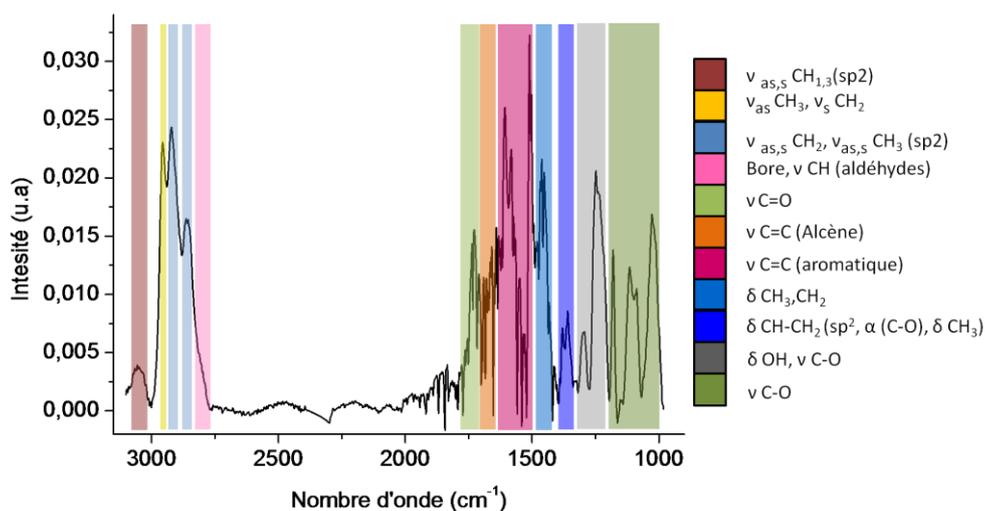


Figure II- 12 : Spectre FTIR réalisé en ATR avec un cristal germanium, d'un substrat CVD (100), hydrogéné puis vieilli 6 mois sous air.

Cet échantillon a été nettoyé par des procédés chimiques classiques, Eau/Ethanol/Acétone/Ethanol/Eau, chaque traitement étant effectué pendant 5 min dans un bain à ultrasons. Il a ensuite été soumis à un plasma hydrogène selon les conditions détaillées dans le tableau et vieilli sous air pendant 6 mois. En ne considérant toujours que la zone des CH<sub>x</sub>, nous pouvons remarquer des différences notables avec le spectre A obtenu pour une

surface hydrogénée. Tout d'abord, une bande située entre 3100 et 3000  $\text{cm}^{-1}$  apparaît. Elle est associée au « stretch » des liaisons =CH, mais peut également être dédiée au stretch asymétrique des fonctions =CH<sub>2</sub>. Les autres composantes situées entre 3000 et 2800  $\text{cm}^{-1}$  ont également évolué. Plus particulièrement, la signature des CH<sub>3</sub> aliphatiques située à 2960  $\text{cm}^{-1}$  qui est moins intense que celle des CH<sub>2</sub> aliphatiques, située à 2925  $\text{cm}^{-1}$ , sur diamant hydrogénée présente sur diamant oxydé une intensité équivalente. Ce phénomène est relatif à l'apparition du stretch symétrique des groupements =CH<sub>2</sub> à 2970  $\text{cm}^{-1}$ . Concomitamment, ce groupement présente une signature complémentaire associée à l'agitation (wag) des CH visible sous forme d'une bande centrée autour de 1850  $\text{cm}^{-1}$  ainsi que deux pics relatifs au cisaillement des =CH<sub>2</sub> et au mouvement de bascule (rock) des =CH respectivement à 1420 et 1400  $\text{cm}^{-1}$ . Dans une seconde zone d'intérêt du spectre IR située en deçà de 1800  $\text{cm}^{-1}$ , on remarque, à la différence du spectre A, que l'intensité des pics dus aux CH<sub>x</sub> aliphatiques est du même ordre que l'ensemble des pics de la région comprise entre 1800 et 1000  $\text{cm}^{-1}$ . L'évolution de cette zone lors du passage d'une surface hydrogénée à une surface oxydée traduit, d'une part, la diversité des fonctions présentes en surface après vieillissement et, d'autre part, le fait que les CH<sub>x</sub> ne sont plus majoritaires.

La partie du spectre comprise entre 1800 et 1400  $\text{cm}^{-1}$  reflète la présence de groupements de surface provenant de l'oxydation de surface du diamant mais aussi de phase non diamant. On trouve une série de pic comprise entre 1800 et 1700  $\text{cm}^{-1}$  montrant la présence de groupements carbonyles associés aux cétones, acides carboxyliques et aldéhydes. On trouve ensuite une série de pics intenses situés à 1610, 1580, 1510, 1500 et 1450  $\text{cm}^{-1}$  associés aux différents modes de vibrations C=C aromatiques, émanant de la zone écroulée (et n'étant pas un produit de l'oxydation de surface). Ces pics témoignent de la présence de phases non diamant en surface du film. Le pic à 1440-1430  $\text{cm}^{-1}$  est associé au mode bascule des CH<sub>2</sub> se trouvant en alpha d'un carbone sp<sup>2</sup> ou en alpha de groupement oxydé type C-O. Il faut noter que ce dernier peut également chevaucher des pics liés aux phases C=C. On trouve enfin un pic centré en 1465  $\text{cm}^{-1}$  associé au mode bascule des groupements CH<sub>2</sub> aliphatiques et au cisaillement des groupements CH<sub>3</sub> aliphatiques.

Intéressons nous maintenant à la région des fingerprint, région comprise entre 1000 et 1500  $\text{cm}^{-1}$ . N'ayant pas accès aux zones spectrales comprises entre 3200 et 3600  $\text{cm}^{-1}$  associées au stretch des liaisons hydroxyles ni à celles entre 1000 et 600  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant à l'agitation (wagging) des C-H sp<sup>2</sup> et aromatiques, il est donc particulièrement compliqué de pouvoir associer précisément les groupements de surface correspondant à chaque pic du

fingerprint. De plus, au regard de la forte intensité des pics précédemment associés aux groupements  $sp^2$  et du manque d'information pour les nombres d'ondes inférieurs à  $1000\text{ cm}^{-1}$ , il est difficile de discriminer les pics émanant du (cisaillement) des C-H de type aromatique et du stretch des différentes liaisons C-O. Ces deux modes de vibrations feront apparaître une série de bande se trouvant dans la gamme  $1000\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ . Bien qu'il existe une grande variété de bandes résultant du « stretch » des C-H aromatiques et qu'ils aient des pics très fins (Colthup et al. [25]), leurs intensités étant faibles nous associerons donc les pics présents aux groupements C-O.

Sur la base de ces hypothèses de travail, le premier pic, observable à  $1030\text{ cm}^{-1}$ , peut être attribué au « stretch » de la liaison C-O des alcools primaires aliphatiques et secondaires aromatiques, ainsi qu'au « stretch » des liaisons C-O-C des éthers aromatiques. Le pic large situé à  $1115\text{ cm}^{-1}$  avec un épaulement à  $1095\text{ cm}^{-1}$ , peut être associé au « stretch » des liaisons C-O aux composantes des éthers aliphatiques et des alcools secondaires respectivement, ainsi qu'à la déformation de certains groupements hydroxyles. Le pic à  $1170\text{ cm}^{-1}$  peut quant à lui être attribué au stretch des liaisons C-O des alcools tertiaires, aux groupements gem-diméthyle mais également aux défauts de types D. Ensuite, le large pic centré en  $1240\text{ cm}^{-1}$ , peut être attribué principalement au stretch des liaisons C-O des ponts éthers mais peut aussi être associé à des fonctions hydroxyles de type phénol, aux éthers aromatiques et vinyle éther, ainsi qu'à la déformation de certains groupements hydroxyles et enfin aux défauts de types D. Le pic à  $1300\text{ cm}^{-1}$  peut être assigné aux éthers aromatiques, ainsi qu'à la déformation de certains groupements hydroxyles, et aux défauts de type D. On trouve ensuite une zone riche en pic difficilement dissociables caractérisant le cisaillement « scissor » des groupements CH,  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ . La zone comprise entre  $1480$  et  $1450\text{ cm}^{-1}$  caractérise le cisaillement antisymétrique des groupements  $\text{CH}_3$  et  $\text{CH}_2$ . La zone comprise entre  $1450$  et  $1400\text{ cm}^{-1}$  fait apparaître la déformation des groupements CH et  $\text{CH}_2$  situés en alpha d'une fonction C-O ou  $sp^2$ . La région comprise entre  $1380$  et  $1360\text{ cm}^{-1}$  met en évidence le mode cisaillement symétrique des fonctions méthyles. On note enfin la présence d'un pic aux alentours de  $1340\text{ cm}^{-1}$  qui reflète le mode de cisaillement des liaisons CH  $sp^3$ .

Les disparités observées entre le spectre A et B, met en évidence deux choses distinctes. La différence de qualité cristalline entre les deux échantillons et donc l'importance de la qualité du substrat de départ. L'état de surface et les défauts présents sur le substrat conditionneront la qualité de la couche épitaxiée. La mauvaise qualité cristalline du spectre B est mise en évidence par les nombreux pics associés aux phases non diamant. En termes de

groupement de surface, la différence observée confirme les travaux de Vanhove et al. [27] montrant l'oxydation naturelle de la surface du diamant. Cela nous obligera également à travailler en utilisant systématiquement comme référence le substrat hydrogéné de départ lors de la caractérisation de fonctionnalisation sur diamant.

Enfin la Figure II- 13 montre le spectre d'une couche de diamant nanocristallin intrinsèque déposé à l'institut Néel et caractérisé quelques jours après hydrogénation. Au vue de l'impossibilité de caractériser les échantillons polycristallins avec l'outil ATR large surface, nous avons utilisé un cristal ATR germanium en pointe classique. La surface de contact dans ce cas n'est que de quelques dizaine de microns. Les composantes du spectre sont similaires à celles de l'échantillon monocristallin homoépitaxié sur substrat Sumitomo. On remarque néanmoins la présence de liaisons de type  $sp^2$  conjuguées et non conjuguées ( $1670-1500\text{ cm}^{-1}$ ). Le pic large centré en  $1040\text{ cm}^{-1}$ , montre la présence d'alcools primaires, secondaires et d'éthers non cycliques. On notera enfin la présence d'un pic caractéristique n'apparaissant pas sur l'échantillon monocristallin homoépitaxié. Il s'agit du pic à  $1260\text{ cm}^{-1}$ , ce pic reflète la présence d'éthers cycliques de type époxy.

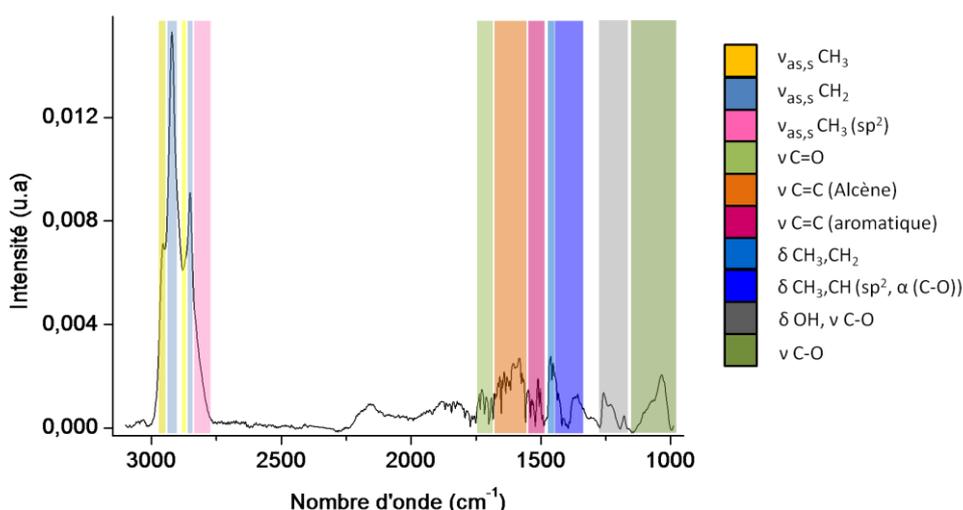


Figure II- 13 : Spectre infrarouge, réalisé en ATR avec un cristal de germanium, d'un échantillon diamant nanocristallin fraîchement hydrogéné.

On peut avoir à travers les spectres effectués sur diamant non fonctionnalisé, la grande sensibilité que les études ATR en spectroscopie infrarouge nous offrent. La diversité des fonctions existantes sur diamant rend difficile l'attribution univoque d'une fonction précise

pour chaque pics observés. Cela montre l'importance d'utiliser une référence dont l'état lors de son acquisition, est le plus proche possible de l'état dans lequel elle est avant modification. La Spectroscopie Infrarouge sera une technique de choix pour la caractérisation et la compréhension du mécanisme de greffage abordée dans le chapitre II.

Nous avons pu voir que le nombre d'outils d'analyse nécessaires à nos études est important. Elles sont bien adaptées aux analyses de surface des matériaux carbonés et seront majoritairement utilisées pour l'étude de nos échantillons. C'est grâce à la complémentarité de ces différentes techniques que nous pourrons caractériser le nouveau matériau composite carboné qui sera traité au chapitre III.

- [1] S. Ghodbane, *Thèse de doctorat*, **2007**. Université Joseph Fourier Grenoble.
- [2] R. Kohl, C. Wild, N. Herres, W. Mullerseberr, P. Koidl, *Diamond & Related Materials*, **1994**. 3, (4-6), 373-381.
- [3] L.L Bouilov, B.V. Spitsyn, B.V derjaguin, *Journal of Crystal Growth*, **1981**. 52, 219-226.
- [4] L. Piseri and G. Zerbi R. Tubino, *The Journal of chemical physics*, **1972**. 56, (3), 1022-1039.
- [5] R. Kuckuk, H. M. Heise, A. K. Ojha, A. Srivastava, V. Srivastava and B. P. Asthana\*, *J. Raman Spectrosc.*, **2009**. 40, 344–353.
- [6] S.A. Asher, R.W. Bormett, R.E. Witowski, W.D. Partlow, R. Lizewski and F. Pettit, *J. Appl. Phys.*, **1995**. 77, (11), 5916-5923.
- [7] A. V. Turukhin, A. A. Gorokhovskiy, W. Phillips and R. R. Alfano, *Appl. Phys. Lett.*, **1995**. 66, (1).
- [8] U. Fano, *Physical Review*, **1961**. 124, (6).
- [9] S.H. Song, C.C. Teng, C.M. Sung and C.T. Lin, *Journal of Nanomaterials*, **2009**.
- [10] P. Gonon, E. Gheeraert, A. Deneuve, L. Abello, G. Lucazeau, *Diamond and Related Materials*, **1993**. 2, (5-7), 742-745.
- [11] D. Ballutaud, S. Ghodbane\*, F. Omnès, C. Agnès, *Diamond & Related Materials*, **2010**. 19, 630–636.
- [12] C. Agnes, *Thèse de doctorat*, **2009**. Université Joseph fourier, Grenoble.
- [13] E. Vanhove, *Thèse de doctorat*, **2010**. Université Joseph Fourier Grenoble.
- [14] J. de Sanoit, E. Vanhove\*, P. Mailley, M.A. Pinault, F. Jomard and P. Bergonzo, *Phys. Status Solidi A*, **2009**. 206, (9), 2063–2069.
- [15] S. Praver and C.J. Rossouw, *J. Appl. Phys.*, **1988**. 63, (9), 4435-4439.
- [16] M. Knupfer, S.Waidmann\*, J. Fink, B. Kleinsorge, J. Robertson, *Diamond and Related Materials*, **2000**. 9, 722–727.
- [17] F. Klauser, X. Liu, N. Memmel\*, E. Bertel, T. Pichler, M. Knupfer, A. Kromka, D. Steinmüller-Nethl, *Diamond & Related Materials*, **2007**. 16 1463–1470.
- [18] T. Tanabe, N. Kangai, K. Niwase, *Journal of Nuclear Materials* **1994**. 212, 1234-1238.
- [19] T. Miyasato, Y. Mizokawa, S. Nakamura, K. M. Geib and C. W. Wilmsen, *Surface Science*, **1987**. 182, 431-438.
- [20] W. Kulisch, C. Popov, S. Bliznakov, B. Mednikarov, G. Spasov, J. Pirov, M. Jelinek, T. Kocourek, J. Zemek, *Appl. Phys. A*, **2007**. 89, 209–212.
- [21] Ralph G. Nuzzo, Stuart T. Jackson\*, *Applied Surface Science*, **1995**. 90 195-203.
- [22] E.M. Baitinger, M.M. Brzhezinskaya\*, V.V. Shnitov, *Physica B*, **2004**. 348, 95–100.
- [23] A. Gutiérrez, I. Garcia, A. Vazquez\*, *Surface and Coatings Technology*, **1996**. 88, 172-177.
- [24] P.H. Solomon, K. Nakanishi, dans "*Infrared Absorption Spectroscopy, 2nd edition*", **1977**. Ed. Holden-Day, (Oakland (U.S)).
- [25] L.H. Daly, N.B. Colthup, S.E. Wiberley, dans "*Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy*", **1964**. Ed. Academic Press, (New York and London).
- [26] T. Jiang and K. Xu, *Carbon*, **1995**. 33, (12), 1663-1671.
- [27] J. de Sanoit, E. Vanhove, J.C. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Nesladek, *Physica Status Solidi A-Applications and Materials Science*, **2007**. 204 (9), 2931-2939.

### III. La fonctionnalisation du Diamant

Le diamant est considéré depuis très longtemps comme un matériau inerte chimiquement et on a ainsi pensé à tort jusqu'il y a peu que la fonctionnalisation contrôlée de sa surface n'était pas envisageable. Or, le développement extensif des techniques de caractérisation de surface (XPS, spectroscopies Auger, Raman, FTIR ...) a depuis peu permis de comprendre que la chimie de surface du diamant existait bel et bien, ce qui a ainsi ouvert largement la voie de l'ingénierie de sa fonctionnalisation chimique dans la période récente. Il est à ce titre intéressant de noter que de nombreuses techniques de fonctionnalisation de surface du diamant utilisées aujourd'hui proviennent de méthodes déjà utilisées sur d'autres semi-conducteurs, la surface carbonée du diamant, de coordination  $sp^3$ , offre également dans ce domaine des possibilités bien plus étendues qui dérivent directement pour certaines d'entre elles de la chimie organique.

#### III.A. Terminaisons chimiques de surface du Diamant

La croissance du diamant, qui s'effectue en milieu plasma microondes  $CH_4/H_2$ , utilise une très forte concentration en hydrogène atomique dans le plasma de manière à éliminer les phases non-diamant de coordination  $sp^2$  et privilégier la coordination de type  $sp^3$ . De plus, le processus de croissance se termine généralement par un plasma d'hydrogène pur, de telle sorte qu'on obtient une surface parfaitement hydrogénée. C'est pour cette raison que les échantillons diamant sont donc fortement hydrophobes à l'état natif en sortie du bâti de croissance. Contrairement aux autres semi-conducteurs (silicium en particulier), la surface hydrogénée du diamant est chimiquement très stable et surtout reste très faiblement sensible à l'oxydation, notamment à l'air ambiant ou dans l'eau. Comme nous allons le voir, cette propriété-clé spécifique nous permet d'effectuer les processus chimiques de greffage de surface sans précautions particulières sous atmosphère ambiante et nous donne également la possibilité de travailler en solvant aqueux.

Comme nous l'avons vu dans la partie II.F du chapitre I aux travers des différentes caractérisations de surface (XPS [1], Raman [2], FTIR), les fonctions de surface du diamant

hydrogéné sont majoritairement des  $\text{CH}_x$  ( $x=1, 2$  ou  $3$ ). Néanmoins, comme cela a été récemment reporté par Vanhove al. [3], [4] et comme nous l'avons montré, le diamant s'oxyde à l'air pour atteindre un taux d'oxydation d'équilibre au bout de plusieurs semaines. Cependant, même après cette oxydation 'naturelle', le diamant possède encore une majorité de fonctions hydrogénées. Il existe une grande variété de terminaisons de surface sur le diamant (Figure III- 1). Contrairement au silicium et à d'autres semi-conducteurs, celles-ci sont stables à l'air une fois formées comme nous l'avons déjà évoqué.

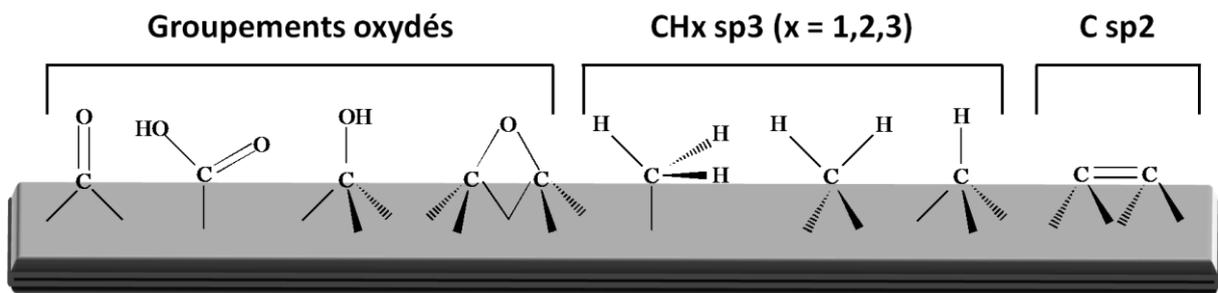


Figure III- 1 : Terminaisons de surface du diamant.

Le cas des phases  $\text{sp}^2$  et non diamant est trop complexe pour pouvoir être détaillé sur cette représentation. Toutefois le cas de l'échantillon oxydé 'naturellement' abordé dans la partie II.F du chapitre I, montre bien la complexité et le mélange de fonctions de surface présente lors d'une oxydation non maîtrisée. On peut en revanche, comme nous allons le voir, générer majoritairement d'une manière volontaire, presque tous les types de fonctions oxygénées de surface en effectuant un traitement oxydant ciblé. Cependant, contrairement au cas des nanoparticules de diamants où ils sont souvent dominants en proportion [5], il reste notoire que seuls les groupements carboxyles ne peuvent pas être obtenus en grande proportion sur diamant. Il faut souligner que l'orientation cristalline joue un rôle prédominant sur le type de groupement de surface. Cet effet privilégie donc l'usage de surfaces de diamant monocristallin d'orientations bien définies (en particulier les (100) et (111)) pour l'étude de ces phénomènes et pour pouvoir mieux développer les modèles, les études publiées ont donc été menées quasi-exclusivement sur diamant monocristallin. Dans le cas des couches polycristallines de diamant telles que nous les avons utilisées pour nos études, on retiendra surtout que le mélange des orientations cristallines des faces dans le polycristal y produit d'une manière quasi-systématique en surface un mélange des différentes fonctions oxydées.

Parmi les groupements oxygénés de surface du diamant, les groupements carbonyles sont d'un intérêt particulier pour réaliser les greffages covalents de molécules organiques. On peut générer volontairement ceux-ci d'une manière massive par les moyens suivants :

- Plasma oxygène [6]

Goeting et al. ont effectué différents traitements oxydants sur des échantillons diamant polycristallins hydrogénés puis ont caractérisé les fonctions de surface générées par XPS. Ils ont mis en évidence dans leur étude que le traitement par plasma oxygène radiofréquence engendre majoritairement la formation de groupements de surface carbonyles. Ce plasma est réalisé sous dioxygène à une pression de 4 mBar, avec une puissance de 320 W pendant une heure.

- Anodisation (100) [7]

L'anodisation est un traitement électrochimique (passivation catalytique) couramment effectué sur les métaux, qui permet de générer une couche d'oxyde sur la surface du matériau visant à le protéger de la corrosion. Notsu et al. ont procédé à une oxydation anodique d'un échantillon diamant polycristallin hydrogéné en appliquant un potentiel de + 2,4V vs Ag/AgCl pendant une heure dans une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M. Les analyses XPS effectuées sur l'échantillon ont montré que les principales fonctions oxydées qu'engendre ce traitement sont des carbonyles. Ils ont également mis en évidence une diminution de la phase sp<sup>2</sup> initialement présente en surface du diamant.

- Procédé thermique (100) [8]

John et al. ont procédé à l'oxydation thermique d'échantillons diamant monocristallin (100). L'échantillon est chauffé à une température de 500°C pendant 4 heures sous une pression en dioxygène variable comprise entre 11 et 760 torrs. Les caractérisations XPS et Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFT) montrent que les fonctions majoritaires présentes après traitement sont les carbonyles.

Les groupes hydroxyles de surface sont également intéressants pour les applications nécessitant une étape de greffage. Différentes techniques permettent de les élaborer :

- Procédés électrochimiques multiétapes (111) [9]

Le procédé consiste à l'anodisation d'échantillons diamant hydrogénés dans les mêmes conditions que celles que nous avons décrites plus haut. Ce traitement induit la formation de groupements carbonyles sur la surface du diamant. Il s'en suit une polarisation

cathodique à  $-1,5V$  vs Ag/AgCl dans une solution de  $HClO_4$  0,1M pendant 30 min. Après caractérisation XPS, Notsu et al. ont montré l'apparition de fonction hydroxyles et la disparition des fonctions carbonyles. De plus ce procédé étant réversible, on peut en procédant à une nouvelle anodisation, régénérer les fonctions carbonyles initialement présentes.

- Oxygène singulet [10]

Dans cette étude Delabouglisse et al. ont montré que soumettre un échantillon diamant polycristallin à de l'oxygène singulet induit majoritairement la formation de groupements hydroxyles en surface du diamant. La formation de l'oxygène singulet a été effectuée par voie chimique en réalisant une solution de  $H_2O_2$  et  $HClO_4$  en quantité équimolaire.

- Ozonation [11]

Boukherroub et al. ont mis en évidence par XPS qu'un échantillon diamant soumis à une illumination U.V sous air pendant deux heures permet d'obtenir une surface oxydée où les groupements hydroxyles prédominent sur les autres types de fonctions.

- Photochimie sous oxygène [12]

Ce traitement est similaire au précédent, à la différence qu'il nécessite l'utilisation d'une lampe Vacuum Ultra Violet (VUV) émettant à une longueur d'onde de 172 nm. Ohta et al. ont également mis en évidence que le traitement génère majoritairement des fonctions hydroxyles.

- Ferricyanure dans KOH [13]

Simon et al. ont procédé à l'oxydation d'échantillons diamant polycristallins en les immergeant dans une solution composée de ferricyanure à 0,3M et de KOH 0,5M. Les analyses XPS ont montré que ce traitement génère une forte quantité de fonctions hydroxyles de surface. Plus le temps de contact entre la solution et le diamant est long, plus le nombre de groupement OH est important.

- Plasma oxygène (100) [14]

Dans cette étude, Hoeb et al. ont utilisé un système de plasma basse pression industriel (TePla) pour oxyder des échantillons diamant monocristallins (100) et microcristallins. Le traitement a été réalisé sous une pression de dioxygène de 1,4 mBar avec une puissance de 300W pendant 300sec. Les caractérisations XPS montrent que les fonctions de surface oxydées sont composées à 80% de groupements hydroxyles et à 20% de groupements

carbonyles. Il est bon de souligner que les traitements décrits ci-dessus permettent l'obtention d'un groupement de surface majoritaire qui n'est en aucun cas unique [14]. On retrouve, par exemple, systématiquement, des ponts éthers pour tout type de traitement oxydant et ces derniers, tout comme la silice, sont inertes et passivent la surface du diamant.

## III.B. Etat de l'art

Du fait de la diversité de fonctions de surface du diamant, on trouve un grand nombre de voies de fonctionnalisation différentes. Nous allons ici détailler ces différentes méthodes en fonction des groupements de surface ciblés.

### III.B.1. Fonctionnalisation via les groupements oxydés

Les traitements oxydants engendrent un pourcentage élevé de groupements hydroxyles. C'est pour cette raison que ce sont les fonctions de surface oxydés les plus utilisées. Les groupements hydroxyles permettent d'employer une des méthodes de fonctionnalisation les plus répandue, la silanisation. Cette méthode a été adaptée des travaux préexistants sur silicium [15, 16]. Elle permet en théorie, en utilisant des chaînes alcanes longues, d'obtenir des SAMs (Self-Assembled Monolayers) illustrées sur la Figure III- 2. Bien que les travaux sur silicium [17] montrent que la présence d'hydroxyles en surface n'est pas nécessaire et que la présence d'un minimum d'eau est requise, toutes les silanisations sur diamant sont effectuées sur des surfaces hydroxylées. Les monocouches ainsi générées sont extrêmement compactes. Cela permet dans le cas de l'APTES d'apporter un grand nombre de fonctions amines disponibles pour une post-fonctionnalisation [18-20], mais cela confère aussi une grande stabilité à la couche du fait des liaisons inter-chaînes. Il faut tout de même noter que cette méthode aboutit souvent à la formation de multicouche, en particulier lors de l'utilisation de composés ayant comme groupe terminal une amine.

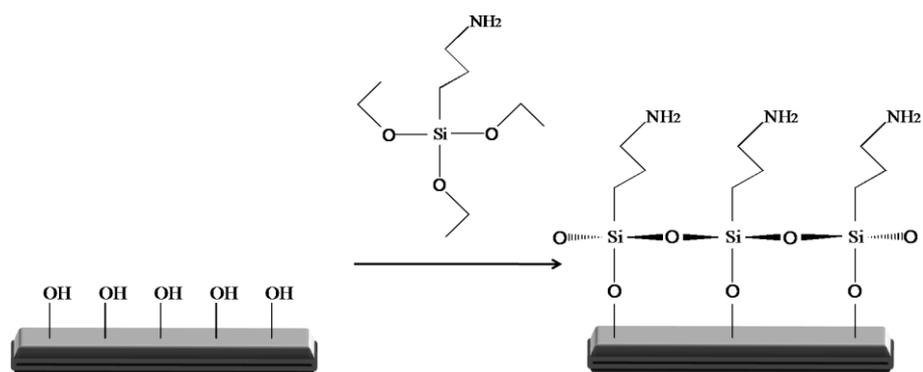


Figure III- 2 : Schéma illustrant la réaction de silanisation entre un alcoxysilane (APTES) et les groupements hydroxyles de la surface du diamant.

Une autre méthode de fonctionnalisation utilisant les hydroxyles de surface est l'estérification. Cette technique issue de la chimie organique, consiste en la réaction entre un groupement carboxylique et un alcool pour former un ester. Delabouglisse et al. [10] ont ainsi pu immobiliser une molécule d'intérêt : la biotine (Figure III- 3). L'avantage de cette technique réside dans sa simplicité et convient parfaitement pour les applications biologiques nécessitant des conditions tamponnées à pH neutre. Une des limites est liée à la labilité de la liaison ester formée, qui pourra s'hydrolyser dans des milieux acide ou basique.

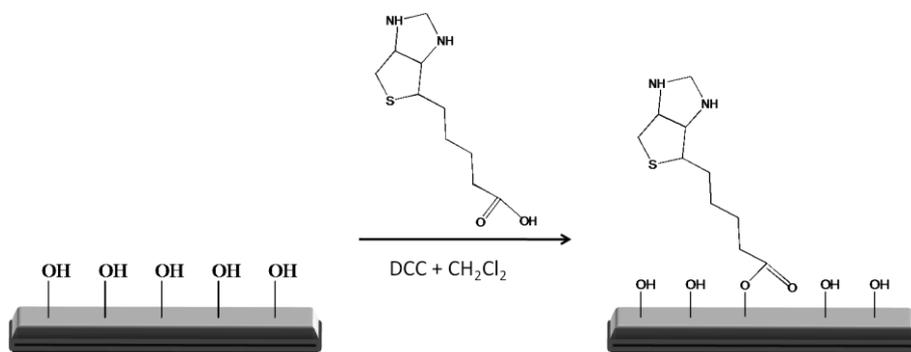


Figure III- 3 : Schéma représentant la réaction d'estérification de la surface de diamant hydroxylée avec la biotine.

Une autre voie de fonctionnalisation utilisant les fonctions hydroxyles de surface se base sur la chimie de coordination du zirconium. La première étape est une phosphatation par réaction entre le trichlorure de phosphore et les fonctions hydroxyles portées par la surface du diamant. Le phosphate introduit sur la surface peut être utilisé pour complexer le Zirconium (Figure III- 4). Il est ensuite possible de rajouter une molécule comportant un ligand avec un pouvoir complexant équivalent à celui des ions hydroxydes, pour qu'elle vienne à son tour complexer le métal. Mazur et al. [21] ont ainsi immobilisé des cycles

aromatiques à travers un ligand carboxylate. L'inconvénient de cette technique est le faible éventail de choix du ligand à apporter. C'est en revanche une méthode versatile qui permet par simple ajout d'EDTA, de facilement retirer le groupement final et d'en introduire un nouveau.

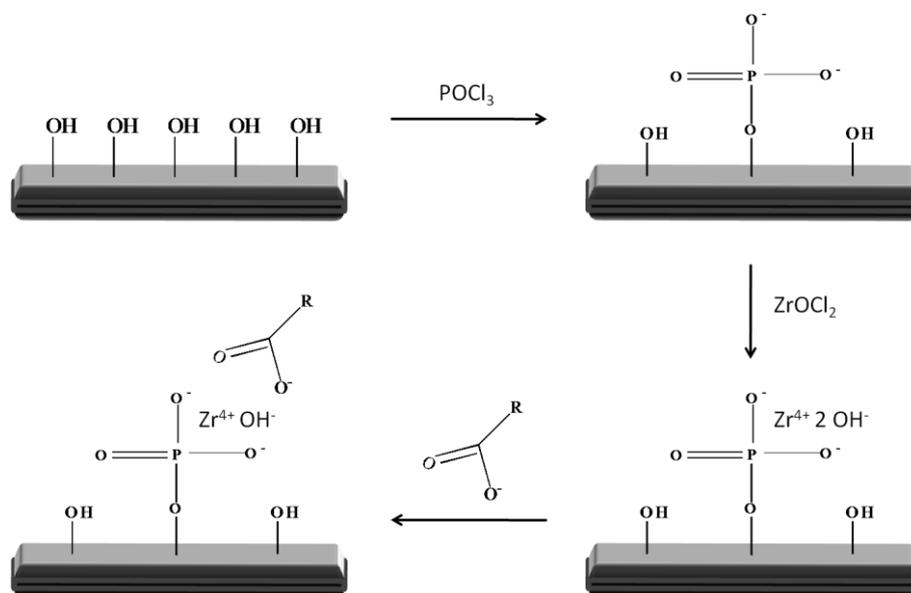


Figure III- 4 : Représentation schématique montrant la phosphatation des groupements hydroxyles par traitement au trichlorure de phosphore, suivi de la complexation des ions zirconium par les groupements phosphates de la surface du diamant. Enfin, l'introduction d'un composé comportant une fonction carboxylate vient chélater l'ion zirconium.

Hoeb et al. [14] ont également utilisé les groupements hydroxyles pour procéder au greffage des alcènes. Tout comme le greffage par photochimie, cette méthode utilise un alcène mais nécessite également une activation thermique (Figure III- 5). Cette réaction s'apparente fortement à l'hydrosilylation sur silicium, à la différence que sur silicium une terminaison de surface hydrogénée est requise. La stabilité de cette liaison est inconnue car le type de la liaison obtenue n'a pas encore été mis en évidence.

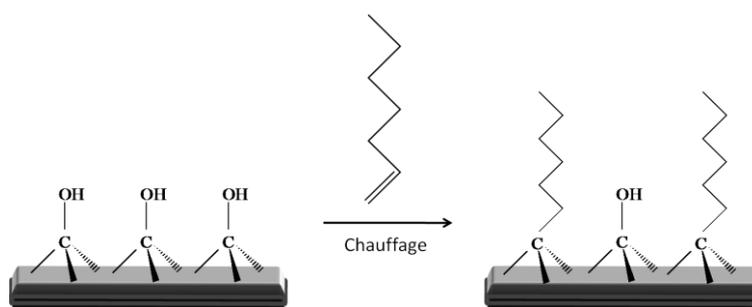


Figure III- 5 : Réaction d'alkylation thermique des alcènes sur une surface de diamant hydroxylée.

Il existe une dernière méthode de fonctionnalisation faisant intervenir des fonctions de surface oxydées. Elle est la seule impliquant les groupements carbonyles. Cette méthode consiste au couplage entre une molécule portant une fonction hydrazine et les carbonyles de surface et conduit à la formation d'une liaison hydrazone. Notsu et al. [7] ont couplé le DNPH (2,4-dinitrophénylhydrazine) sur diamant (Figure III- 6). Cette réaction issue de la chimie organique a beaucoup d'intérêt dans le domaine des « Drug delivery ». En effet, cette liaison est stable à pH neutre mais se clive très rapidement en milieu acide. Il est donc envisageable de fonctionnaliser des nanoparticules de diamant avec des molécules d'intérêt (protéine, peptide, anticorps, antibiotique...) en utilisant cette méthode. Ces dernières peuvent alors être relarguées dans des zones ciblées du corps humain. On peut immédiatement penser à l'action catalytique des lysosomes qui sont des organites présents dans le cytosol de toutes les cellules et dont le pH est maintenu entre 3,5 et 5.

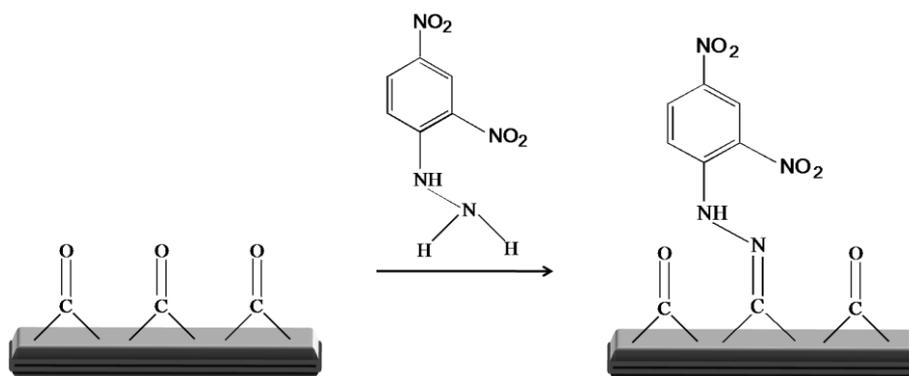


Figure III- 6 : Schéma de fonctionnalisation de la surface du diamant par réaction entre la DNPH et les carbonyles.

Nous avons vu les différentes techniques de fonctionnalisations existantes mettant en jeu les groupements oxydés de la surface du diamant. Il faut noter que la plupart des liaisons mises en jeu n'affichent pas une très grande stabilité.

### III.B.2. Fonctionnalisation via les surfaces reconstruites

La reconstruction de surface est un processus largement étudié sur silicium [22, 23], qui a été transposé sur diamant. Le processus de reconstruction consiste au chauffage des échantillons sous vide. Cela induit une restructuration de la surface du matériau conduisant à

la formation de dimère en surface C=C. Il est ensuite possible de procéder à une réaction de Diels-Alder ; ce sont des cycloadditions [4+2] et [2+2] (Figure III- 7.a et b). Ces réactions proviennent également de la chimie organique. Hovis et al. [24] ont immobilisé des cyclopentènes (Figure III- 7.c) sur diamant monocristallin (100). L'avantage de ce greffage est la formation de liaisons C-C très stables qui offre la possibilité en modifiant les alcènes initiaux d'apporter un groupement d'intérêt utilisable pour une post-fonctionnalisation. Ce type de processus demeure tout de même très lourd à mettre en place car les surfaces reconstruites nécessitent de porter les échantillons à des températures élevées sous vide secondaire. De plus cet état de surface n'étant pas stable sous air, il requiert que la réaction de cycloaddition se déroule sous atmosphère inerte, impliquant que l'enceinte utilisée pour la reconstruction soit directement reliée à celle de couplage.

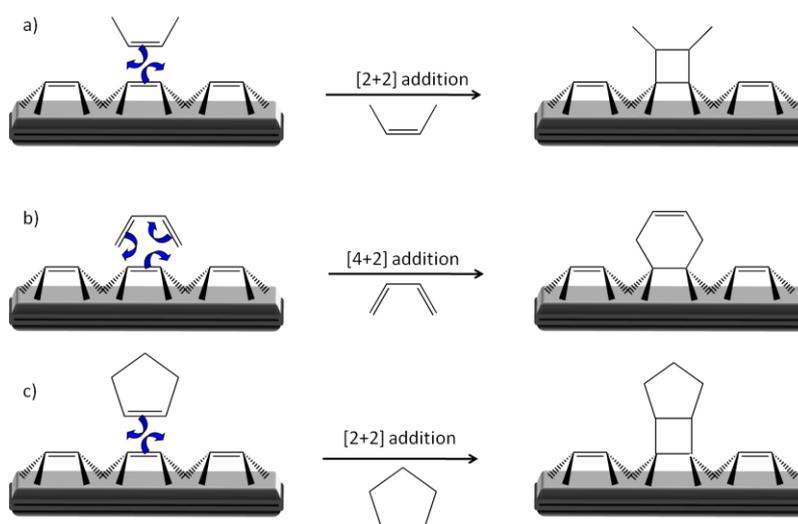


Figure III- 7 : Schéma de principe des réactions de cycloadditions de type Diels-Alder b) [4+2], a) et c) [2+2].

### III.B.3. Fonctionnalisation via d'autres groupements de surface

Les fonctions de surface hydrogénées et oxydées ne sont pas les seules fonctions existantes sur diamant. On peut y introduire des fonctions halogénées et aminées. Freedman [25] a effectué une chloration/fluoruration d'échantillons diamant monocristallins (100) en portant leur température à environ 470°C sous un flux de gaz (Cl<sub>2</sub> ou F<sub>2</sub>) sous vide (Figure III- 8.a). Il existe une autre méthode de chloration décrite par Ando et al. [26] (Figure III- 8.b). Elle est basée sur l'illumination du diamant par une source U.V (274 nm) sous un flux de chlore gazeux pendant 24 heures. Ils ont ensuite substitué les chlores de surface en soumettant

l'échantillon au même rayonnement que précédemment mais sous un flux d'ammoniac gazeux, obtenant ainsi une surface aminée.

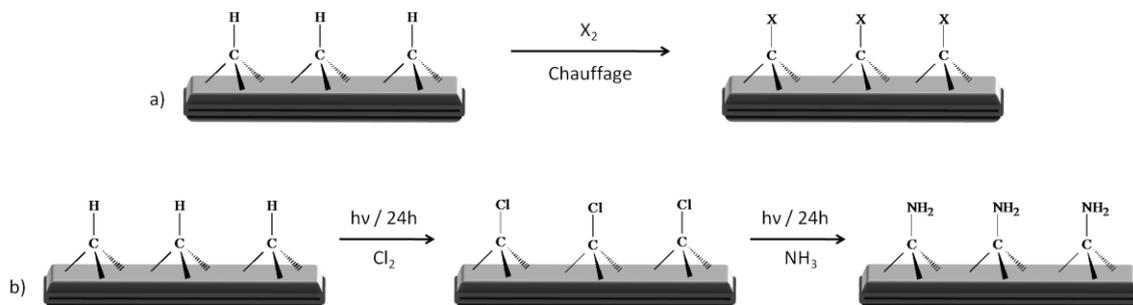


Figure III- 8 : a) l'halogénéation thermique de surface du diamant, b) chlorination de la surface du diamant par photochimie, suivi d'une amination.

Plusieurs groupes ont par la suite utilisé les amines de ces surfaces modifiées pour effectuer une post-fonctionnalisation. Zhang et al. [27] les ont couplées avec du glutaraldéhyde, apportant ainsi un groupement aldéhyde terminal (Figure III- 9.b). Il est également possible d'effectuer un couplage classique avec un acide carboxylique [28] (Figure III- 9.c). Enfin on peut introduire des amines de surface en procédant à un plasma sous ammoniac [29], puis coupler ces amines avec une hydrazine modifiée conduisant à la formation d'une fonction terminale semicarbazide (Figure III- 9.a).

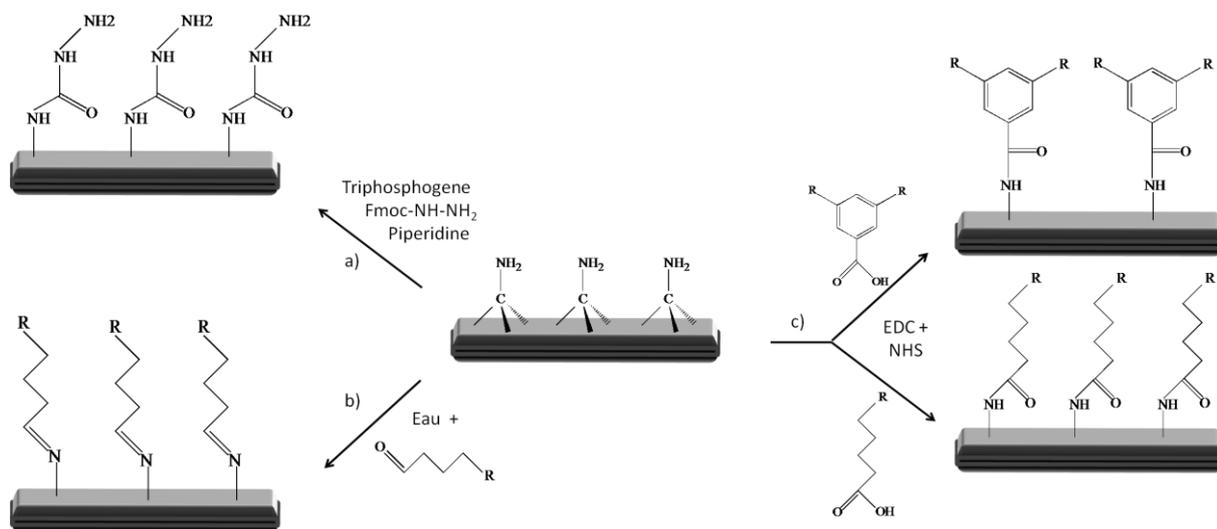


Figure III- 9 : Couplage de la surface du diamant aminée avec différentes fonctions : a) chloroformate, b) aldéhyde, c) acide carboxylique.

La modification de surface par des fonctions amines permet d'envisager un grand nombre de couplages en se référant aux méthodes existantes issues de la chimie organique. De plus, l'introduction de ces groupements de surfaces peut être utilisée pour modifier la mouillabilité de la surface.

### **III.B.4. Fonctionnalisation des surfaces hydrogénées**

Par rapport aux états de surface oxygénés évoqués précédemment, travailler sur des surfaces hydrogénées constitue un réel gain de temps. En effet, le diamant sorti de bâti ou conservé sous air présente un état de surface hydrogéné à l'état naturel, ne nécessitant donc aucun traitement de surface particulier ultérieur. La technique que nous allons maintenant décrire est la fonctionnalisation électrochimique des sels de diazonium, largement répandue mais qui nécessite l'utilisation de substrats électriquement conducteurs qui servent d'électrode électrochimique. L'utilisation de cette technique a été développée par Swain et al. [30], à partir des travaux menés par Pinson et al. [31] sur carbone vitreux. On effectue d'abord, à proximité de l'électrode, la réduction électrochimique du groupement diazonium, ce qui induit la libération de diazote gazeux en solution et la formation d'un radical sur le cycle benzénique. Le radical ainsi formé, peut ensuite réagir sur la surface de l'électrode pour y réaliser un greffage covalent. Même si le choix des positions ainsi que le type des groupements R substitués a un effet sur la délocalisation des électrons de valence et influe donc la stabilité chimique du radical, la durée de vie du composé radicalaire reste néanmoins non négligeable et peut ainsi conduire à une réaction (non nécessairement souhaitée) de polymérisation. C'est pour cette raison que cette technique conduit assez systématiquement à la formation d'une multicouche (Figure III- 10.a)

Pour pallier à cette difficulté, Garrido et al. [32] ont mis au point avec succès une technique qui permet de fonctionnaliser des surfaces de diamant hydrogénées avec les sels de diazonium sans l'assistance de l'électrochimie (Figure III- 10.b). Cette technique, plus simple dans son principe, nécessite seulement la mise en contact des sels avec le substrat de diamant hydrogéné. En revanche, le temps de greffage nécessaire pour l'obtention d'une monocouche est de 70 heures. C'est le pouvoir réducteur des fonctions de surface du diamant hydrogéné qui permet la réduction des sels de diazonium. Cette caractéristique particulière du diamant sera abordée en détail dans la partie III.D de ce chapitre.

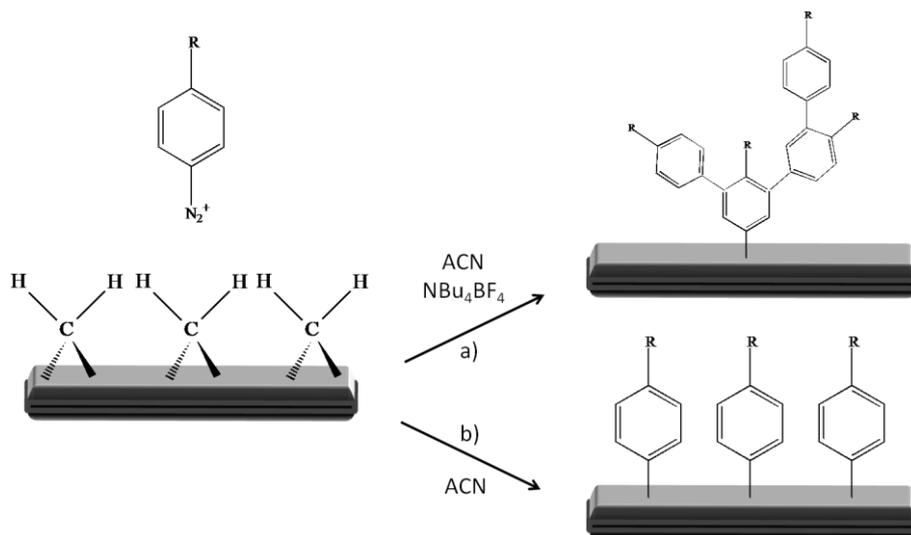


Figure III- 10 : Schéma de principe illustrant le greffage des sels de diazonium sur la surface de diamant, a) par voie électrochimique, b) par voie chimique.

La dernière technique de fonctionnalisation basée sur les groupements de surface hydrogénés est le greffage photochimique des alcènes. Cette technique consiste à recouvrir le diamant avec l'alcène par spin coating, puis à l'illuminer par un rayonnement U.V à 254 nm pendant 6 heures (Figure III- 11). L'illumination U.V forme un radical sur le groupement alcène et induit la création d'une lacune électronique (trou de charge positive) dans le diamant. C'est la combinaison des deux effets qui permet le greffage. Il faut garder à l'esprit que le radical formé sur l'alcène est très réactif. Il peut donc réagir sur une autre molécule en solution ou déjà immobilisée sur le substrat et ainsi conduire à la formation de multicouches. Le contrôle du temps de greffage est donc nécessaire lorsqu'on choisit d'utiliser cette méthode de greffage. De plus, le rayonnement U.V peut dégrader le groupement fonctionnel que l'on cherche à introduire via la fonctionnalisation. Cela limite donc le choix des molécules que l'on peut immobiliser. A titre d'exemple, Hamers et al. [33] ont immobilisé un alcène comportant un groupement terminal Trifluoracetamide, qui est en fait une amine protégée. La protection de l'amine est nécessaire afin qu'elle ne soit pas détériorée durant l'insolation. Il y a donc une étape de déprotection supplémentaire pour pouvoir effectuer la post-fonctionnalisation. Une solution est d'utiliser un groupement terminal carboxylique [34], insensible au rayonnement U.V. il permet en effet d'éviter l'étape de protection et de le coupler directement avec une amine.

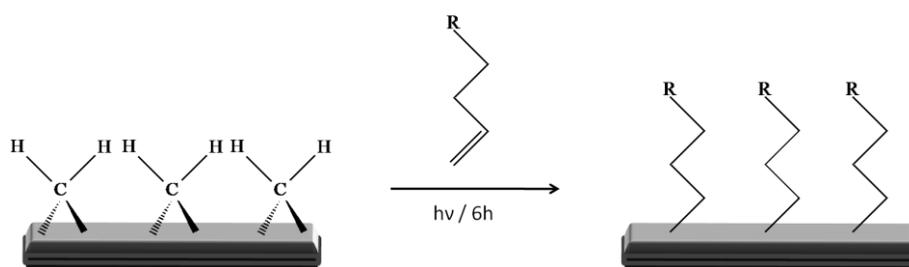


Figure III- 11 : Schéma illustrant le greffage des alcènes par photochimie sur diamant hydrogéné.

Comme nous l'avons vu, toutes les méthodes de fonctionnalisation n'offrent pas la même stabilité des molécules greffées, qui bien évidemment dépend de la stabilité chimique du lien covalent directement formé avec la surface diamant elle-même. Les liaisons formées les plus solides sont les liaisons covalentes C-C obtenues à partir des procédés de greffage sur les substrats de diamant hydrogénés. On peut également remarquer que les temps nécessaires à la mise en œuvre de ces fonctionnalisations sont dans tous les cas longs et donc la plupart du temps peu compatibles avec les contraintes inhérentes aux processus industriels de fabrication. En outre, toutes ces techniques nécessitent au moins trois étapes pour pouvoir immobiliser des molécules d'intérêt biologique. De plus la majorité des voies de fonctionnalisation usuelles (Photochimie des alcènes, électrochimie des diazoniums) ne permettent pas de contrôler la quantité de molécules immobilisées, induisant donc la perte des propriétés de la surface du diamant et en particulier ses caractéristiques électrochimiques. Le Tableau II- 2 dresse les avantages et inconvénients des principales méthodes décrites dans cette partie.

Méthode	Avantages	Inconvénients	Référence
UV-Alcène	Adressable, Stabilité, Echantillon dopé ou intrinsèque	Long Multi-étapes	[33, 35]
Diazonium voie Electrochimique	Adressable, Stable, Rapide	Echantillon dopé, Multicouches, Multi-étapes	[36, 37]
Diazonium voie Chimique	Monocouche, Stable	Long, Multi-étapes	[32]
Amination	Monocouche, Mono-étape, Stable, Echantillon dopé ou intrinsèque, Adressable	Long, Multi-étapes	[38, 39]
Silanisation	Echantillon dopé ou intrinsèque	Multi-étapes, Multicouches, Instable	[18]
Estérification	Mono-étape	Long, Instable	[10]

*Tableau II- 2 : Tableau récapitulatif comparant les avantages et inconvénients des différentes techniques de fonctionnalisation existantes sur diamant.*

Une des premières limitations de ces techniques est l'aspect multi-étapes, qui rend impossible la parallélisation massive des dépôts, allonge le temps de mise en œuvre et complique la conception du dispositif. De plus, aucune des méthodes abordées ne permet d'immobiliser en une étape des molécules d'intérêt. C'est à partir de ce constat que nous avons cherché à mettre au point une nouvelle voie de fonctionnalisation répondant à plusieurs critères. Elle devra tout d'abord permettre l'immobilisation directe et spontanée de molécules d'intérêt biologique, ce qui implique de travailler en solvant aqueux dans des conditions « douces », c'est-à-dire dans un environnement proche des milieux physiologiques en termes de pH, température, salinité. D'autre part, l'utilisation d'un apport d'énergie extérieure tel qu'un rayonnement U.V où l'électrochimie est exclu car il pourrait endommager certaines espèces biologiques (ADN, protéine...). Pour pouvoir envisager la fonctionnalisation en une seule étape de peptide, protéine ou enzyme, il faut donc faire appel à un groupement fonctionnel commun à toutes ces espèces. On peut penser au soufre qui est présent dans la majorité des protéines, au groupement carboxyliques ou encore aux amines. Enfin on doit

pouvoir à travers cette technique, contrôler la quantité d'espèces immobilisée. Le diamant possède des propriétés électrochimiques exceptionnelles qui sont fortement altérée lors de la formation de monocouches compactes.

Nous avons donc mis au point une nouvelle méthode de fonctionnalisation nous permettant de ne pas être confronté aux limitations inhérentes aux différentes méthodes de fonctionnalisation abordées dans cette partie.

### III.C. Greffage spontané des amines sur Diamant

#### III.C.1. Le modèle biologique : Biotine-Avidine

Une partie importante de l'étude est basée sur le greffage d'une molécule d'intérêt biologique : la Biotine. La biotine, de par sa reconnaissance spécifique de l'avidine, constitue un modèle biologique. La biotine, ou vitamine H ou B<sub>8</sub> (Figure III- 12.a), est une vitamine hydrosoluble qui est stable à la chaleur, en solution aqueuse, et surtout peu sensible à l'oxydation. De plus, elle permet l'immobilisation d'un grand nombre d'espèces de manière générique (peptide, protéine, enzyme...) à travers le couplage biotine-Avidine (Figure III- 12.c). Nous avons donc basé le développement de cette nouvelle méthode de fonctionnalisation sur ce modèle biologique. C'est au travers des modifications successives des conditions de greffage de la biotine que l'optimisation des paramètres de cette nouvelle de fonctionnalisation a été possible. L'avidine (Figure III- 12.d) est une glycoprotéine tétramérique que l'on trouve dans le blanc d'œuf. Chaque monomère constitue un site de reconnaissance pour une molécule de biotine. Une particularité remarquable de ce couple est la très faible valeur de sa constante de dissociation  $K_d = 10^{-15}$  M, en faisant l'une des liaisons non covalentes les plus fortes. La solidité du lien entre la biotine et l'avidine résulte des nombreuses liaisons hydrogènes formées lors de la reconnaissance entre ces dernières (Figure III- 12.c). Néanmoins cette liaison peut être rompue en dénaturant (perte de structure tertiaire et secondaire d'une protéine) l'avidine par l'intermédiaire de différents traitements (acide-base, surfactant, solvants organiques, chauffage...). On peut ainsi régénérer la surface biotinylée et réutiliser le même échantillon pour différentes expériences.

Il existe plusieurs voies pour immobiliser des objets biologiques à travers le couple biotine-avidine. La première consiste en l'utilisation de l'Avidine modifiée par une espèce d'intérêt. On trouve en effet dans le commerce une grande variété de protéine (enzyme, anticorps, fluorophore...) liées à l'avidine. Nous utiliserons la Streptavidine- R-phycoérythrine (conf. partie III.C.3) et une enzyme conjuguée : l'avidine-HRP (conf. partie III.G). On peut donc, après le greffage de la biotine sur substrat, procéder à l'immobilisation de l'avidine par simple reconnaissance.

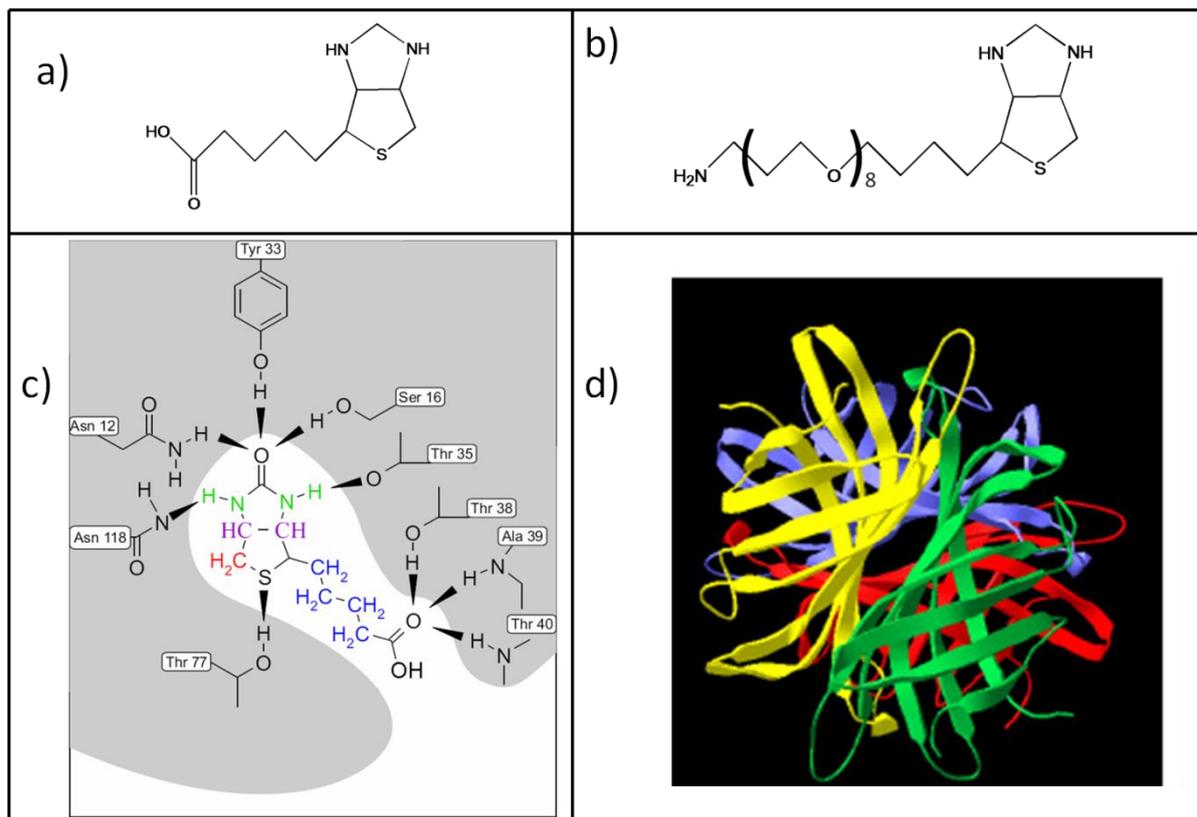


Figure III- 12 : a) Formule topologique de la biotine et b) biotine(peg)<sub>8</sub> aminée. c) Schéma d'un des quatre sites de liaison de la biotine avec l'avidine illustrant les différents acides aminés impliqués dans la reconnaissance, d) Structure de l'avidine.

L'avidine possédant quatre sites de reconnaissance de la Biotine identiques, on peut par la suite immobiliser une nouvelle molécule d'intérêt et même procéder à des empilements multicouches Figure III- 13. Ce type d'empilement peut par exemple être utilisé pour immobiliser des couches successives d'enzymes pour la conception de biocapteurs. Cosnier et al. [40] ont ainsi immobilisés la Glucose Oxydase (GOx) et l'Alcaline Phosphatase (AkP), pour créer un biocapteur ampérométrique à glucose et phenylphosphate respectivement. Le

couple biotine-avidine constitue un modèle biologique et la Biotine sera utilisée comme une molécule générique qui permettra l'immobilisation de diverses espèces biologiques.

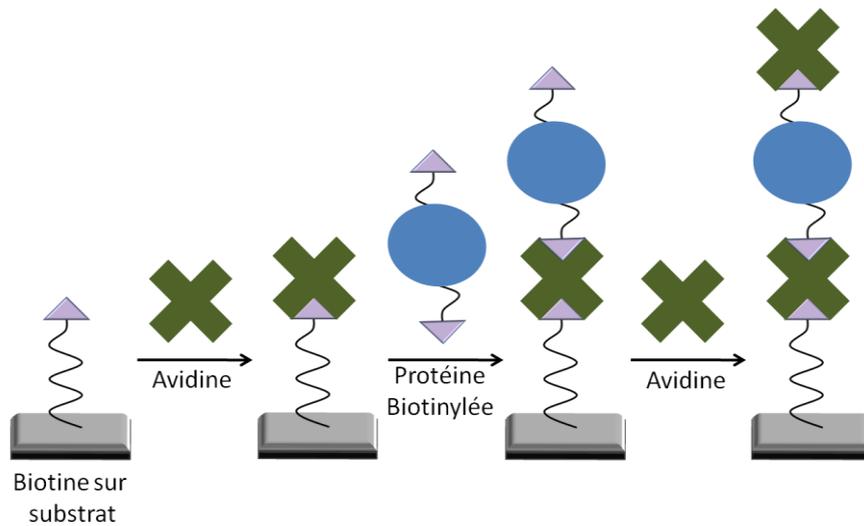


Figure III- 13 : Schéma de principe illustrant un empilement multicouche sur un substrat biotinylé, d'une espèce d'intérêt biotinylée, basé sur les propriétés de reconnaissance biotine-Avidine.

### III.C.2. Le drop-casting

La technique du drop-casting a été utilisée dans la première phase de caractérisation du greffage. Elle consiste au dépôt de gouttes de tailles variables sur le substrat et permet de paralléliser le greffage. Le CREAB dispose de deux appareils automatisés utilisés pour ce type de dépôt ; le premier projette la solution à déposer sous forme de spray, la taille des gouttes obtenues étant de l'ordre de la centaine de micromètres. L'appareil de dépôt utilisé pour cette étude est quant à lui constitué d'un bras mobile automatisé surmonté d'une aiguille de taille variable servant de réservoir, préalablement remplie par la solution à déposer (Figure III- 14) et que l'on place en contact avec le substrat. Après le retrait de l'aiguille, il se forme une goutte de quelques centaines de pico litres et d'une taille comprise entre 300 et 600  $\mu\text{m}$  de diamètre. Cet appareil automatisé comporte un dispositif de lavage et séchage permettant de paralléliser les plots avec des solutions de greffages différentes.

Le drop casting permet donc de procéder à la mise en œuvre de matrices de plot multiparamétriques et constitue ainsi un outil de choix pour l'optimisation des conditions de greffage

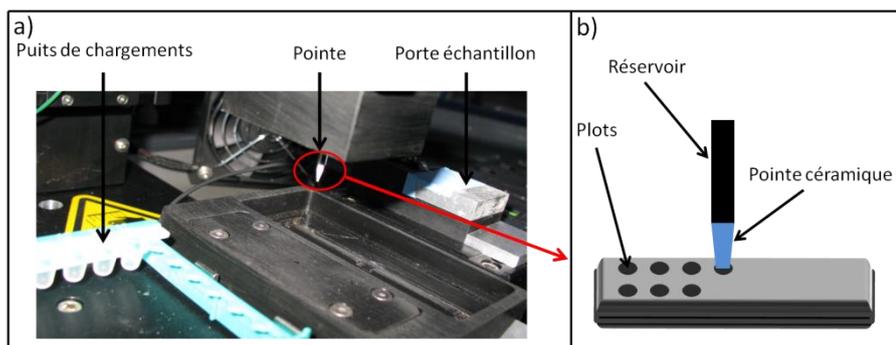


Figure III- 14 : a) Photo de l'appareil automatisé dédié aux dépôts par drop casting, b) Schéma de l'aiguille qui contient la solution de greffage à déposer.

### III.C.3. La microscopie de fluorescence

Le choix du modèle biologique biotine-avidine nous a permis d'utiliser la microscopie de fluorescence pour caractériser et optimiser la méthode de fonctionnalisation des amines. C'est une méthode très sensible, parfaitement adaptée au dispositif de dépôt par drop-casting, qui nous a permis de mettre en évidence le greffage de la biotine. Nous avons alors utilisé la Streptavidine-R-Phycoérythrine (SAPE), qui est une protéine conjuguée formée de deux sous ensembles. La R-Phycoérythrine est un fluorophore protéique qui, à l'instar des organiques, permet de nous affranchir de tout problème de photoblanchiment et d'absorbances non maîtrisées de ces derniers. Les fluorophores organiques classiques (fluorescéine, Rhodamine...) sont généralement des substances contenant plusieurs noyaux aromatiques conjugués. Lors du phénomène d'absorption, ces molécules passent dans un état excité avant d'émettre. Elles sont à ce moment instable et peuvent réagir de manière covalente avec leur environnement proche. Dans le cas des fluorophores protéiques, le chromophore est encapsulé dans la protéine. Il est ainsi préservé de toutes modifications covalentes irréversibles de sa structure ce qui lui confère une plus grande stabilité. La streptavidine a été choisie pour le modèle biologique qu'elle constitue avec la biotine, comme explicité précédemment, et permet ainsi de visualiser les zones greffées, mais aussi d'apprécier l'homogénéité du greffage à l'échelle des molécules biologiques. Cela nous permet également de mener des études semi-quantitatives en comparant les taux de fluorescence des différents plots lors des greffages multiparamétriques. Le procédé de révélation par microscopie de fluorescence, utilisé pour caractériser le greffage de la biotine, est un procédé classique mis au point au laboratoire [10]. L'échantillon est tout d'abord rincé abondamment à l'eau ultrapure après greffage, puis séché. Il est ensuite plongé 15 min dans une solution de Bovin Serum Albumin

(BSA) à 10 mgr/ml dans du tampon phosphate salin (Phosphate buffered saline, PBS) puis rincé abondamment au PBS. Cette étape vise à éviter l'adsorption non spécifique du complexe enzymatique conjugué de SAPE sur les zones non greffées. L'échantillon est ensuite plongé dans ce dernier pendant 15 min, puis rincé abondamment au PBS. Ce fluorophore affiche une large zone d'absorption affichant plusieurs maximums à 496, 546, 565nm et un maximum d'émission à 580nm.

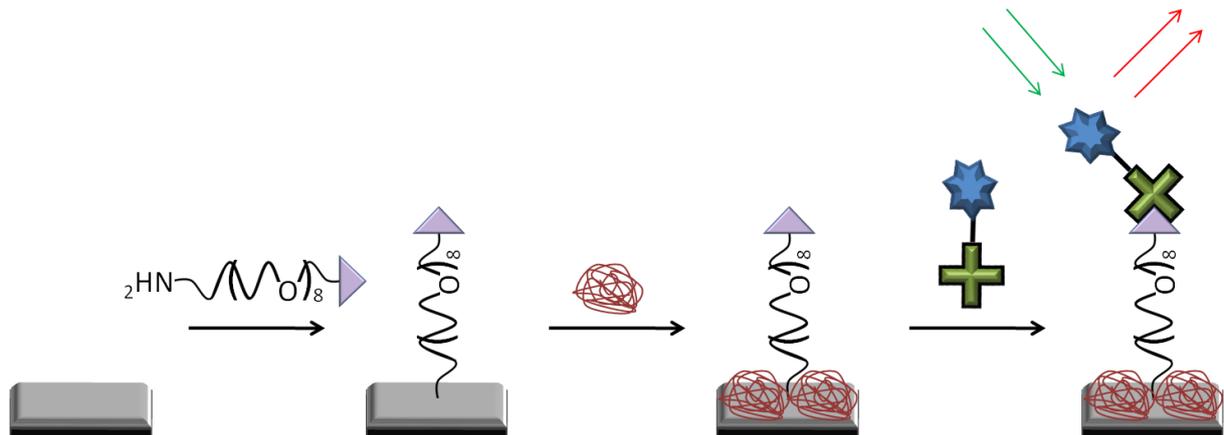


Figure III- 15 : Représentation schématique du greffage de la biotine-(peg)<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>, suivi de l'étape de blocage des sites non spécifiques par la BSA puis du couplage de la biotine avec la SAPE.

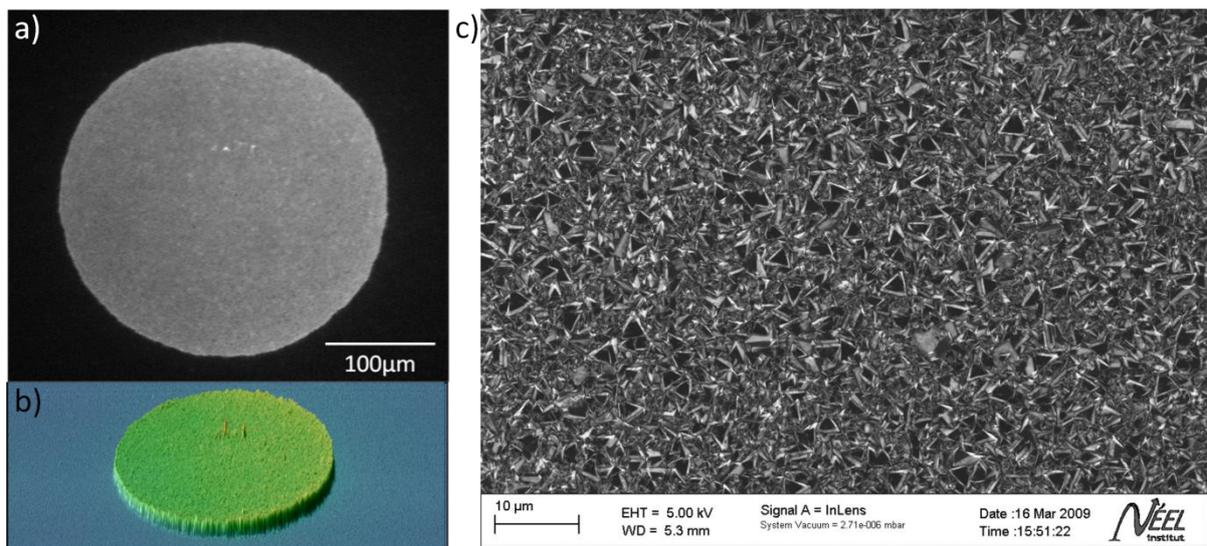
Sur la Figure III- 15 est illustrée la représentation schématique de la révélation par microscopie de fluorescence, du greffage de la biotine-aminée par drop-casting sur un échantillon diamant microcristallin dopé. La Figure III- 16.b montre la cartographie 2D de l'intensité de fluorescence du plot de biotine (Figure III- 16.a). On y voit clairement l'homogénéité de la fluorescence du plot. L'intensité de fluorescence du plot est de 1210 u.a avec un écart type de 110 u.a. La spécificité de la reconnaissance Biotine-Avidine est mise en évidence par la très faible valeur de l'intensité de fluorescence à l'extérieur du plot. L'intensité de fluorescence moyenne à l'extérieur du plot est de 90 u.a avec un écart type de 30 u.a. On peut remarquer que la fluorescence est parfaitement homogène sur tout le plot, mais il est en revanche impossible d'affirmer que le greffage est effectif sur tous les type de grains et donc sur toutes les orientations cristallines. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, les échantillons diamant polycristallins sont composés d'un ensemble de grains de diamant d'orientations cristallines différentes. Comme le montre la Figure III- 16.c, la taille des grains d'un échantillon microcristallin est comprise entre 0,7 et 3  $\mu\text{m}$ . La résolution du microscope utilisé ne permet pas l'observation de la fluorescence sur un grain unique. Nous ne sommes

donc pas en mesure de conclure que le greffage ne s'effectue pas sur une orientation cristalline particulière.

Bien que la microscopie de fluorescence ne permette pas d'étude quantitative, elle permet en revanche des études qualitatives si l'on travaille avec les contrastes de fluorescences. L'intensité de fluorescence est dépendante de nombreux facteurs (Fluorophore, BSA, Lampe...), on ne peut donc pas l'utiliser comme paramètre d'analyse pertinent lors d'études comparatives. De plus la caméra CCD utilisée ne donne qu'une valeur d'intensité arbitraire retranscrite en niveau de gris. Il est toutefois possible de comparer plusieurs expériences en utilisant le contraste de fluorescence. Le contraste de fluorescence est décrit

comme :

$$\text{Contraste} = \frac{\text{Intensité du plot} - \text{Intensité du Blanc}}{\text{Intensité du Blanc}}$$



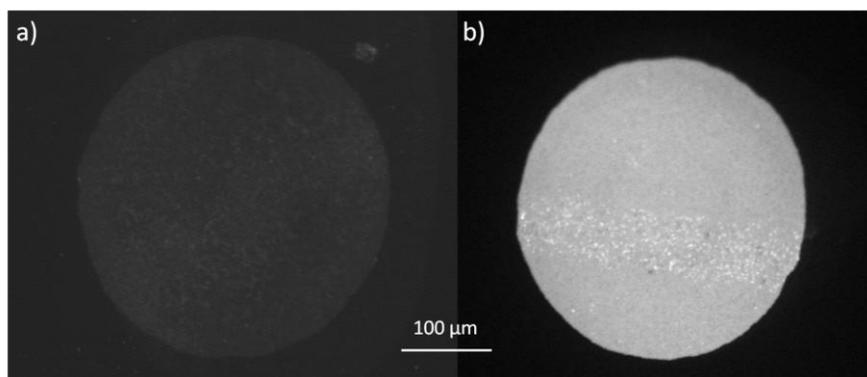
*Figure III- 16 : a) Image de microscopie de fluorescence d'un plot de biotine greffée sur diamant hydrogéné, b) Cartographie 2D de l'intensité de fluorescence du plot de biotine présenté sur la fig. a, c) Image MEB en électrons secondaires d'un échantillon diamant microcristallin.*

Le contraste sera la seule grandeur utilisée lors des expériences de microscopie de fluorescence, elle nous permettra d'effectuer des analyses comparatives pertinentes.

### III.C.4. Conditions de greffage

#### III.C.4.a *Etat de surface du Diamant*

Certaines méthodes de fonctionnalisation ne nécessitent pas le contrôle de l'état de surface du matériau à greffer car elles ne sont pas dépendantes d'un groupement surfacique particulier. A titre d'exemple, le greffage des sels de diazonium par voie électrochimique [36] permet un greffage sur diamant oxydé ou hydrogéné. En revanche le greffage des sels de diazonium de manière spontanée [32] n'est possible que sur un diamant hydrogéné ; c'est sur le caractère réducteur du diamant hydrogéné qu'est basée cette technique. La technique de greffage spontané des amines sur diamant que nous avons mise au point, requiert également un diamant hydrogéné et repose elle aussi sur le caractère réducteur du diamant hydrogéné. Cet aspect sera détaillé dans la partie III.D [41]. La solution de greffage de biotine utilisée est identique à celle utilisée dans la partie précédente, elle sera la même pour tout le chapitre. Cette solution est constituée de biotine(peg)<sub>8</sub>-aminée (Figure III- 12.b de la partie précédente) introduite dans la solution de greffage à une concentration de 3mM. Le milieu de greffage est une solution de Phosphate de sodium dibasique 0,2M contenant 20% de glycérol et ajustée à un pH de 10. La Figure III- 17 est une image de microscopie de fluorescence du greffage de la biotine par drop-casting, sur un diamant polycristallin hydrogéné (Figure III- 17.b) et sur un diamant polycristallin très fortement oxydé chimiquement (Figure III- 17.a) par traitement H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub> à chaud pendant 4 heures. Le contraste de fluorescence de la biotine greffée sur l'échantillon oxydé est de 2±1. Celui sur diamant hydrogéné est de 9±2. Il faut noter que l'oxydation par voie chimique utilisée n'est pas la plus efficace sur diamant et qu'il persiste donc des fonctions CH<sub>x</sub> après le traitement. Cela explique la fluorescence résiduelle observée sur cet échantillon. Du fait du caractère hydrophile du diamant oxydé, le temps de greffage a été réduit au maximum de manière à limiter l'étalement de la goutte sur le substrat oxydé. Nous avons également rajouté du glycérol pour augmenter la viscosité de la solution. On peut néanmoins remarquer que la taille des plots n'est pas identique pour les deux échantillons. Celle du diamant oxydé est de 350µm alors que celle du diamant hydrogéné est de 310 µm, mettant en évidence le caractère hydrophile de l'échantillon oxydé. On remarque également la forte hétérogénéité de la fluorescence de l'échantillon oxydé. Cela est du à l'inhomogénéité de l'attaque chimique en fonction de l'orientation cristalline des grains. Cela met clairement en évidence que l'état hydrogéné du diamant est nécessaire pour ce type de greffage.



*Figure III- 17 : a) Image de microscopie de fluorescence d'un échantillon diamant oxydé par voie chimique et fonctionnalisé avec une solution de biotine aminée, b) Image de microscopie de fluorescence d'un échantillon diamant hydrogéné et fonctionnalisé avec une solution de biotine aminée.*

Parallèlement, le greffage de l'héxylamine a été réalisé sur deux substrats diamant monocristallins (100) Sumitomo Ib. Un échantillon a été oxydé par voie chimique dans un mélange  $H_2SO_4/HNO_3$  à chaud pendant 4 heures, l'autre a été hydrogéné dans les conditions classiques. La solution de greffage est constituée d'héxylamine à 60mM dans une solution de Phosphate de sodium dibasique 0,2M ajustée à pH 10. Les temps de contact entre l'échantillon et la solution pour les greffages destinés à être caractérisés en FTIR sont de l'ordre de 12 heures. Les temps sont longs pour permettre de se rapprocher au mieux d'une monocouche compacte, de manière à pouvoir récolter le signal le plus intense possible. L'héxylamine ne présente aucun intérêt particulier. C'est en revanche une molécule simple nous permettant d'avoir une signature la plus épurée possible. De plus elle ne possède qu'une seule fonction complexe qu'est le groupement amine. Elle constitue donc une molécule de choix nous permettant d'étudier le greffage et son mécanisme. La fonctionnalisation a été caractérisée en FTIR à l'aide d'un accessoire ATR. Lors de la caractérisation de l'échantillon oxydé, la référence utilisée est celle de l'échantillon hydrogéné avant traitement chimique. Dans le cas de la caractérisation de l'échantillon oxydé mis en contact avec la solution de greffage, la référence utilisée est celle de l'échantillon oxydé. Intéressons nous au cas de l'échantillon traité chimiquement avant sa mise en contact avec la solution de greffage. Le spectre est présenté en rouge sur la Figure III- 18.

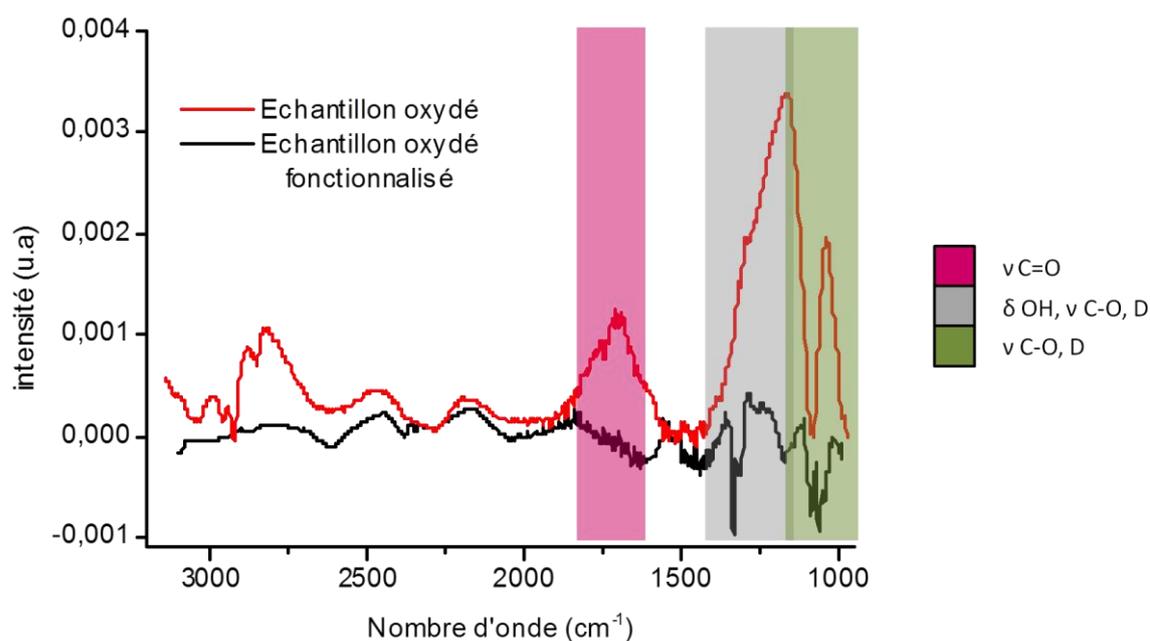


Figure III- 18 : Spectres infrarouge réalisés en ATR avec un cristal germanium d'un échantillon diamant oxydé par traitement  $H_2SO_4/HNO_3$  (en rouge), d'un échantillon diamant oxydé par voie chimique puis mis en contact avec la solution de greffage contenant l'hexylamine (en noir).

On remarquera tout d'abord la présence de pics négatifs correspondant aux différents groupements  $CH_x$  de surface compris entre  $2960$  et  $2850\text{ cm}^{-1}$ . Cela montre clairement qu'il y a eu une diminution significative de la quantité de  $CH_x$  de surface. Le pic centré à  $1040\text{ cm}^{-1}$  indique la présence d'alcool primaire au travers de l'élongation « stretch » de la liaison C-O. On note ensuite la présence d'un pic très large centré en  $1160\text{ cm}^{-1}$ . Nous attribuons ce large pic à un ensemble de bandes dues aux éthers aliphatiques et aromatiques, aux alcools tertiaires et de types phénols, ainsi qu'aux cisaillements « scissoring » de certains groupements hydroxyles. On peut voir un épaulement aux alentours de  $1300\text{ cm}^{-1}$  qui est dû au stretch de la liaison C-O des acides carboxyliques. Ce pic est à relier à la large bande centrée en  $1710\text{ cm}^{-1}$ , qui est la signature des groupements carboxyliques. Ce spectre montre clairement que le traitement oxydant  $H_2SO_4/HNO_3$  génère un mélange de fonctions oxydées. Bien qu'il nous soit impossible de quantifier le pourcentage de chaque type de fonction, nous pouvons voir que ce traitement génère un nombre non négligeable de fonctions de type carbonyle. L'obtention de ce type de fonctions est habituellement très dure à obtenir sur diamant, c'est pourquoi il est nécessaire de le souligner. Le spectre présenté en noir sur la Figure III- 18

correspond à l'échantillon mis en contact avec la solution de greffage d'hexylamine. Nous pouvons voir qu'il n'y a aucune trace de CH<sub>x</sub> qui attesterait de la présence de la chaîne alcane de l'hexylamine. Il y a en effet très peu de signal et on observe seulement du bruit sur le spectre. Cela signifie qu'aucune modification de surface notable n'est observable.

Sur la Figure III- 19 est présenté le spectre de l'hexylamine greffée sur l'échantillon hydrogéné. Les modes de vibrations à 2925 et 2865 cm<sup>-1</sup> sur le spectre a montrent la présence des CH<sub>2</sub> de l'hexylamine à la surface du diamant. On remarque également que le cisaillement des CH<sub>2</sub> à 1460 cm<sup>-1</sup> est très bien défini. Ces pics mettent clairement en évidence la présence de la chaîne alcane à la surface du diamant. On remarque également un pic à 1650 cm<sup>-1</sup> indiquant la présence de phase sp<sup>2</sup> non conjuguées. Il apparait une série de pics mettant en évidence la présence de groupements oxydés. Les pics à 1090 et 1110 cm<sup>-1</sup> et 1735 cm<sup>-1</sup> sont associés aux alcools secondaires, éthers aliphatiques et aux carboxyles respectivement. Le pic fin situé à 1260 cm<sup>-1</sup> est quant à lui associé aux éthers cycliques de type époxydes. Le mécanisme de formation de ces groupements sera détaillé dans la partie III.D.

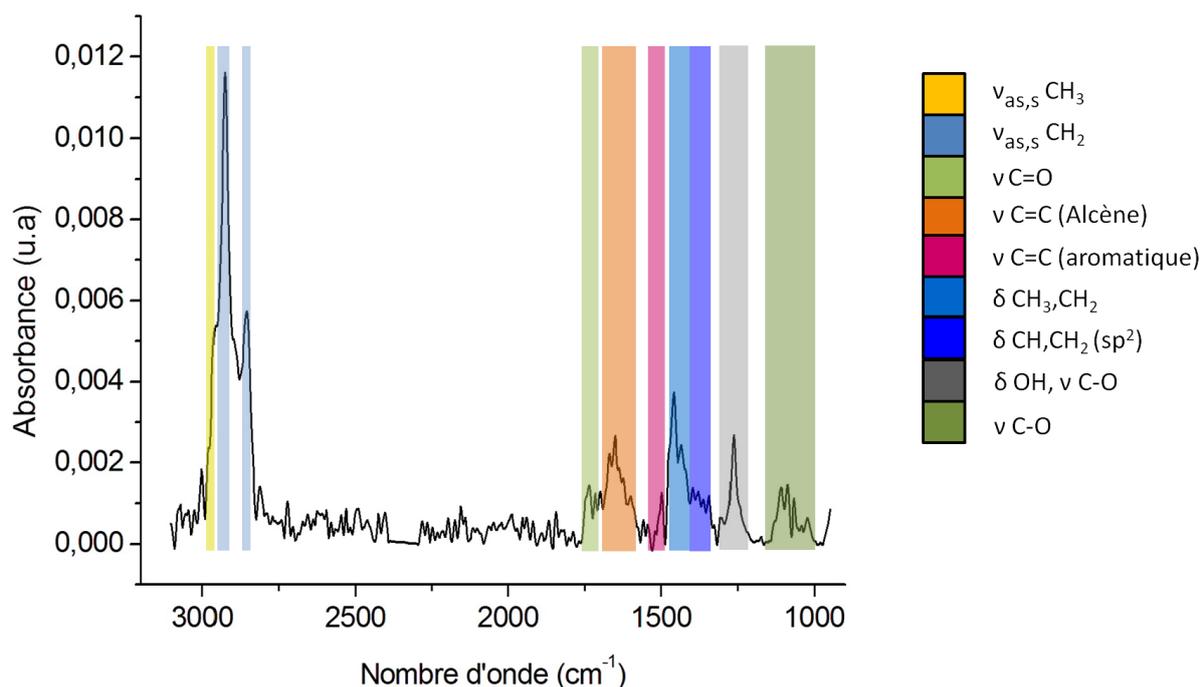


Figure III- 19 : Spectre infrarouge réalisé par ATR avec un cristal germanium d'un échantillon diamant hydrogéné greffé avec l'hexylamine.

Parallèlement au greffage d'amine primaire aliphatique, nous avons essayé dans les mêmes conditions d'immobiliser d'autres types d'amine. La fonctionnalisation des amines

secondaires aliphatiques semblent fonctionner, même si elle paraît plus lente et qu'elle n'est pas mise en évidence de manière univoque. En revanche, le greffage des amines tertiaires et des amines aromatiques n'est pas possible dans ces conditions. Nous aborderons dans cette partie le greffage des différents types d'amines. Nous verrons pourquoi les amines primaires aliphatiques sont les meilleures candidates pour cette méthode de greffage.

Nous avons donc pu mettre en évidence que les groupements C-Hx de surface sont nécessaires pour que le greffage soit possible. Le greffage se base sur le caractère réducteur du diamant hydrogéné. Travailler sur ce type de surface permet d'utiliser des échantillons diamant « as grown », c'est-à-dire de pouvoir utiliser des couches diamant fraîchement déposées sans aucun traitement de surface préalable. Cela constitue un gain de temps en évitant de rajouter une étape supplémentaire. Il est toutefois possible de réutiliser des échantillons oxydés en procédant à un plasma hydrogène pour régénérer les fonctions C-Hx de surface.

### *III.C.4.b Les solvants*

Le solvant joue un rôle crucial dans cette nouvelle méthode de fonctionnalisation des amines. Différents solvants organiques ont été essayés pour le greffage de la biotine sur diamant hydrogéné. Les solvants utilisés sont l'acétonitrile, le DMSO, le THF, le DMF et l'éthanol. Le greffage n'a été possible avec aucun de ces solvants. Le seul permettant le greffage des amines est l'eau. Nous verrons comment il est impliqué dans le mécanisme et pourquoi il est le seul à pouvoir assurer le greffage des amines dans la partie III.D.

La solution de greffage standard utilisée est du phosphate de sodium dibasique à une concentration de 0,2M ajustée à pH 10. La biotine y est introduite à une concentration de l'ordre du millimolaire. On rajoute lors des dépôts par drop-casting du glycérol à hauteur de 20% pour limiter l'évaporation et l'étalement de la goutte. Il faut avoir à l'esprit que lorsque la taille des plots déposés est inférieure à 500  $\mu\text{m}$ , le volume de goutte correspondante est de l'ordre de la centaine de nano litre. Le séchage de ce type de goutte est très rapide. De plus les molécules telles que les brins d'Oligomère DésoxyriboNucléique (ODN) introduits lors du greffage augmente la mouillabilité de la surface, favorisant ainsi l'étalement de la goutte. Le glycérol nous permet également de réduire ce phénomène. Dans les conditions usuelles on utilise des solutions de phosphate de sodium monobasique ou dibasique car il est adapté à la

solvatation d'espèces biologiques. Il comporte également des zones tampons dans la gamme de pH.

Pour vérifier que le sel support n'est pas impliqué dans le mécanisme de greffage ; nous avons préparé deux solutions de biotine-aminée, la première ayant comme sel support le carbonate (a) et l'autre le phosphate (b). La révélation de ce greffage a été effectuée par spectroscopie de fluorescence (Figure III- 20) suivant le protocole détaillé dans la partie III.C.3. Le contraste de fluorescence des deux plots est identique. Cela montre donc que le greffage n'est pas influencé par sel support.

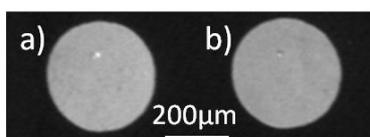


Figure III- 20 : Image de fluorescence de la biotine greffée sur diamant hydrogéné avec un sel support de : a) Hydrogénocarbonate/Carbonate de sodium, b) Phosphate de sodium dibasique.

Il reste néanmoins à nous assurer que le milieu de greffage, et en particulier les ions phosphates et carbonates présents dans celui-ci, ne sont pas impliqués dans le mécanisme d'immobilisation des amines. Nous allons donc évaluer l'effet de la solution de greffage sur la surface de diamant hydrogéné. Nous avons pour ce faire placé un substrat diamant monocristallin (100) CVD Element-Six « optical grade » hydrogéné en contact avec la solution de phosphate de sodium dibasique à une concentration de 0,2M ajustée à pH 10 ne contenant pas d'amine pendant 12 heures. Nous avons ensuite caractérisé cet échantillon en FTIR à l'aide de l'accessoire ATR avec pour référence l'échantillon hydrogéné avant sa mise en contact avec la solution. Le spectre recueilli est présenté sur la Figure III- 21 . On peut remarquer la très faible intensité du signal montrant que la surface de l'échantillon n'a pas subi de transformations significatives. Deux bandes majeures sont observables, la première centrée en  $1060\text{ cm}^{-1}$  contient plusieurs pics qui révèlent la présence de fonctions oxydées. La deuxième se situe à  $1650\text{ cm}^{-1}$ . Elle indique l'apparition d'une phase  $\text{sp}^2$ . L'analyse détaillée du spectre laisse apparaître une première bande située à  $1060\text{ cm}^{-1}$  et affiche un épaulement vers les bas nombres d'onde à  $1030\text{ cm}^{-1}$ . Elles peuvent être associées respectivement, à l'étirement asymétrique des ions phosphates mais également à l'étirement des alcools primaires. Il y a ensuite deux pics consécutifs centrés en  $1110\text{ cm}^{-1}$  et  $1160\text{ cm}^{-1}$  qui sont la signature des éthers aliphatiques et des alcools tertiaires. Le deuxième pic apparaît à  $1650\text{ cm}^{-1}$

<sup>1</sup>. Il correspond à l'apparition d'une phase sp<sup>2</sup> non conjuguée en quantité moindre que les phases oxydées précédemment citées.

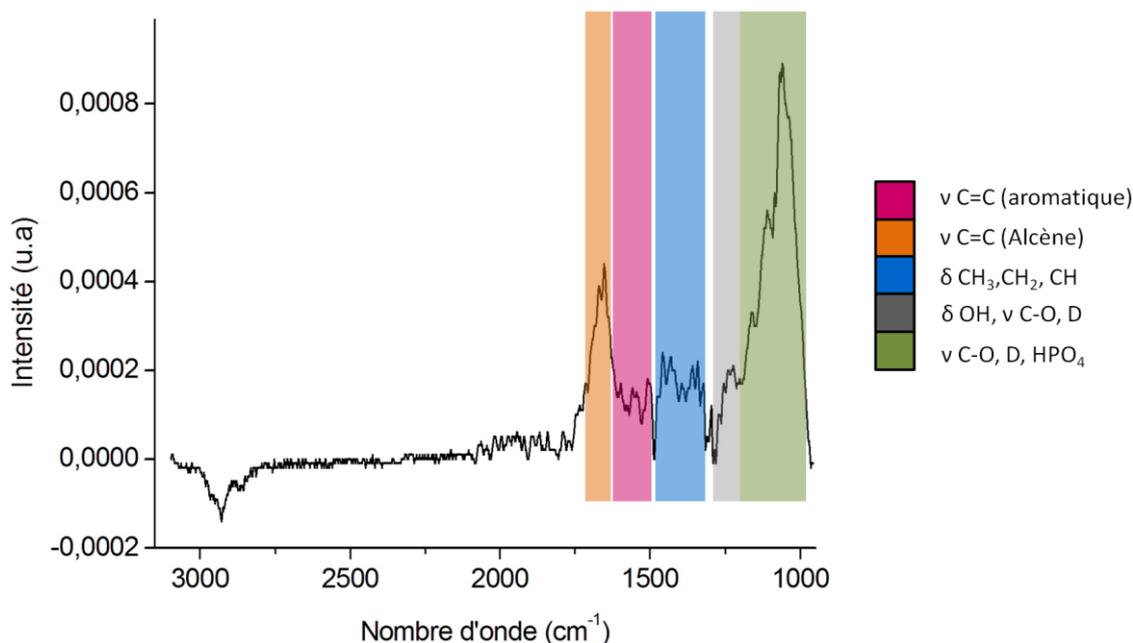


Figure III- 21 : Spectre infrarouge réalisé par ATR avec un cristal germanium d'un échantillon diamant hydrogéné mis en contact avec la solution de greffage ne contenant pas d'amine.

Bien que l'évolution globale de l'état de surface soit minime, on note l'apparition de fonctions oxydées et d'une phase sp<sup>2</sup>. La solution de greffage a donc induit une légère oxydation, ainsi qu'une graphitisation de la surface du diamant. Si l'on se reporte à la zone des CH<sub>x</sub> (2970-2850 cm<sup>-1</sup>), on note l'apparition d'une bande négative qui indique qu'il y a eu une diminution de la quantité de ces derniers. Cette évolution est due à l'effet conjugué des ions hydroxydes et de l'oxygène dissous.

Malgré l'impossibilité de travailler avec des solvants organiques, cette méthode de greffage nous permet d'immobiliser tous types d'espèces aminées en milieu aqueux, en une seule étape et de manière spontanée. Or il n'existe aucune méthode de fonctionnalisation offrant la possibilité de greffer sur du diamant hydrogéné ou oxydé, des molécules d'intérêts telles que la biotine en une seule étape. Pouvoir travailler en milieu aqueux rend envisageable l'immobilisation directe de la plupart des espèces biologiques (Peptide, ODN, protéine, anticorps...), ce qui constitue un atout de taille pour les applications dans le domaine de la bio-détection.

### III.C.4.c Condition de pH et temps

Après avoir abordé le rôle que joue le solvant dans la méthode de fonctionnalisation des amines, nous allons voir que le temps est également un paramètre essentiel. Dans de nombreuses méthodes de fonctionnalisation telles que le greffage des alcènes par photochimie [33], ou le greffage spontané des sels de diazonium [32], le contrôle du temps de greffage est nécessaire. Dans le cas du greffage par photochimie, le temps ne doit pas dépasser 6 heures pour éviter la formation de multicouches, alors que dans le cas du greffage spontané des sels de diazonium il doit être de 70 heures minimum pour assurer la formation d'une monocouche dense. Dans notre cas, l'influence du temps est également un facteur essentiel, et nous verrons qu'au travers du contrôle du temps de greffage on peut moduler la densité de greffage. Le pH des solutions de greffage est un paramètre crucial. Pour mettre en évidence l'influence du pH sur la fonctionnalisation nous avons procédé au greffage par drop casting de la biotine avec une gamme de pH comprise entre 7,5 et 11,5. Nous avons également fait varier le temps pour illustrer son influence sur la quantité d'espèces immobilisées. La Figure III- 22.a montre l'image de microscopie de fluorescence de la matrice correspondant au greffage de la biotine. Les différents pH utilisés pour le greffage sont notés en abscisse et les différents temps en ordonnée. La Figure III- 22.b représente le profil 1D de l'intensité de fluorescence brute pour un temps de greffage de 5 min et met en évidence l'évolution de la fluorescence en fonction du pH de la solution.

Il faut également noter que, comme pour de nombreuses méthodes de fonctionnalisation, la concentration de l'espèce à greffer en solution est aussi un paramètre important. On peut en effet relier le temps de greffage à la concentration d'espèces en solution. Diminuer sa concentration en solution revient à augmenter le temps de greffage nécessaire pour immobiliser une même quantité d'espèces. L'effet de la concentration sur la cinétique de greffage peut être observé sur la Figure III- 22.b. On remarque également que l'intensité de fluorescence n'est pas homogène sur tout le plot mais quelle est supérieure sur la bordure des plots. Cela est dû à l'effet Marangoni. Il s'agit d'un phénomène de convection à l'intérieur de la goutte qui génère un gradient de concentration, augmentant la quantité d'espèces en périphérie de la goutte. Le volume de la goutte étant de quelques centaines de nanolitres et le temps de greffage relativement courts, la concentration en espèces aminées devient un facteur limitant.

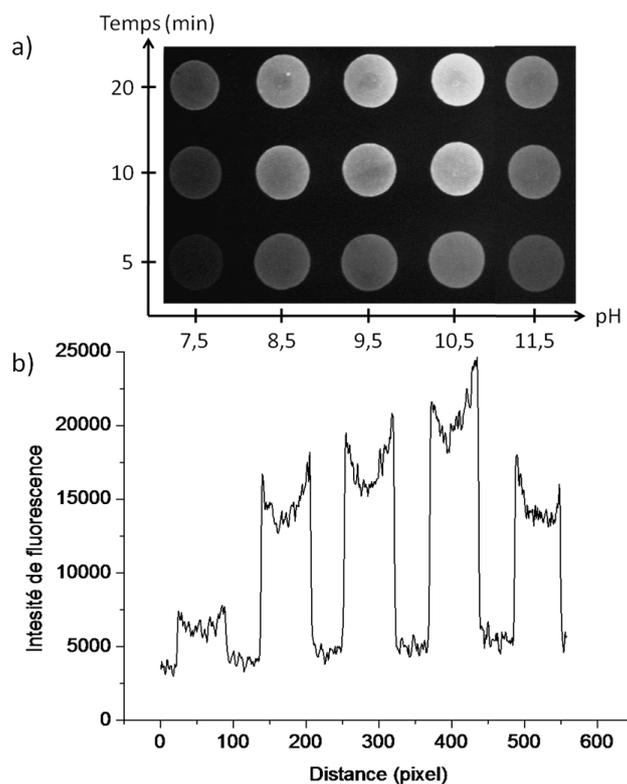


Figure III- 22 : a) Image de microscopie de fluorescence du greffage de la biotine aminée en fonction du pH (abscisse) et du temps (ordonnée), b) Profil 1D de l'intensité de fluorescence brute en fonction du pH (7,5/8,5/9,5/10,5/11,5) pour un temps de greffage de 5min.

Nous verrons par la suite que l'espèce à greffer n'est pas la seule à intervenir dans le mécanisme de greffage, la concentration en ions hydroxydes, et donc le pH, constitue également un facteur impactant directement la cinétique de greffage.

La Figure III- 22.a illustre le fait que pour chaque valeur de pH, l'augmentation du temps de contact de la solution avec le substrat résulte en une augmentation du taux de fluorescence. Cela signifie donc que la quantité immobilisée est d'autant plus grande que le temps de greffage est long. L'évolution de la fluorescence en fonction du pH met clairement en évidence l'existence d'une gamme optimale comprise entre 9,5 et 11,5 dans le cas de la biotine. A partir de cette observation il semblerait que l'amine réagisse sous sa forme déprotonée. En revanche, la présence d'un optimum soulève des questions et laisse entrevoir un mécanisme réactionnel complexe. Nous verrons plus tard que la gamme de pH optimale dépend de la concentration de l'espèce aminée, de son pKa mais également de la concentration en ions hydroxydes.

Pour montrer que la fonctionnalisation nécessite une solution de greffage basique, nous avons mis en contact une solution constituée d'héxylamine à 60 mM dans du phosphate de sodium dibasique 0,2M ajustée à pH 4 avec un échantillon de diamant hydrogéné pendant 12 heures. Le spectre associé est présenté sur la Figure III- 23.

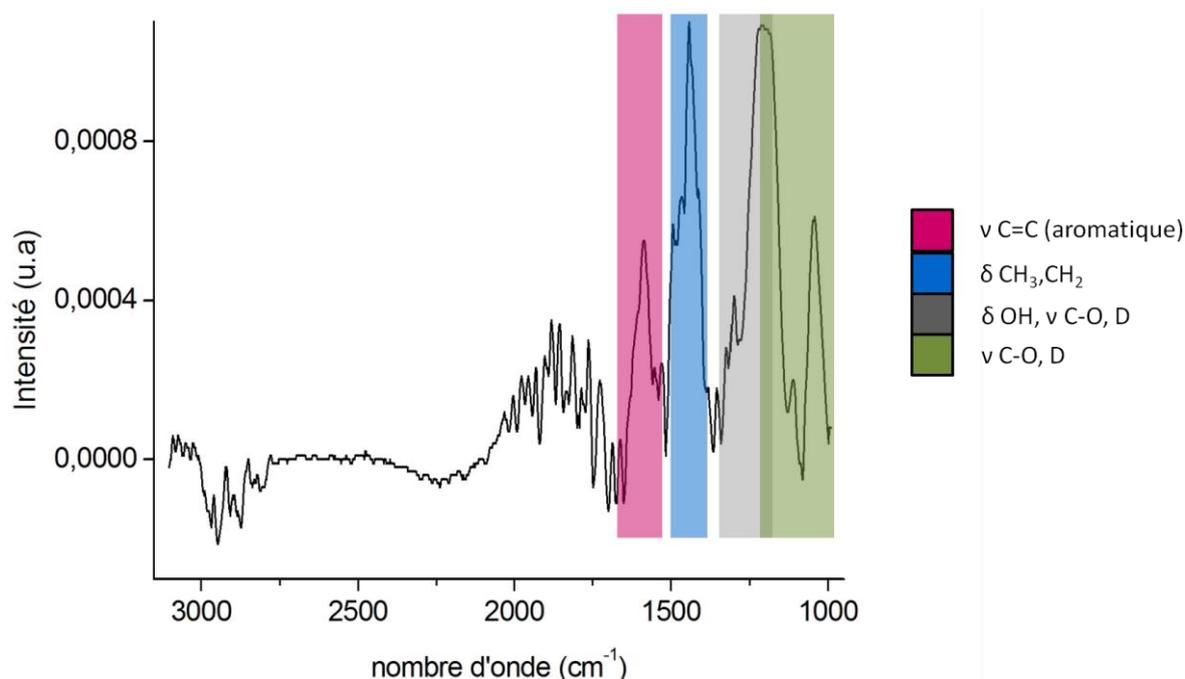


Figure III- 23 : Spectre infrarouge réalisé en ATR avec un cristal germanium d'un échantillon diamant hydrogéné mis en contact avec la solution de greffage d'hexylamine ajustée à pH 4.

Nous pouvons tout d'abord constater l'absence de pic dans la zone 2850-2970 cm<sup>-1</sup>. Cela montre qu'il n'y a pas d'hexylamine à la surface de l'échantillon. On remarque en revanche, l'apparition de nombreux pics dans la zone 1000-1300 cm<sup>-1</sup>, mettant en évidence le stretch des liaisons C-O. Le premier pic situé à 1050 cm<sup>-1</sup> est la signature des alcools primaires aliphatiques. On remarque ensuite un pic très large centré en 1210 cm<sup>-1</sup> attribué aux fonctions hydroxyles de type phénol, aux éthers aromatiques et vinyle éther, ainsi qu'aux « bending » de certains groupements hydroxyles. Il apparaît également un pic intense à 1440 cm<sup>-1</sup> avec un épaulement à 1430 cm<sup>-1</sup>. Ces pics sont attribués respectivement au mode bascule des CH<sub>2</sub> se trouvant en alpha d'un carbone sp<sup>2</sup> et à ceux en alpha de groupement oxydé type C-O. Au vue de la forme de cette large bande, des pics associés aux phases C=C aromatiques doivent être confondus avec les différents modes bascules des CH<sub>2</sub>. Il y a ensuite deux pics à 1500 et 1580 cm<sup>-1</sup> qui sont la signature de phase C=C de type aromatique, indiquant la présence de phase non diamant. Il est important de noter que dans ce cas on remarque que la

zone située entre 2850 et 2970  $\text{cm}^{-1}$  associée au CHx apparaît cette fois ci négative. Cela montre qu'il y a eu disparition d'une partie des fonctions hydrogénées de surface présente sur le diamant avant sa mise en contact avec la solution de greffage. Ce spectre affiche des caractéristiques similaires à celui détaillé dans le Chapitre I qui provenait d'un substrat hydrogéné identique, laissé sous air 6 mois puis caractérisé.

Si on compare ce spectre à celui de la Figure III- 21 présentée dans la partie III.C.4.b, correspondant à la mise en contact d'un échantillon hydrogéné dans la solution de greffage standard à pH basique en l'absence d'espèce aminée. On peut alors déduire que les solutions basiques ne modifient pas de manière significative la surface du diamant hydrogéné, alors que les solutions acides oxydent clairement les échantillons hydrogénés. Ce résultat est en accord avec des travaux récents effectués par Bongrain et al. [42] sur des micro-levers de diamants caractérisés par XPS, dans lesquels ils ont également montré le caractère oxydant des solutions acides sur les échantillons diamant.

Un dernier facteur pouvant être impliqué dans le mécanisme de greffage a également été étudié, la lumière pouvant agir comme un catalyseur. Nous nous sommes donc assuré qu'il n'y ait aucun effet d'activation du à la lumière ambiante. Nous avons constaté que la présence ou l'absence de lumière n'influe en rien la fonctionnalisation.

Nous avons montré qu'il est possible d'immobiliser toute espèce comportant une amine primaire aliphatique de manière spontanée par simple contact de la solution de greffage avec le substrat et ce en une seule étape. Il reste néanmoins à évaluer la force d'accroche du lien entre la molécule immobilisée et le substrat. La stabilité est un des paramètres cruciaux permettant de caractériser une méthode de greffage. Nous avons vu au paragraphe III.B, que toutes les méthodes de fonctionnalisation ne conduisent pas à la formation d'une liaison covalente. Ces dernières étant plus stables que les liaisons métal-ligand [14], elles n'affichent pourtant pas toutes la même solidité. Par exemple le couplage des hydrazines avec les carbonyles [7] ou le couplage d'acide carboxylique avec les fonctions hydroxyles de surface [10], engendre des liaisons covalentes qui peuvent être rompues avec une simple variation de pH.

### III.C.5. Caractérisation du greffage

Nous allons dans cette partie analyser de manière expérimentale deux paramètres d'intérêt majeur caractérisant le greffage. Dans un premier temps nous évaluerons la stabilité de la biotine greffée en nous appuyant sur la microscopie de fluorescence. Puis nous nous intéresserons dans un second temps à l'influence du temps de greffage sur la quantité d'espèces immobilisées. Nous caractériserons le greffage par électrochimie en immobilisant une sonde électrochimique.

#### *III.C.5.a Stabilité*

Pour évaluer la stabilité de notre greffage nous avons fonctionnalisé la biotine puis effectué des cycles de révélation successifs par microscopie de fluorescence. La biotine(peg)<sub>8</sub>-aminée a été immobilisée par drop casting. Le milieu de greffage est une solution de Phosphate de sodium dibasique 0,2M contenant 20% de glycérol et ajustée à un pH de 10. La biotine(peg)<sub>8</sub>-aminée est introduite à une concentration de 3 mM. La solution de greffage est mise en contact avec le substrat pendant 2 heures puis l'échantillon est rincé et séché.

Nous avons ensuite procédé à la révélation par microscopie de fluorescence selon le protocole standard détaillé au paragraphe III.C.3. Le contraste de fluorescence est ensuite calculé. Il s'en suit une étape de régénération de la surface qui consiste à rompre le lien biotine-avidine de manière à préparer la surface pour une nouvelle étape de révélation par microscopie de fluorescence. Comme nous l'avons vu au paragraphe III.C.1, la constante de dissociation du couple est très faible, ce qui dénote la grande force de liaison entre ces deux espèces. Bien qu'il existe différents traitements pour rompre le lien biotine-avidine, nous avons constaté expérimentalement que la seule voie permettant de régénérer parfaitement la surface est basée sur l'utilisation de la trypsine. La trypsine est une protéase que l'on trouve dans le système digestif et qui permet l'hydrolyse des protéines. Elle clive les liaisons peptidiques des chaînes protéiques, découpant ainsi les protéines en petits fragments. Une régénération totale de la surface nécessite de mettre l'échantillon en contact avec une solution de trypsine pendant au moins 12 heures à une température de 37°C. Après ce traitement, l'échantillon est rincé abondamment à l'eau ultrapure/éthanol/eau ultrapure puis séché. L'échantillon est à partir de ce moment prêt pour une nouvelle révélation.

Le cycle de révélation est illustré sur la Figure III- 24. Il fait apparaître l'étape de révélation par microscopie de fluorescence mais également l'étape de régénération de la surface.

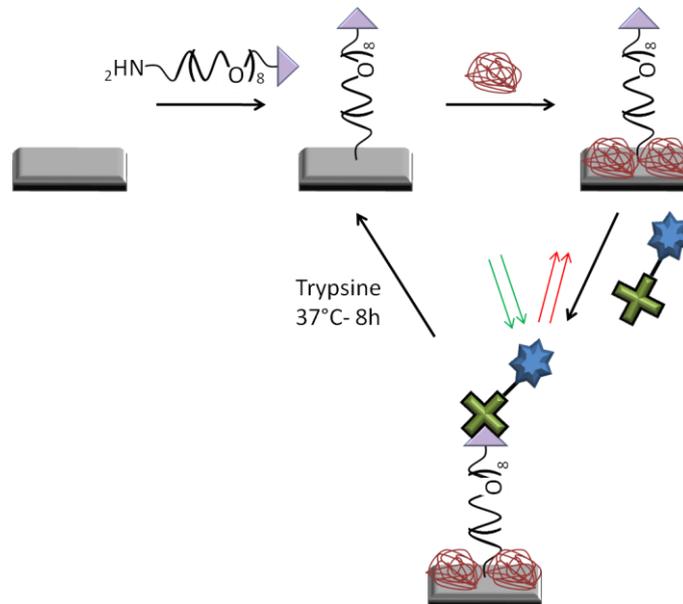


Figure III- 24 : Représentation schématique du greffage de la biotine, puis du cycle de révélation : 1) Blocage des sites non spécifiques avec la BSA, 2) Couplage du fluorophore (SAPE) avec la biotine, 3) Régénération de la surface par traitement à la trypsine.

Il a été réalisé au total 27 cycles de révélations. Nous avons calculé le contraste de fluorescence pour chaque cycle et reporté les valeurs dans l'histogramme de la Figure III- 25.a. Pour mettre en évidence l'importance du traitement de l'échantillon avec la trypsine, nous avons omis ce traitement aux cycles 6 et 13. Nous pouvons voir que le contraste de fluorescence diminue fortement lorsque le traitement à la trypsine n'est pas effectué. Cela vient du fait que les molécules de SAPE immobilisées lors du cycle précédent sont restées fixées sur les biotines fonctionnalisées. Il n'est donc pas possible d'immobiliser des nouvelles molécules de fluorophore actives. Or la SAPE qui est restée fixée a subi le phénomène de photoblanchiment et n'est donc plus active en fluorescence. Ce constat montre l'importance de l'étape de régénération de la surface par la trypsine. Nous nous sommes assuré qu'il n'y avait aucune rémanence de la fluorescence. Pour ce faire, après l'étape de traitement à la trypsine nous n'avons pas introduit de fluorophore avant la révélation du cycle 17. On voit que le contraste de fluorescence est bien de 0.

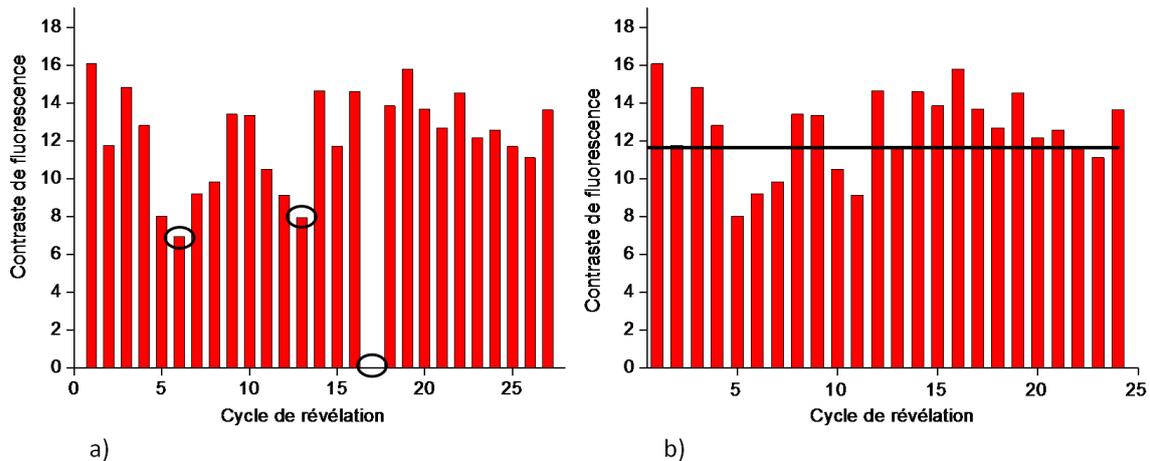


Figure III- 25 : a) Histogramme représentant l'intensité de fluorescence des cycles révélation successifs de la biotine greffée sur diamant hydrogéné, pour les cycles 6 et 13 l'échantillon n'a pas été soumis à l'étape de régénération par la trypsine et pour le cycle 17 il n'a pas été couplé à la SAPE. b) Histogramme représentant l'intensité de fluorescence des cycles de révélation successifs de la biotine greffée sur diamant hydrogéné auquel a été soustrait les cycles 6, 7 et 13.

Nous avons ensuite retiré ces 3 cycles et tracé un nouvel histogramme (Figure III-25.b.) A partir de ce nouveau graphique nous avons calculé le contraste de fluorescence moyen. Celui-ci est de 11,5 avec un écart type de 2,2 et un écart moyen de 1,7. On remarque que la valeur de l'écart type reste faible devant le contraste de fluorescence moyen. Les fluctuations observées sont inhérentes à la technique de microscopie de fluorescence. Il faut tout d'abord noter que l'ensemble des révélations s'est étalé sur une période d'un mois et demi. Sur un laps de temps aussi grand, de nombreux facteurs sont à prendre en compte (l'intensité de la lampe fluctuant d'une expérience à l'autre, le vieillissement des solutions de BSA dans le temps engendrant un blocage moins efficace des zones non greffées...). Il faut également prendre en compte l'utilisation de différents lots de SAPE, pouvant engendrer une variation de la concentration en fluorophore. Enfin, le paramètre crucial est lié à la régénération de la surface. Le temps de traitement ainsi que les solutions de trypsine ont varié durant cette expérience entraînant donc des fluctuations sur l'état de surface après régénération.

En 2002, Hamers et al. [33] ont mis au point une biopuce à ADN en utilisant la méthode de fonctionnalisation des alcènes par photochimie. Ils ont ensuite caractérisé la stabilité de la liaison par microscopie de fluorescence, en procédant à trente cycles de révélation basés sur l'hybridation-déshybridation de l'ADN. Bien que l'outil de caractérisation soit similaire, et comme nous l'avons abordé dans la partie III.C.3, il est

impossible de tirer une quelconque conclusion en utilisant des valeurs brutes de spectroscopie de fluorescence. Ils se sont donc intéressés à l'évolution de la fluorescence en fonction du nombre de cycles pour conclure à la stabilité de la liaison. Ils ont constaté des fluctuations de l'intensité autour d'une valeur moyenne et ont pu conclure que la liaison formée lors de la fonctionnalisation des alcènes par photochimie est stable. Même si cette méthode expérimentale n'apporte pas d'indication sur la nature de la liaison, elle permet d'écarter de nombreux cas de figure comme les interactions électrostatiques ou encore les liaisons datives. Les observations faites dans notre cas sont similaires à celles faites par Hamers. On peut donc en déduire que la liaison formée est stable.

### *III.C.5.b Corrélation entre temps de greffage et quantité greffée*

Cette partie est axée sur l'étude de la cinétique du greffage. Une première partie sera basée sur le suivi du greffage de l'héxylamine en temps réel par Solution Gate Field Effect Transistor (SGFET). Ces travaux se sont déroulés à l'université de Munich au Walter Schottky Institute dans l'équipe de Jose Garrido. Les FETs ont été réalisés par Mortiz Hauf qui est Doctorant au sein de cette équipe. Cette expérience nous renseignera sur la cinétique de notre greffage. La seconde partie sera basée sur l'immobilisation puis la détection d'une molécule sonde électrochimiquement active. A partir de la caractérisation électrochimique, une estimation de la quantité greffée pourra être déduite. En fonction de cette quantité, nous pourrions envisager la possibilité que cette technique de greffage conduise à la formation d'une monocouche.

#### 5.b.1 Suivi cinétique du greffage par FET

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, les transistors à effet de champ sont basés sur les propriétés de conduction surfacique du diamant intrinsèque hydrogéné. Kobayashi et al. [43] ont été les premiers à mettre en évidence ce phénomène sur diamant. L'équipe de Kawarada a ensuite poursuivi les travaux jusqu'à la conception du premier SGFET en 2001 [44]. Dans le cas de diamant intrinsèque hydrogéné, une région positivement chargée (de type p) se crée en sub-surface. Dans ce cas, la densité surfacique de porteurs devient supérieure à  $10^{13}/\text{cm}^2$ . Elle a alors un ordre de grandeur supérieur à celle des Metal Oxide Semiconductor FET (MOSFET) sur silicium. Les porteurs présents en sub-surface constituent donc le canal

(Figure III- 26.a). On place ensuite l'électrolyte en contact avec le dispositif (Figure III- 26.b) pour constituer le SGFET. L'électrode de référence en contact avec la solution électrolytique, qui est Ag/AgCl dans notre cas, constitue la grille. C'est pour cette raison que l'on parle de Solution (électrolyte) Gate FET. Le diamant hydrogéné induit donc tous ces effets de charge et permet l'apparition de la couche conductrice de type p en sub-surface. On peut voir qu'une modification de charge à proximité de la surface modifiera la quantité de porteur et donc la conductivité du canal. De la même manière, si la quantité de C-H surfacique varie on observera également un changement de la conductivité.

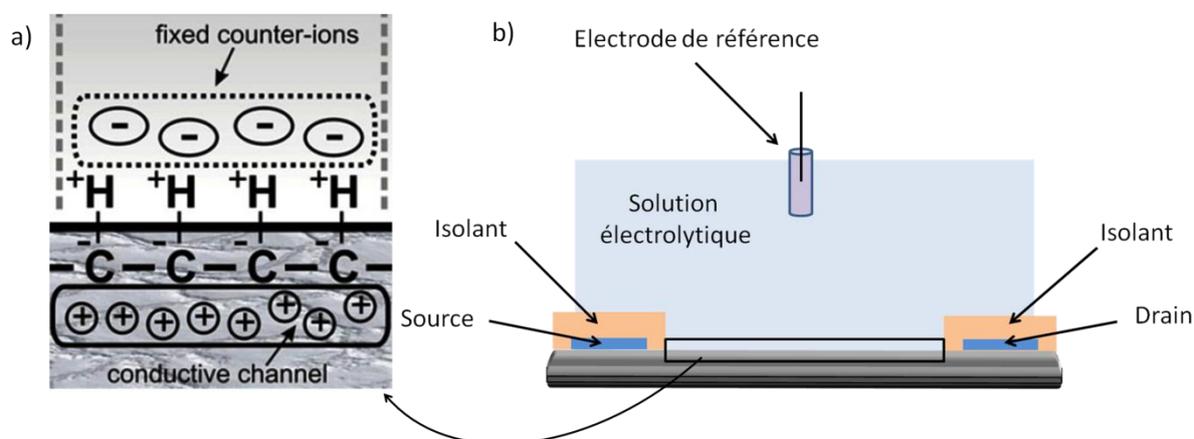


Figure III- 26 : a) Schéma représentant le canal conducteur apparaissant en sub-surface des échantillons diamant intrinsèques hydrogénés plongés dans une solution électrolytique, b) Représentation schématique d'un SGFET diamant.

La caractéristique d'un transistor est donnée par la courbe  $I_{ds}$ - $V_{ds}$ . Cette courbe montre l'évolution du courant transitant entre le drain et la source lorsqu'on fait varier le potentiel entre ces bornes, pour un potentiel grille-source donné. Il faut garder à l'esprit que la conductivité du canal, donc le courant drain-source, est modulée par le potentiel appliqué entre la grille et la source. Le FET a une surface de 9 mm<sup>2</sup> et le volume de la solution en contact avec la surface est de 1ml. La solution utilisée pour les caractérisations est une solution de KCl 0,1M contenant 10mM de tampon phosphate à pH 7,4. La Figure III- 27.a montre les courbes  $I_{ds}$ - $V_{ds}$  pour une tension grille comprise entre +0,4V et -0,7V. On remarque pour des tensions de drain comprises entre 0 et -0,1V, que le courant de drain est proportionnel à cette dernière. C'est dans cette partie, où le transistor adopte un comportement ohmique, que nous nous positionnerons lors de nos études. Pour avoir la sensibilité la plus grande tout en restant dans la zone linéaire nous choisirons une tension drain-source de -100mV.

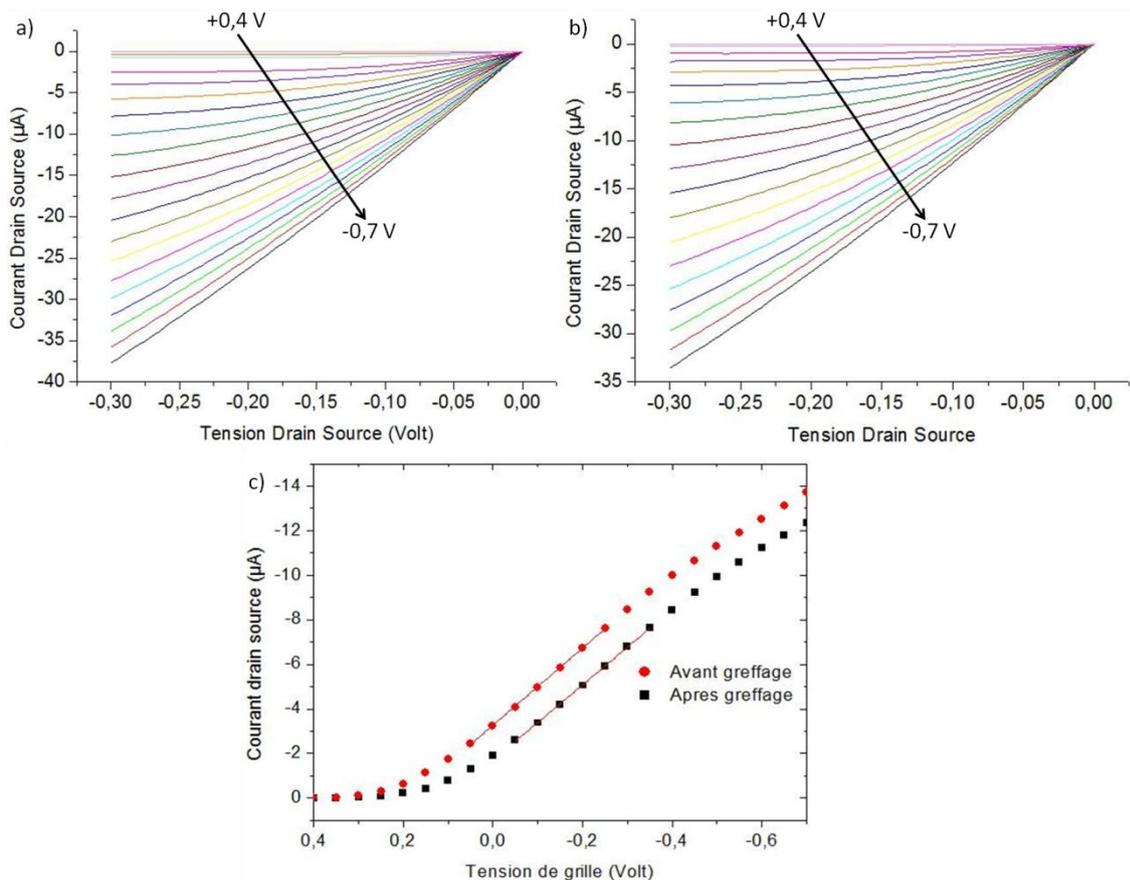


Figure III- 27 : a) Caractéristique  $I(\text{drain source}) - V(\text{drain source})$  du transistor avant fonctionnalisation pour une tension de grille comprise entre  $+0,4V$  et  $-0,7V$  vs  $Ag/AgCl$ , b) Caractéristique  $I - V$  (drain-source) du transistor après fonctionnalisation pour une tension de grille comprise entre  $+0,4V$  et  $-0,7V$  vs  $Ag/AgCl$ , c) Caractéristique  $I(\text{drain source}) - V(\text{grille})$  du transistor avant (en rouge) et après (en noir) greffage.

Après avoir caractérisé notre FET avant fonctionnalisation, nous avons procédé au suivi de l'immobilisation de l'héxylamine en temps réel. Le suivi consiste à appliquer une tension drain-source de  $-100mV$  et une tension de grille de  $-300mV$  et d'enregistrer le courant drain-source en fonction du temps. Nous injectons ensuite des concentrations différentes d'héxylamine dans la solution de greffage. La solution de greffage utilisée est du phosphate de sodium dibasique à  $0,2M$  ajustée à un  $pH$  de  $9,6$ . Avant de procéder à la première injection nous avons laissé le courant se stabiliser pendant quelques heures. Nous effectuons une première injection d'héxylamine de  $2\mu M$  en solution, puis nous laissons le courant évoluer pendant deux heures. La seconde injection porte la concentration de la solution à  $800\mu M$  et la troisième à  $17,5mM$ . Le temps total de fonctionnalisation est de 16 heures. La Figure III- 28 montre les injections ainsi que la variation de l'intensité drain-source en fonction du temps. La variation du courant est positive car le courant drain-source est négatif

mais cela correspond bien à une baisse du courant. Comme nous l'avons vu au chapitre I, seules les molécules chargées négativement peuvent influencer sur la conductivité du canal du fait de la charge positive des hydrogènes de surface. Or la molécule introduite en solution est chargée positivement car l'amine est majoritairement protonée pour cette valeur de pH. Elle ne peut donc pas modifier la conductivité du transistor. De plus elle n'aura pas tendance à s'adsorber sur la surface du fait de la charge positive de la surface. Cette variation implique qu'il y ait une diminution de la quantité de C-Hx en surface mettant clairement en évidence la disparition de C-H en surface.

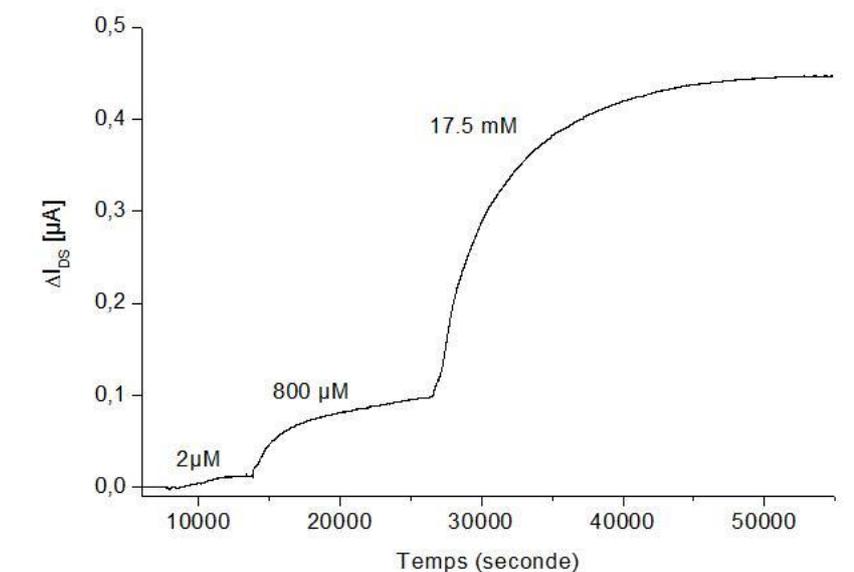


Figure III- 28 : Variation du courant drain-source en fonction du temps lors des injections successives d'héxylamine dans une solution de phosphate de sodium dibasique 0,2M ajustée à pH 9,6 à des concentrations successives de 2, 800 $\mu M$  et 17,5mM. La tension drain-source imposée est de -100mV et la tension de grille de -300mV vs Ag/AgCl.

L'utilisation d'une fonction exponentielle permet d'accorder les données expérimentales aux calculs théoriques. L'ajustement des paramètres montrent qu'il s'agit d'une exponentielle du deuxième ordre pour les deux premières injections et du premier ordre pour la dernière. Cela signifie que deux paramètres rentrent en compte dans la cinétique de greffage. Nous aborderons plus en détails ce point dans la partie suivante.

Après 14 heures de fonctionnalisation, le transistor a été caractérisé par la mesure  $I_{DS}$ - $V_{DS}$  dans les mêmes conditions qu'avant l'immobilisation de l'héxylamine. La Figure III-27.b montre les courbes obtenues. A partir des courbes  $I_{DS}$ - $V_{DS}$ , nous avons tracé pour le transistor, avant et après le greffage, le courant drain-source en fonction de la tension de grille

pour une de tension drain-source de -100mV. Les données sont reportées dans la Figure III-27.c. On peut remarquer que pour une tension de grille comprise entre 0 et -0,3V les deux courbes affichent une partie linéaire. De plus il y a un décalage en intensité entre le FET avant et après greffage qui met en évidence une variation du nombre de C-H de surface. Or l'intensité du drain est directement proportionnelle au nombre de porteur. La baisse de l'intensité observée fait apparaître une diminution de la conductivité qui correspond à une diminution moyenne du nombre de porteur par rapport au transistor non modifié de 10%. Hamers et al. [45] ont évalué la quantité d'atomes de carbone présent sur diamant hydrogéné (111) est de  $1,8 \cdot 10^{15}$  atome/cm<sup>2</sup>. Dans le même temps ils ont montré qu'une monocouche compacte conduit à l'immobilisation de  $4 \cdot 10^{14}$  molécule/cm<sup>2</sup>. Cela signifie donc que lors du greffage d'une monocouche compacte sur diamant hydrogéné, seul un atome de carbone sur 10 est lié à une molécule appartenant à la monocouche. C'est ce qui explique que même après fonctionnalisation sur diamant hydrogéné il existe toujours ces phénomènes de conduction surfacique. Dans notre cas la diminution de l'intensité et donc de la conductivité du canal de 10% semble correspondre à la disparition d'une liaison C-H sur un atome de carbone sur 10 et corrèle les observations faites par Hamers. Dans la partie III.C.4.a, nous avons caractérisé par FTIR un échantillon greffé dans les mêmes conditions avec l'héxylamine et nous avons montré que la molécule était bien greffée. Même s'il est pour le moment impossible de statuer sur la nature de liaison, si on corrèle les résultats de FTIR et ceux du SGFET, on peut affirmer que la fonctionnalisation a lieu sur les CH de surface, qu'il y a disparition de ces CH et greffage de la molécule.

Le greffage de l'héxylamine sur SGFET, nous a permis de mettre en évidence la spécificité du greffage sur les liaisons C-H de surface du diamant hydrogéné. En dépit de la grande stabilité associée à ce type de liaison, nous avons pu montrer la disparition des hydrogènes de surface lors de la fonctionnalisation. Ce constat implique donc la rupture de ces liaisons durant le mécanisme de greffage. Nous avons également pu voir que la variation de la conductivité observée semble correspondre à l'immobilisation d'une monocouche. D'autre part, le suivi du greffage laisse apparaître une cinétique de greffage complexe qui semble être du deuxième ordre. En revanche nous ne pouvons toujours pas affirmer que le greffage soit équivalent sur chacune des orientations cristallines présentes. C'est ce à quoi nous allons maintenant essayer de répondre.

## 5.b.2 Etude électrochimique de l'immobilisation du ferrocène aminé

La caractérisation de la quantité de molécule fonctionnalisée est une étude nécessaire pour différentes raisons. Tout d'abord, l'estimation du nombre de molécules greffées nous permettra de supputer quant à la formation ou non d'une monocouche. De plus, comme nous l'avons vu dans la partie III.C.4.c, il y a une évolution du contraste de fluorescence et donc de la quantité immobilisée en fonction du temps de contact entre la solution de greffage et le substrat. Ce constat nous autorise à penser qu'il est possible de remonter à la cinétique en calculant le nombre de molécules greffées en fonction du temps de greffage. L'électrochimie est une technique adéquate pour calculer le nombre d'espèces présentes sur la surface de l'électrode, lorsque celles-ci sont immobilisées. Il faut pour cela choisir un couple redox, qui affiche une bonne réversibilité. Nous avons choisi un couple bien connu et un des plus utilisé dans le domaine de l'électrochimie, le ferrocène. C'est un couple stable, affichant une bonne réversibilité car le processus d'échange électronique est purement électrochimique. En effet, le transfert électronique entre le ferrocène et la surface s'effectue selon un processus « outer sphere ». Contrairement aux processus inner sphere qui nécessite la formation d'une liaison entre l'espèce redox et le substrat, le transfert outer sphere s'effectue par un mécanisme de type effet tunnel.

Cette étude a été réalisée sur une série de huit échantillons nanocristallins lourdement dopés provenant du même wafer d'origine. Cela nous a permis de travailler avec une gamme d'échantillons aux propriétés électrochimiques similaires. Nous avons ensuite greffé sur ces échantillons, préalablement hydrogénés dans les conditions standards décrites dans la partie III.C.4, une molécule de ferrocène-(peg)<sub>3</sub>-aminé (Figure III- 29).

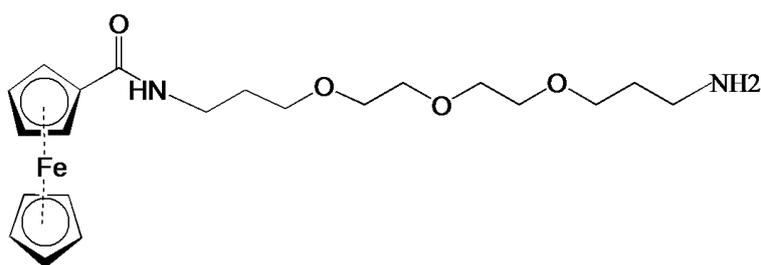


Figure III- 29 : Formule topologique du ferrocène(peg)<sub>3</sub> aminé.

Une seule solution mère a été préparée et utilisée pour le greffage de chaque échantillon. Cette solution comporte le ferrocène-(peg)<sub>3</sub>-aminée à 20 mM dans une solution aqueuse de phosphate dibasique 0,2M, ajustée à un pH de 10,6. La solution a ensuite été fractionnée et chaque échantillon a été immergé dans cette dernière avec des temps de contact

différents de : 30 sec, 1 min, 30 min, 1h30, 3h30, 8h, 14h et 24h. Les échantillons ont ensuite été rincés, puis séchés avant d'être caractérisés par électrochimie. La solution électrolytique support utilisée est une solution de Perchlorate de lithium 0,2M. Pour chaque échantillon, l'acquisition des voltampérogrammes à différentes vitesses de balayage a été effectuée. La Figure III- 30.a montre les voltampérogrammes du ferrocène correspondant à l'échantillon qui est resté en contact 3h30 avec la solution de greffage. On peut voir que le potentiel standard du couple est de + 0,38 V par rapport à l'électrode de référence Ag/AgCl. Cela correspond aux valeurs rapportées dans la littérature [46], [47]. L'équation de Randles-Sevcik (1) relie l'intensité recueillie à l'électrode en fonction du coefficient de diffusion de l'espèce D, de sa concentration C, du nombre d'électrons impliqués dans le transfert n, de la surface de l'électrode A, de la vitesse de balayage v et de la constante de Faraday F.

$$I = \frac{0,4463nFAC\sqrt{DnFv}}{\sqrt{RT}} \quad (1)$$

L'équation présentée ici décrit l'évolution du courant dans le cas d'un régime diffusif, c'est-à-dire dans le cas où l'espèce est en solution. Le transport de matière jusqu'à l'électrode est donc soumis à la diffusion. Dans ce cas, la loi de Randles-Sevcik montre que l'intensité sera proportionnelle à la racine carrée de la vitesse de balayage.

Une espèce immobilisée sur la surface de l'électrode ne sera en revanche pas soumise au phénomène de diffusion. L'intensité enregistrée à l'électrode peut alors être exprimée comme :

$$I = 0,25 NFAC.l.a$$

où l est l'épaisseur de la couche réservoir, C la concentration en espèce dans le volume de la couche réservoir (A.l) et  $a = nFv/RT$ .

Cela signifie donc que pour toute espèce immobilisée sur la surface de l'électrode, l'intensité des pics d'oxydation et réduction recueillie sera donc proportionnelle à la vitesse de balayage. Nous avons reporté l'intensité des pics d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage (Figure III- 30.b). L'évolution linéaire de l'intensité des pics en fonction de la vitesse de balayage, implique donc que l'espèce est bien immobilisée sur le

substrat.

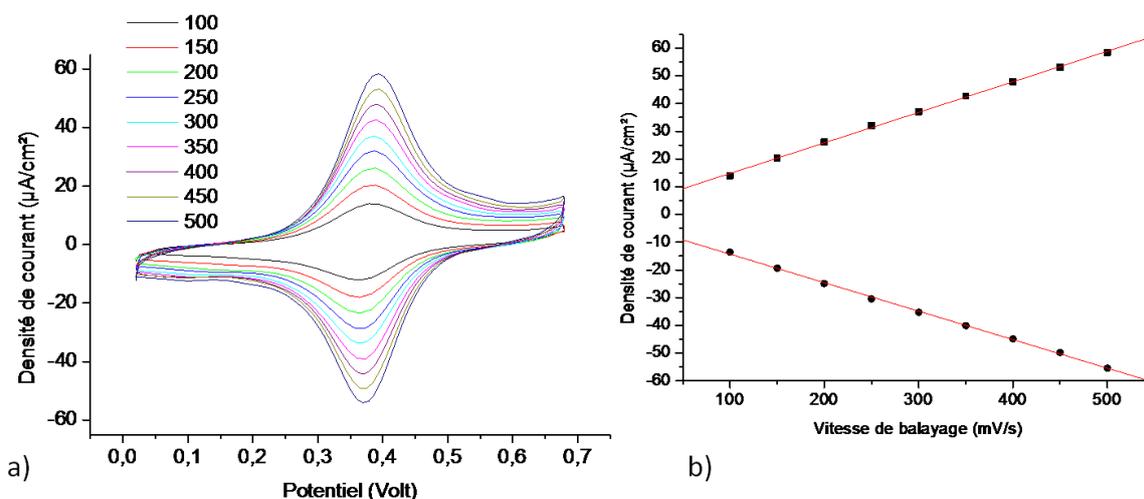


Figure III- 30 : a) Voltampéromogrammes réalisés sur une électrode diamant restée en contact avec la solution de greffage contenant le ferrocène aminé pendant un temps de 3h30. Solution électrolytique de LiClO<sub>4</sub> 0,2M dans l'eau, S<sub>électrode</sub> : 0,12 cm<sup>2</sup>. b) Graphique montrant l'évolution de la densité de courant des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage des voltampéromogrammes représentés.

Il est également possible grâce aux voltampéromogrammes d'évaluer la quantité d'espèces immobilisée à la surface de l'électrode. Pour tout phénomène faradique il est possible de remonter à la charge qui a transité par l'électrode à partir des voltampéromogrammes. Pour cela il suffit d'intégrer l'aire sous le pic d'oxydation ou de réduction. La loi de l'électrolyse de Faraday (2) permet de relier la charge (Q), la quantité d'espèces qui a échangé des électrons avec l'électrode ©, le nombre d'électrons impliqués dans le transfert (n) et la constante de Faraday (F).

$$Q = FCn \quad (2)$$

Nous avons ainsi pu pour chaque temps de greffage évaluer la quantité de ferrocène immobilisée sur la surface. Toutes les quantités greffées ont été calculées pour une vitesse de balayage de 250 mV/s. Nous avons ensuite tracé la quantité greffée en fonction du temps de contact de l'échantillon avec la solution de greffage (Figure III- 31.a). La Figure III- 31.b a quant à elle été tracée sous forme d'histogramme et selon une échelle de temps non linéaire.

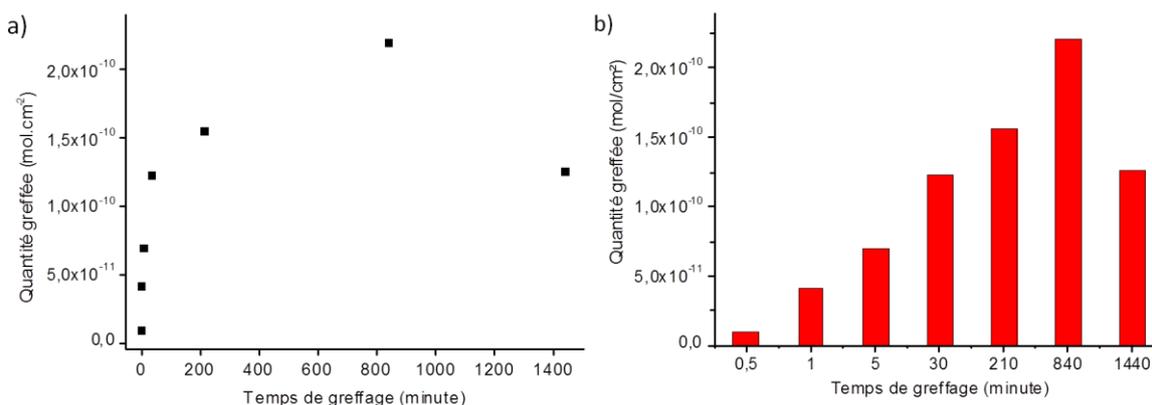


Figure III- 31 : a) Evolution de la quantité de ferrocène immobilisée sur des électrodes diamant restées en contact des temps différents (30s, 1, 30, 90 210, 840, 1440 min) avec la solution de greffage contenant le ferrocène aminé en fonction du temps, b) Histogramme montrant l'évolution de la quantité de ferrocènes immobilisée sur des électrodes diamant en fonction d'une échelle de temps non linéaire.

On remarque tout d'abord la diminution apparente de la quantité greffée pour le dernier point correspondant au temps de 24 heures. Le cas particulier de cet échantillon sera traité ultérieurement et nous nous intéresserons uniquement aux six premiers points dans un premier temps. La Figure III- 31.a représentant l'évolution de la quantité greffée en fonction du temps nous renseigne donc directement sur la cinétique du greffage. En nous intéressant de plus près à la vue d'ensemble de la Figure III- 32.a on constate que le greffage semble présenter deux phases cinétiques différentes. Les gammes de temps correspondant à ces deux cinétiques ont été entourées par des cercles. La première phase cinétique représentée par la courbe bleue est rapide, alors que la deuxième illustrée par la courbe rouge est lente. Cela confirme les observations relatives aux différentes techniques de fonctionnalisation non radicalaire aboutissant à la formation de monocouche. Nous nous plaçons dans la configuration où la quantité d'espèces à immobiliser en solution n'est pas limitante. Dans la première étape, la quantité de molécules déjà immobilisées à la surface est faible, elles n'ont donc à ce moment là pas encore d'interactions entre elles. Les sites de greffage potentiels en surface sont par conséquent majoritairement non occupés et tout se passe comme si les molécules à greffer en solution ne voyaient pas les sites déjà fonctionnalisés. On peut voir que cette étape est relativement courte et correspond à une gamme de temps comprise entre 0 et une dizaine de minutes. Il a été établi expérimentalement que la quantité immobilisée durant cette étape correspond à la formation de 40 à 80 % de la monocouche. Cette valeur dépend en majeure partie de la molécule immobilisée.

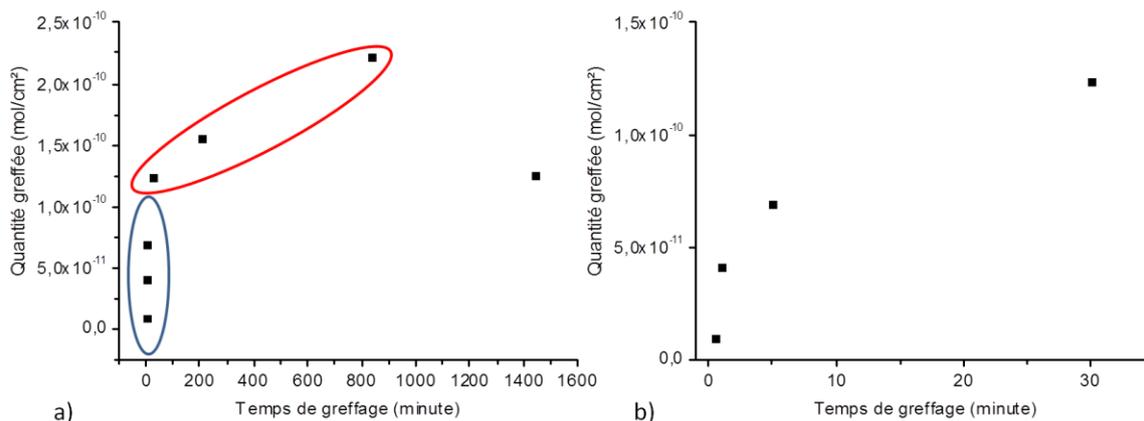


Figure III- 32 : a) Evolution de la quantité de ferrocènes immobilisée en fonction du temps de greffage mettant en évidence deux phases cinétiques distinctes, b) Zoom sur les quatre premiers temps de greffage (30s, 1, 30 et 90 min) de la courbe illustrant l'évolution de la quantité de ferrocènes immobilisée en fonction du temps de greffage.

Il est admis que le greffage d'une molécule peu encombrante correspond à une quantité d'espèces immobilisée de l'ordre de  $10^{-10}$  mole/cm<sup>2</sup>. Dans notre cas la quantité maximale immobilisée est de  $2,2 \cdot 10^{-10}$  mole/cm<sup>2</sup> pour un temps de 14 heures. Cette quantité est de  $1,3 \cdot 10^{-10}$  mole/cm<sup>2</sup> pour un temps de 30 min. On a donc formation de 60% de la monocouche après seulement 30 min de greffage. Au vue des quantités greffées, rien ne semble indiquer la formation de multicouches, il semblerait même que cette technique de greffage aboutisse à la formation d'une monocouche. Il est à ce stade impossible de conclure qu'il y ait formation d'une monocouche, nous essaierons de répondre à cette question dans la partie III.D lorsque nous traiterons la partie axée sur le mécanisme de greffage. A la suite de cette étape rapide, apparaît la deuxième étape beaucoup plus lente. La diminution de la cinétique est due à l'encombrement surfacique généré par les molécules déjà immobilisées. La quantité d'espèces greffée sur la surface augmente et les sites de greffages potentiels restant sont maintenant moins nombreux et moins accessibles. Les molécules présentes en surface sont orientées de manière aléatoire, encombrant donc les sites de greffage disponibles restant. Pour que le greffage de nouvelles espèces soit possible, il doit maintenant y avoir un mouvement des chaînes alkyles des molécules immobilisées permettant de libérer un nouveau site de greffage. Il n'existe en réalité aucune délimitation précise séparant ces deux étapes mais il s'agit plutôt d'une diminution progressive de la vitesse de greffage. Ceci est clairement mis en évidence si on effectue un zoom sur les quatre premiers points Figure III- 32.b, on remarque qu'en réalité la courbe a un comportement exponentiel. L'analyse de cette

courbe sera abordée dans la partie III.E qui sera consacrée à l'analyse détaillée de la cinétique du greffage.

Nous allons maintenant tenter d'expliquer la raison de la diminution apparente de la quantité greffée pour le temps de greffage de 24 heures. Sur la Figure III- 33.a sont représentés les voltampérogrammes correspondant à différents temps de greffage pour une vitesse de balayage de 300mV/s.

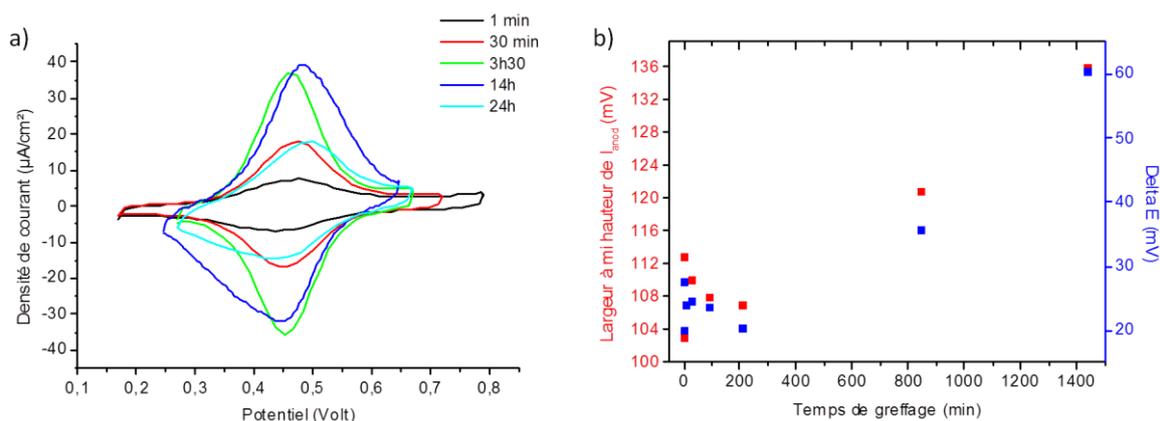


Figure III- 33 : a) voltampérogrammes réalisés sur des électrodes diamant restées en contact avec la solution de greffage contenant le ferrocène pendant 1, 30, 210, 840 et 1440 minutes, b) Evolution de la largeur à mi-hauteur des pics d'oxydation, ainsi que de la différence de potentiel entre les pics d'oxydation et de réduction des différents voltampérogrammes (Figure III- 33.a) en fonction du temps de greffage.

Nous avons pour chacun de ces voltampérogrammes calculé la différence de potentiel séparant le pic d'oxydation et le pic de réduction (notée  $\Delta E$ ), ainsi que la largeur à mi-hauteur de ces mêmes pics. Les valeurs obtenues sont reportées dans la Figure III- 33.b . On remarque que l'évolution des valeurs du  $\Delta E$  et de la largeur à mi-hauteur en fonction du temps de greffage est la même. La loi de Nernst (3) définit le potentiel d'équilibre de l'électrode par rapport au potentiel standard du couple redox.

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \left[ \frac{a^{\text{ox}}}{a^{\text{red}}} \right] \quad (3)$$

Pour un couple redox parfaitement réversible en solution, la valeur du  $\Delta E$  doit donc être de 30 mV. Dans notre cas, l'espèce étant immobilisée au voisinage de la surface, il ne devrait y avoir en théorie aucune différence de potentiel entre le pic d'oxydation et de

réduction. Dans la pratique, cette valeur est supérieure à 0V. On constate pour les temps inférieurs à 14 heures que la valeur du  $\Delta E$  est de l'ordre de 25mV pour les premiers temps de greffage et qu'elle augmente pour les points correspondant à 14 et 24 heures de greffage (Figure III- 33.b). De plus si l'on regarde l'allure des voltampérogrammes de la Figure III- 33.a, on peut voir l'élargissement, ainsi que l'écrasement des pics d'oxydation et de réduction. Les valeurs des largeurs à mi-hauteur des voltampérogrammes affichent un comportement similaire à celles de l'évolution  $\Delta E$  et mettent en évidence cet écrasement. Il faut tout d'abord rappeler que le  $\Delta E$  est une valeur thermodynamique directement reliée à l'enthalpie libre du système. Le potentiel E appliqué à l'électrode représente l'énergie que l'on met à disposition des espèces redox pour échanger des électrons avec l'électrode de travail. Dans notre cas l'augmentation du  $\Delta E$  correspond à une dissipation d'énergie. On peut modéliser l'interface de l'électrode de diamant par le circuit équivalent de Randles [4, 48] représenté sur la Figure III- 34.a.

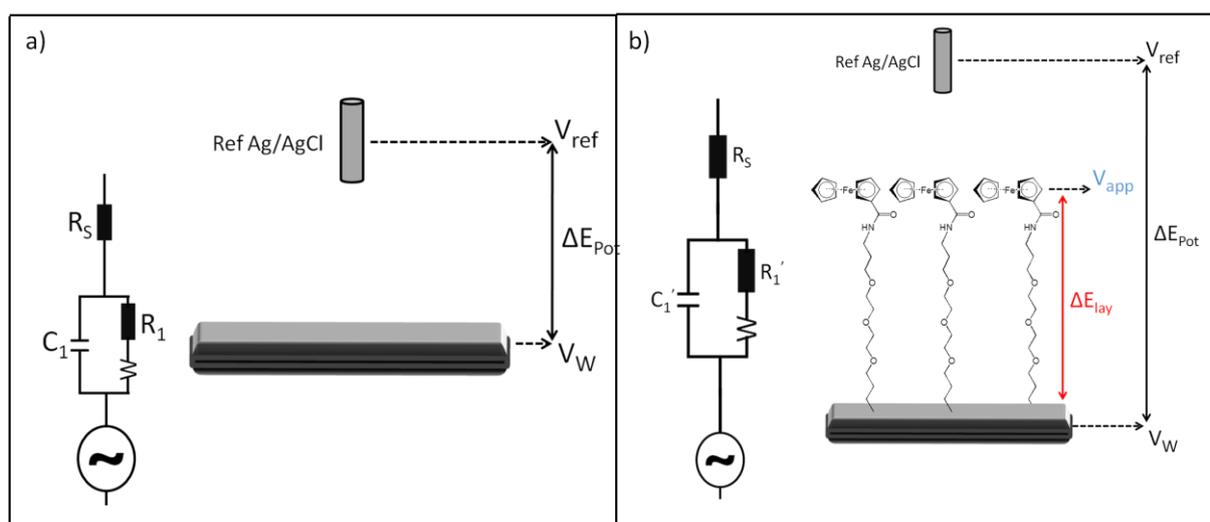


Figure III- 34 : a) Schéma du modèle de Randles, décrit par un circuit électrique équivalent, associé au comportement électrique d'une électrode diamant, b) Schéma de la modélisation par un circuit électrique équivalent d'une électrode diamant fonctionnalisée par une couche de ferrocène-(peg)<sub>3</sub>.

Le courant total enregistré à l'électrode provient de processus faradiques et non-faradiques. Les processus faradiques proviennent du transfert de charges entre la sonde électrochimique en solution et l'électrode et les processus non faradique de la capacité double couche. Pour une sonde électrochimique donnée et un matériau non fonctionnalisé, l'impédance dépend uniquement des propriétés de l'électrode. Lorsque l'on fonctionnalise un matériau, la contribution de la couche immobilisée modifie considérablement les processus

faradiques et capacitifs et donc l'impédance (Figure III- 34.b). Quand la couche fonctionnalisée est compacte, les propriétés électrochimiques de l'électrode vont être modifiées. Le groupement ferrocène situé au dessus de cette couche ne verra plus le potentiel  $V_{pot}$  imposé par le potentiostat, mais un potentiel apparent  $V_{app}$  inférieur à ce dernier (Figure III- 34.b). Une des modifications du comportement électrochimique est l'augmentation de la capacitance avec le temps de greffage. Ainsi  $C_1$  devient  $C_1'$  avec  $C_1' > C_1$ . Quand la couche greffée devient compacte, la densité des chaînes ralentit considérablement la diffusion des ions à l'intérieur de la couche. On observe donc une augmentation de la capacité double couche. Il est possible à partir des différents voltampérogrammes d'évaluer le courant non-faradique (ou capacitif) (Figure III- 35.a). Ces valeurs ont été reportées sur la Figure III- 35.b. Il faut noter qu'il s'agit d'une estimation des valeurs et en aucun un calcul formel mais cela nous donne néanmoins des informations sur son évolution en fonction du temps de greffage. L'autre modification est liée à la difficulté qu'a le groupement ferrocène à atteindre la surface. Pour que le transfert électronique soit possible, cela nécessite une certaine mobilité des chaînes. Or le groupement est maintenant éloigné de la surface et l'encombrement dû à la densité de la couche rend difficile l'approche du groupement redox vers la surface. Cela se traduit par une augmentation de la résistance de transfert de charge et  $R_1$  devient  $R_1'$  avec  $R_1' > R_1$  (Figure III- 34). Ces deux phénomènes impliquent d'augmenter l'énergie, et donc le potentiel appliqué à l'électrode, nécessaire au processus redox. Dans le cas extrême correspondant à l'échantillon greffé pendant 24 heures et pour une vitesse de balayage élevée, il n'est donc plus possible d'échanger des électrons avec tous les groupements ferrocène de la couche. Cela implique donc une baisse apparente de la quantité immobilisée.

La caractérisation du greffage du ferrocène aminé par électrochimie nous a permis de mettre en évidence l'influence du temps sur la quantité greffée, ainsi que les phénomènes de densification de la couche. Cela nous a également permis de remonter à la cinétique de greffage. Le calcul des quantités immobilisées pour les temps de greffage longs semble indiquer que cette méthode permet d'obtenir une monocouche sans toujours en avoir la preuve. Nous allons maintenant caractériser notre greffage par MEB et voir s'il est possible de conclure quant à la formation d'une monocouche et à l'homogénéité du greffage sur chaque orientation cristalline.

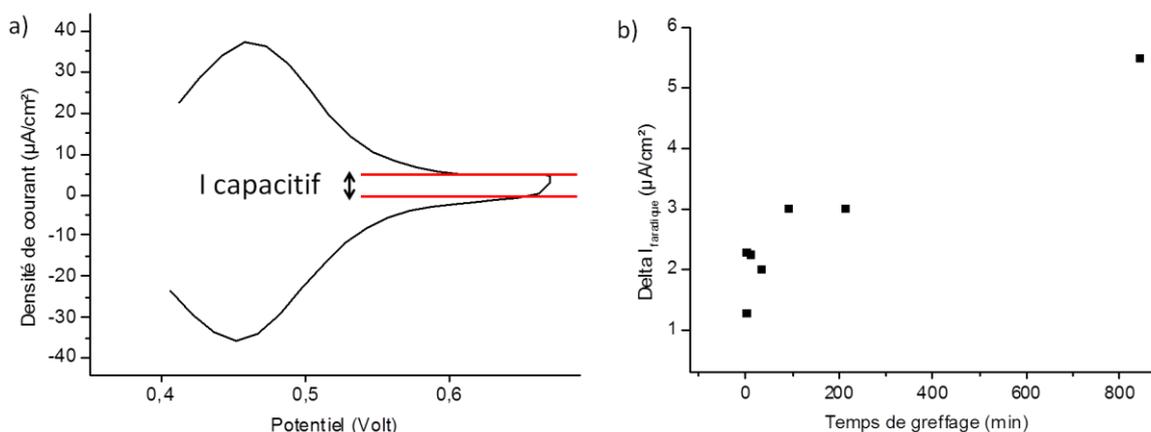


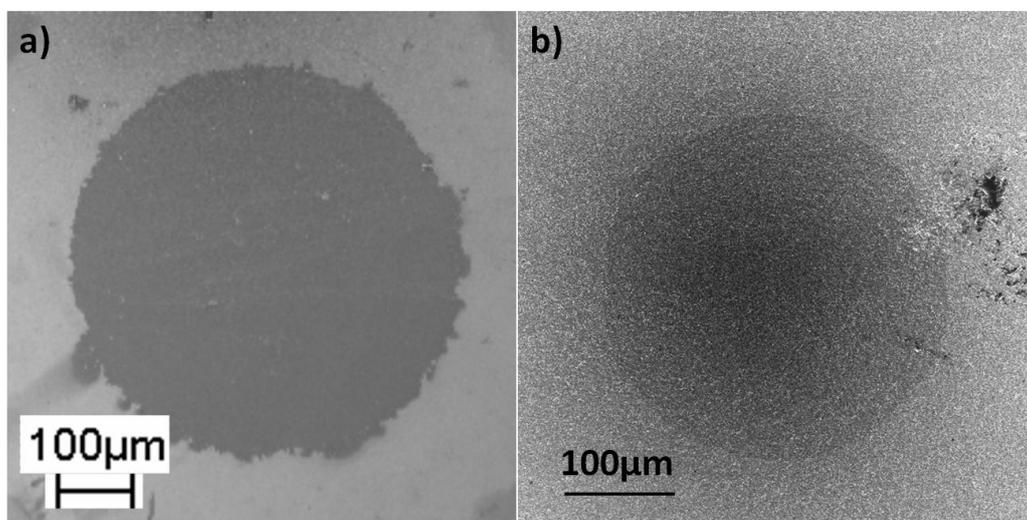
Figure III- 35 : a) Illustration de la méthode d'évaluation du courant capacitif à partir d'un voltampérogramme, b) Variation de l'intensité du courant capacitif en fonction du temps de greffage du ferrocène.

### III.C.5.c Caractérisation MEB

Hamers et al. [49] ont utilisé la technique MEB pour caractériser le greffage d'une monocouche qu'ils ont immobilisée par la méthode de photochimie des alcènes. Ils ont pu observer une différence de contraste entre les zones greffées qui apparaissent plus sombres et les zones non greffées. Cette observation peut être reliée au fait que les électrons secondaires émis (<50eV) par le substrat diffusent au travers de la couche organique après leur émission. Le niveau de gris d'un pixel de l'image observé lors des expériences MEB en électrons secondaires peut être globalement reliée au nombre d'électrons (secondaires) récoltés dans la partie de l'échantillon correspondant au pixel. Un niveau de gris clair correspond à un grand nombre d'électron recueilli au détecteur.

Agnes et al. [50] ont étudié le greffage des sels de diazonium par voie électrochimique sur des électrodes diamant. Ils ont caractérisés les couches par AFM et ont montré que cette technique conduisait à la formation de multicouches. Ils ont également procédé à des observations MEB de leurs fonctionnalisations. La Figure III- 36.a montre une image d'un plot du film de nitrophényles immobilisé. Nous avons greffé par drop casting la biotine-(peg)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub> par la méthode de greffage des amines sur diamant hydrogéné dans les mêmes conditions que l'étude menée dans la partie III.C. La solution est composée de biotine aminée 2mM dans une solution de phosphate de sodium dibasique 0,2M contenant du glycérol à 20%

en volume et ajustée à pH 10. La solution est restée une heure en contact avec l'échantillon. Nous avons ensuite caractérisé le greffage par microscopie électronique à balayage (MEB).

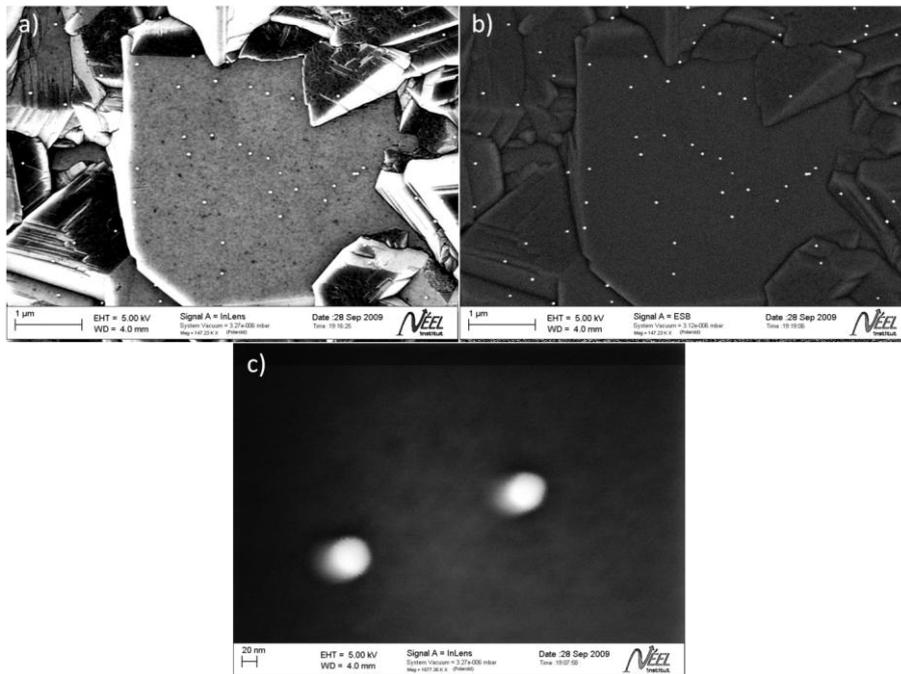


*Figure III- 36 : Images MEB en électrons secondaires : a) d'un plot de nitro-phenyles greffés par réduction électrochimique des sels de diazonium, b) d'un plot de biotine immobilisée par la méthode de greffage spontanée des amines sur diamant hydrogéné. Tension d'accélération : 2keV*

La Figure III- 36.a. montre l'image MEB en électrons secondaires d'un plot de biotine greffé par drop casting. On observe qu'une tache sombre d'un diamètre de 320 µm apparaît au centre de l'image. Elle correspond parfaitement à la taille des plots observés en microscopie de fluorescence. Nous pouvons donc affirmer qu'il s'agit de notre plot de biotine. Si l'on compare notre plot à celui observé par Agnes et al. [51], on remarque que dans leurs cas le contraste entre la zone greffée et non greffée est plus marqué. Bien qu'il ne soit pas encore possible de conclure, il semblerait encore que notre greffage ne conduise pas à la formation de multicouches. Il n'a en revanche pas été possible dans ces conditions de déterminer si le greffage est efficace sur chacune des orientations cristallines présentes dans les échantillons polycristallins.

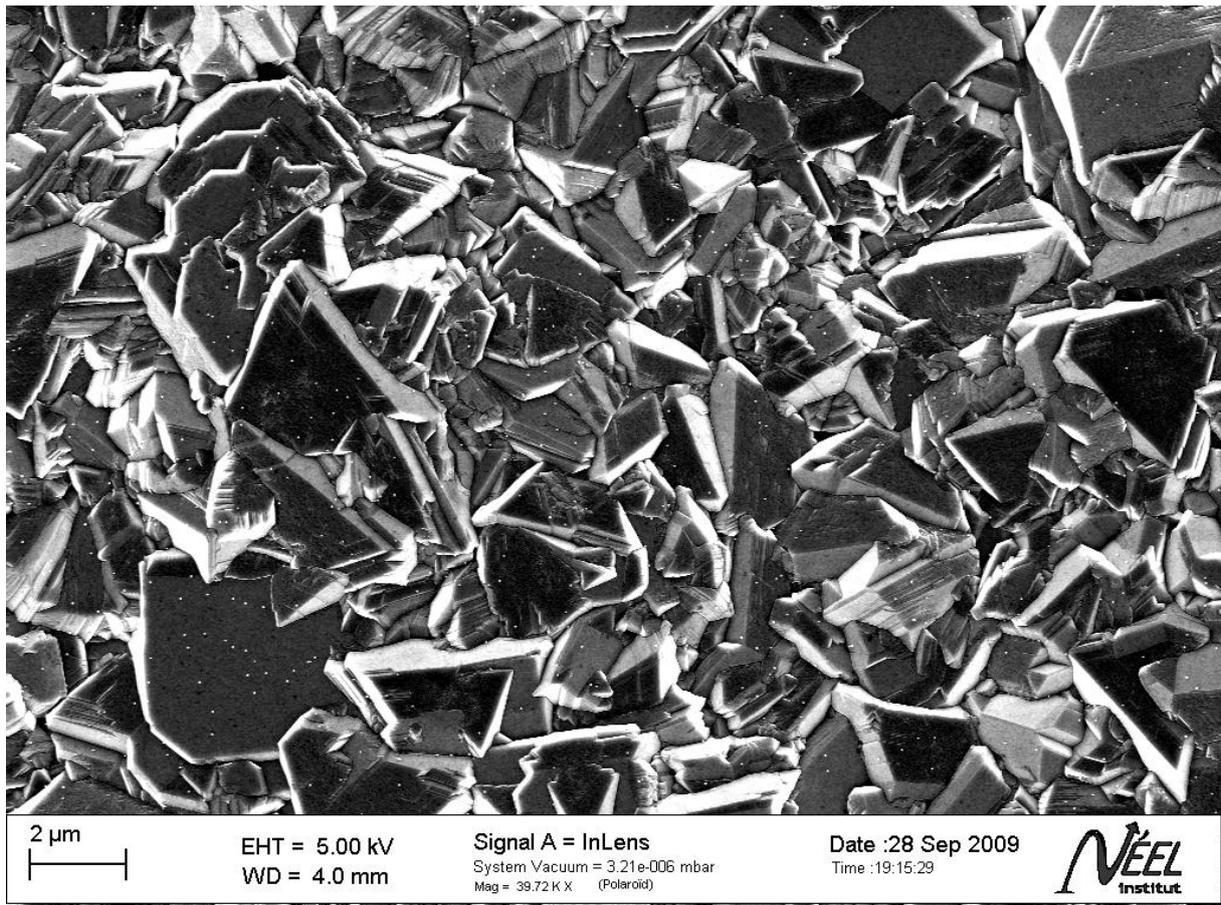
Pour tenter de mettre en évidence si le greffage est spécifique à une orientation cristalline particulière, nous avons utilisé une solution de streptavidine fonctionnalisée avec des billes d'or d'un diamètre de vingt nanomètres et cherché à les localiser en MEB. Nous avons fonctionnalisé un échantillon microcristallin avec la biotine-(peg)<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> selon le même protocole que précédemment. Il a ensuite été placé dans la solution de BSA à 10 mgr/ml pendant 20 minutes, puis mis en contact avec la solution de streptavidine-bille d'or pendant

deux heures. La mesure de la Densité Optique (D.O) a permis l'estimation de la quantité de billes d'or en solution. Cette valeur est de l'ordre de  $10^9$  billes. L'échantillon a ensuite été rincé au PBS puis à l'eau ultra pure et enfin séché. Les Figure III- 37.a, c montrent les images MEB en électrons secondaires de l'échantillon couplé avec la streptavidine-bille d'or. La Figure III- 37.b est une image en électrons rétrodiffusés. Le contraste de phase observé entre le matériau foncé et les particules brillantes nous indique qu'il s'agit bien de particules métalliques. Le phénomène de rétrodiffusion est lié au numéro atomique. En effet, plus un atome est lourd, plus la quantité d'électrons rétrodiffusés est importante. De plus le diamètre des nanoparticules d'or utilisées est de 20nm, il correspond bien à la taille des objets observés sur la Figure III- 37.c.



*Figure III- 37 : a), c) Images MEB en électrons secondaires de l'échantillon greffé avec la biotine, puis couplé à la solution de streptavidine-bille d'or, b) Image MEB en électrons rétrodiffusés du même échantillon.*

L'observation de la Figure III- 38, montre que les particules d'or sont aléatoirement réparti sur l'ensemble de l'échantillon. On en retrouve sur tous les types de grains présents sur la surface du diamant. Cela montre clairement que le greffage n'est pas dépendant d'une orientation cristalline particulière. On peut penser que la faible quantité de bille d'or observée est due à la faible quantité de greffage, or nous verrons dans la partie III.D, que cette technique de greffage conduit à la formation d'une monocouche.



*Figure III- 38 : Image MEB en électrons secondaires de l'échantillon greffé avec la biotine puis couplé à la solution de streptavidine-bille d'or*

La quantité de biotine immobilisée est donc bien supérieure à la quantité de bille d'or observées. A travers un comptage statistique du nombre de billes d'or, on trouve une quantité de 5 billes d'or par  $\mu\text{m}^2$ . La taille de l'échantillon est de  $6 \times 6 \text{mm}^2$ , soit  $0,36 \text{cm}^2$ . On peut en déduire que le nombre de billes d'or total immobilisées sur l'échantillon est de l'ordre de  $2 \cdot 10^8$  billes et nous avons initialement une quantité de  $10^9$  billes en solution. Plusieurs raisons liées au mode opératoire peuvent expliquer cette différence. Premièrement, il est peu probable que toutes les molécules de streptavidine-bille d'or présentes en solution puissent se coupler avec une molécule de biotine en surface. Deuxièmement, l'analyse en MEB de l'échantillon implique qu'il soit rincé et séché avant caractérisation. Cette étape de séchage peut avoir engendré une dénaturation des protéines et le décrochage d'une partie des billes d'or.

Jusqu'ici nous avons mis en évidence par FTIR, le greffage de l'hexylamine sans toutefois pouvoir déduire la nature du lien entre le substrat et cette dernière. Les expériences de fonctionnalisation de la biotine et sa caractérisation par microscopie de fluorescence ont

permet de trouver les conditions de greffage optimum, ainsi que l'effet des paramètres de greffage sur la quantité immobilisée. Nous avons également montré la stabilité de l'accroche entre les molécules greffées et le substrat. Grâce aux caractérisations électrochimiques du ferrocène greffé, nous avons vu que la quantité immobilisée est de l'ordre de celle d'une monocouche. Enfin nous avons recueilli des informations concernant la cinétique de greffage. Nous allons maintenant à partir de ces différentes observations être en mesure de formuler des hypothèses sur le mécanisme de greffage. Nous allons également approfondir l'étude de la cinétique de la réaction et voir si elle valide ou non le mécanisme proposé.

### III.D. Mécanisme de greffage

Deinhammer et al. [52] ont été les premiers à mettre en évidence le greffage des amines par voie électrochimique sur carbone vitreux. Cette technique est basée sur l'oxydation électrochimique d'une amine aliphatique induisant la création d'un radical sur cette dernière. Ce radical réagit ensuite sur la surface de l'électrode. Il se forme donc une liaison C-N avec la surface. Il faut noter que le potentiel d'oxydation d'une amine aliphatique primaire se situe autour de +1,3V vs Ag/AgCl. Par la suite Adenier et al. [53] ont montré que l'on pouvait étendre cette technique à un grand nombre de métaux tels que le Platine et l'Or et le Fer. Enfin Pinson et al. [54] ont mis en évidence une méthode de greffage spontanée d'amines sur les mêmes matériaux que ceux utilisés pour le greffage électrochimique. La réaction se déroule dans l'acétonitrile par une simple mise en contact des échantillons avec la solution. Dans cette méthode, l'amine réagit donc sous sa forme déprotonée. Le mécanisme est décrit comme étant radicalaire et il aboutit à la formation d'une liaison C-N, comme dans le cas du greffage électrochimique. Le mécanisme de formation de ce radical en solution n'y est pas détaillé.

A ce stade, nous avons vu que la technique n'est efficace que sur diamant hydrogéné, que le seul solvant utilisable est l'eau et que le pH joue un rôle crucial. Pour être en mesure de formuler des hypothèses viables sur le mécanisme de greffage mis en jeu, il faut connaître l'état de la liaison entre le diamant et la molécule immobilisée. Vis-à-vis des travaux antérieurs, on pourrait penser à la formation d'une liaison C-N entraînant la formation d'une amine secondaire après le greffage. Des caractérisations en XPS ont été menées pour mettre en évidence la présence d'azote après la fonctionnalisation. Une des limites rencontrées provient du fait que l'azote présente une faible section efficace en XPS. De plus on retrouve

toujours la signature de ce dernier, en raison de la présence d'azote résiduel sur les échantillons. Il n'a donc pas été possible par les analyses XPS, de conclure quant à la formation ou non d'une liaison C-N. La caractérisation Infrarouge du greffage de l'hexylamine ne permet pas non plus de tirer de conclusion univoque quant à la présence d'une liaison C-N après le greffage. Les signatures principales des amines secondaires en Infrarouge est l'étirement (stretch) et l'agitation (wagg) des N-H qui apparaissent respectivement à  $3300-3500\text{ cm}^{-1}$  et  $700-750\text{ cm}^{-1}$ . Nous n'avons pas accès à ces parties du spectre. Il y a également une bande liée au stretch C-N-C comprise entre  $1170$  et  $1190\text{ cm}^{-1}$ . En se reportant au spectre infrarouge relatif au greffage de l'héxylamine sur diamant hydrogéné (Figure III- 19) traité dans la partie III.C.4.a de ce chapitre, on peut voir que cette bande est absente. Cela ne permet pas de conclure de manière explicite à l'absence d'amine. En nous reportant aux conditions de greffage, nous allons essayer de proposer un mécanisme adapté.

Si l'on considère les conditions de greffage abordées dans la partie III.C.4, on constate que, hormis le temps, le paramètre critique de cette méthode de fonctionnalisation est le pH. La Figure III- 39, montre l'évolution du contraste de fluorescence en fonction du pH pour les différents temps de greffage.

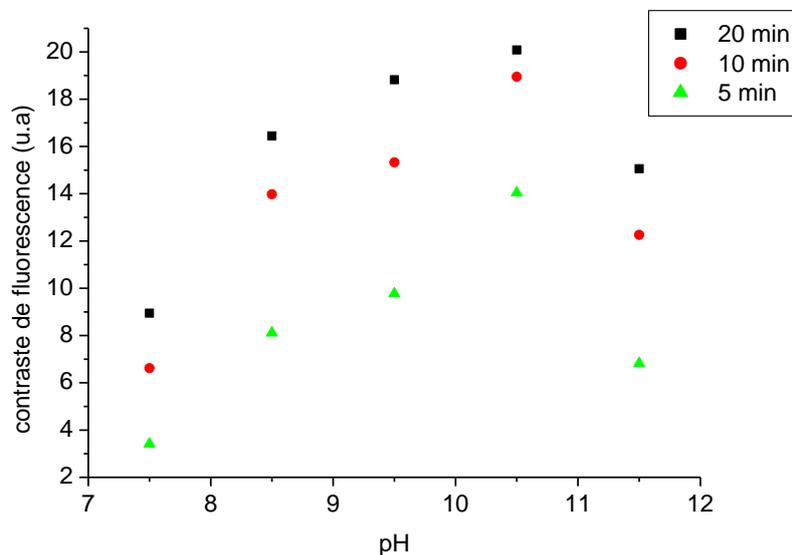


Figure III- 39 : Graphique présentant l'évolution du contraste de fluorescence associé aux différents temps de fonctionnalisation de la biotine aminée en fonction du pH des solutions de greffage.

On y voit une augmentation du contraste de fluorescence jusqu'à un optimum se trouvant entre pH 9,5 et 10,5, puis une diminution pour les valeurs de pH supérieures à 10,5. Il faut rappeler que les amines sont des bases faibles, elles possèdent donc un caractère accepteur de proton. La Figure III- 40 représente le diagramme pH unidimensionnel mettant en évidence les formes prédominantes de l'amine en fonctions du pH. Le pKa de la biotine aminée utilisée est 10, cela signifie donc que la concentration de l'amine sous sa forme déprotonée est de plus en plus importante. Or le contraste diminue lorsque la forme déprotonée de l'amine devient prépondérante. Il diminue également lorsque le pH diminue et donc que la forme protonée devient prédominante.

Tout semble indiquer qu'un autre paramètre rentre en compte. Il s'agit en fait des ions hydroxydes. Nous avons donc tracé le graphique représentant la concentration en ions hydroxydes, parallèlement à celle en amine déprotonée, en fonction du pH.

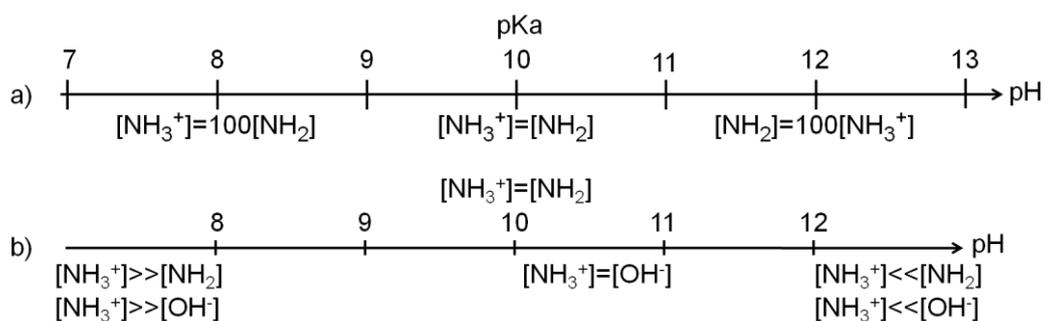


Figure III- 40 : Diagrammes unidimensionnel pH : a) indiquant les zones de prédominances des formes protonées et déprotonées de l'amine en fonction du pH, b) Comparant les quantités en amines protonées et en ions hydroxydes en fonction du pH.

Si l'on compare la quantité en ions hydroxydes à celle de la forme prédominante de l'amine on observe que pour des pH très inférieurs au pKa la quantité d'amine protonée est importante mais la quantité d'ions hydroxydes est faible. A l'inverse pour les pH supérieurs au pKa, la quantité d'amine protonée est faible mais la quantité d'ions hydroxydes est grande. Enfin pour les valeurs de pH voisines de 10, la quantité d'amine protonée et déprotonée est importante et la quantité d'ions hydroxydes est du même ordre de grandeur. Les conditions, en terme de concentration, utilisées pour l'immobilisation de la biotine-aminée utilisée était de 3mM. Nous avons à partir de cette valeur, tracé le graphique (Figure III- 41) représentant l'évolution de la concentration en ions hydroxydes et en amine déprotonée. La courbe montre que la valeur de pH pour laquelle les concentrations des deux espèces est maximale est de 10,5. Si les ions hydroxydes sont impliqués dans le greffage, il semble donc que l'amine ne

réagisse pas sous sa forme déprotonée car sinon le contraste augmenterait pour des valeurs de pH supérieur au pKa. Cela confirme donc les observations de microscopie de fluorescence et indique que les ions hydroxydes n'ont pas pour rôle de déprotoner l'amine car c'est sous cette forme qu'elle semble réagir. Tout cela semble indiquer la présence d'un mécanisme lié à la présence des ions hydroxydes en solutions, en parallèle à celui de la réaction de l'amine sur le diamant.

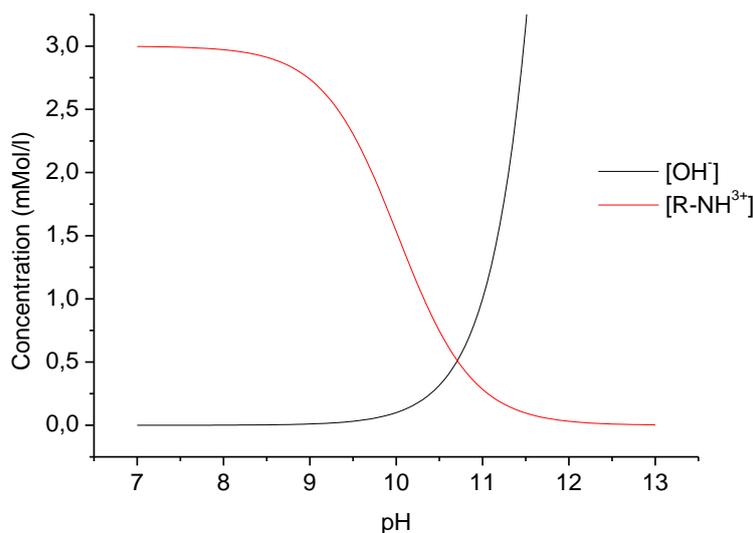


Figure III- 41 : Graphique illustrant l'évolution de la concentration de la forme protonée de l'amine et de celle en ions hydroxydes en fonction du pH pour une solution de greffage contenant 3mM de biotine-(peg)<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>.

Dans les réactions classiques issues de la chimie organique, l'amine est majoritairement utilisée sous sa forme déprotonée. Sa forme protonée est inerte car c'est à travers son doublet libre que l'amine est réactive et que la plupart des réactions usuelles ont lieu. Le seul mode de réaction possible des amines protonées est décrit par la chimie organique. Elles constituent dans ce cas un groupement partant. Elles sont impliquées dans des réactions de type substitution nucléophile. Si une réaction similaire est à l'origine de la fonctionnalisation, cela implique la présence d'un groupement nucléophile sur la surface du diamant. Si on s'intéresse à la propriété réductrice du diamant décrite dans la partie III.B.4, il est possible d'envisager sous certaine condition, la présence d'un groupement de ce type à la surface du diamant hydrogéné. En effet, les hydrogènes de surfaces du diamant hydrogéné sont polarisés positivement et les carbones liés à ces derniers négativement (Figure III- 42.a).

L'électronégativité de l'atome d'hydrogène de 2.5 et celle du carbone est de 2.1 sur l'échelle de Pauling. La polarisation positive de l'atome d'hydrogène est donc minime mais suffisante pour augmenter l'affinité de la surface vis-à-vis des ions chargés négativement [55]. De plus nous avons vu que les ions hydroxydes semblent être impliqués dans le mécanisme de greffage. Si on se réfère aux observations faites lors du greffage de l'hexylamine par FET, il y a disparition d'hydrogène de surface lors du greffage. Or les OH<sup>-</sup> sont de très bons accepteurs de proton et la seule voie possible d'interaction entre ces ions et la surface ne peut se faire qu'à travers les atomes d'hydrogènes. Il est en effet concevable que dans des conditions basiques en milieux aqueux, l'on puisse former des carbanions sur la surface du diamant hydrogéné (Figure III- 42.b). Une telle espèce en solution aqueuse n'est bien sûr pas stable, elle ne constitue donc qu'une espèce transitoire (Figure III- 42.c) représentée par l'équilibre de l'équation (1) :



Il est même probable que cette espèce n'existe pas réellement mais qu'il s'agisse plutôt d'une interaction faible entre les ions hydroxydes et l'hydrogène renforçant d'avantage la polarisation négative de l'atome de carbone Figure III- 42.d. Qu'il y ait formation ou non d'un carbanion, on peut d'un point de vue cinétique associer une vitesse de formation à cette espèce transitoire. La vitesse de formation de ce carbanion sera d'autant plus grande que la quantité d'ions hydroxyde en solution sera importante. En parallèle, comme l'amine réagit sous sa forme protonée, lorsque le pH augmente la quantité d'amine protonée diminue. Cela implique donc la présence d'un pH de greffage optimum et confirme les observations expérimentales de la partie III.C.4.c.

Il apparaît alors que la molécule comportant le groupement aminé sous sa forme protonée, peut réagir par l'intermédiaire du carbone en alpha de l'amine. Par analogie avec la chimie organique ce groupement est considéré comme électrophile. De fait, il en résulte un dégagement d'ammoniac en solution. D'un point de vue de l'encombrement surfacique, l'attaque du carbanion sur le carbone en alpha de l'amine ne peut se faire que par le côté opposé du groupement partant.

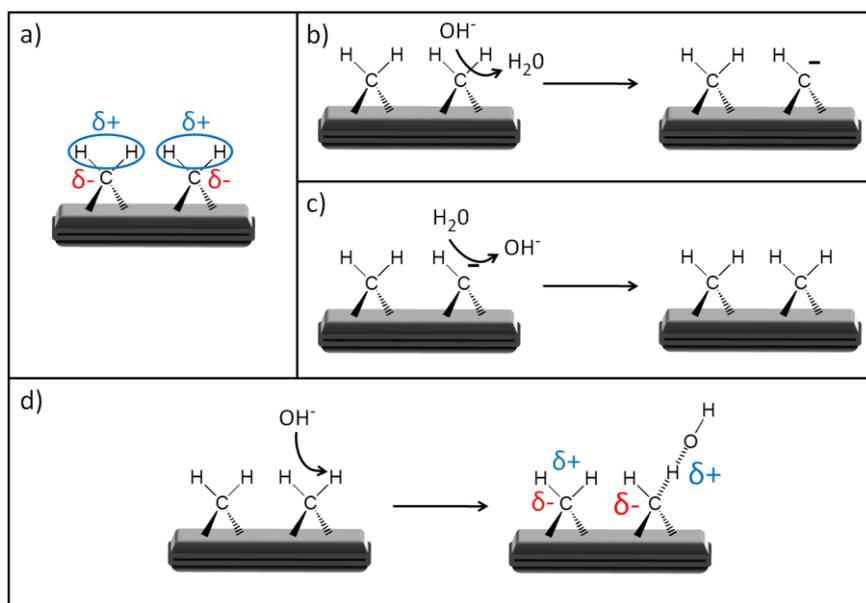


Figure III- 42 : a) Polarisation de la liaison C-H du diamant hydrogéné, b) Apparition du carbanion (ou espèce transitoire) sur un atome de carbone de la surface du diamant hydrogéné, c) reformation de la liaison C-H du diamant par réaction du carbanion avec l'eau, d) état transitoire illustrant l'augmentation de la polarisation négative de l'atome de carbone de surface du diamant.

La Figure III- 43 illustre le schéma réactionnel décrit précédemment, appliqué au cas de l'héxylamine. La quantité d'ammoniac dégagé en solution à la suite de la réaction est trop faible pour pouvoir être détectée par les méthodes de chimie analytique classiques. De plus, il est impossible de détecter les changements de pH dus à la consommation d'ions hydroxydes car l'apparition de la base faible qu'est l'ammoniac compense leur disparition. Nous avons constaté que la réaction de greffage est optimale avec des amines primaires et ne semble pouvoir être possible avec des amines tertiaires. En se référant à la chimie organique et l'influence du groupement alkyle porteur du nucléofuge, il semblerait qu'il s'agisse dans notre cas d'une substitution nucléophile d'ordre 2 (SN2). En effet, les groupements alkyles primaires favorisent les SN2 et les tertiaires les SN1. Un mécanisme réactionnel de type substitution nucléophile explique également l'impossibilité de fonctionnaliser les amines aromatiques en raison de la délocalisation du doublet de l'amine sur le cycle qui rend impossible le départ de cette dernière. Néanmoins, l'utilisation d'un solvant polaire protique n'est pas favorable à ce type de réaction. Nous expliciterons ce point lorsque nous traiterons de la cinétique réactionnelle. A ce stade, le mécanisme proposé semble expliquer tous les points d'ombre rencontrés jusqu'ici.

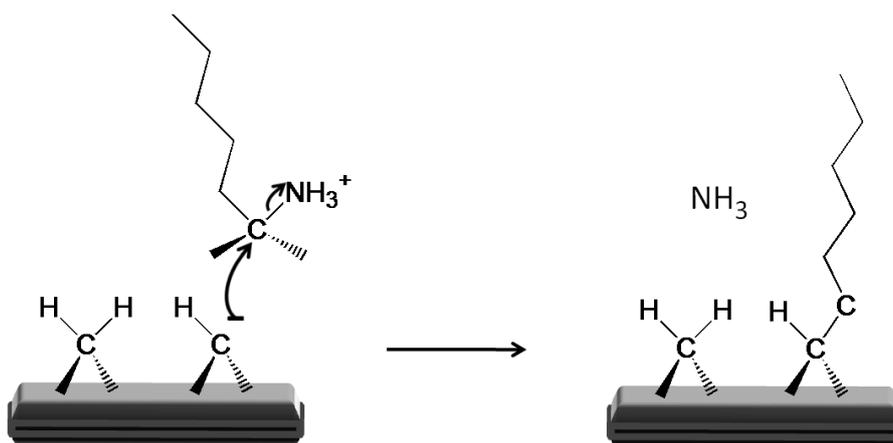


Figure III- 43 : Schéma de la réaction entre le carbanion formé sur la surface du diamant et le carbone situé en alpha du groupement partant aminée.

Au regard des hypothèses précédemment formulées, il est possible de confirmer le mécanisme de greffage proposé en utilisant d'autres types de groupements partant dans le même type de solution aqueuse. Sur le tableau de la Figure III- 44 est présentée une liste de groupements partants organisés en fonction de la labilité de chacun.

$R-N_2^+$	Sels de diazonium
$R-OR'_2^+$	Ions oxonium
$R-OSO_2C_4F_9$	Nonaflates
$R-OSO_2CF_3$	Triflates
$R-OSO_2F$	Fluorosulfonates
$R-OTs, R-Oms...$	Tosylates, mesylates et similaire
$R-I$	Iodures
$R-Br$	Bromures
$R-OH_2^+$	Acides conjugués des alcools
$R-Cl$	Chlorures, et chlorure d'acyles quand ils sont liés à un carbonyle
$R-OHR^+$	Acides conjugués des ethers
$R-ONO_2, R-OPO(OH)_2$	Nitrates, phosphates et esters inorganiques
$R-SR'_2^+$	Thioethers
$R-NR'_3^+$	Sels de tetraalkylammonium
$R-F$	Fluorures
$R-OCOR$	Esters et anhydrides d'acide quand ils sont liés à un carbonyle
$R-NH_3^+$	Sels d'ammonium
$R-OAr$	Phenoxides
$R-OH$	Alcools et acides carboxyliques quand ils sont attachés à un carbonyle
$R-OR$	Ethers et esters quand ils sont liés à un carbonyle

Figure III- 44 : Liste des groupements partants classés par ordre de labilité décroissante.

On peut remarquer qu'ils ne peuvent pas tous être utilisés en solution aqueuse basique ; certains n'y sont pas solubles et d'autres n'y sont pas stables. Nous avons donc procédé au greffage de deux molécules comportant chacune un groupement partant différent dans une solution de phosphate dibasique 0,2M à un pH de 10, sur des substrats monocristallins (100) CVD Element-Six« optical grade » hydrogénés. La première molécule utilisée est le fluoropentane à une concentration de 3mM, la deuxième est le phénoxybutane à une concentration de 1 mM. Le premier groupement partant est l'ion fluor, le deuxième est le phénolate ; les Figure III- 45.a et b illustrent respectivement les deux réactions.

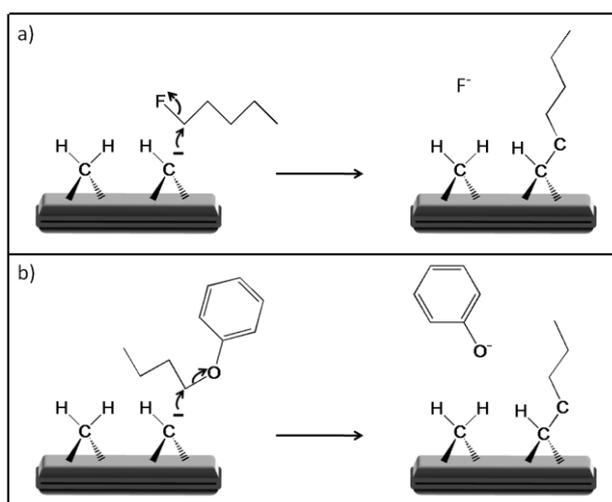


Figure III- 45 : Schéma réactionnel illustrant la réaction entre le carbanion formé sur la surface du diamant et des molécules contenant des groupements partants différents : a) Le fluoropentane (groupement partant : fluor), b) Le phénoxybutane (groupement partant : Phénolate).

La caractérisation de la fonctionnalisation a été effectuée par spectroscopie infrarouge en ATR selon le même mode opératoire que dans les parties précédentes. Le spectre de l'échantillon greffé avec le phénoxybutane est représenté sur la Figure III- 46.a et celui greffé avec le fluoropentane sur la Figure III- 46.b.

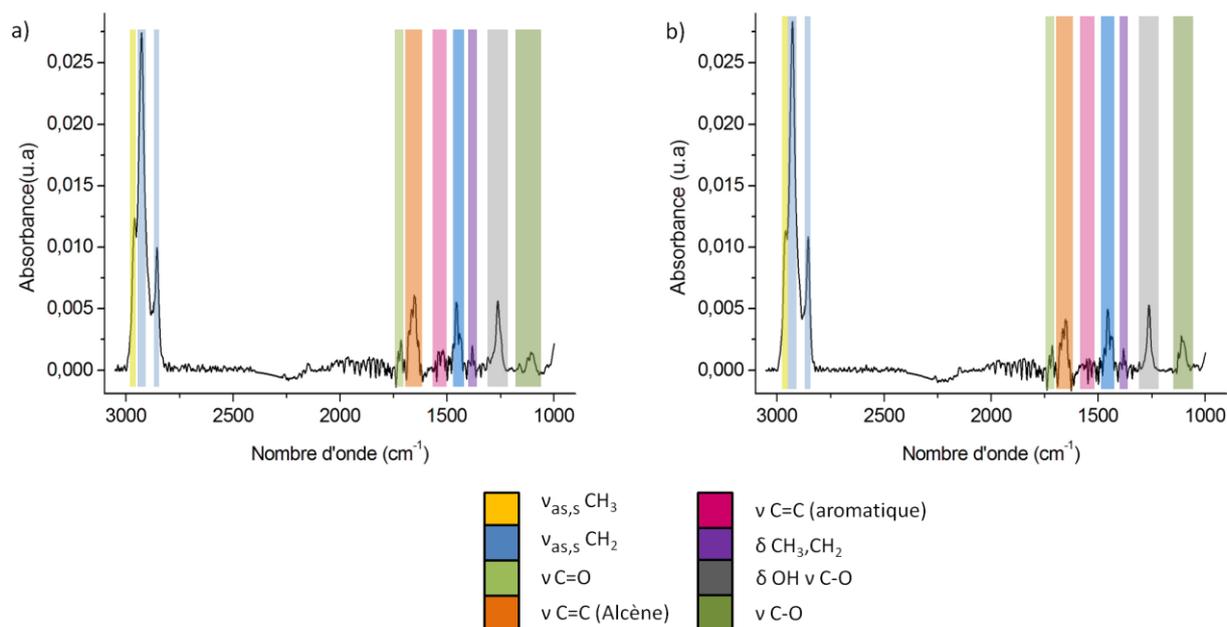


Figure III- 46 : Spectres infrarouges réalisés en ATR avec un cristal germanium, d'un échantillon diamant hydrogéné mis en contact avec : a) la solution de greffage de phénoxybutane pendant 14 heures, b) la solution de greffage de fluoropentane pendant 14 heures.

On remarque que les deux spectres sont quasiment équivalents, et si l'on se reporte au spectre correspondant au greffage de l'hexylamine représenté sur la Figure III- 19 de la partie III.C.4.a de ce chapitre ; on peut constater qu'ils sont en fait tous les trois équivalents. Les pics observables sont les mêmes sur les deux spectres et on peut voir les pics associés aux stretches asymétriques des  $\text{CH}_3$  à  $2960\text{ cm}^{-1}$  et à ceux asymétriques et symétriques des  $\text{CH}_2$  situés respectivement à  $2927$  et  $2857\text{ cm}^{-1}$ . Il est possible de voir que le ratio  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$  est supérieur dans le cas du fluoropentane. On peut ensuite voir un léger pic situé autour de  $1720\text{ cm}^{-1}$  qui est la signature des  $\text{C}=\text{O}$ . On voit ensuite un pic centré à  $1650\text{ cm}^{-1}$  mettant en évidence la présence de phase  $\text{sp}^2$  non conjugué. On observe un pic à  $1455\text{ cm}^{-1}$  avec un épaulement à  $1440\text{ cm}^{-1}$ , que l'on peut corréliser respectivement au mode bascule des  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ , et à l'agitation des  $\text{CH}_2$  en alpha des liaisons  $\text{C}-\text{O}$  et  $\text{sp}^2$ . On remarque aussi un pic centré à  $1265\text{ cm}^{-1}$  qui est la signature des éthers cycliques de type époxy et enfin un dernier à  $1110\text{ cm}^{-1}$  qui montre la présence d'éthers non cycliques. La présence des chaînes alcanes en surface est donc clairement mise en évidence. Cela montre bien que le greffage a fonctionné et cela valide le mécanisme réactionnel proposé. On notera qu'à la différence des amines, les conditions de greffage optimales dans le cas de l'utilisation de groupement partant fluor ou phénolate sont différentes. En effet, au plus la quantité d' $\text{OH}^-$  présents en solution sera grande au plus le greffage sera rapide car il n'influe pas sur le groupement partant. Dans le cas des

amines le pH optimum est un compromis qui vise à maximiser les quantités d'ions hydroxydes et d'amines protonées en solution.

Il faut noter que les pics observés sont les mêmes que ceux présents lors du greffage de l'hexylamine. Bien que des pics associés aux liaisons  $sp^2$ , ainsi qu'aux liaisons C-O apparaissent, la signature des CHx reste largement majoritaire. En comparant les spectres associés au greffage à celui montrant l'effet de la solution de greffage ne contenant pas d'amine sur le diamant hydrogéné représenté sur la Figure III- 21 de la partie III.C.4.b, on retrouve des signatures équivalentes. Ce sont celles associées aux liaisons C=C non conjuguées et aux liaisons C-O à l'exception de celle associée aux ponts éthers ( $1265\text{ cm}^{-1}$ ) que l'on ne retrouve que dans le cas du greffage. En se référant aux mécanismes réactionnels proposés, il est tout à fait envisageable d'imaginer une série de réactions parallèles aboutissant aux fonctions oxydées (Figure III- 47.b) ou à la formation de liaison  $sp^2$  (Figure III- 47.c). Il est également possible d'imaginer un mécanisme justifiant la formation des éthers cycliques dans le cas du greffage (Figure III- 47.a). Ces schémas illustrent des exemples de réactions pouvant se produire, dès lors que l'on envisage l'hypothèse qu'il puisse apparaître, sous certaines conditions, une espèce transitoire réactive de type carbanion sur la surface du diamant. Il ne s'agit pas d'une liste exhaustive au vue de la grande diversité de mécanismes étant susceptibles d'intervenir.

Nous avons donc pu montrer que les hypothèses apportées quant au mécanisme de greffage, nous permettent d'expliquer les observations tirées des spectres infrarouges relatifs aux différentes fonctionnalisations, ainsi qu'à l'effet de la solution de greffage sur le diamant. Nous allons dans un dernier temps nous intéresser à la cinétique de greffage et voir s'il est possible de la corrélérer au mécanisme réactionnel proposé afin de le valider.

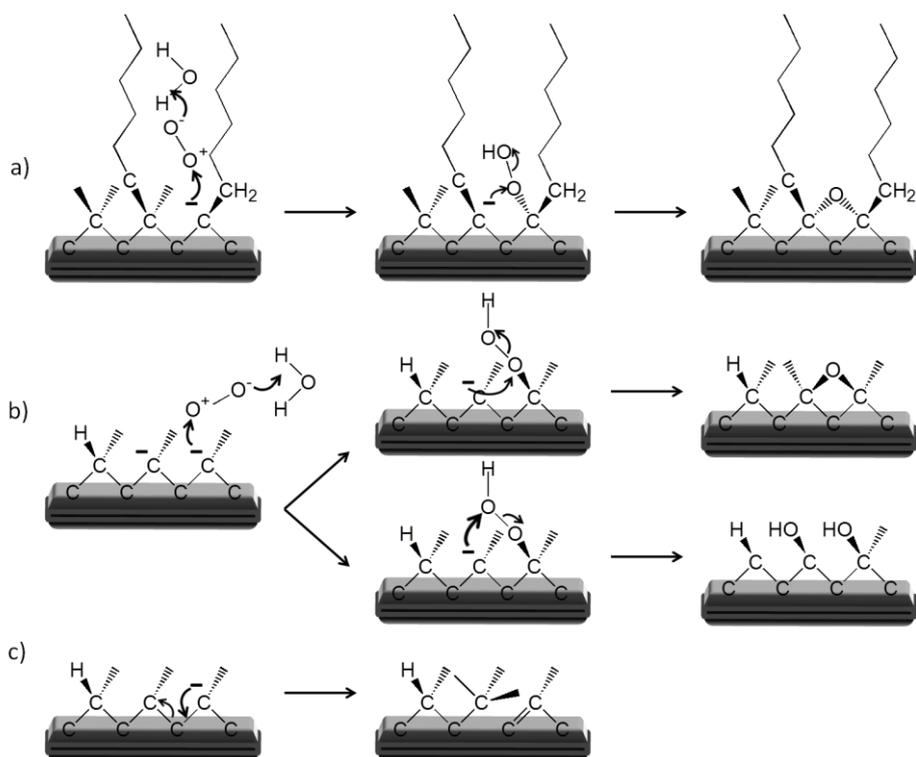


Figure III- 47 : Schéma réactionnel illustrant : c), b) les réactions annexes entre le carbanion formé sur la surface du diamant et l'oxygène dissous entraînant respectivement la formation d'éthers cycliques et d'alcools, a) la formation de liaison  $sp^2$  en surface du diamant.

### III.E. Cinétique de greffage

Nous nous intéressons maintenant à la Figure III- 31.a de la partie 5.b.2, illustrant l'évolution de la quantité de ferrocène aminé greffée en fonction du temps. Si on trace le même graphique mais en fonction du logarithme du temps, nous obtenons la courbe représentée sur la Figure III- 48. On constate que cette opération conduit à la linéarisation de la courbe de greffage et le coefficient de régression linéaire obtenu est de 0,99. Ce constat signifie que l'évolution de la quantité greffée en fonction du temps est donc de type exponentiel du premier ordre et ne dépend, dans les conditions de greffage précédentes, que de la concentration d'une seule des espèces impliquées.

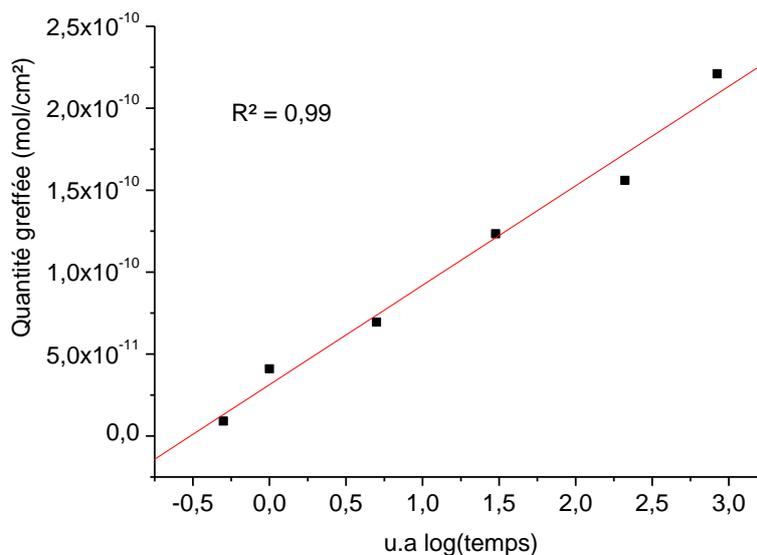
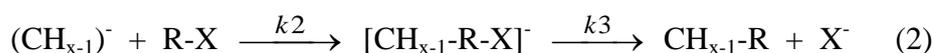
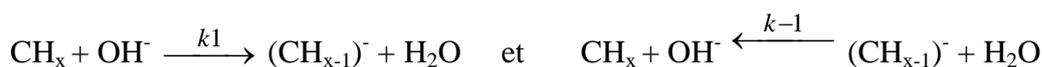


Figure III- 48 : *Quantité de ferrocène fonctionnalisé en fonction du logarithme du temps de contact entre la solution de greffage et le diamant hydrogéné.*

Comme nous l'avons vu précédemment, le mécanisme de greffage proposé s'apparente à une réaction de type substitution nucléophile. La fonctionnalisation sur surface (2D) engendre un encombrement et impose une attaque du groupement nucléophile à l'opposé du groupement partant. La chimie organique décrit ce type de réaction comme étant une substitution nucléophile d'ordre 2. L'ordre 2 signifie que la cinétique réactionnelle dépend de la concentration en nucléophile mais également de la concentration de l'espèce porteuse du groupement partant. Dans le cas d'une SN1, la cinétique est d'ordre 1 et n'est limitée que par la vitesse de formation du carbanion, c'est une réaction lente et réversible qui constitue l'étape limitante de la réaction. Or lors du greffage de l'hexylamine par FET, nous avons vu que la quantité immobilisée évoluait selon une cinétique de type exponentielle du second ordre. En revanche la chimie organique décrit les solvants polaires protiques comme non favorable aux réactions SN2 car ils stabilisent le doublet non liant du nucléophile en solution. Dans notre cas, le nucléophile est généré in situ sur un atome de carbone n'ayant pas de doublet libre avant d'être « activé » par les ions hydroxydes. Il n'y a donc pas d'effet de stabilisation du solvant sur le nucléophile mais un effet de désactivation (1). Nous allons exprimer la cinétique réactionnelle en fonction du mécanisme proposé.





On note  $(\text{CH}_{x-1})^- = \text{CH}_x'$

L'équation (2) est l'expression typique d'une SN2 (substitution nucléophile d'ordre 2), la cinétique réactionnelle est connue et s'exprime comme  $v = k_4 [\text{R-X}] [\text{CH}_x']$ . Elle est donc dépendante de la concentration en nucléophile mais également de la concentration de l'espèce portant le nucléofuge.

Cinétique de formation du carbanion sur la surface du diamant :

$$\frac{d[(\text{CH}_x)']}{dt} = k_1 [\text{CH}_x] [\text{OH}^-] - k-1 [\text{CH}_x'] - k_4 [\text{CH}_x'] [\text{R-X}] \quad (3)$$

$(\text{CH}_{x-1})^-$  ou  $\text{CH}_x'$  est un intermédiaire réactionnel ; il n'est généralement pas détectable in situ. La cinétique d'un tel mécanisme est décrite par le principe des états stationnaires initialement introduits par Chapman en 1913. Ce principe suppose que la vitesse absolue de formation de la réaction intermédiaire est nulle. On a donc :

$$\frac{d[(\text{CH}_x)']}{dt} = k_1 [\text{CH}_x] [\text{OH}^-] - k-1 [\text{CH}_x'] - k_4 [\text{CH}_x'] [\text{R-X}] = 0$$

$$\text{Soit, } [\text{CH}_x'] = \frac{k_1[\text{CH}_x][\text{OH}^-]}{k-1+k_4[\text{R-X}]} \quad (4)$$

$$\text{De plus, } \frac{d[\text{CH}_x'\text{-R}]}{dt} = k_4 [\text{CH}_x'] [\text{R-X}], \text{ or d'après (4) :}$$

$$(5) \quad \frac{d[\text{CH}_x'\text{-R}]}{dt} = k_4 [\text{CH}_x'] [\text{R-X}] = \frac{k_1 k_4 [\text{CH}_x] [\text{OH}^-]}{k-1+k_4[\text{R-X}]} [\text{R-X}]$$

A ce stade il reste à voir laquelle des deux étapes est limitante. Si la majorité des intermédiaires issus de l'étape 1 se dissocie suivant l'étape -1, cela implique que  $k-1 \ll k_1$ . Dans ce cas de figure, tout se passe comme si le carbanion  $\text{CH}_x'$  n'existait pas. La comparaison de  $k_4$  et  $k-1$  ne peut s'effectuer indépendamment de la concentration en R-X. Nous nous placerons donc dans le cas où la concentration en espèces a greffée est grande. Le cas où  $k_4[\text{R-X}] \ll k-1$  ne peut être considéré indépendamment de celle de  $[\text{R-X}]$ . Cette

hypothèse signifie que la durée de vie du  $\text{CHx}'$  est courte par rapport à la vitesse de réaction avec  $\text{R-X}$ , la vitesse de formation du carbanion est donc limitante. En revanche si les intermédiaires formés lors de la réaction 1 réagissent majoritairement selon l'étape 2 au dépend de la réaction -1, cela signifie que  $k_{-1} \ll k_4$  et donc :

$$\frac{d[\text{CHx}'\text{-R}]}{dt} = k_1[\text{CHx}][\text{OH}^-]$$

Dans ce cas de figure la cinétique dépend de la concentration en ions hydroxydes et de celle des  $\text{CHx}$  de surface.

Il faut tout de même prendre en compte qu'à la différence de la chimie en solution où l'on a une approche 3D des phénomènes diffusifs, nous sommes ici dans une configuration 2D. Le gradient d'espèces est donc surfacique et non plus volumique. Dans ce cas, la cinétique réactionnelle pourrait dépendre uniquement des phénomènes diffusifs. Si tel était le cas la cinétique de la réaction serait donc régie par la loi de Fick :

$$\text{Ainsi le profil de diffusion est donné par : } C(x,t) = C(0) \operatorname{erfc} \frac{x}{2 * \sqrt{(Dt)}},$$

$$\text{ou } C(x,t) = C(0) \left( 1 - 2 * \left( \frac{x}{2 * \sqrt{(Dt \pi)}} \right) \right).$$

Si c'était le cas, cela impliquerait une évolution de la cinétique de greffage en  $\frac{1}{\sqrt{t}}$ . Or si l'on applique la fonction carré à la variable temps de la Figure III- 31.a de la partie 5.b.2 illustrant l'évolution de la quantité de ferrocène aminée greffé en fonction du temps, nous n'obtenons pas un comportement linéaire. Cela montre que les phénomènes diffusifs ne limitent pas le greffage et n'ont pas de conséquences majeures sur la cinétique chimique de la réaction. Au regard de ce constat nous pouvons désormais analyser la quantité des différentes espèces disponibles lors de la fonctionnalisation.

Si l'on considère  $[\text{CH}_0]$  comme la quantité maximale de site de greffage disponible, il vient qu'à tout instant  $t$  le nombre de site disponible restant s'écrit :

$$[\text{CH}_x] = [\text{CH}_0] - [\text{CHx}'\text{-R}], \text{ de plus : } \frac{k_1 k_4 [\text{CHx}][\text{OH}^-]}{\frac{k_{-1}}{[\text{R-X}] + k_4}} = \frac{d[\text{CHx}'\text{-R}]}{dt} \quad (6)$$

On voit donc que la cinétique de greffage est fonction des concentrations de  $[OH^-]$ ,  $[CH_x]$  et  $[R-X]$ . Il s'agit donc d'une cinétique d'ordre 3. Il est néanmoins possible d'envisager quelques approximations.

Le taux de couverture surfacique lors de l'obtention d'une monocouche compacte par greffage d'une molécule simple et peu encombrante correspond à l'immobilisation d'environ  $10^{-10}$  mole/cm<sup>2</sup>. Le pH de la solution de greffage est de 10, ce qui correspond à une concentration en ions hydroxydes de l'ordre de  $10^{-4}$  mol/l. En ce qui concerne l'espèce greffée, sa concentration est de l'ordre du milli molaire et on peut évaluer que la quantité de  $R-NH_3^+$  est de l'ordre du millimolaire. La variation de la quantité en espèce aminée et en ions hydroxydes entre le début et la fin du greffage est négligeable, on peut donc estimer ces concentrations comme constante et simplifier l'équation (6).

$$\text{On a donc : } \frac{d[CH_x'-R]}{dt} = \frac{k_5[CH_x]}{\frac{k-1}{[R-X]} + k_4} = K_{app}[CH_x] \quad (7)$$

$$\text{où } k_5 = k_1 k_4 [OH^-] \text{ et } K_{app} = \frac{k_5}{\frac{k-1}{[R-X]} + k_4}$$

Si l'on considère  $[CH_0]$  comme la quantité maximale de site de greffage disponible, on peut alors considérer qu'à tout instant  $t$  le nombre de site disponible restant s'écrit :  $[CH_x] = [CH_0] - [CH_x'-R]$ .

$$\text{Il vient que : } \frac{d[CH_x'-R]}{dt} = K_{app}([CH_0] - [CH_x'-R]) \text{ et } \frac{d[CH_x'-R]}{[CH_0] - [CH_x'-R]} = K_{app} dt$$

L'intégration des deux cotés donne :  $-\ln([CH_0] - [CH_x'-R]) = K_{app} * t + \text{constante}$

A  $t = 0$ ,  $[CH_x'-R] = 0$ . On a donc  $\text{constante} = -\ln([CH_0])$ .

$$\text{Ce qui implique : } \ln\left(\frac{[CH_0]}{[CH_0] - [CH_x'-R]}\right) = K_{app} * t$$

Et enfin :  $[CH_x'-R] = [CH_0] * (1 - \exp(-K_{app} * t))$

Les conditions expérimentales choisies lors du greffage du ferrocène nous ont permis de procéder à certaines approximations, qui une fois apportées à l'équation font apparaître une cinétique du premier ordre (6). Dans ce cas, la vitesse de greffage dépend uniquement de la quantité de CHx disponible sur la surface du diamant. Cette conclusion corréle les résultats expérimentaux obtenus lors du greffage du ferrocène (Figure III- 48) qui font apparaître un comportement cinétique du premier ordre. Comparons maintenant ces calculs théoriques aux résultats expérimentaux de la partie III.C.5.b. Dans le paragraphe 5.b.1 de ce chapitre, nous avons abordé le suivi du greffage de l'hexylamine par FET en fonction du temps. Dans cette expérience, nous avons fait varier la concentration d'hexylamine et observé une diminution de la quantité de CHx de surface en fonction du temps. L'ajustement des paramètres expérimentaux montre que la courbe est une exponentielle du second ordre. Cela montre que le greffage dépend dans ce cas de deux paramètres distincts qui sont la concentration de la molécule aminée et en ions hydroxydes. Evaluons maintenant la quantité des différentes espèces présentes lors du greffage. La solution de greffage était constituée de carbonate 0,2M ajustée à un pH de 9,6, la surface de l'échantillon était de 0,1 cm<sup>2</sup> et le volume de solution de 1 ml. Les concentrations d'hexylamine introduites en solution étaient de 2.10<sup>-3</sup>, 0,8 et 17,5 mM. Sachant que le pKa de l'hexylamine est de 10,6, cela correspond à des quantités molaires d'hexylamine présentes en solution de 2.10<sup>-10</sup>, 8.10<sup>-8</sup> et de 1,75.10<sup>-6</sup> moles et une quantité d'ions hydroxydes de 4.10<sup>-8</sup> moles. Hormis la concentration finale d'hexylamine, toutes les autres concentrations ne peuvent pas être considérées comme en excès vis-à-vis de la quantité de sites de greffage disponibles sur la surface du diamant hydrogéné. En considérant le mécanisme réactionnel précédemment décrit (Figure III- 42 et Figure III- 43), nous avons montré que l'équation décrivant la cinétique de greffage est d'ordre trois. Les paramètres qui régissent la cinétique sont la quantité de CHx en surface, la quantité d'ions hydroxydes et la quantité en espèce aminé. Cela correspond bien à l'évolution du greffage en exponentielle du second ordre observée par SGFET. Dans la partie II.5.b.2, traitant du greffage du ferrocène-aminé, nous avons observé l'évolution de la quantité greffée pour une concentration en espèce aminé pouvant être considérée comme constante. La solution était composée de ferrocène-(peg)<sub>3</sub> aminée à 20 mM dans une solution aqueuse de phosphate dibasique 0,2M, ajustée à un pH de 10,6. Les échantillons avaient une taille de 0,4 cm<sup>2</sup> et la solution de greffage un volume de 10 ml. Le nombre de moles de ferrocène et d'ions hydroxydes étaient donc respectivement, de 1.10<sup>-4</sup> et de 4.10<sup>-6</sup> moles. Nous voyons donc dans ce cas que les quantités des espèces impliquées dans le greffage présentes en solution sont en

excès vis-à-vis du nombre de sites disponibles. Cela explique donc pourquoi dans ce cas l'application du logarithme sur le temps de greffage, a rendu linéaire la quantité greffée.

Nous avons réussi à mettre au point une technique de greffage directe, rapide et spontanée, permettant l'immobilisation d'une monocouche de molécules d'intérêts biologique en une seule étape sur diamant hydrogéné. Cette méthode consiste en la mise en contact d'un composé comportant un groupement partant dans une solution aqueuse basique avec un échantillon diamant hydrogéné dopé ou non. Cette voie de fonctionnalisation permet de gérer la quantité d'espèces immobilisées au travers du temps de contact entre la solution de greffage et l'échantillon. Nous avons mis en évidence la formation d'une liaison C-C stable. Parmi les groupements partants qu'il est possible d'utiliser, les amines restent le plus intéressant et ce à plusieurs titres. C'est un des groupements qui est le plus largement répandu dans le commerce. On trouve en effet un grand nombre de molécules organiques ou inorganiques modifiées par une amine aliphatique. C'est également une des fonctions présente sur l'enveloppe protéique de la plupart des espèces biologiques. De plus nous avons vu que le greffage est possible à des pH doux (8). On peut donc envisager l'immobilisation directe de molécules biologique (peptides, protéines, enzymes...) au travers de ce groupement.

- [1] D. Ballutaud, S. Ghodbane\*, F. Omnès, C. Agnès, *Diamond & Related Materials*, **2010**. 19, 630–636.
- [2] S. Ghodbane, *Thèse de doctorat*, **2007**. Université Joseph Fourier Grenoble.
- [3] J. de Sanoit, E. Vanhove, J.C. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Nesladek, *Physica Status Solidi A-Applications and Materials Science*, **2007**. 204 (9), 2931-2939.
- [4] E. Vanhove, *Thèse de doctorat*, **2010**. Université Joseph Fourier Grenoble.
- [5] Minyung Lee\*, Ah-Young Jee, *Current Applied Physics*, **2009**. 9, e144–e147.
- [6] Frank Marken, Christiaan H. Goeting, Aurora Gutierrez-Sosa, Richard G. Compton, John S. Foord \*, *Diamond and Related Materials*, **2000**. 9, 390–396.
- [7] Ichizo Yagi, Hideo Notsu, Tetsu Tatsuma, Donald A. Tryk, Akira Fujishima\*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2000**. 492, 31–37.
- [8] Neil Polwart\*, Phillip John, Clare E. Troupe, and John I. B. Wilson, *J. AM. CHEM. SOC.*, **2003**. 125, 6600-6601.
- [9] Ichizo Yagi, Hideo Notsu, Tetsu Tatsuma\*, Donald A. Tryk\*, and Akira Fujishima\*, *Electrochemical and Solid-State Letters*, **1999**. 2, (10), 522-524.
- [10] Bernadette Marcus, Didier Delabouglisse, Michel Mermoux, Pierre Bouvier, Jerome Chane-Tune, Jean-Pierre Petit, Pascal Mailley, Thierry Livache, *ChemComm*, **2003**. 2698-2699.
- [11] Rabah Boukherroub\*, Xavier Wallart, Sabine Szunerits, Bernadette Marcus, Pierre Bouvier, Michel Mermoux, *Electrochemistry Communications*, **2005**. 7, 937–940.
- [12] N. Saito, R. Ohta, Y. Inoue, H. Sugimura, O. Takai, *Journal of Vacuum Science and Technology A*, **2004**. 22, (5), 2005-2009.
- [13] G. Charrier, N. Simon\*, A. Etcheberry, *Electrochimica Acta*, **2010**. 55, 5753–5759.
- [14] Marianne Auernhammer, Marco Hoeb, Sebastian J. Schoell, Martin S. Brandt, Jose A. Garrido, Martin Stutzmann, and Ian D. Sharp\*, *Langmuir*, **2010**. 26, (24), 18862–18867.
- [15] M.L. Hair, C.P. Tripp, *Langmuir*, **1992**. 8, (4), 1120.
- [16] L. Léger, P. Silberzan, D. Ausseré, J.J. Benattar, *Langmuir*, **1991**. 7, (8), 1647.
- [17] C. R. Kurkjian, J. L. Markham, J. D. Le Grange\*, *Langmuir*, **1993**. 9, 1749-1763.
- [18] Taishi Fukazawa, Hideo Notsu, Tetsu Tatsuma\*, Donald A. Tryk\*, and Akira Fujishima\*, *Electrochemical and Solid-State Letters*, **2001**. 4, (3), H1-H3.
- [19] S. Szunerits, Y. Coffinier, C. Jama, R. Desmet, O. Melnyk, B. Marcus, L. Gengembre, E. Payen, D. Delabouglisse and R. Boukherroub\*, *Langmuir*, **2007**. 23, 4494-4497.
- [20] T. Pourrostami, J. Hernando\*, J.A. Garrido, O.A. Williams, D.M. Gruen, A. Kromka, D. Steinmüller, M. Stutzmann *Diamond & Related Materials*, **2007**. 16, 138–143.
- [21] Maciej Mazur\*, Paweł Kryszynski and G.J. Blanchard, *Langmuir*, **2005**. 21, 8802-8808.
- [22] Andrew V. Teplyakov, Timothy R. Leftwich, *Surface Science Reports*, **2008**. 63, 1–71.
- [23] J.M. Buriak\*, *Chem. Rev.*, **2002**. 102, 1271-1308.
- [24] S. K. Coulter, J. S. Hovis, R. J. Hamers\*, M. P. D’Evelyn, J. N. Russell and J. E. Butler, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**. 122, 732-733.
- [25] Andrew Freedman, *J. Appl. Phys.*, **1994**. 75, (6), 3112-3120.
- [26] Mikka Nishitani-Gamo, Robin E. Rawles, Toshihiro Ando, Kazuo Yamamoto, Mutsukazu Kamo, Yoichiro Sato, *Diamond and Related Materials*, **1996**. 5, 1136-1142.
- [27] Guo-Jun Zhang\*, Kwang-Soup Song\*, Yusuke Nakamura, Taro Ueno, Takashi Funatsu, Iwao Ohdomari and Hiroshi Kawarada, *Langmuir*, **2006**. 22, 3728-3734.
- [28] Jung-Hoon Yang, Kwang-Soup Song, Guo-Jun Zhang, Munenori Degawa, Yoshinori Sasaki, Iwao Ohdomari, and Hiroshi Kawarada\*, *Langmuir*, **2006**. 22, 11245-11250.

- [29] Sabine Szunerits, Yannick Coffinier, Charafeddine Jama, Remi Desmet, Oleg Melnyk, Bernadette Marcus, Leon Gengembre, Edmond Payen, Didier Delabouglise and Rabah Boukherroub\*, *Langmuir*, **2007**. 23, 4494-4497.
- [30] Tzu-Chi Kuo, Richard L. McCreery\* and Greg M. Swain\*, *Electrochemical and Solid-State Letters*, **1999**. 2, (6), 288-290.
- [31] Rachid Hitmi, Michel DeLamar, Jean Pinson\* and Jean Michel Savéant\*, *J. Am. Chem. SOC.*, **1992**. 114, 5883-5884.
- [32] Marin Steenackers, Simon Q. Lud, Rainer Jordan\*, Paola Bruno, Dieter M. Gruen, Peter Feulner, Jose A. Garrido\* and Martin Stutzmann, *J. AM. CHEM. SOC.*, **2006**. 128, 16884-16891.
- [33] Orlando Auciello, Wensha Yang, James E. Butler, Wei Cai, John A. Carlisle, Jennifer E. Gerbi, Dieter M. Gruen, Tanya Knickerbocker, Tami L. Lasseter, John N. Russell, JR. Llooyd, M. Smith and Robert J. Hamers, *Nature Materials*, **2002**. 1, 253–257.
- [34] P. Christiaens, V. Vermeeren, S. Wenmackers, M. Daenen, K. Haenen, M. Nesladek, M. vandeVen, M. Ameloot, L. Michiels, P. Wagner\*, *Biosensors and Bioelectronics*, **2006**. 22, 170–177.
- [35] E. Schmich, A. Hartl, J. A. Garrido\*, J. Hernando, S.C.R. Catharino, S. Walter, P. Feulner, A. Kromka, D. Steinmuller AND M.Stutzmann, *Nature Materials*, **2004**. 3, 736-742.
- [36] Sarah E. Baker, Wensha Yang, James E. Butler, Chang-soo Lee, John N. Russell, Jr., Lu Shang, Bin Sun, and Robert J. Hamers\*, *Chem. Mater.*, **2005**. 17, 938-940.
- [37] D. Shin, H. Uetsuka, N. Tokuda, K. Saeki and C.E. Nebel\*, *Langmuir*, **2007**. 23, 3466-3472.
- [38] Munenori Degawa, Kwang-Soup Song, Yusuke Nakamura, Hirofumi Kanazawa, Hitoshi Umezawa and Hiroshi Kawarada, *Japanese Journal of Applied Physics*, **2004**. 43, (6B), 814–817.
- [39] Sabine Szunerits & Rabah Boukherroub, *J. Solid State Electrochem.*, **2008**. 12, 1205–1218.
- [40] B. Galland, S. Cosnier, C. Gondran, A. Le Pellec, *Electroanalysis*, **1998**. 10, (12), 808-813.
- [41] P. Mailley, C. Agnes, F. Omnes, S. Ruffinatto, *Brevet PCT*, **2009**. FR 2947544.
- [42] C. Agnes, A. Bongrain, L. Rousseau, E. Scorsone, J.C. Arnault, S. Ruffinatto, F. Omnes, P. Mailley, G. Lissorgues, P. Bergonzo, *Langmuir*, **2011**. 27, (19), 12226-12234.
- [43] S. Shikama, T. Maki, M. Komari, Y. Sakaguchi, K. Sakuta, T. Kobayashi, *Jpn. J. Appl. Phys.*, **1992**. 31, 1446-1449.
- [44] H. Kawarada, Y. Araki, T. Sakai, T. Ogawa and H. Umezawa, *phys. stat. sol.*, **2001**. 185, (1), 79–83.
- [45] Sarah E. Baker, Bin Sun, James E. Butler, Heesuk Kim, John N. Russell, Lu Shang, Kiu-Yuen Tse, Wensha Yang, Robert J. Hamers, *Diamond & Related Materials*, **2007**. 16, 1608–1615.
- [46] Carl A. Koval, George C. Lisensky Robert R. Gagné\*, *Inorg. Chem.*, **1980**. 19, 2854-2855.
- [47] Veronique Balland\*, Sophie Lecomte and Benoît Limoges\*, *Langmuir*, **2009**. 25, (11), 6532–6542.
- [48] J. Randles, *Transaction of the Faraday Society*, **1948**. 44, 327-338.
- [49] Paula E. Colavita, Xiaoyu Wang, Kevin M. Metz, James E. Butler and Robert J. Hamers\*, *Langmuir*, **2007**. 23, 11623-11630.
- [50] M. Bonnauron, C. Agnes, F. Omnes, J.C. Arnault, P. bergonzo, M. Nesladek, *Sensor Letters*, **2009**. 7, (5), 872-879.

- [51] M. Bonnauron, C. Agnes, F. Omnes, J.C. Arnault, P. Bergonzo, M. Nesladek, P. Mailley, *Sensor Letters*, **2009**. 7, (5), 872-879.
- [52] Mankit Ho Randall, S. Deinhammer, James W. Anderegg, and Marc D. Porter\*, *Langmuir*, **1994**. 10, 1306-1313.
- [53] Mohamed M. Chehimi, Alain Adenier, Iluminada Gallardo\*, Jean Pinson, and Neus Vila, *Langmuir*, **2004**. 20, 8243-8253.
- [54] Iluminada Gallardo, Jean Pinson and Neus Vila, *J. Phys. Chem. B*, **2006**. 110, 19521-19529.
- [55] J.O.M. Bockris and A.K.N. Reddy, *Modern Electrochemistry*, **1970**. (plenum Press, New York).

## IV : Applications

L'un des axes de recherche principaux de ma thèse est de concevoir des dispositifs en diamant pour le domaine de la bioélectronique. Nous allons mettre en évidence dans ce chapitre toutes les applications que la nouvelle méthode de greffage des amines, détaillée précédemment, rend possible. Nous verrons au travers des différents exemples, les potentialités industrielles qu'offre cette nouvelle technique de fonctionnalisation.

### III.F. Greffage de molécules d'intérêt biologique

Comme précédemment montré dans le chapitre I, différents dispositifs bioélectroniques ont d'ores et déjà été conçus tels que des biopuces [1], des biocapteurs enzymatique [2] ou des BioFET [3]. Plus particulièrement, si l'on se focalise sur la conception de biopuces à ADN, différents dispositifs ont été réalisés sur Diamant, [4-6]. Ainsi, la biopuce à ADN réalisée par Christiaens et al., la plus simple à élaborer, nécessite pas moins de deux étapes de greffage et 26 heures de réaction au total pour un seul brin ODN sonde immobilisé et sans localisation du greffage. Sur l'ensemble des biopuces réalisées sur diamant, seules celles mises au point par les équipes de Hammers et Kawarada ont permis de détecter simultanément deux brins cibles différents. La méthodologie la plus couramment mise en œuvre est celle de Hammers qui nécessite quant à elle trois étapes, quarante heures de réactions et plusieurs étapes de lithographie rédhibitoires pour un multiplexage de l'information biologique immobilisée. Et, au final, ce constat peut être étendu aux autres dispositifs bioélectroniques reportés dans la littérature. Dans la suite de ce chapitre nous allons ainsi montrer les apports de la nouvelle technique de greffage des amines, rapportée dans la partie III.C, pour la réalisation de biopuces, de biocapteurs de troisième génération ou encore pour la capture et l'immobilisation de neurones. Enfin ce chapitre se clôturera par la démonstration des potentialités de notre nouvelle méthodologie en termes de structuration/localisation des zones biofonctionnelles.

### III.F.1. Biopuce à ADN

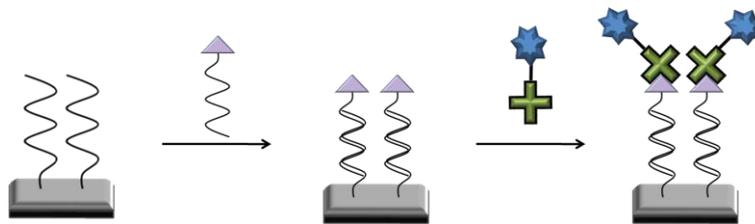
En utilisant la méthode de greffage des amines présentée dans le chapitre III.C., nous avons mis au point au laboratoire, comme preuve de concept, une biopuce simple (2 informations biologiques différenciées) en utilisant des brins d'ODN commerciaux (GENSET) présentant en position 5' terminale une amine primaire. Nous avons choisi deux brins d'ADN dont les séquences, ainsi que celles de leur brin complémentaire respectifs biotinylé, sont rapportées dans le Tableau IV- 1. Notons ici que les séquences choisies sont calculées afin de ne générer aucune structure secondaire (auto-complémentarité impliquant la formation de boucles). D'un point de vue méthodologie de greffage, chaque brin est solubilisé à une concentration de 10µM dans une solution aqueuse de phosphate de sodium dibasique 0,2M pH 9 (ajusté à la soude 0.2M) contenant 20% de glycérol (permettant d'éviter une évaporation trop rapide de la goutte en cours de dépôt). Nous avons ensuite déposé par drop-casting, à l'aide d'une aiguille de 300 µm de diamètre, sur diamant hydrogéné chacune des solutions, sous forme d'une goutte de l'ordre de la dizaine de nanolitres. La solution de greffage est laissée en contact avec le substrat pendant 30 min afin de générer l'accroche covalente des brins cibles.

Représentation	Nom	Séquence
	Zip9-NH <sub>2</sub>	5'-NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -T <sub>10</sub> -GAC-CAT-CGT-GCG-GGT-AGG-TAG-ACC-3'
	Zip6-NH <sub>2</sub>	5'-NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -T <sub>10</sub> -GAC-CGG-TAT-GCG-ACC-TGG-TAT-GCG 3'
	c-Zip9-Biot	5'-Biotine-GGT-CTA-CCT-ACC-CGC-ACG-ATG-GTC-3'
	c-Zip6-Biot	5'-Biotine-CGC-ATA-CGA-GGT-CGC-ATA-CCG-GTC-3'

Tableau IV- 1 : Séquences ODN utilisées pour la fabrication d'une biopuce ADN sur diamant hydrogéné par dépôt de goutte.

Après rinçage à l'eau ultrapure, les échantillons sont séchés. La caractérisation du greffage est alors effectuée par microscopie de fluorescence, à l'aide d'un brin complémentaire biotinylé, la biotine permettant de révéler le greffage par couplage avec un fluorophore marqué par la streptavidine. Le processus de révélation schématisé sur la Figure IV- 1 a été mis au point au laboratoire dans le cadre de la mise en œuvre des biopuces MICAM [7]. Il sert maintenant de méthode de routine pour la validation de nouvelles méthodologies de greffage. Typiquement la phase d'hybridation consiste en la mise en

contact avec le substrat fonctionnalisé d'une solution appelée Tampon d'Hybridation (TH) contenant le brin complémentaire-biotynilé (100 nM). Cette solution complexe a pour but d'éviter l'adsorption non spécifique de l'ADN complémentaire et du fluorophore (via la saturation de la surface par l'ADN de saumon et la BSA contenue dans le Denhart) et d'assurer ainsi une reconnaissance spécifique idéale entre les brins d'ODN. Cette solution est laissée en contact avec le substrat durant 15 min. L'échantillon est ensuite rincé avec une solution appelée Tampon de Rinçage qui évite la déshybridation des brins appariés et l'élimination des brins non spécifiquement adsorbés ou surnuméraires présents en solution. Dans un second temps la révélation est opérée par mise en contact de la SAPE (fluorophore protéique conjugué streptavidine-R-Phycoérythrine) avec l'échantillon hybridé durant 15 min puis par rinçage avec le TR. Enfin, le processus de dénaturation habituel des brins d'ADN consiste en la mise en contact de l'échantillon hybridé avec une solution fortement basique (pH 9-10) afin de rompre les liaisons hydrogènes et d'ouvrir le double brin par répulsion électrostatique.



*Figure IV- 1 : Représentation schématique du processus de révélation par microscopie de fluorescence de l'immobilisation du brin d'ODN cible par hybridation avec le brin sonde immobilisé.*

La Figure IV- 2 illustre le processus de révélation et présente les images de fluorescence associées à l'hybridation et la révélation d'une biopuce modèle contenant deux informations biologiques parallèles : Zip6 et Zip 9. Les Figure IV- 2.a, b et c montrent respectivement les images de fluorescence de la puce lors de sa mise en contact et de l'hybridation avec des brins de c-Zip9, de c-Zip6 et de c-Zip6 et c-Zip9 additionnés. Chaque étape d'hybridation-révélation est suivie de la dénaturation des plots. Ainsi ces images de fluorescences démontrent la spécificité de reconnaissance du brin immobilisé avec son brin cible. La Figure IV- 2.b nous montre par ailleurs qu'il n'y a aucune rémanence de la fluorescence d'une étape de révélation à l'autre ainsi que la stabilité du lien entre sonde et diamant au travers de conservation du contraste de fluorescence d'une expérience à l'autre.

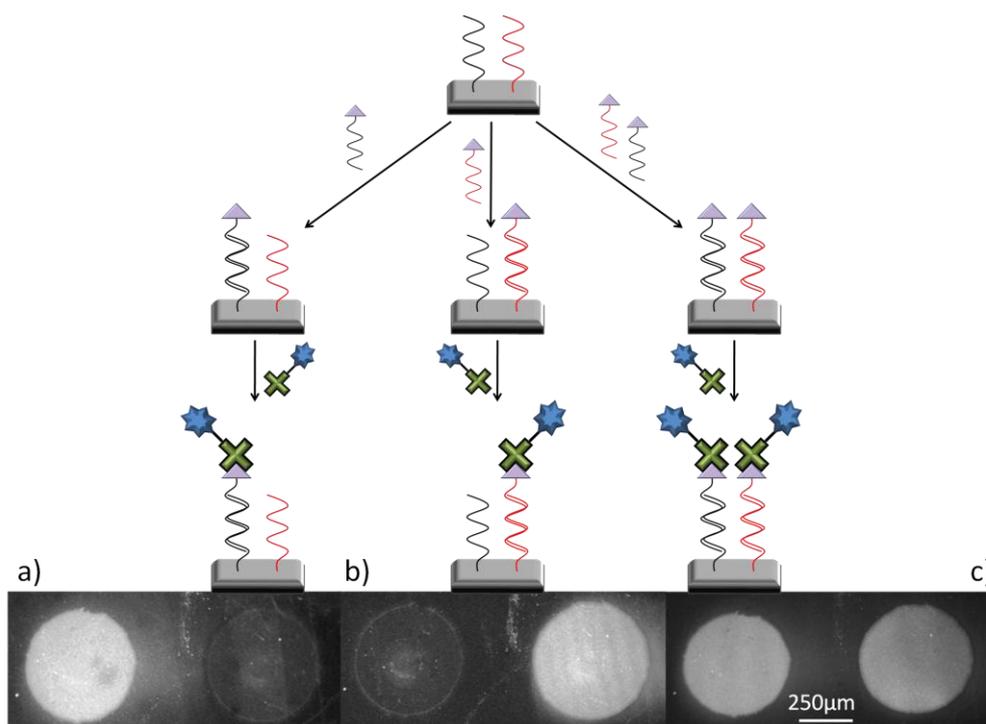


Figure IV- 2 : Schéma de principe de la révélation et images de fluorescence de la biopuce à ADN correspondantes.

Au travers de l'expérience précédente, nous avons donc vu qu'il est possible via l'utilisation de notre nouvelle technique de greffage, de concevoir de manière rapide, simple et en une seule étape une biopuce à ADN. Bien que nous n'ayons utilisé que deux brins d'ODN différents, on peut augmenter le nombre de brins sondes immobilisés, et donc la complexité de la biopuce, sans allonger de manière significative son temps de conception. Toutefois, dans le cadre d'une parallélisation massive de l'information biologique ou chimique, la taille des plots réalisés ici demeure trop grande. La méthodologie de greffage par dépôt de goutte à partir d'une micropipette n'est alors pas adaptée à la conception de la biopuce et d'autres outils devront être utilisés comme nous le verrons dans la suite de ce manuscrit.

### III.F.2. Capture de double brin d'ADN par un « hameçon » intercalant

Nous avons vu précédemment que les biopuces permettent la détection d'un brin d'ODN cible en solution. Il n'est en revanche pas possible avec ce type de dispositif de détecter la présence d'un brin d'ADN quelconque. L'électrochimie permet de détecter et

même éventuellement de quantifier l'ADN en solution par oxydation des bases azotées (purines). Cette oxydation nécessite l'application de potentiels supérieurs à +0,9 et à +1,5V vs Ag/AgCl, respectivement pour la guanosine et l'adénosine. Le diamant apparaît alors comme une électrode idéale de part sa fenêtre de potentiel étendue. La détection de guanosine et d'adénosine en solution sur diamant a été étudiée par Fortin et al. [8], des concentrations limites de 10  $\mu$ M ont pu être décelées. Cette limite de détection élevée montre les limites de cette voie de détermination. De plus au vue des potentiels très anodiques requis, la sélectivité de la mesure n'est pas garantie. En effet, il est très difficile de travailler directement dans des milieux biologiques complexes car ils contiennent un grand nombre d'espèces électroactives pouvant interférer avec le signal analytique. Enfin il n'est pas possible avec cette méthode de différencier des bases libres en solution d'un brin d'ADN, pas plus qu'il n'est possible de différencier deux brins dont la séquence est différente. Afin de s'affranchir de ces limitations sans pour autant passer par une matrice d'immobilisation complexe, il existe un moyen qui consiste à utiliser des agents intercalants de l'ADN immobilisés sur l'électrode [9]. En effet, de par leur interaction avec l'ADN double brin, ces agents peuvent alors servir d'hameçons permettant de pêcher/capturer des fragments hybridés en solution. Cette méthode de détection présente plusieurs avantages: D'une part les agents intercalants de par leur affinité avec le double brin permettent de s'assurer qu'il s'agit d'ADN et non de bases libres ; d'autre part, l'hybridation et donc la sélectivité de la capture des ADN simple brin cibles par un ODN sonde est assurée en phase homogène. Cela permet une capture plus efficace de cibles présentes en faible concentration en limitant l'impact néfaste de la diffusion. De plus il est également possible de marquer la sonde par un agent de contraste (sonde redox, enzyme, fluorophore..) sans être obligé de passer par une étape de marquage, puis éventuellement de révélation, de la cible qui pourrait s'avérer dénaturante. Dans cette optique, en tant que preuve de concept, nous avons ainsi utilisé une pyridoacridone (PyA) modifiée par un bras présentant une amine terminale et immobilisée sur diamant pour être utilisée comme hameçon. Cette molécule, présentée Figure IV- 3, a été synthétisée par L. Bouffier (ISM Bordeaux) et M. Demeunynck (DPM, Grenoble).

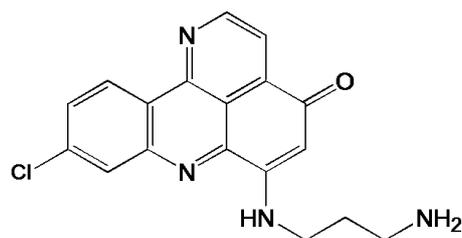


Figure IV- 3 : Formule topologique de la pyridoacridone aminée

Comme tout agent intercalant, la PyA interagit sélectivement avec les doubles brins d'ADN. De plus cette molécule est électrochimiquement active au travers de son couple redox de type quinone-imine (Figure IV- 4.a). Bouffier et al. [10] ont caractérisé la réponse redox de cet intercalant (Figure IV- 4.b) ainsi que son affinité pour l'ADN double brin et son utilisation comme marqueur de l'hybridation d'ADN sur biopuce. Ainsi après hybridation d'une sonde immobilisée et donc formation du double brin, l'intercalant est ajouté en solution puis piégé par le duplex. Sa détection électrochimique met alors en évidence la présence du double brin. Ils n'ont détecté l'intercalant que sur les substrats modifiés avec les doubles brins. Cependant, même si la différenciation doubles/simple brin est très sélective, l'interaction non spécifique de ce marqueur avec la matrice d'immobilisation génère un biais relativement important sur la mesure. Il n'en va pas de même avec la méthodologie dite de l'hameçon pour laquelle la non spécificité est annulée par l'immobilisation de l'intercalant.

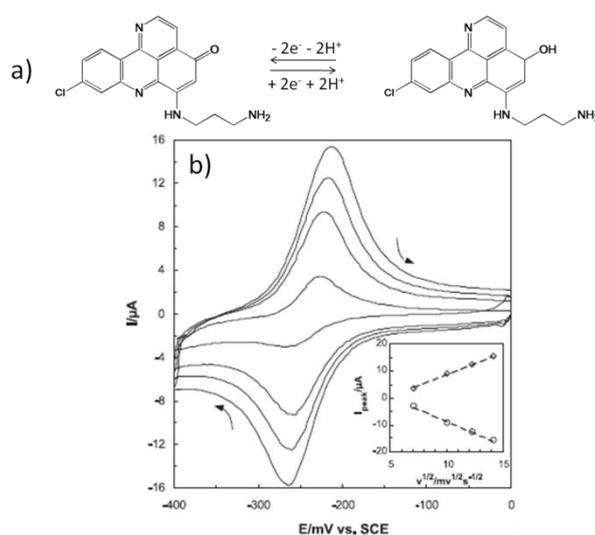


Figure IV- 4 : a) Mécanisme d'oxydoréduction de la PyA, b) Voltampérogrammes de la PyA (1mM) dans LiClO<sub>4</sub> 0,1M en solution aqueuse désaérée sur une électrode de platine, vitesses de balayage comprise entre 25 et 200 mV/s, référence SCE.[11]

Ainsi, nous avons tout d'abord immobilisé la PyA sur diamant pour tenter de détecter un double brin d'ADN en solution. L'intercalant (Figure IV- 3) a été dissout dans une solution de phosphate de sodium dibasique 0,2M à une concentration de 150μM, puis immobilisé par dépôt de goutte en utilisant la technique de greffage des amines sur diamant hydrogéné. Deux échantillons diamant microcristallin ont été fonctionnalisés en parallèle et laissés au contact de la solution pendant environ 30 minutes. La caractérisation électrochimique du greffage a été effectuée par voltammétrie cyclique dans une solution électrolytique de perchlorate de

lithium 0.2M avec une pseudo-électrode de référence en platine sur l'un des échantillons. Les voltampérogrammes associés sont présentés Figure IV- 5.a. Pour nous assurer que la molécule est bien immobilisée sur le substrat, nous avons tracé l'évolution de l'intensité des pics d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage (Figure IV- 5.b.) L'évolution linéaire de l'intensité en fonction de la vitesse de balayage, signature d'un comportement électrochimique temporel, montre que la molécule est bien immobilisée sur la surface du diamant. La stabilité des signaux obtenus montre qu'il s'agit bien d'un greffage et non d'une adsorption. Enfin, l'intégration du courant sous les pics d'oxydation et de réduction permet d'estimer la concentration surfacique greffée qui est estimée à  $8,5 \cdot 10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$ .

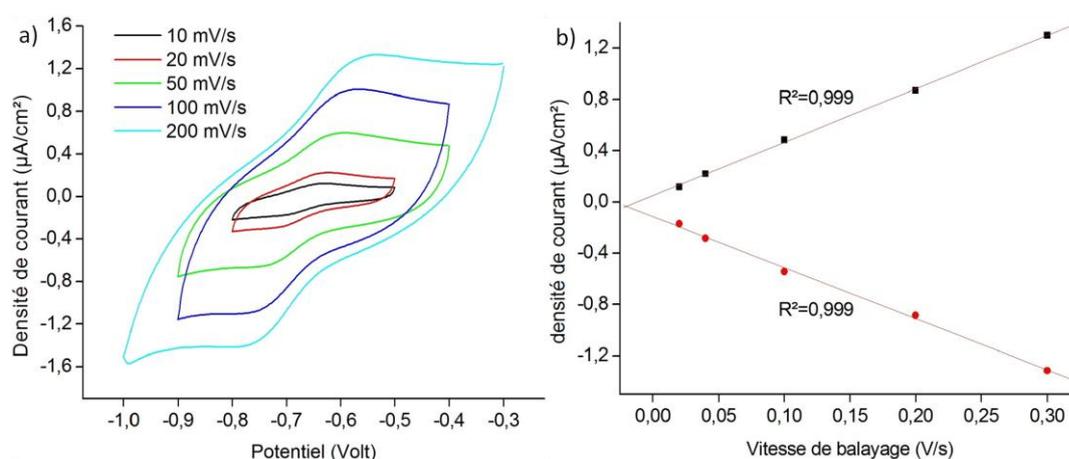
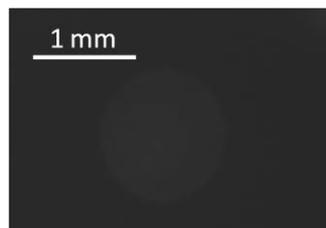


Figure IV- 5 : a) Voltampérogrammes de la PyA (vs Ag/AgCl) greffée sur une électrode diamant, solution électrolytique de LiClO<sub>4</sub> 0,2M.. b) Courbe illustrant l'évolution de la densité de courant des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage.

Après avoir vérifié l'immobilisation effective de l'intercalant, nous avons ensuite utilisé le second échantillon pour la capture d'ADN double brin. De manière préliminaire à cette capture, afin de se prémunir de toute adsorption non spécifique de doubles brins cibles, la surface de l'échantillon est saturée dans une solution de BSA ( $1 \text{mg.mL}^{-1}$  dans le PBS pH 7,4) pendant 15 minutes. Pour l'étape de capture des doubles brins d'ADN, l'échantillon est mis en contact avec une solution de PBS à pH 7,4 contenant le double brin d'ADN (Zip6, Tableau IV- 1) à une concentration de  $1 \mu\text{M}$ . Nous avons laissé la solution en contact une heure avec l'échantillon fonctionnalisé par l'intercalant, puis, l'un des deux brins étant biotynilé, l'échantillon a été caractérisé par microscopie de fluorescence en suivant le protocole détaillé dans la partie III.F.1 de ce chapitre.

Comme le montre la Figure IV- 6, on distingue une fluorescence ténue au niveau de la surface fonctionnalisée par l'intercalant. Malgré cette image peu contrastée, cela montre que le double brin d'ADN ne s'est immobilisé sur la surface que par l'intermédiaire de l'intercalant. La faible fluorescence observée est relative à une faible quantité d'ADN double brin capturée du fait probablement de la longueur du bras espaceur liant l'intercalant à la surface. Cette proximité entre le PyA et la surface, gêne la mobilité de l'intercalant et donc son interaction avec le double brin. Un bras espaceur plus grand pourrait résoudre ce problème mais cela nécessiterait tout de même l'utilisation d'un primaire d'arrimage car un bras plus long rendrait insoluble l'espèce dans les solutions aqueuses. Par ailleurs, la densité de surface de l'intercalant joue un rôle majeur et pourrait donc être optimisée afin de favoriser la capture. Il serait également possible d'utiliser ce protocole original de détection en visant une lecture électrique plus simple à implémenter sur un système de type « lab-on-chip ». Ainsi, bien que la technique de fluorescence soit extrêmement sensible, l'utilisation de transistors en diamant de type SGFET (cette structure ayant fait la preuve de sa compatibilité avec la nouvelle méthodologie de fonctionnalisation rapportée dans ce travail) permettrait de mettre au point un système intégré permettant une mesure électrique in situ sans marquage de la sonde ou de la cible. Notamment, l'un des points intéressants de cette technique, contrairement à une hybridation sur sonde immobilisée, réside dans une variation de densité électronique et de pH accru du fait de l'absence de brin sonde au voisinage de la surface (apportant ses propres acidité et densité électroniques).



*Figure IV- 6 : Image de la fluorescence du double brin d'ADN immobilisé sur le substrat par intercalation de la PyA.*

Cette partie a mis évidence l'intérêt d'utiliser la technique de greffage des amines pour la détection de l'ADN. Le caractère spontané et mono-étape simplifie considérablement la conception d'un tel dispositif. Toutefois, de nombreux dispositifs bioélectroniques utilisent des protéines en tant que biorécepteur (enzymes redox, anticorps...). Ainsi, dans le paragraphe suivant nous allons nous intéresser à l'immobilisation de ces biomolécules mais aussi pour les protéines redox à leur connexion électrique directe avec la surface du diamant.

### III.F.3. Cytochrome c

Le Cytochrome c (Figure IV- 7.a) est une hémoprotéine que l'on trouve sur la membrane interne des mitochondries. Elle permet le transfert d'électron entre différentes espèces de la chaîne respiratoire. Le centre prosthétique de cette protéine est un hème (Figure IV- 7.b) ; il s'agit d'un atome de fer complexé par quatre atomes d'azote appartenant à une porphyrine. Cet hème constitue un couple redox, on le retrouve dans l'hémoglobine où il se lie avec l'oxygène. Le Cytochrome c, à l'inverse de l'hémoglobine, ne forme aucune liaison avec l'oxygène. Hormis son rôle primordial de relais d'électron, il est impliqué dans le mécanisme de mort cellulaire, l'apoptose. C'est pour cette raison qu'il fait l'objet d'un grand nombre d'étude. Le Cytochrome c initie le mécanisme d'apoptose [12] lorsqu'il est relargué dans le cytosol [13, 14] ; de fait sa concentration diminue dans la mitochondrie. Paradoxalement il présente une activité enzymatique similaire à celle des peroxydases, il peut ainsi réduire les nitrites [15] et le peroxyde d'hydrogène [16]. Plus prosaïquement, l'hème du cytochrome est accessible électrochimiquement par transfert direct avec une électrode [17, 18] du fait de la petite taille de la protéine et de la proximité du centre hème avec la surface de l'enveloppe protéique. Cette propriété est mise à profit dans ce travail afin de démontrer, d'une part, la possibilité d'immobiliser une protéine catalytique sans perte de ses caractéristiques rédox et, d'autre part, l'existence d'un transfert électronique direct avec le diamant permettant d'envisager l'élaboration de biocapteurs de troisième génération.

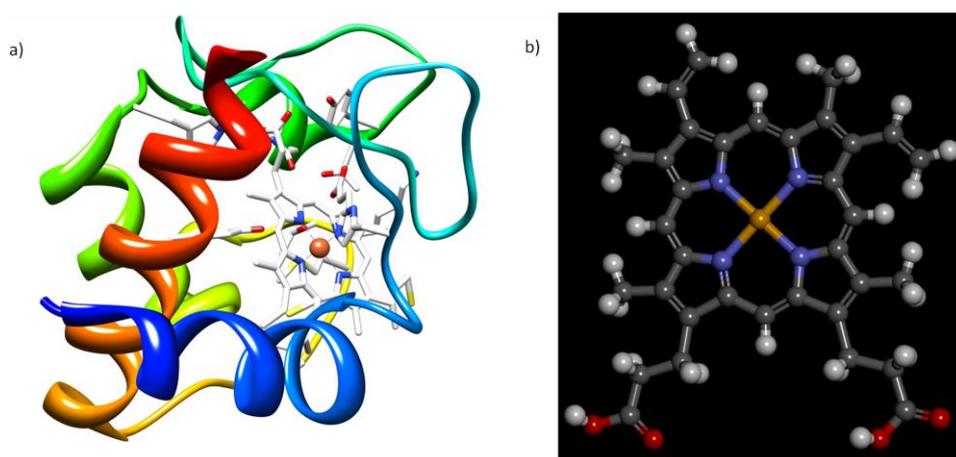


Figure IV- 7 : a) structure du cytochrome c, b) Centre héminique du cytochrome c.

Il existe différentes voies pour immobiliser une protéine, elle peut être fonctionnalisée ou adsorbée sur la surface. L'adsorption présente des problèmes de reproductibilité et de désorption incontrôlée des espèces, de plus le diamant hydrogéné ne permet pas l'adsorption directe de protéine du fait de son caractère hydrophobe. Yang et al. [16] ont montré qu'il n'est pas possible d'adsorber directement le cytochrome sur diamant hydrogéné, ils ont donc préparé la surface du diamant par oxydation de la surface par plasma  $O_2$ , suivie d'un traitement acide  $HNO_3/H_2SO_4$ . Comme nous l'avons vu au chapitre I, les diamants oxydés affichent des propriétés électrochimiques bien moins intéressantes que les hydrogénés. Ainsi, on remarque une diminution de la surface électroactive ainsi qu'un affaissement du coefficient de transfert de charge concomitamment à une large augmentation de la différence de potentiel pic à pic  $\Delta E$  en voltamétrie cyclique [19]. Dans ce contexte, nous avons donc opté pour l'immobilisation du cytochrome c par greffage covalent. Pour la plupart des enzymes, et notamment pour celles de petites tailles où le centre prosthétique est proche de l'enveloppe extérieure, il n'est pas envisageable de les immobiliser directement sur une surface. Le changement d'état redox de la protéine entraîne une modification de la conformation de cette dernière, qui est rendue impossible si la protéine est immobilisée trop proche de la surface. De plus, si la protéine trouve plusieurs points d'accroche sur la surface, cela peut entraîner une dénaturation de leur structure tertiaire et donc dans le cas des enzymes, une perte de leur activité enzymatique.

De ce fait, nous avons choisi d'immobiliser le cytochrome c par l'intermédiaire d'un bras espaceur, le 6-aminohexanoïque acide ou acide aminocaproïque (ACA). L'acide a été greffé par la méthode de fonctionnalisation directe des amines. Nous avons utilisé une solution de phosphate de sodium dibasique 0,2M ajustée à pH 10 contenant 10mM d'ACA. Comme il est impossible de caractériser le greffage sur les électrodes diamant par FTIR, nous avons procédé en parallèle à la fonctionnalisation dans les mêmes conditions d'un échantillon intrinsèque et d'une électrode. Les deux échantillons ont été placés en contact avec la solution de fonctionnalisation pendant 30 min, puis nous avons procédé à la caractérisation par spectroscopie infrarouge à l'aide d'un accessoire ATR. Le spectre infrarouge de l'ACA après greffage est présenté sur la Figure IV- 8.

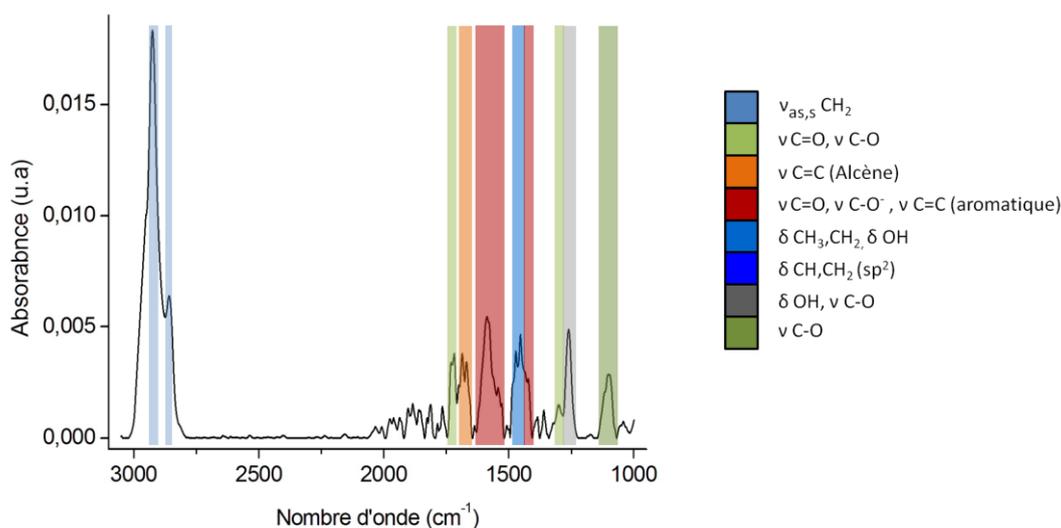


Figure IV- 8 : Spectre infrarouge, réalisé en ATR avec un cristal Germanium, d'un substrat diamant CVD intrinsèque (100) fonctionnalisé avec l'ACA.

On peut voir que la majeure partie du spectre est équivalente à ceux observés pour les greffages précédents. Tout d'abord la signature de l'élongation asymétrique et symétrique des  $\text{CH}_2$  à  $2925$  et  $2860 \text{ cm}^{-1}$  respectivement, ainsi que leurs cisaillements à  $1460 \text{ cm}^{-1}$ , mettant en évidence la présence des chaînes alcanes de l'ACA sur le substrat. On note en revanche l'absence de bande significative à  $2960 \text{ cm}^{-1}$ , indiquant l'absence de groupement méthyle sur la surface du diamant. Les bandes situées entre  $1680$  et  $1660 \text{ cm}^{-1}$  sont la signature des alcènes non conjugués dont on retrouve des traces lors de chaque greffage. On peut également remarquer la présence de la bande située à  $1260 \text{ cm}^{-1}$  qui révèle la présence de ponts éthers. On remarque ensuite la présence d'une bande large à  $1590 \text{ cm}^{-1}$ . Cette bande est la signature de l'élongation asymétrique des fonctions  $\text{COO}^-$  mettant en évidence la présence de sels d'acide. Cette bande est corrélée à l'élongation symétrique d'intensité beaucoup plus faible de cette même fonction, que l'on peut voir à  $1420 \text{ cm}^{-1}$ . Le greffage s'effectuant à pH basique, les fonctions acides sont alors déprotonées. On peut donc s'attendre à trouver la signature des sels d'acide en surface du diamant. On remarque néanmoins un épaulement à  $1580 \text{ cm}^{-1}$  et une autre bande à  $1550 \text{ cm}^{-1}$  qui peuvent représenter la signature des liaisons  $\text{sp}^2$  conjuguées. On remarque ensuite une autre bande d'intensité moyenne bien définie à  $1720 \text{ cm}^{-1}$ . Il s'agit de l'élongation des  $\text{C}=\text{O}$  des groupements acides. Cette bande peut être reliée à celle située à  $1300 \text{ cm}^{-1}$ , ainsi qu'à la large bande centrée sur  $1100 \text{ cm}^{-1}$ , résultant de la déformation des OH et de l'élongation des C-O respectivement. La présence de groupements carboxyliques peut être expliquée par l'étape de rinçage à l'eau ultrapure durant laquelle une partie des sels ont

pu être protonés. Enfin la bande large centrée à  $1100\text{ cm}^{-1}$  laisse apparaître plusieurs composantes qui sont la signature du stretch des C-O, des alcools secondaires, des éthers non cycliques et des acides carboxyliques. Nous avons pu mettre en évidence l'immobilisation de l'ACA sur la surface du diamant, grâce aux signatures des chaînes alcanes et des groupements carboxyliques. Ce sont ces groupements qui vont être utilisés dans une deuxième étape pour immobiliser le cytochrome c sur le diamant au travers d'un bras espaceur suffisamment court, pour assurer une connexion directe l'hème du cytochrome c avec l'électrode (Figure IV- 9).

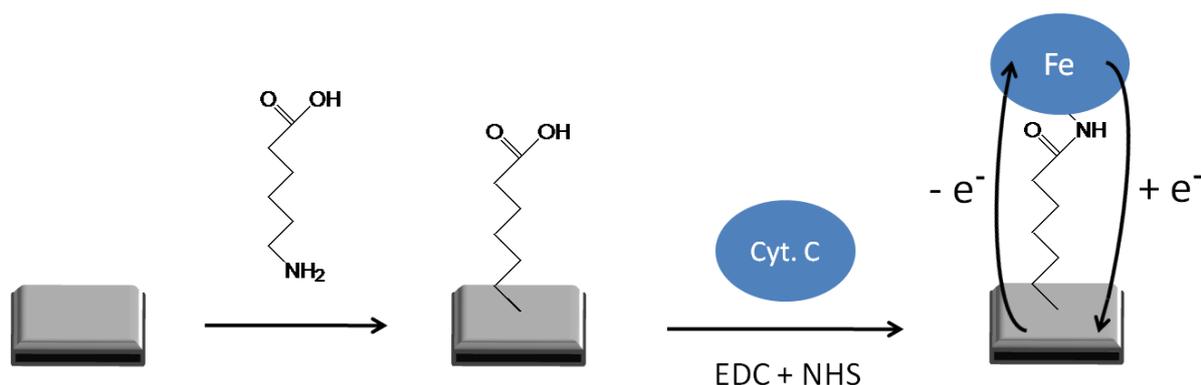


Figure IV- 9 : Schéma de principe du greffage du cytochrome c sur un échantillon diamant modifié fonctionnalisé avec l'ACA.

Le couplage de la protéine a été réalisé suivant le procédé décrit par Rubio-Retama et al. [20] selon un procédé classiquement utilisé en biochimie. Brièvement, celui-ci consiste en l'activation des fonctions carboxyliques de l'ACA immobilisées sur la surface conduisant à la formation d'esters activés, puis en la réaction de ces derniers avec une amine primaire (généralement portée par une fonction lysine) présente sur l'enveloppe protéique de la protéine pour former une liaison peptidique. La formation de l'ester activé sur la surface du diamant est réalisée par un procédé classique basé sur l'utilisation 1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et de N-hydroxysuccinimide (NHS) [21]. En solution aqueuse l'ester activé s'hydrolyse rapidement, en particulier à pH basique. Pour cette raison nous utilisons une solution tamponnée à pH légèrement acide avec du 2-(N-morpholino)ethanesulfonique acide (MES) 0,2M dans laquelle sont introduits 200 mM l'EDC et 50 mM de NHS. L'échantillon est alors immergé dans cette solution durant deux heures, puis rincé à l'eau ultrapure et séché. Enfin, la surface ainsi activée est mise en contact pendant six heures à une température de  $4^{\circ}\text{C}$  avec une solution de PBS ajustée à pH 8 contenant  $1\text{ mg.mL}^{-1}$  de cytochrome c. Le diamant ainsi modifié est alors abondamment rincé au PBS

avant de procéder à sa caractérisation électrochimique par voltammétrie cyclique dans une solution de PBS (Figure IV- 10).

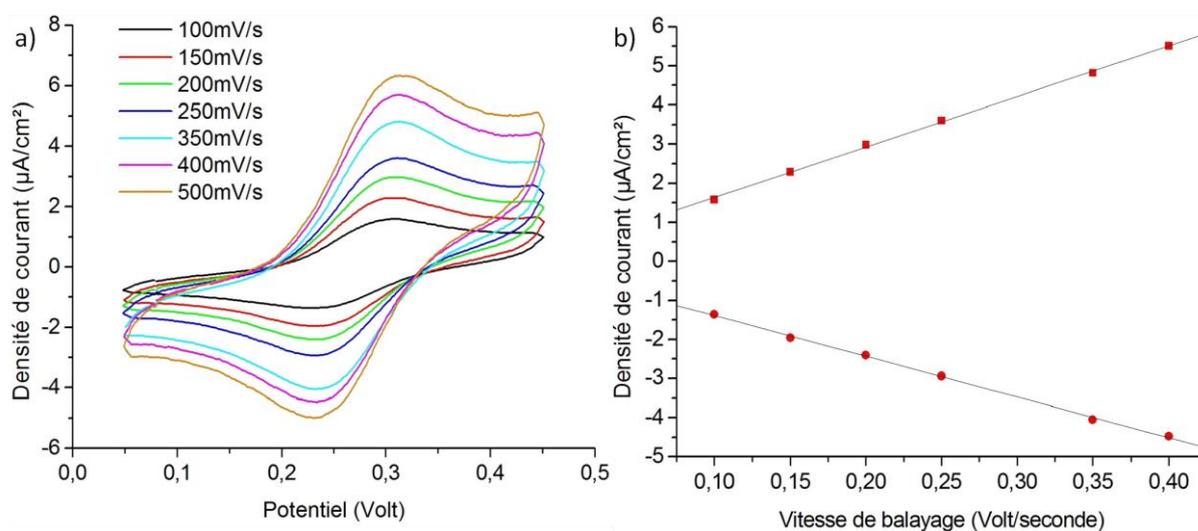


Figure IV- 10 : a) Voltampérogrammes du centre héminique du cytochrome *c* (vs Ag/AgCl) greffé sur une électrode diamant, solution électrolytique de PBS, b) Courbe illustrant l'évolution de la densité de courant des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage.

Les voltampérogrammes de la Figure IV- 10.a illustrent le transfert direct entre l'hème du cytochrome *c* et l'électrode diamant. Nous avons reporté sur la Figure IV- 10.b, l'intensité des pics d'oxydation et de réduction des voltampérogrammes en fonction de la vitesse de balayage. Comme nous l'avons vu dans la partie 5.b.2, l'évolution linéaire de  $I_{pic}$  en fonction de la vitesse de balayage montre que l'espèce est immobilisée sur la surface de l'électrode. L'intégration de l'aire sous les pics d'oxydation ou de réduction et l'application de la loi de Faraday nous permet d'appréhender la concentration de surface en cytochrome *c* immobilisé qui est de l'ordre de  $3.10^{-12} \text{ mol.cm}^{-2}$ . Ceci est en accord avec les résultats reportés dans la littérature pour l'immobilisation d'une monocouche de protéines de taille équivalente [16],[22]. Le potentiel demi-vague du couple redox afférent au cytochrome *c* immobilisé par notre méthode est de + 0,265V vs Ag/AgCl. Or, le potentiel redox formel du cytochrome *c* en solution est de + 0,265V vs NHE soulignant ainsi un décalage de + 0,26V dans notre cas. En fait, il s'avère que le potentiel standard du cytochrome *c* est extrêmement sensible à son environnement : force ionique de la solution d'analyse mais aussi nature des groupements de surface du matériau support et type d'interaction entre le cytochrome et la surface (adsorbé ou greffé) [23]. Ainsi, Whitesides et al. [24] ont évalué l'influence sur le potentiel redox du greffage ou de l'adsorption du cytochrome *c* sur des SAMs comportant différents

groupements terminaux. Son potentiel peut varier alors entre - 0,35 et + 0,4V vs Ag/AgCl en fonction du type de terminaison par lequel il est lié (adsorption ou greffage) à la surface. Dans certain cas, bien que le cytochrome *c* soit immobilisé, il n'est pas possible de coupler son centre redox avec la surface. L'hème de cette protéine redox est situé sur un coté et à l'extrême périphérie de la protéine (Figure IV- 7), c'est pour cette raison qu'il est si sensible à son environnement. Cela implique également que l'orientation selon laquelle il est immobilisé influence directement la distance entre le centre prosthétique et la surface, ce qui impacte directement la réversibilité du couple redox. On remarque que dans notre cas la différence de potentiel interpic  $\Delta E_p$  est de 65mV et n'augmente pas pour la gamme de vitesse de balayage étudiées, ce qui dénote une bonne réversibilité du transfert électronique impliquant que l'hème du cytochrome est bien orienté et proche de la surface.

Le cytochrome *c* sous sa forme native ne présente aucune activité catalytique de type réductase. Kagan et al. [12] ont montré que lors du processus d'apoptose le cytochrome *c* adopte une activité de type peroxydase. Ils ont mis en évidence que l'hème est encapsulé par une chaîne peptidique dans une poche le protégeant du solvant. Lors de la dénaturation partielle mais irréversible de la protéine, cette chaîne est déplacée et le solvant rentre en contact avec l'hème. Waldeck et al. ont [22] mis en évidence qu'une baisse du pH jusqu'à des valeurs de 3-4, permet de dénaturer la protéine et d'amorcer son activité enzymatique. Ils ont également montré que dans le cas où le cytochrome *c* est greffé sur surface il est beaucoup moins stable qu'en solution et que la diminution de pH implique une dénaturation totale de l'enzyme. C'est également ce que nous avons pu observer dans notre cas.

En conclusion, cette étude sur l'immobilisation du cytochrome *c* nous a permis de mettre en évidence l'existence d'un couplage électrique direct entre le centre prosthétique d'une protéine redox et l'électrode diamant. L'emploi de bras espaceur de longueurs différentes avec d'autres groupements terminaux pourrait rendre possible la dénaturation partielle de l'enzyme et donc l'utilisation de son activité de type réductase. Toutefois, le cytochrome *c* était utilisé ici comme protéine redox modèle afin de vérifier ce couplage direct qui peut être alors mis à profit pour la conception de biocapteurs de troisième génération. Ainsi, nous allons utiliser maintenant cette propriété pour élaborer un biocapteur sensible au peroxyde d'hydrogène via l'utilisation de la peroxydase immobilisée selon une voie différente.

### III.G. Biocapteur au peroxyde d'hydrogène

Le champ d'applications associées à la peroxydase fait de cette enzyme l'une des plus étudiée. On trouve des applications dans le diagnostic et l'analyse [25], dans le domaine des biocapteurs [26], dans la dépollution de l'eau [27], dans la synthèse de polymères [28] ou encore dans de nombreux procédés de synthèse biotechnologique [29]. En 2007, Ruzgas et al. [26] ont immobilisé l'enzyme sur substrat et ont proposé un mécanisme réactionnel validant l'activité catalytique de cette protéine envers les peroxydes et les phénolates. La même année Dong et Li [30] ont immobilisé la peroxydase et réalisé le premier biocapteur au peroxyde d'hydrogène sur Or. Cette réalisation représente le premier biocapteur de troisième génération basé sur le couplage électrique direct de la peroxydase avec l'électrode. Les études fondamentales sur le mécanisme réactionnel menées par Savéant et al. [31], Ferapontova et al. [32] et Kubota et al. [33] ont abouti à une compréhension totale des mécanismes en jeu. Ces travaux ont significativement élargi les voies d'applications potentielles des peroxydases. Paradoxalement peu de travaux axés sur l'immobilisation de la peroxydase sur diamant ont été menés. Ainsi, Rubio-Retama [20] et al. et Hernando et al. [34] ont connecté la Peroxydase de raifort ou Horseradish Peroxidase (HRP) de manière directe sur électrode diamant et ont réalisé un biocapteur au peroxyde d'hydrogène de troisième génération. La mise au point d'un biocapteur de troisième génération sur diamant basé sur l'utilisation d'une peroxydase a un double intérêt. Le premier concerne le domaine de l'analyse et des biocapteurs, les propriétés électrochimiques couplées aux caractéristiques anti-fouling du diamant peuvent permettre d'abaisser les seuils de détection et la durée des vies des capteurs. De plus le peroxyde d'hydrogène n'est pas détectable par voie électrochimique directe sur diamant à des potentiels n'impliquant pas d'interférences électrochimiques [35]. Le centre prosthétique de cette protéine est un hème (Figure IV- 11.a) ; il s'agit d'un atome de fer complexé par quatre atomes d'azote appartenant à une porphyrine. Le mécanisme réactionnel de l'action catalytique de la HRP sur l' $H_2O_2$  est schématisé sur la Figure IV- 11.b . La première étape est rapide et consiste au transfert d'un atome d'oxygène du peroxyde d'hydrogène vers la Ferri-porphyrine E ( $Fe^{III}$ ) pour former le composé E1 ( $Fe^V$ ) :  $[Fe^{IV}=O]^+$ . Dans un second temps le cation radical porphyrine E1 est réduit par un donneur d'électron Q pour former l'intermédiaire oxyferryl E2 ( $Fe^{IV}$ ). Dans la dernière étape, l'intermédiaire E2 est réduit par un nouveau donneur Q produisant une molécule d'eau et régénérant la ferri-porphyrine E. Ainsi, il a été montré qu'une électrode polarisée à un potentiel suffisamment réducteur,

typiquement - 0,2 V/ECS pouvait jouer le rôle des donneur d'électron Q via un transfert électronique directe entre l'hème de l'enzyme et le substrat [36].

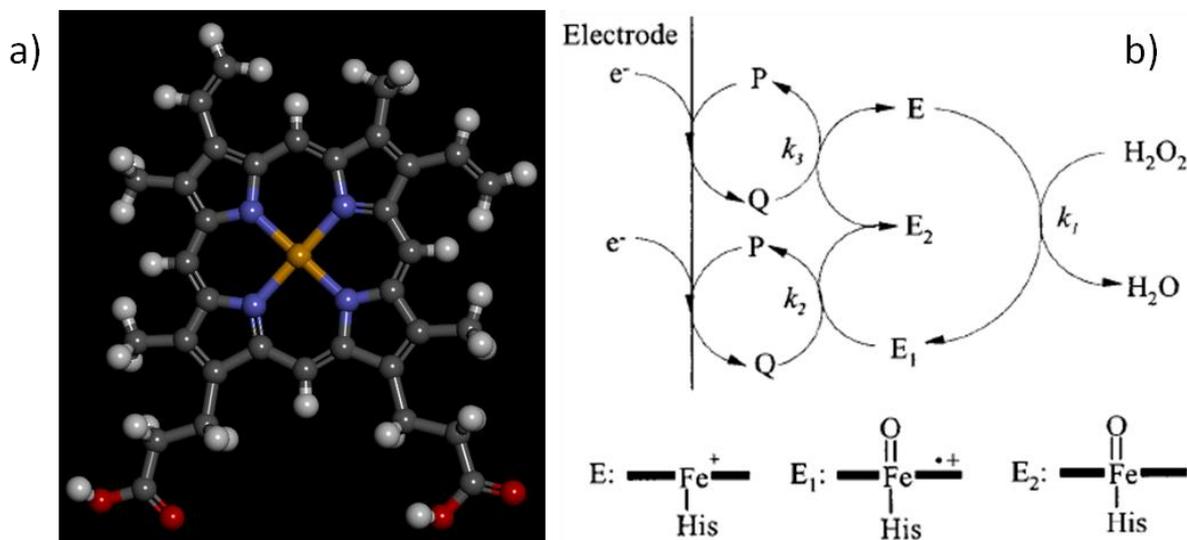


Figure IV- 11 : a) centre hémique de la HRP, b) Schéma du mécanisme réactionnel de l'action catalytique de la HRP sur l' $H_2O_2$ .

Pour mettre en œuvre un tel capteur nous avons travaillé sur la base d'une immobilisation via l'utilisation du lien générique avidine-biotine préalablement utilisé comme système modèle pour la biofonctionnalisation du diamant. Cette méthodologie nous permet d'utiliser une enzyme commerciale préalablement modifiée par l'avidine sans risque de dénaturation lors de l'étape de greffage comme nous l'avons montré pour le cytochrome *c*. Nous avons ainsi greffé la biotine sur le substrat comme précédemment introduit puis immobilisé le conjugué Avidine-HRP via la formation du complexe biotine-Avidine (Figure IV- 12).

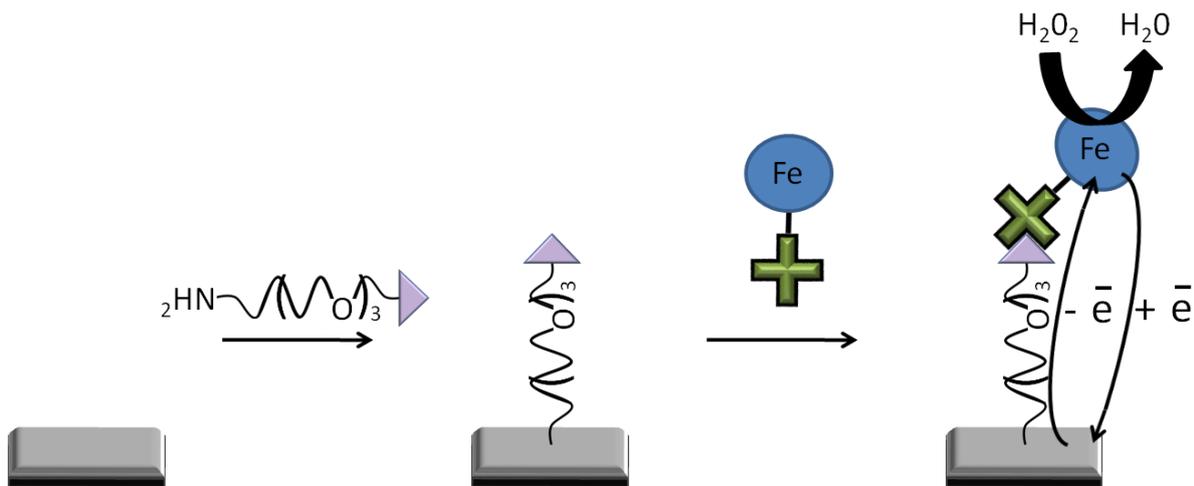


Figure IV- 12 : Schéma illustrant l'immobilisation de la HRP sur l'électrode diamant à travers le couple biotine-avidine et le principe de fonctionnement du biocapteur.

La première étape de la conception du capteur a consisté en le greffage de la biotine-(peg)<sub>3</sub>-aminée (Figure IV- 12) directement sur diamant hydrogéné en utilisant la méthode de greffage des amines précédemment décrite. Le choix de la biotine a été conditionné par la taille du bras espaceur. En effet le processus d'échange électronique nécessite que le substrat et l'enzyme soit à proximité l'un de l'autre. Nous avons montré expérimentalement que l'utilisation de la biotine-(peg)<sub>8</sub>-amine, ou d'une biotine sans bras espaceur ne permettait pas de coupler électriquement la peroxydase et l'électrode. Dans le premier cas l'éloignement entre la HRP et le substrat ne permet probablement pas de coupler le centre redox de la protéine et dans le second, la trop grande proximité entre la biotine et le substrat rend impossible la reconnaissance entre cette dernière et l'avidine du conjugué enzymatique. Le greffage de la biotine a été effectué dans une solution de phosphate de sodium ajustée à un pH de 10, le temps de contact entre l'échantillon diamant polycristallin et la solution est de 6 heures.

Suite au greffage de la biotine, nous avons caractérisé le substrat biofonctionnalisé par spectroscopie d'impédance. La Figure IV- 13.a montre le spectre d'impédance de l'électrode de diamant nue avant fonctionnalisation et la Figure IV- 13.b montre celui de l'électrode fonctionnalisée par la biotine. Les mesures d'impédance ont été effectuées dans une solution de ferri/ferro cyanure 2mM contenant comme électrolyte support le Perchlorate de Lithium à 0,2M. La consigne en potentiel est alors modulée en fréquence (entre 100kHz et 200mHz) autour du potentiel de circuit ouvert (amplitude du signal 10mV rms) fixé par le potentiel standard du couple redox ferri/ferrocyanure 2 mM dissout en solution qui est de +0,18 V vs

Ag/AgCl. Le modèle le plus simple et le plus naturel pour étudier la cinétique d'un transfert électrochimique se produisant à l'interface d'une électrode est le circuit de Randles [37] (Figure IV- 14.a). Les circuits équivalents correspondant à l'électrode de diamant nu et à la biotine fonctionnalisée sont reportés sur la Figure IV- 14.a et b respectivement.

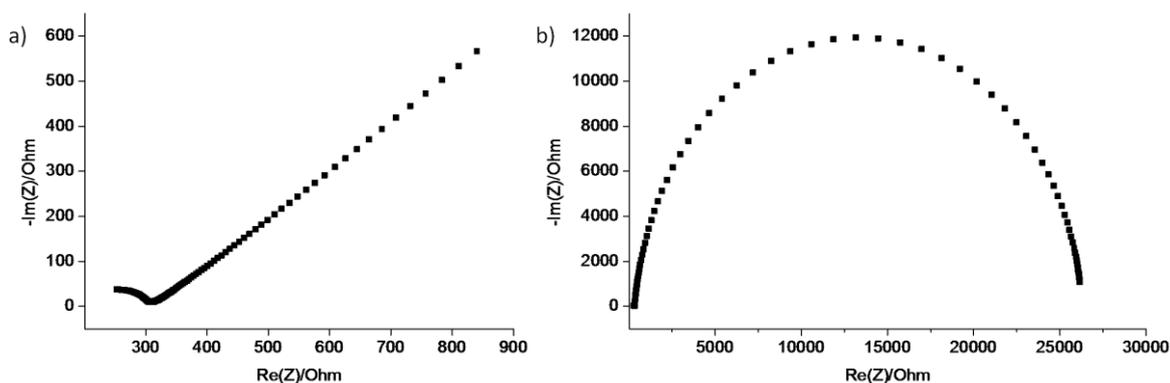


Figure IV- 13 : a) Spectre d'impédance représenté dans le plan NYQUIST de l'électrode diamant, réalisé au potentiel standard du couple  $Fe^{II}/Fe^{III}$  du ferri/ferrocyanure 2mM (+0,2V vs Ag/AgCl) dans une solution aqueuse de  $LiClO_4$  0,2M. b) Spectre d'impédance représenté dans le plan NYQUIST de l'électrode diamant fonctionnalisée par la biotine, réalisé dans les mêmes conditions que a).

Dans le cas du diamant nu, la capacité de double couche,  $C_{dl}$ , peut être modélisée par un élément capacitif pur dans le circuit équivalent de Randles, [38]. Après fonctionnalisation, cette capacité a été remplacée par un élément à phase constante, CPE. Il est classique d'introduire cet élément pour modéliser des spectres issues de matériaux fonctionnalisés. Il modélise le comportement capacitif imparfait de l'électrode, du fait de l'existence d'hétérogénéités de surface, qui induit un décentrage du demi-cercle résonant  $R_{CT}-C_{dl}$  par rapport à l'axe réel de l'impédance. Les spectres obtenus pour chacune des surfaces de diamant, Figure IV- 13.c pour l'électrode diamant nu et Figure IV- 13.d pour l'échantillon modifié avec la biotine, ont été ajustés par simulation numérique, sur  $1.10^6$  itérations selon la méthode d'échantillonnage aléatoire, via l'utilisation du logiciel EC-Lab (Bio-Logic) afin de quantifier les valeurs caractérisant chacun des éléments du circuit équivalent.

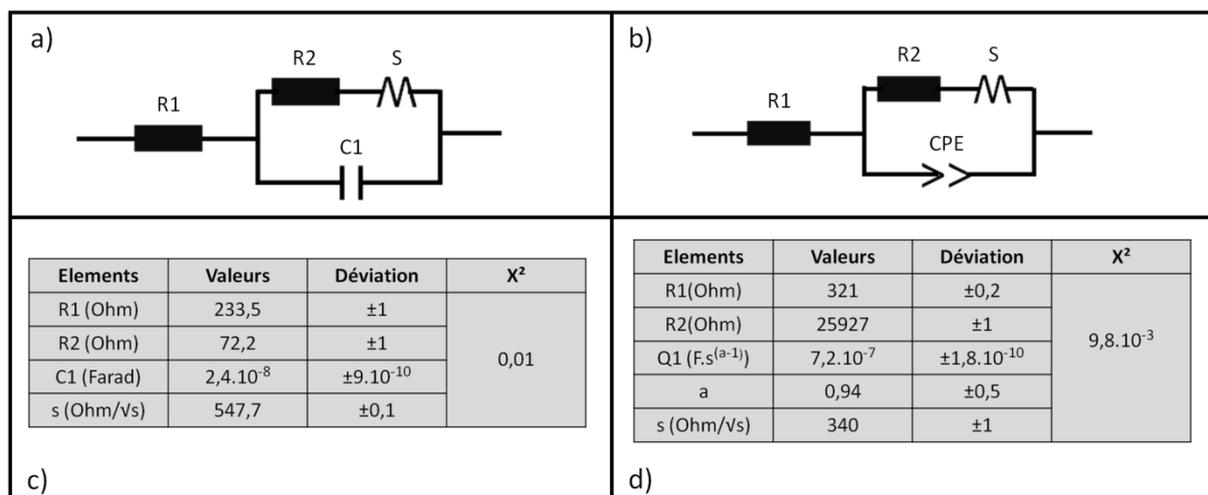


Figure IV- 14 : a), b) circuits équivalents de Randles associés à l'électrode de diamant nu et fonctionnalisée par la biotine, valeurs des composants électriques issus de l'ajustement analytique du modèle associé avec les données expérimentales : c) de l'électrode diamant nu, d) de l'électrode fonctionnalisée par la biotine.

Les valeurs issues de la simulation dans le cas de l'électrode de diamant nu sont caractéristiques de ce type de matériau [39]. Les valeurs d'intérêt sont la résistance de transfert de charge (R<sub>ct</sub>), notée R2 et la capacité double couche C1 dont on remarque la très faible valeur. Si l'on s'intéresse aux valeurs des simulations obtenues dans le cas de l'électrode modifiée par la biotine, on peut remarquer une augmentation de la R<sub>ct</sub> et de la capacitance noté Q1. En se référant à la partie III.G, où nous avons décrit l'effet des couches immobilisées en surface sur les phénomènes électrochimiques intervenant à l'interface, l'augmentation de la capacité double couche est due à la difficulté qu'ont les espèces à diffuser à l'intérieur de la couche greffée. La R<sub>ct</sub> est reliée à la constante de vitesse de transfert de charge k<sub>0</sub> selon l'équation :

$$\frac{1}{R_{ct}} = \frac{n^2 F^2 k_0 S C_0}{RT} ; \text{ où } n \text{ est le nombre d'électrons échangés, } c_0 \text{ la concentration des}$$

espèces redox à l'électrode et S la surface électroactive disponible, les autres composantes ayant leur signification classique. Durant le greffage, une partie de ces sites électroactifs de surface disparaissent, ce qui implique une diminution de la surface spécifique et donc une augmentation de la R<sub>ct</sub>. Ces augmentations signent clairement l'immobilisation de la biotine sur la surface de notre électrode. De plus, les valeurs obtenues sont en accord avec celles rencontrées dans la littérature pour l'immobilisation d'une monocouche aliphatique sur diamant via la photochimie des alcènes [20].

Suite à la caractérisation de la monocouche biotynilée déposée sur le diamant, l'élaboration du capteur a été finalisée par le couplage du conjugué HRP-Avidine avec la biotine. Ce dernier est effectué en deux étapes. Tout d'abord la surface de l'échantillon est saturée par la BSA via la mise en contact de la surface avec une solution à  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  de protéine pendant 20 min à température ambiante. Cette étape vise à limiter l'adsorption non spécifique du conjugué. Au cours de la seconde étape, une solution de HRP-Avidine à  $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$  dans du PBS est mise en contact avec la surface préalablement biotynylée et saturée pendant deux heures à une température de  $4^{\circ}\text{C}$ . En parallèle nous avons soumis un échantillon diamant non modifié au même traitement afin de l'utiliser comme négatif. Les deux échantillons sont alors caractérisés par voltammétrie cycliques dans une solution de PBS. Les voltampérogrammes de l'échantillon fonctionnalisé avec la biotine sont présentés sur la Figure IV- 15.a et ceux de l'échantillon non modifié sur la Figure IV- 15.c. Pour ce dernier, excepté un fort courant capacitif, émanant probablement de l'adsorption de la BSA sur la surface diamantée, aucun signal redox n'est détecté. A contrario, dans le cas de l'échantillon fonctionnalisé avec la biotine, on observe clairement un couple redox dont le potentiel de demi vague, égal à  $+0,1 \text{ V vs Ag/AgCl}$ , est en accord avec celui observé pour la peroxydase immobilisée sur diamant [20]. Ces résultats mettent en évidence, d'une part le rôle du couplage avidine-biotine dans l'immobilisation de la protéine et, d'autre part, le transfert électronique direct entre l'hème de l'enzyme et l'électrode. A partir des voltampérogrammes de la Figure IV- 15.a, nous avons ensuite tracé l'évolution de l'intensité des pics d'oxydation et de réduction en fonction de la vitesse de balayage (Figure IV- 15.b). L'évolution linéaire du courant de pic avec la vitesse de balayage démontre un comportement temporel de l'interface et donc l'immobilisation de la HRP sur l'électrode de diamant. En intégrant l'aire sous le pic et en utilisant la loi de Faraday, nous avons pu estimer que la quantité d'HRP immobilisée sur la surface est de l'ordre de  $8.10^{-11} \text{ mol.cm}^{-2}$ . Cette valeur est en accord avec celles reportées dans la littérature [40] et met en évidence la formation d'une monocouche de peroxydase. Notons enfin le comportement capacitif de l'interface modifié par l'enzyme. Ce phénomène peut être attribué à la formation de l'assemblage moléculaire complexe formé à la surface de l'électrode.

Les voltampérogrammes de la Figure IV- 15.a démontrent la présence du centre hémique de l'HRP à la surface de l'électrode. Toutefois, il est important de caractériser le comportement catalytique de la protéine redox afin de vérifier sa non-dénaturation par la procédure de fabrication et donc les capacités de biodétection du biocapteur ainsi élaboré. Pour ce faire, nous avons utilisé ce dernier pour la détection ampérométrique du substrat de la

HRP, le peroxyde d'hydrogène. Ainsi, le biocapteur a été calibré via des injections de peroxyde d'hydrogène successives permettant de balayer sa gamme dynamique par incrément de la concentration en analyte. L'échantillon a été caractérisé dans une solution de PBS ajusté à pH 6,2 (correspondant à un pH optimal de fonctionnement de la HRP) mise en convection par un agitateur magnétique afin de travailler dans des conditions stationnaires d'apport en  $H_2O_2$  vers la surface de l'électrode biologiquement modifiée.

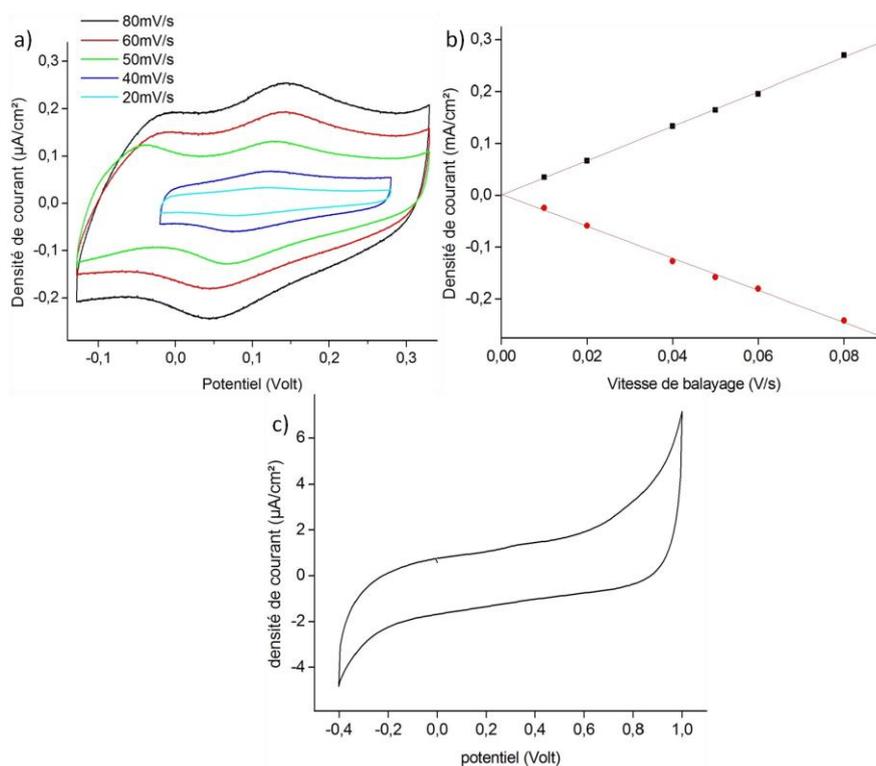
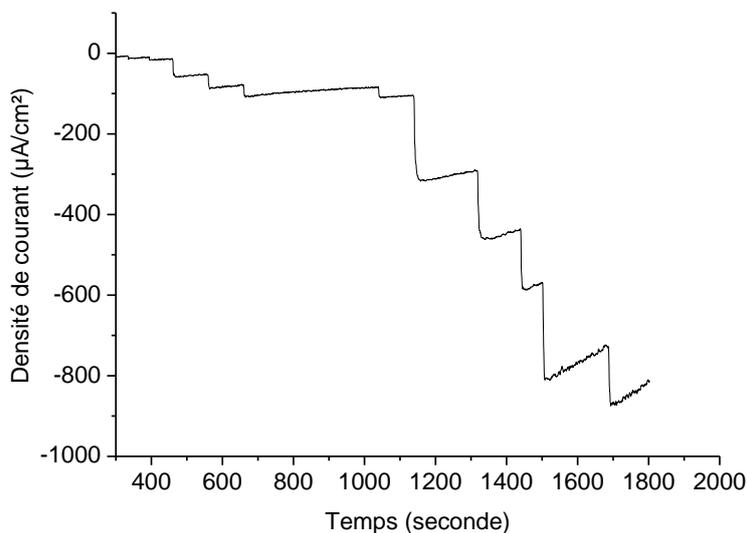


Figure IV- 15 : a) voltampérogrammes du centre héminique (vs Ag/AgCl) de la HRP immobilisée sur une électrode diamant via le couple biotine-avidine, solution électrolytique de PBS. b) Courbe illustrant l'évolution de la densité de courant des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage. c) Voltampérogramme d'une électrode diamant non fonctionnalisée par la biotine mais mis en contact avec la solution d'HRP-Avidine, solution support de PBS, électrode de référence Ag/AgCl.

Durant la mesure ampérométrique un potentiel constant de - 0,05V est appliqué à l'électrode correspondant à l'état réduit, et donc catalytiquement actif des biomolécules de peroxydase. Consécutivement à l'injection d' $H_2O_2$  en solution, les peroxydases réduisent le peroxyde d'hydrogène en solution et sont portées à leur état oxydé. Dans un contexte d'utilisation normal de la HRP, un substrat carboné donneur d'électron permet la régénération de l'enzyme. Dans le cas d'un biocapteur de troisième génération, l'électrode joue le rôle de donneur d'électrons. On devrait alors observer une augmentation du courant cathodique

enregistré lié à la régénération de l'enzyme par connexion directe avec l'électrode. Ce phénomène se traduit sur le chronoampérogramme de la Figure IV- 16 par l'obtention d'un nouveau palier de courant d'amplitude plus grande consécutif à chaque injection supplémentaire d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution. Ainsi, chaque marche illustre le courant enregistré pour une concentration donnée d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution. .



*Figure IV- 16 : Chronoampérogramme réalisé sur l'échantillon modifié par la HRP-Avidine durant l'injection successive d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la solution de PBS ajustée à pH 6,2. Le potentiel appliqué est de -0,05V vs Ag/AgCl. La concentration en solution lors des différentes injections est de : 0,1/1/10,1/20,1/30,1/39,9/137,9/235,9/333,9/638,9/756,9 mM.*

A partir du chronoampérogramme, on reporte les valeurs du courant cathodique de chaque palier en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène associée pour obtenir la courbe d'étalonnage du biocapteur Figure IV- 17. Les cinétiques enzymatiques sont

décrites en première approximation par le modèle de Michaelis-Menten :  $v = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$

$v$  est la vitesse de la réaction enzymatique,  $V_{\max}$  est la vitesse maximale pour la concentration saturante en substrat et  $S$  la concentration en substrat. L'apport de peroxyde étant stationnaire, le flux de courant généré par le transfert électronique lors de la régénération du centre enzymatique de la HRP suit de manière homothétique la vitesse réactionnelle. L'équation de Michaelis-Menten peut alors être écrite sous la forme d'un courant :

$$I = \frac{I_{\max} [S]}{K_M + [S]}$$

On remarque que l'évolution de notre courbe d'étalonnage suit globalement l'équation de Michaelis-Menten. Ainsi, une partie linéaire est observée pour les faibles concentrations en  $H_2O_2$ , il s'agit de la gamme dynamique de notre biocapteur qui s'étend entre 1 et 40  $\mu M$  (Figure IV- 17). Notons cependant que pour une cinétique Michaélienne pure, donc obtenue en phase homogène, cette première partie du graphe se réfère à une limitation par l'équilibre de complexation. Ceci n'est pas le cas ici du fait du fonctionnement du biocapteur en phase hétérogène, la gamme dynamique étant alors globalement limitée par le transport de matière à faible concentration en peroxyde. On peut également noter l'apparition du régime de saturation pour les valeurs de concentration importantes. L'autre caractéristique principale d'un biocapteur est sa sensibilité ; elle calculé dans la partie dynamique. Elle vaut dans notre cas  $2 \mu A.mM^{-1}.cm^{-2}$ . A titre d'exemple, les caractéristiques du biocapteur de troisième génération du même type réalisé par Rubio-Retama et al., affichent une gamme dynamique supérieure (0,1 et 30 mM) mais une sensibilité inférieure ( $0,5 \mu A/cm^2$ ). Bien que les peroxydases soient dédiées à la décomposition de l' $H_2O_2$ , il reste tout de même un agent toxique du fait de sa grande réactivité. A forte concentration il va endommager de manière irréversible les peroxydases, induisant une baisse de l'activité catalytique globale. La dénaturation des enzymes se manifeste à travers la dérive du courant cathodique observée pour les fortes concentrations.

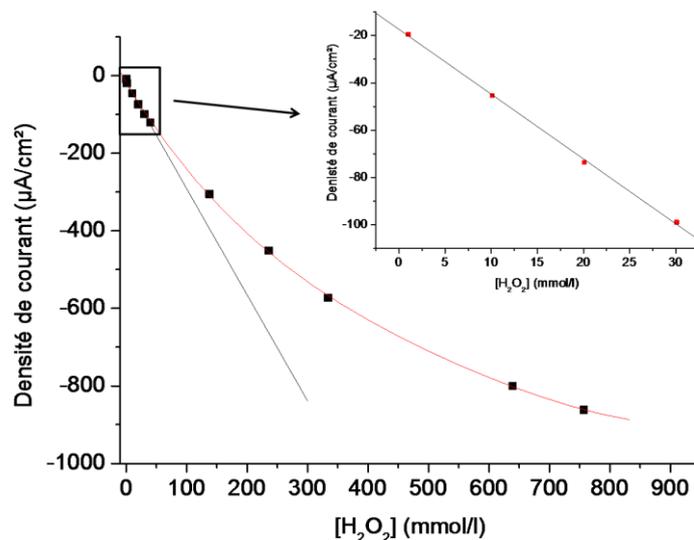


Figure IV- 17 : Courbe d'étalonnage du biocapteur représentant l'évolution de la densité du courant cathodique, associée aux plateaux observés sur le chronoampèrogramme, en fonction de la concentration en  $H_2O_2$  en solution.

Nous avons donc réussi à procéder à l'immobilisation de la HRP-Avidine au travers du couplage spécifique biotine-Avidine. Malgré l'utilisation d'un complexe enzymatique conjugué, nous sommes parvenus à coupler de manière directe la peroxydase avec l'électrode. La configuration de ce capteur présente un réel avantage en termes de durée de vie. A la différence des capteurs basés sur l'immobilisation d'enzymes de manière covalente, dont la durée de vie est limitée par le vieillissement de ces dernières, la base du capteur (diamant fonctionnalisé avec la biotine) peut être réutilisée un grand nombre de fois suite à la dénaturation de l'avidine (digestion par de la trypsine, destruction des structures secondaires et tertiaire par des tensioactifs...) et au relargage de l'enzyme désactivée. La biotine étant très résistante et la nature du lien avec le diamant très robuste, il est alors possible de reconstituer le capteur par simple couplage avec l'électrode. Cela confère également une très bonne reproductibilité au biocapteur en termes de quantité d'enzyme immobilisée. La base diamant-biotine représente alors une voie générique élégante pour la fabrication de divers capteurs enzymatiques basés sur une connexion directe ou sur la détection d'un produit diffusif. Toutefois, comme nous l'avons vu sur les votampérogrammes de la Figure IV- 15.a, cette immobilisation indirecte implique un comportement capacitif marqué et peut générer une gêne au transfert électronique. Dans ce contexte, il peut être intéressant d'immobiliser les protéines au plus proche de la surface de diamant comme nous l'avons présenté pour le cytochrome c ou alors par couplage directe sans adjonction d'un bras espaceur.

### III.H. Immobilisation directe de protéine

Il n'existe à ma connaissance aucun exemple d'immobilisation directe de protéine sur substrat. C'est pourquoi dans ce chapitre nous avons tenté d'arrimer des protéines sans étape intermédiaire chimique sur substrat diamant en utilisant la technique de fonctionnalisation des amines.

Dans ce contexte, nous nous sommes attachés à la fonctionnalisation du diamant par des anticorps. En fait, l'immobilisation de telles protéines est un enjeu majeur dans le cadre de l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire ou encore la différenciation des cellules souches [41]. De tels dispositifs ciblant l'analyse de cellules vivantes adhérentes ont déjà été réalisés [42], en revanche l'étude de cellules non adhérentes ou de neurones présents dans des milieux complexes nécessite l'utilisation de protéines telles que les immunoglobulines (Ig) ou les intégrines. La réalisation de biopuces permet alors le tri,

l'identification et le comptage cellulaire [41]. L'utilisation de notre technique de greffage implique la présence d'une amine aliphatique située sur l'enveloppe externe de la protéine. Comme nous l'avons vu précédemment, les amines proviennent la plupart du temps de la lysine que l'on retrouve en surface de la quasi-totalité des protéines. C'est donc au travers de la lysine que nous tenterons de mettre en œuvre le greffage des anticorps. Nous nous intéresserons dans un premier à temps à l'anticorps anti-CD90 ou anti-Thy1. Il reconnaît et se lie spécifiquement au CD90 ou Thy1. Cette protéine est une glycoprotéine de la famille des immunoglobulines liée à la membrane plasmique de certaines cellules. Dans un deuxième temps nous tenterons d'immobiliser la molécule d'anticorps la plus abondante dans le corps humain, l'Immunoglobuline G (IgG).

Nous allons tout d'abord détailler succinctement la structure générale des anticorps qui est représentée sur la Figure IV- 18. On peut décomposer les anticorps en deux domaines distincts, un domaine constant et un domaine variable (Figure IV- 18.b). Le domaine constant est constitué des fragments notés CH et CL, il est caractéristique de l'espèce et l'isotype. Il permet à l'Ig de se lier aux cellules possédant un récepteur dédié à la reconnaissance de ce fragment. Le fragment variable est composé de deux sites de reconnaissance antigénique identiques ou paratopes constitués eux même de fragments lourds VH et légers VL. Ces paratopes reconnaissent une zone spécifique de leur antigène dédié appelée épitope.

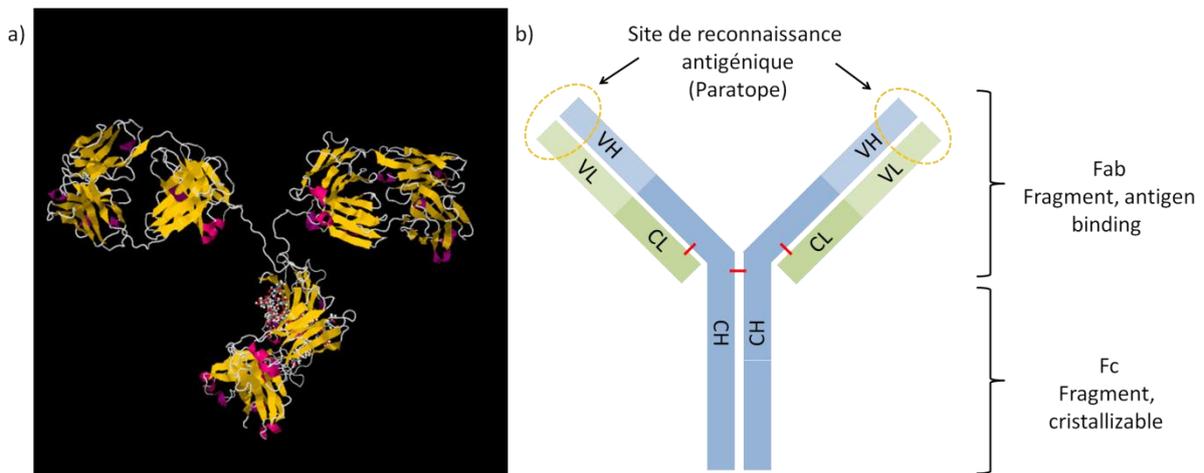


Figure IV- 18 : a) structure d'un anticorps, b) représentation schématique d'un anticorps mettant en évidence le paratope.

Il est possible de différencier les anticorps monoclonaux et polyclonaux. Les premiers ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné alors que les polyclonaux sont un mélange d'anticorps qui reconnaîtront différents épitopes sur un même antigène.

Les processus de couplage spécifique dans lesquels sont impliqués les immunoglobulines sont dépendants de la conformation de ces protéines. Une dénaturation de ces dernières empêchera toute reconnaissance. Nous allons donc voir s'il est possible de greffer des anticorps de manière spontanée sur substrat diamant en utilisant la technique de greffage des amines. Puis nous essaierons également d'évaluer si l'immobilisation affecte leur activité de reconnaissance.

### III.H.1. Thy1

Chez l'homme, le CD90 est exprimé, entre autre, sur les fibroblastes, les neurones ou encore les cellules sanguines souches. Il est impliqué dans l'activation des lymphocytes T, les phénomènes d'adhésion cellulaire, la croissance tumorale et neuronale. Dans notre cas nous avons utilisé l'anticorps anti-CD90 (ou Thy1) issu de la souris. Nous avons préparé cinq solutions de Phosphate de sodium 0,2 M à différents pH, contenant 25% de glycérol en volume. Nous avons ensuite introduit l'anticorps anti-CD90 à une concentration de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> dans chaque solution. Le dépôt a été effectué par drop-casting et les solutions ont été laissées en contact une heure avec l'échantillon diamant nanocristallin intrinsèque hydrogéné.

La Figure IV- 19.a représente schématiquement la matrice associée au dépôt, les plots noirs symbolisent les solutions déposées qui contiennent le Thy1 et les plots rouges la solution de greffage ne contenant pas ce dernier (faux négatif). Après greffage, l'échantillon a été rincé au PBS puis nous avons procédé à la révélation par microscopie de fluorescence. Pour cela, l'échantillon a été immergé dans une solution de BSA 10 mg.mL<sup>-1</sup> pendant 20 min, puis rincé au PBS. Nous avons ensuite mis l'échantillon en contact pendant 20 min avec une solution d'anticorps monoclonal anti-souris biotinylé. Après avoir rincé l'échantillon au PBS, nous l'avons placé en contact avec une solution de SAPE 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> pendant 15 min, puis après rinçage nous avons procédé à la révélation par microscopie de fluorescence. La Figure IV- 19.c est une image de la matrice observée en microscopie de fluorescence et la Figure IV- 19.b l'évolution du profil 1D de l'intensité de fluorescence en fonction du pH des solutions de dépôts.

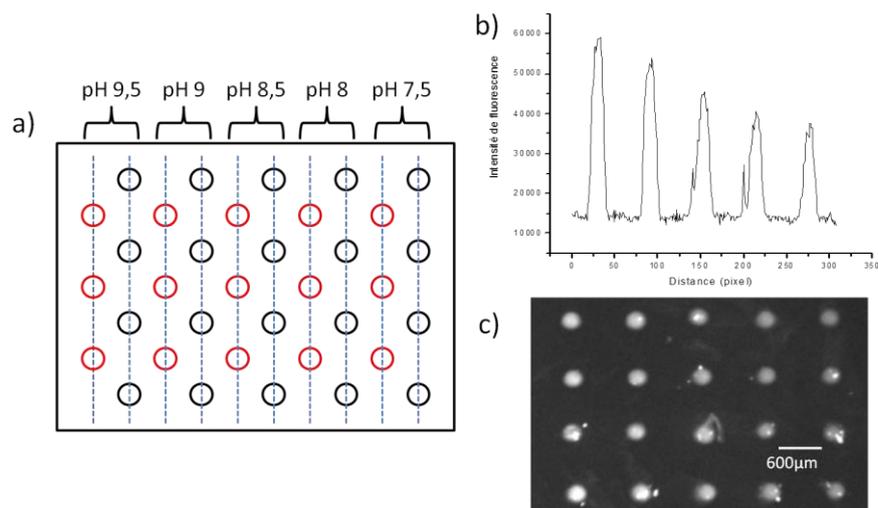


Figure IV- 19 : a) Schéma de la matrice de dépôt du CD90, le pH des solutions de greffage est de 7,5/8/8,5/9/9,5. b) Profil 1D de l'intensité illustrant l'effet du pH, c) image de fluorescence de la matrice présentée en a).

Afin d'interpréter correctement la Figure IV- 19.c, il faut garder à l'esprit qu'un grand nombre de lysines sont accessibles sur la périphérie de l'anticorps et réparties en différentes positions sur les fragments constant et variables. De fait, il est donc impossible avec notre méthode de choisir l'orientation de la protéine lors de son immobilisation. Toutefois, il faut relativiser cette limite sachant qu'il en est de même lors des étapes de couplage peptidiques classiques visant à modifier les immunoglobulines. Ces couplages sont statistiques et font ainsi intervenir les amines appartenant à ces mêmes lysines sans possibilité de sélectionner une zone de couplage précise (fragment constant ou paratopes). C'est en fait ce qui se passe lors de notre greffage, certains CD90 seront immobilisés par le fragment constant et d'autres par les paratopes. Dans notre cas ce sont les fragments variables (paratopes) de l'IgM anti souris qui reconnaissent les fragments constants de l'anticorps CD90, utilisés ici comme épitopes sondes. Notons ici que le cas contraire, c'est-à-dire l'utilisation des fragments variables de l'anti-CD90 comme sonde, n'aurait pas changé diamétralement les observations que nous allons faire ici.

Les contrastes de fluorescence sont présentés dans le Tableau IV- 2. On peut tout d'abord noter l'absence totale de fluorescence émanant des plots exposés aux différentes solutions de greffage ne contenant pas d'anti-CD90. Les valeurs élevées du contraste de fluorescence dénote la très bonne spécificité de la reconnaissance entre le fragment constant de l'anti-CD90 immobilisé et l'IgM anti souris. On peut également constater la faible valeur de l'écart type du contraste de fluorescence sur une ligne de plots élaborés dans les mêmes

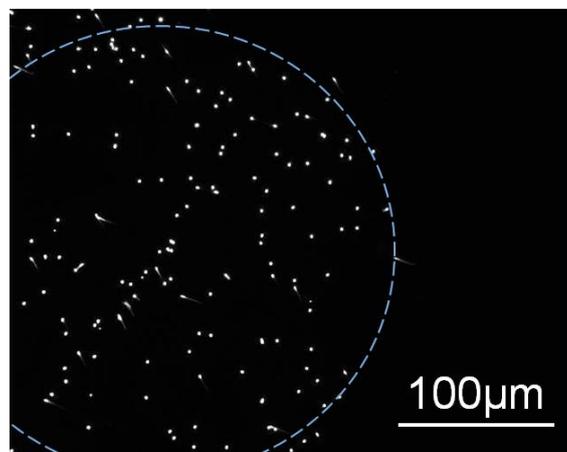
conditions (Tableau IV- 2) mettant en évidence la reproductibilité de la technique. On remarque aussi que l'évolution du contraste est similaire à celle observée lors du greffage de la biotine (cf. partie III.C.4.c) avec des valeurs de contraste maximales pour les pH 9 et 9,5. Ce qui implique que mêmes pour ces valeurs de pH élevées, les protéines n'ont pas été dénaturées et conservent leurs propriétés de reconnaissance. Toutefois, il n'est pas possible de tirer de conclusion générale pour les protéines, chaque type n'affichant pas la même sensibilité vis-à-vis des variations de pH. Toutefois, le paramètre pH peut être efficacement pondéré par le temps durant lequel la protéine est en contact avec la solution (ainsi, plus ce temps sera court, moins il y aura de chance pour que la protéine soit dénaturée). Parallèlement, nous avons vu qu'il existe une corrélation temps-pH et plus le pH sera élevé, plus le greffage sera rapide. Enfin, notons que la large gamme de pH exploitable pour le greffage qui rend notre méthode d'immobilisation assez générique. Ainsi, il est important de rappeler que même pour des valeurs de pH proche du pH physiologique, le greffage est efficace. Cela signifie qu'il sera également possible d'immobiliser des protéines sensibles qui nécessitent l'utilisation de solutions dont le pH est proche de la neutralité.

pH	7,5	8	8,5	9	9,5
Contraste	10±0,2	11±0,2	20±0,2	25±0,3	24±0,2

Tableau IV- 2 : Evolution du contraste de fluorescence en fonction du pH utilisé pour le greffage du CD90.

A la suite de ces travaux préliminaires, de nouveaux échantillons ont été préparés pour effectuer des tests de capture cellulaire visant des cellules non adhérentes. Dans ce contexte, j'ai préparé des échantillons de diamant présentant des plots anti-CD90, les expériences de capture cellulaire ayant été réalisées par Amel Bendali, doctorante à l'institut de la vision (Inserm) dans l'équipe de Serge Picaud à Paris. Les cellules ciblées lors de cette étude sont les cellules ganglionnaires rétiniennes du rat qui exprime la protéine CD90. Les cellules ont été marquées au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) qui est un marqueur fluorescent nucléaire se liant à l'ADN afin de caractériser la capture cellulaire par microscopie de fluorescence. Ces expériences ont été menées sur la base de la technique d'immunopanning [43, 44], technique effectuée sur un milieu cellulaire complexe provenant directement de la rétine du rat. Cette dernière a initialement été développée pour effectuer du tri cellulaire ; elle permet à partir d'un organe ou une biopsie, d'isoler un type cellulaire particulier dans un milieu complexe. La Figure IV- 20 est une image de microscopie de fluorescence réalisée après purification et

capture des cellules ganglionnaire. On remarque une zone circulaire contenant une forte densité cellulaire mise en évidence par le grand nombre taches fluorescente. Le périmètre circulaire décrit par les cellules est identique en taille et en position à celle des plots d'anti-CD90 déposés par drop-casting. Notons la faible densité de cellules capturées aspécifiquement à l'extérieur de ce plot et démontrant la sélectivité de la capture. Ce résultat démontre encore une fois la possibilité d'immobiliser des anticorps pour la capture d'antigène sans dénaturation de la protéine. Au delà de cette conclusion purement analytique, cette capture sélective, bien que non optimisée, pourrait être utilisée pour le design de réseaux artificiels de neurones.



*Figure IV- 20 : Image de fluorescence, centrée sur un plot d'anti-CD90, réalisée après l'expérience d'immunopanning.*

La technique de greffage des amines primaires aliphatiques sur diamant hydrogéné nous a permis d'immobiliser de manière directe un anticorps non modifié. Au travers des caractérisations par microscopie de fluorescence, nous avons pu mettre en évidence que l'anticorps n'est pas dénaturé et conserve ses propriétés de reconnaissance. Nous avons également pu montrer qu'il est possible de greffer le Thy1 à des pH proches du pH physiologique (plus généralement, ce constat peut être étendu à la majeure partie des protéines). Nous avons également pu montrer l'intérêt de cette immobilisation pour la capture des cellules neuronales suite à l'immobilisation de l'anti-CD90. Toutefois, il demeure important de tenter une immobilisation parallélisée de plusieurs anticorps afin de démontrer la possibilité de multiplexer l'information biologique sur un même support diamant pour le design de biopuces à protéines.

### III.H.2. Immunoglobuline G

Maintenant que nous avons vu que la technique de greffage des amines nous a permis d'immobiliser de manière directe du Thy1, nous allons tenter d'étendre le procédé aux immunoglobulines, et de fait à la majeure partie des protéines, au travers de la conception d'une biopuce à protéines.

Les immunoglobulines sont des protéines d'adhérence que l'on trouve dans les fluides corporels et qui ont une activité anticorps. Elles sont largement répandues dans le domaine de l'analyse pour la détection et/ou la quantification de diverses substances (cellules, bactéries, protéines...) dans des milieux physiologiques complexes avec une grande spécificité [25]. Afin de généraliser notre méthodologie de greffage aux protéines au sens large et de démontrer la possibilité de créer une biopuce à protéine, nous avons immobilisé des Ig de différentes espèces (lapin, humain, souris) et la biotine-(peg)<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> (utilisée ici comme contrôle positif) en utilisant la technique de fonctionnalisation des amines sur diamant hydrogéné. Les Ig ont été introduites à une concentration de 0,1mg.mL<sup>-1</sup> dans une solution de phosphate de sodium dibasique 0,2M contenant 25% en volume de glycérol et ajustée à un pH de 8,5. Le greffage a été mené par la mise en contact des différentes solutions d'Ig par drop-casting selon le plan de dépôt présenté sur la Figure IV- 21. Les solutions ont été laissées en contact avec le substrat pendant 30 min. Notons que pour cette biopuce, nous avons utilisé le fragment constant des immunoglobulines comme sonde, la Figure IV- 21 n'est alors que schématique et d'autres orientations sont bien sur disponibles sur le diamant.

Après greffage l'échantillon a été rincé abondamment au PBS avant d'être immergé dans une solution de BSA 10 mg.mL<sup>-1</sup> pendant 20 min, de manière à saturer la surface et à éviter toute adsorption non spécifique lors des étapes postérieures. L'échantillon a ensuite été mis en contact avec une solution d'IgG biotinylé anti-lapin à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> pendant 20 min. L'IgG anti-lapin devrait reconnaître spécifiquement le fragment constant de l'IgG lapin. Enfin, afin de révéler cette reconnaissance spécifique théorique, on procède au couplage de la biotine et de l'IgG anti-lapin avec le fragment streptavidine du conjugué fluorescent SAPE en recouvrant l'échantillon avec une solution de fluorophore à 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> durant 15 min. Notons que l'échantillon est rincé abondamment au PBS entre chaque étape et en fin de protocole. La représentation schématique de ce protocole de révélation est illustrée sur la Figure IV- 21.

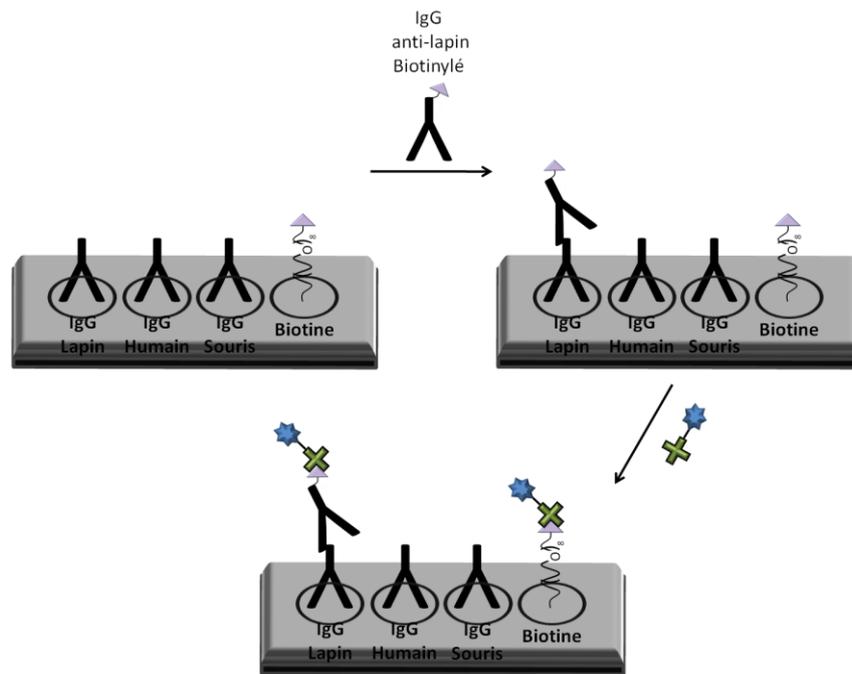


Figure IV- 21 : Schéma du plan de dépôt des IgG et de la biotine, associé au schéma de principe de la révélation par microscopie de fluorescence du greffage.

Suite à l'action de l'IgG de lapin, nous avons ensuite procédé à la révélation par microscopie de fluorescence. Cette image est présentée sur la Figure IV- 22.

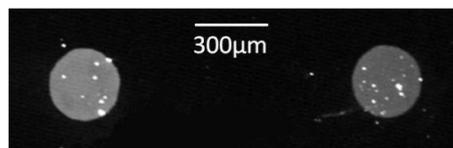


Figure IV- 22 : Image de fluorescence illustrant le greffage de l'IgG de lapin.

On peut voir sur la Figure IV- 22 que seuls deux puits sont fluorescents : il s'agit des puits élaborés à partir d'IgG de lapin et de biotine. L'absence totale de fluorescence sur les puits d'IgG humain et souris met en évidence la bonne spécificité de la reconnaissance entre IgG lapin et anti-lapin. Ce résultat très encourageant confirme que la structure de la protéine demeure intacte.

Cette étude a permis de montrer qu'il est possible d'immobiliser en une seule étape, de manière spontanée et dans des conditions proches de celles des milieux physiologiques des protéines. De plus les protéines immobilisées ne sont pas dénaturées et conservent leur activité biologique après immobilisation. Bien que l'étude ait été axée sur la réalisation de

biopuces, ce procédé de greffage peut être étendu à tous les dispositifs existants sur diamant tels que les FETs et les microleviers. Nous avons également montré que la réalisation de biopuces a rendu possible la capture d'un type de cellule contenu dans un milieu complexe. La simplicité et la rapidité de l'immobilisation constituent un réel avantage pour les applications en diagnostic médical.

### III.I. Structuration du greffage

Les coûts de fabrication des couches diamant par CVD est relativement faible, ce qui en fait un matériau particulièrement compétitif et attractif. Mais pour le domaine de l'industrie, la structuration et la densification des dépôts pour la conception de dispositifs miniaturisés s'avèrent nécessaire. Pour les applications en diagnostic ou comme capteur, l'économie sur la taille des substrats, le temps de greffage, le coût de la technique, ainsi que le contrôle des dépôts est nécessaire. Il existe un large panel de technique permettant de réaliser des dépôts structurés à des tailles micrométriques et nanométriques [45]. On trouve entre autre : le dépôt à l'aide d'aiguille [46], le  $\mu$ contact printing [45]; l'impression par jet d'encre [47], la photolithographie [48], l'electrospray [49], les microleviers [50], le nanofountain pen [51] ou encore le dip-pen nanolithography [52]. La comparaison entre ces différentes techniques est présentée dans le tableau ci-dessous.

Technique	Aiguille	Jet d'encre	Microleviers	Photolithograpu
Type	Contact	Non-contact	Contact	Non-contact
Surface de dépôt	> 10cm <sup>2</sup>	> 10cm <sup>2</sup>	> 1cm <sup>2</sup>	> 1cm <sup>2</sup>
Vitesse de dépôt	Lent	Très rapide	Lent	Très rapide
résolution	100 $\mu$ m	> 20 $\mu$ m	10 $\mu$ m	10 $\mu$ m
Technique	Electrospray	$\mu$ CP	Nanofontaine	Dip-pen
Type	Non-contact	Contact	Contact	Contact
Surface de dépôt	> 1cm <sup>2</sup>	> 1cm <sup>2</sup>	$\approx$ mm <sup>2</sup>	$\approx$ mm <sup>2</sup>
Vitesse de dépôt	rapide	Très rapide	Très lent	Très lent
résolution	5 $\mu$ m	< 100 nm	100 nm	15 nm

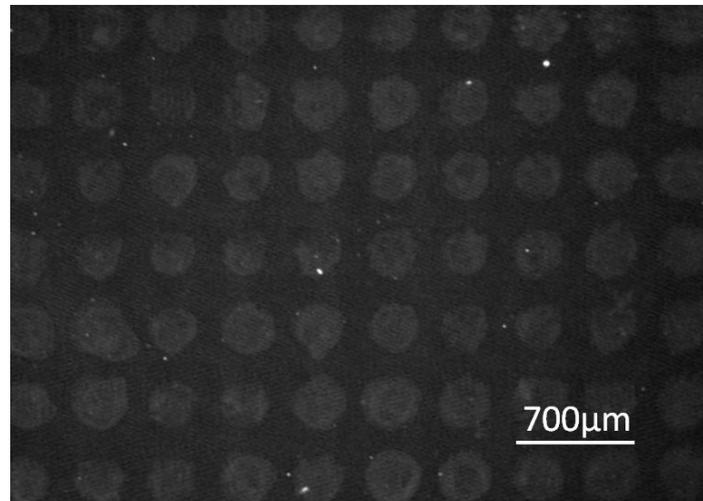
Tableau IV- 3 : Comparaison de la vitesse de la vitesse, de la surface et de la résolution des dépôts pour différents techniques.

Nous avons vu que le temps de greffage associé à notre méthode d'immobilisation est très rapide. De plus, travailler en solution aqueuse, sans apport d'énergie extérieure constitue un avantage supplémentaire. Cette technique, du fait du panel de groupements fonctionnels greffables, donne également accès à un grand choix de molécule commerciale. Nous allons voir dans ce chapitre les potentialités qu'offre cette technique en termes de méthodologie de dépôt ou encore de résolution. Ainsi différentes techniques permettant soit une fonctionnalisation rapide et collective du support comme le microcontact printing, soit le dépôt parallélisé de microplots tels que les réseaux de leviers (bioplumes) ou encore une résolution extrême comme le DPN ont été mise à profit afin de repousser les limites de la nouvelle méthodologie de greffage présentée dans ce manuscrit.

### III.I.1. Micro-contact printing

Le micro-contact printing ( $\mu$ CP) est une technique mise au point par Whitesides dans les années 90 pour la fonctionnalisation de surfaces métalliques par les alkane-thiols. Cette méthode permet, à l'aide d'un tampon structuré et par simple contact, de pouvoir immobiliser de manière locale et rapide une molécule d'intérêt sur un substrat. En outre ce procédé, très peu coûteux, permet en une seule étape de décorer un substrat avec des motifs de taille micro à nanométriques et ce de manière collective (toutes les zones modifiées le sont avec la même molécule). Cette méthode a suscité un énorme engouement dans le domaine des biotechnologies [53] mais aussi dans le domaine de l'électronique et des semi-conducteurs [54] du fait de ses capacités à immobiliser de façon extrêmement rapide une monocouche organisée de molécule d'intérêt. Le tampon utilisé est en règle générale fabriqué avec un élastomère comme le polydiméthylsiloxane (PDMS) mais peut aussi être conçu en Polyméthylméthacrylate (PMMA) pour plus de durabilité, ces polymères étant peu coûteux et très faciles à structurer. Le tampon est généralement mis en forme par simple coulage dans un moule en silicium sur lequel est gravé le motif à répliquer, mais pour des résolutions plus fines, les techniques de lithographies optiques usuelles ou encore les techniques de lithographies électroniques, permettant d'atteindre des tailles de dépôt inférieures à 5 nm [55], peuvent être utilisées. Pour effectuer le transfert, la surface du tampon est imbibée de la solution à déposer puis, après un léger séchage permettant de conserver une bonne résolution du dépôt, placé en contact avec le substrat. Dans notre cas les tampons ont été confectionnés par Sébastien Dumenil, technicien au CREAB. Le motif du tampon choisi est une matrice de

plots de 250 $\mu\text{m}$  de diamètre espacés de 500 $\mu\text{m}$ . L'éthanol constitue un solvant de choix pour les dépôts par  $\mu\text{CP}$  car il diffuse dans le polymère et est ainsi relargué lentement lors du contact entre le tampon et une surface. Pour les dépôts de très petites tailles, inférieure à 500nm, il est même obligatoire d'utiliser des solvants avec des poids moléculaire élevés (isopropanol) pour limiter la diffusion. Il est également possible d'utiliser un solvant aqueux lorsque la résolution des motifs n'est pas inférieure à 500nm. Dans le cas présent, notre méthode de greffage exclue l'utilisation d'un alcool comme solvant. Nous avons donc utilisé la solution de greffage habituelle (solution aqueuse de phosphate de sodium dibasique 0,2M ajustée à pH 10). Afin de valider la possibilité de structurer des surfaces diamantées par microcontact printing, nous avons procédé au greffage d'un brin d'ADN dissout à une concentration de 10  $\mu\text{M}$  dans la solution précédemment citée. La révélation du motif ainsi transféré a été menée par hybridation avec un brin complémentaire biotynilé et révélation par microscopie de fluorescence en utilisant la SAPE. L'ODN immobilisé est le Zip9, sa séquence ainsi que le protocole de révélation ont été décrits en détail dans la partie III.F.1 de ce chapitre. La Figure IV- 23 montre l'image de microscopie de fluorescence du brin d'ADN immobilisé par  $\mu\text{CP}$  sur un substrat diamant polycristallin hydrogéné.



*Figure IV- 23 : Image de fluorescence d'une matrice de plot d'ODN greffés par microcontact printing.*

Il faut noter que la rugosité de surface du substrat est un facteur essentiel influant sur l'homogénéité des dépôts. En effet la technique de micro-contact printing consiste à poser le tampon imbibé de la solution de greffage sur le substrat pendant quelques secondes, voir quelques minutes. Si l'échantillon est trop rugueux, le contact du tampon sur ce dernier ne se fera pas de façon homogène comme cela s'est produit dans notre cas (la rugosité des

échantillons microcristallins utilisés est de l'ordre de 200 nm RMS). Cette valeur est relativement élevée pour les dépôts par  $\mu$ CP et nous avons donc du exercer une légère pression sur le tampon pour permettre à toute les zones protubérantes d'être en contact avec le substrat. Cette contrainte appliquée sur le tampon implique un élargissement, ainsi qu'une inhomogénéité de certains plots. On peut remarquer sur la Figure IV- 23 une disparité de la taille des plots et une déformation de certains d'entre eux. Néanmoins les plots sont bien discernables et le contraste moyens est de  $5\pm 2$ . L'hétérogénéité des plots explique valeur de l'écart moyen du contraste soit élevée.

Le but de ce dépôt par micro-contact printing n'était pas de chercher à optimiser les conditions expérimentales mais simplement de montrer que la méthode de greffage des amines permettait d'utiliser la technique de  $\mu$ CP. La mise en œuvre d'échantillons nanocristallins, présentant des rugosités très en deçà de l'ordre de 20-40 nm RMS, assurerait probablement de meilleures homogénéités et résolutions des dépôts. La formulation d'un mélange de solvants plus visqueux devrait également permettre d'améliorer la régularité du dépôt.

### III.I.2. Bioplumes

Nous allons dans cette partie traiter de l'immobilisation d'ADN et de protéines en une seule étape par une méthode de dépôt par contact voisin de la technique du drop-casting utilisée précédemment. L'outil de dépôt est une série de dix micro-leviers, alignés parallèlement à l'image d'un peigne (Figure IV- 24.b), et manipulés par un système de moteurs trois axes. Cet appareil a été mis au point par l'équipe de Christian Bergaud au Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS) de Toulouse [50] pour la fabrication de biopuces. Ces peignes sont constitués d'un réseau de douze microleviers en silicium, chacun des leviers mesure 2 mm de long, 210  $\mu$ m de large et 5  $\mu$ m d'épaisseur et est séparé de ses voisins d'une distance de 450  $\mu$ m. Il possède un canal intérieur ouvert servant de réservoir, que l'on remplit par capillarité, et qui se termine en bout de plume dans une zone où la taille de ces dernière est affinée jusqu'à une largeur de 6  $\mu$ m. Une fois le peigne aligné parallèlement à la surface, les microleviers sont portés au contact de cette dernière pendant un temps déterminé (ajustement en altitude par un moteur piézoélectrique monté en série sur le moteur pas à pas de micropositionnement). Lors du retrait du peigne de la surface, une ligne de douze gouttes d'un volume variant entre le femto et le picolitre est déposée sur le substrat (la taille de la goutte étant fixée par le temps de contact, l'angle de contact et les énergies de

surface du levier et du support à modifier). Par la suite les microleviers ont été modifiés pour pouvoir effectuer des dépôts par electrosporting, le canal a été recouvert d'or pour être utilisé comme contre électrode (Figure IV- 24.a). Ces microleviers ont été utilisés pour la mise au point de biopuces à ADN [56]. Dans le cadre de ma thèse l'utilisation des peignes a été dédiée à la miniaturisation des dépôts d'ODN et d'anticorps.

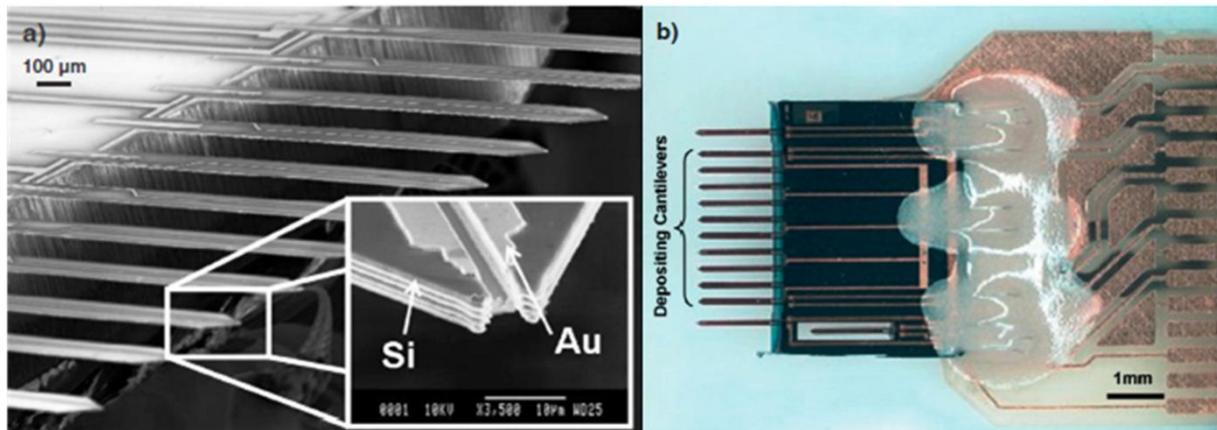


Figure IV- 24 :a) Image MEB du système de microleviers, b) Image optique du réseau de microleviers.[56]

### III.1.2.a Greffage de l'ADN

Les procédés expérimentaux, ainsi que les paramètres de greffage sur lesquels sont basés la mise au point de la biopuce à ADN à l'aide des microleviers, sont identiques à ceux détaillés dans la partie III.F.1. Nous avons donc procédé à l'immobilisation du Zip9 aminé et à la révélation par microscopie de fluorescence dans les mêmes conditions que celles de la partie III.F.1. Le temps de contact entre la solution de greffage et le substrat était dans ce cas de 10 min. Notons par ailleurs que le dépôt d'un réseau de plots de 6 par 6 comme ceux représentés Figure IV- 25 (multiplié par 12 plumes...) prend moins d'une minute.

La Figure IV- 25 présente les images obtenues lors de la révélation du greffage par microscopie de fluorescence à différents grossissements (x4, x10, x20, x40). On remarque sur les Figure IV- 25.a et b. la présence de comètes émanant des plots d'ADN. Nous les avons observées à plusieurs reprises lors de différentes expériences de fonctionnalisation. Elles se

forment lors de l'étape de rinçage de l'échantillon et témoignent de la rapidité du processus de greffage.

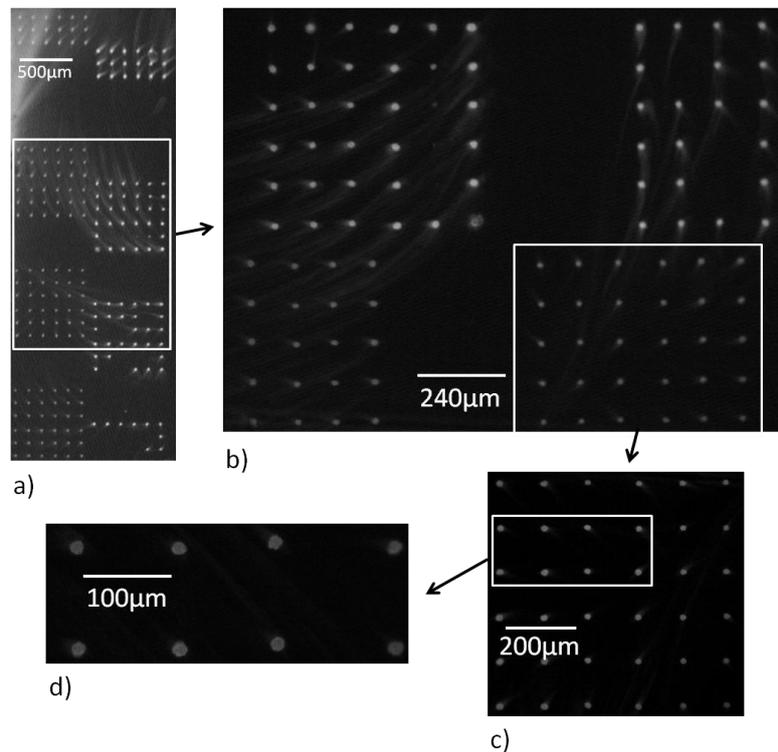


Figure IV- 25 : Images de fluorescence d'une matrice de plot d'ADN déposée avec le système de microleviers à différents grossissements.

La taille des plots est ici de l'ordre de la dizaine de micromètres ; elle varie en fonction de la viscosité de la solution mais également en fonction de l'état de surface du matériau. Nous n'avons pas dans cette étude cherché à réaliser une biopuce à ADN en immobilisant différents brins d'ADN en parallèle, la preuve de concept a été établie dans la partie III.F.1. Cette expérience montre que l'on peut utiliser la technologie des microleviers pour réaliser une biopuce à ADN, pouvant contenir jusqu'à 10 000 plots/cm<sup>2</sup> (les dépôts pouvant être encore densifiés comme le montre la Figure IV- 25.d). La limite de cette méthodologie tient essentiellement à la recharge des plumes et à leur nettoyage entre chaque dépôts.

Nous avons vu qu'il était possible de densifier le greffage d'ADN et rendre possible la miniaturisation des biopuces ADN. Nous allons maintenant tenter de voir s'il est possible d'en faire de même avec les protéines.

### III.1.2.b Immobilisation de l'anticorps CD90

Au vu des résultats obtenus lors du greffage du Thy1 dans la partie III.H.1, nous avons donc tenté de fonctionnaliser le diamant avec ce même anticorps en utilisant les microleviers. Nous avons suivi le même mode opératoire et les mêmes paramètres expérimentaux que ceux détaillés dans la partie III.H.1.

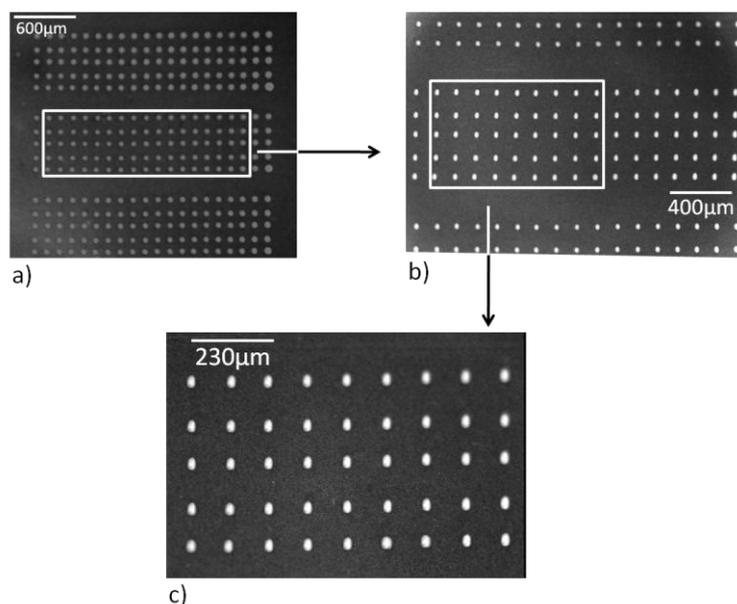


Figure IV- 26 : Images de fluorescence d'une matrice de plot de l'anti-CD90 déposée avec le système de microleviers

Le protocole de révélation est également le même que celui détaillé dans la partie III.H.1. La taille, ainsi que l'homogénéité des dépôts est similaire à celle observée lors du greffage de l'ADN. Bien que le contraste moyen soit de l'ordre de 10, on remarque que le taux de fluorescence des zones non greffées est relativement élevé. Cela est dû à un mauvais blocage de la surface par la BSA. La taille des plots est de l'ordre de la dizaine de microns, ce qui correspond à la taille d'une cellule. Au vu des expériences préliminaires de capture de cellule que nous avons abordées dans la partie III.H.1, on peut imaginer pouvoir capturer des cellules uniques, puis y coupler de la détection de sécrétion en temps réel [41].

Nous avons montré dans cette partie qu'il est possible avec la méthode de fonctionnalisation des amines primaires sur diamant hydrogéné de densifier et structurer les dépôts à l'échelle micrométriques. Qui plus est, l'utilisation d'un solvant aqueux dont on peut augmenter la viscosité permet d'utiliser tout les types d'outils de densification de dépôt à

notre disposition. Nous allons donc dans la partie suivante voir s'il est possible d'utiliser la méthode permettant d'obtenir les dépôts les mieux résolus, le Dip-Pen Lithography.

### III.I.3. Dip pen lithography

Le dip pen lithography a initialement été développé par H.J. Butt de l'Université de Mayence. La technique a été reprise et améliorée par Mirkin [52], [57], de l'Université de Northwestern puis rapidement employée par de nombreux groupes. Cette technique permet de déposer de manière localisée à l'échelle nanométrique tous types d'objets organiques ou inorganiques. Mirkin et al. ont déposé des silanes sur silicium [58] et de l'ADN sur silicium et or [59]. Liu et al. ont déposés des nanoparticule d'or sur des substrats modifiés par des alcanethiols [60] et Pena et al. de la biotine sur silicium [61]. Mirkin et al. [62] ont utilisé des pointes conductrices afin d'effectuer des désorptions de thiols localisées. Il est même possible de déposer des peptides ou protéines [63], [64]. Une des limites du DPN est la vitesse d'écriture, qui rend impossible toute application industrielle de cette technique. Mais en 2006 l'équipe de Mirkin a réussi à mettre au point un dispositif de 55 000 pointes en parallèles, permettant d'augmenter considérablement la vitesse des dépôts. La technique du DPN consiste au trempage (dipping) d'une pointe AFM dans un réservoir contenant la solution à déposer. Lors du retrait de la pointe de cette dernière, une couche de molécule (encre) reste adsorbée sur la pointe alors que le solvant s'évapore. On procède ensuite au déplacement de la pointe sur le substrat en mode contact selon le motif prédéfini (Figure IV-27). Lors de toutes caractérisations AFM sous atmosphère ambiante, il se forme un ménisque entre la pointe et le substrat lorsqu'ils rentrent en contact l'un de l'autre. Ce ménisque provient de la condensation de la couche d'eau adsorbée sur les surfaces. Les espèces à déposer adsorbées sur la pointe peuvent alors diffuser vers le substrat à travers ce ménisque. La taille du ménisque dépendra majoritairement du rayon de courbure de la pointe, de l'état de surface du substrat et de la pointe mais également du degré d'hygrométrie. Les processus de transport des molécules déposées sur la pointe lors du dipping dépendent de la composition chimique, de la mobilité et de la distribution de l'encre sur la pointe, des états de surface de la pointe et du substrat et enfin de la température.

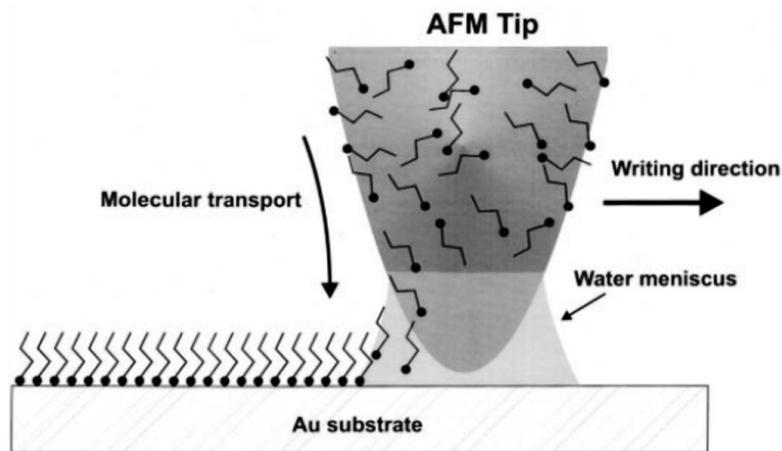


Figure IV- 27 : Schéma de principe des dépôts par Dip-Pen Lithography.

J'ai réalisé cette étude au Nanotechnology and Integrated BioEngineering Centre (NIBEC) à l'université d'Ulster à Belfast dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Patrick Lemoine. Afin de prendre en main cette nouvelle méthodologie de dépôt, j'ai, dans un premier temps, déposé un polymère sur silicium, puis dans un second temps, j'ai tenté d'immobiliser de l'ADN avec notre technique de greffage des amines.

### III.1.3.a Dépôt de PMMA sur silicium

Nous avons effectué des dépôts de Polyméthacrylate de méthyle (PMMA) sur silicium. Ce polymère peut être utilisé pour le seeding de nanoparticules de diamant. Comme nous l'avons vu au dans le chapitre I, la croissance de diamant nanocristallin nécessite préalablement un dépôt de nanoparticules (seeding) sur le substrat. Il existe différentes voies pour déposer les nanoparticules. On trouve la sonication, le spray-coating, le spin-coating ou encore le dip-coating. Cette dernière méthode consiste à enduire le substrat avec une substance qui permettra l'immobilisation ultérieure des nanoparticules. Le Silicium est chargé négativement, le PMMA est un polymère polycationique qui se fixe donc sur le silicium par des interactions électrostatiques. Les nanoparticules de diamants sont également négativement chargées, elles sont donc immobilisées sur le polymère par interaction électrostatique alors qu'elles sont repoussées par la surface de silicium non modifié. En structurant les dépôts de PMMA sur silicium, il serait donc possible de procéder à des croissances de diamant

localisées voir d'obtenir des objets de type nanofils. C'est pour cette raison que nous avons choisi de déposer le PMMA sur silicium.

Il faut rappeler qu'avant de procéder à l'écriture des motifs, il faut au préalable charger la pointe en substance à déposer. Bien que cette étape puisse paraître triviale, elle est cruciale et s'avère être dans la pratique très compliquée à maîtriser. En effet lors du remplissage, il est impératif que la pointe ne trempe pas intégralement dans la solution. Cela induit un dépôt de molécule sur sa partie supérieure dédiée à la réflexion du faisceau laser du système électronique de rétroaction. La présence de molécules sur cette partie implique une diffusion du faisceau laser par les molécules déposées et rend la pointe inutilisable. Lors de l'approche de la pointe vers un substrat il apparaît une force d'attraction qui va l'attirer et la mettre en contact avec le substrat. La Figure IV- 28 présente des courbes d'approche retrait, la Figure IV- 28.a est celle d'une pointe classique sur une surface de diamant hydrogénée, la Figure IV- 28.b est celle d'une pointe qui vient d'être chargée en PMMA sur une surface de silicium. Il y a 3 parties distinctes sur une courbe d'approche retrait. La phase A que l'on retrouve lors de l'approche et du retrait et qui illustre le fait qu'il n'y a aucune interaction entre la pointe et le substrat. La zone B correspond au moment où la pointe est en contact avec le substrat et le système piezo toujours en phase d'approche, c'est d'ailleurs dans cette zone que l'on calcule les caractéristiques de la pointe. On retrouve la même partie dans la zone de retrait, puis on rencontre une zone de déflexion négative (zone C) par rapport au potentiel du photodétecteur. Cet effet est dû aux forces d'adhésion entre la pointe et le substrat induites notamment par l'apparition du ménisque. La valeur de cette force est de  $0,3 \cdot 10^{-9}$  nN. De nombreux facteurs sont impliqués dans ces différents phénomènes et les modèles physiques théoriques les décrivant sont complexes. Dans le cas de l'approche d'une pointe chargée en PMMA sur une surface de silicium (Figure IV- 28.b), on remarque que la courbe comporte les mêmes parties à l'exception d'une nouvelle déflexion négative dans la partie de l'approche qui précède l'entrée en contact de la pointe avec le substrat. Cet effet dit de « jump to contact » est principalement dû aux forces de Van der Waals et dépend de l'état de surface de la pointe et du substrat, ainsi que du degré d'hygrométrie [65]. On s'aperçoit que cet effet est absent dans le cas du diamant, dans notre cas il est majoritairement dû aux forces électrostatiques. La pointe étant en silicium, les forces d'attractions électrostatiques entre le PMMA et cette dernière sont donc élevées. De la même manière, ces forces sont responsables de l'attraction entre le PMMA et la surface. On remarque également une autre différence majeure dans le phénomène de « jump off contact » (partie C). Dans le

cas classique de l'approche de la pointe non chargée la valeur d'adhésion était de  $0,3 \cdot 10^{-9}$  nN alors qu'elle est de  $1,1 \cdot 10^{-9}$  nN dans le cas de la pointe chargée et de son approche sur silicium. L'état de surface oxydé du silicium influe la taille du ménisque, or la force d'adhésion dépend de la taille de ce dernier. De plus les forces électrostatiques entre la pointe et la surface avec le PMMA augmentent également la force d'adhésion.

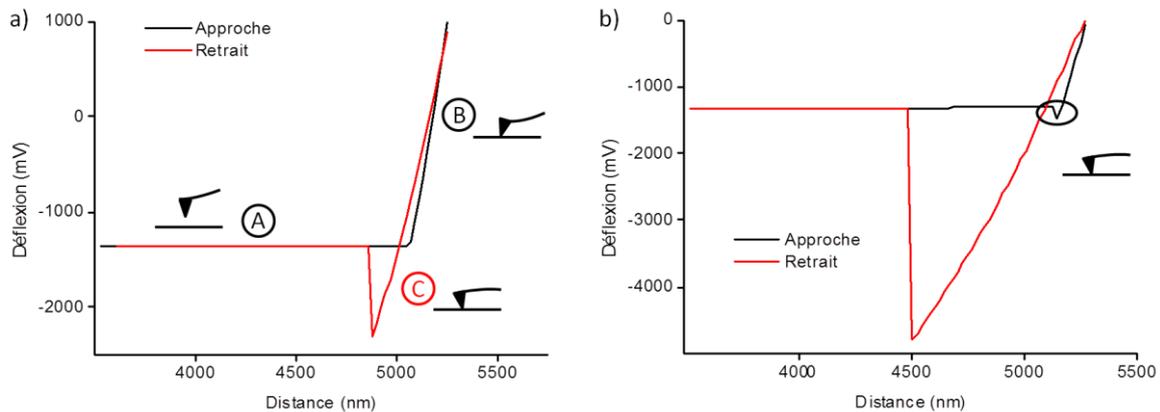
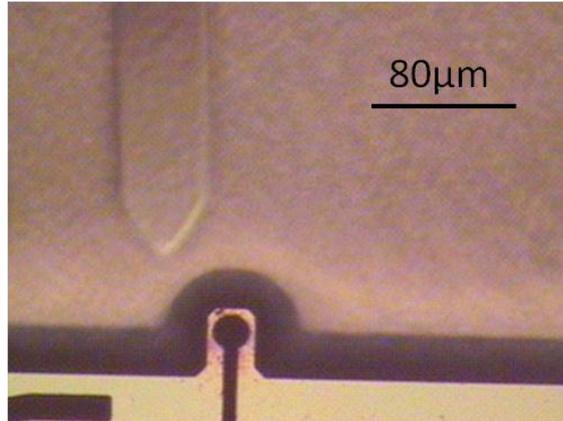


Figure IV- 28 : Courbes AFM d'approche-retrait réalisées avec, a) une pointe sèche sur un échantillon diamant hydrogéné, b) une pointe chargée en PMMA sur un échantillon silicium.

En se référant à la description des courbes d'approche retrait, on comprend aisément qu'il est impossible de « charger » la pointe en espèces à déposer (étape de « dipping ») en procédant par trempage direct dans des volumes de solution importants. Les forces d'attractions engendrées par la solution entraînent invariablement une immersion totale de la pointe. Nous utilisons donc un système de puits de chargement de taille limitée qui interdisent le trempage total de la pointe. Comme on peut le voir sur la photo présentée Figure IV- 29, la largeur du levier est de  $45 \mu\text{m}$ , alors que les puits ont un diamètre de  $20 \mu\text{m}$  pour une profondeur de  $80 \mu\text{m}$ . Cela évite ainsi tout recouvrement de la pointe par la solution à déposer. L'appareillage utilisé impose une approche et un trempage manuel et demande beaucoup de prudence. Cette étape demande parfois beaucoup de temps et représente une des limitations de cette technique.



*Figure IV- 29 : Image optique de l'approche d'une pointe vers un puit de chargement.*

Les paramètres qui influencent majoritairement le dépôt sont l'état de surface du substrat, le degré d'hygrométrie et le temps de contact entre la pointe et le substrat. Dans notre cas, les seuls paramètres étudiés sont le temps de contact pointe-substrat et la valeur de la force appliquée lors de l'écriture. Nous avons constaté expérimentalement que la force n'avait aucun effet sur les dépôts, si ce n'est de détériorer la pointe et de modifier son rayon de courbure. Nous avons donc procédé au dépôt de lignes de PMMA avec différentes vitesses d'écriture, ces lignes mesurent  $8\ \mu\text{m}$  de long et sont espacées de  $2\ \mu\text{m}$ . Il est bon de noter que dans ce cas, l'écriture s'effectue en mode AFM contact, alors que la caractérisation du dépôt est menée en LFM. De manière générale l'échantillon est préalablement cartographié relativement à des repères réalisés par FIB, ces marques permettent alors de changer de pointe et de retrouver aisément les zones de dépôt à l'aide de la caméra. Dans notre cas nous n'avons pas procédé au marquage des échantillons, ce qui nous a contraint à effectuer les caractérisations avec la même pointe immédiatement après le dépôt (risque de sur-écriture pouvant détériorer le dépôt lors de la caractérisation). Dans ce cas la vitesse de lecture a été fixée à  $4\ \mu\text{m/s}$ , de manière à ne pas redéposer d'espèces durant l'étape de caractérisation. Cette vitesse de lecture très rapide rend très difficile la détermination de la hauteur de la couche déposée. En effet, même si la fréquence de lecture est moins critique dans le mode contact que dans le mode tapping, l'ordre de grandeur utilisé ici diminue la résolution verticale de la mesure.

Nous avons effectué des dépôts de PMMA en ligne en faisant varier la vitesse de dépôt. La Figure IV- 30 présente l'image en LFM et le profil associé, de la caractérisation du dépôt. Les vitesses de dépôt sont décroissantes de droite vers la gauche de l'image et prennent des valeurs comprises entre  $0,5$  et  $0,05\ \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ .

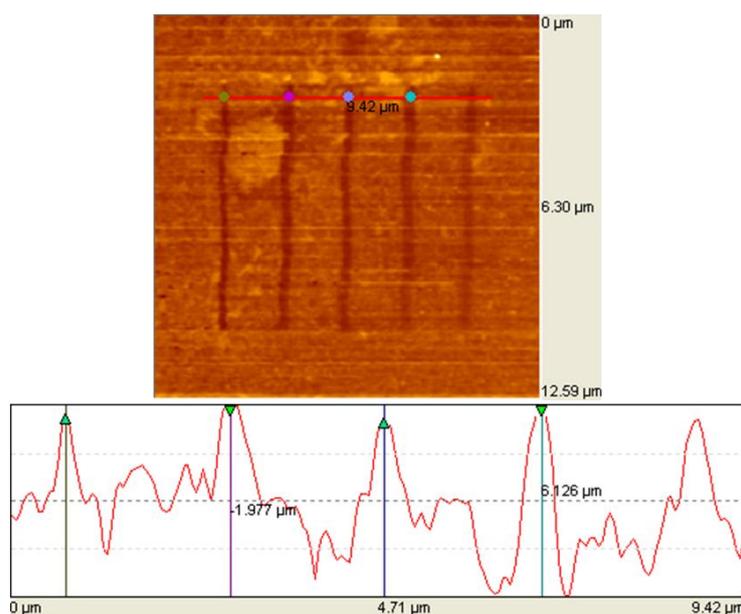


Figure IV- 30 : Image LFM et le profil associé d'un dépôt de PMMA réalisé sur silicium.

Dans le tableau ci-dessous sont répertoriées les largeurs des lignes de PMMA déposées en fonction de la vitesse de dépôt.

Vitesse d'écriture ( $\mu\text{m/s}$ )	0,05	0,075	0,1	0,25	0,5
Largeur des lignes (nm)	307	341	359	466	361
Ecart type (nm)	14	20	25	23	19

Tableau IV- 4 : Tableau représentant les largeurs des lignes de PMMA déposées sur silicium en fonction de la vitesse d'écriture.

L'évolution de la largeur des lignes observée est conforme à ce qui était attendu. Le paramètre déterminant la largeur des lignes est la taille du ménisque, ce dernier dépendant principalement du degré d'hygrométrie mais également du caractère hydrophyle/hydrophobe de la surface de l'échantillon. Cependant, pour que les espèces puissent se déposer il faut qu'elles diffusent de la pointe vers le substrat à travers le ménisque. En considérant que le coefficient de diffusion est constant pour chaque vitesse d'écriture, si le temps de contact entre la pointe et le substrat augmente, la quantité d'espèces déposées augmente également. Si on s'intéresse à la dernière ligne correspondant à la vitesse de dépôt de  $0,5 \mu\text{m/s}$ , on remarque que la largeur est inférieure à celle de la ligne écrite à  $0,25 \mu\text{m/s}$  et que le contraste est plus faible que les précédents. Il s'agit en fait d'une diminution de la quantité de PMMA présente

sur la pointe. Bien que la pointe soit considérée comme un réservoir infini, il est possible que pour les dépôts prolongés la quantité d'espèce vienne à manquer. Cela constitue une limitation supplémentaire pour les applications grande échelle. Il faut tout de même noter que la largeur des lignes est relativement élevée, ce qui signifie qu'une importante quantité de PMMA a été déposée et donc un épuisement rapide de la quantité de PMMA contenue sur la pointe.

Les principales limites la technique de Dip-Pen Nanolithography ont été mises en évidence dans cette partie mais nous avons tout de même montré qu'il est possible de structurer les dépôts de PMMA sur silicium. Une diminution du degré d'hygrométrie, associée à une vitesse d'écriture plus rapide permettrait de réduire la taille des dépôts. Au regard de ces test préliminaires, nous allons dans la partie suivante tenter de déposer des brins d'ODN sur diamant hydrogéné.

### *III.1.3.b Dépôt d'ADN sur diamant hydrogéné*

Comme nous l'avons vu dans la partie III.C.4.c, traitant des conditions de greffage, un pH légèrement basique est requis pour que la fonctionnalisation soit possible. L'ADN étant une molécule fortement hydrophile et chargée, il paraît envisageable qu'une certaine quantité d'ions  $\text{OH}^-$  puissent rester dissous dans la couche organique adsorbée après dipping. Nous avons utilisé une solution classique de phosphate de sodium dibasique 0,2 M contenant 25% de glycérol en volume et dans lequel le Zip9 aminé (conf. Partie III.F.1) a été introduit à 10  $\mu\text{M}$ . Des substrats diamants monocristallins (100) Element-Six (grade optique) ont été utilisés pour cette étude. A la différence du silicium, qui est parfaitement plan, ces échantillons affichent une rugosité RMS de  $1,2 \pm 0,6$  nm. Cela représente une réelle limitation pour les caractérisations, car la rugosité est du même ordre de grandeur que la taille des brins d'ODN courts non hybridés déposés sur substrat.

Comme dans le cas du PMMA, nous avons tout d'abord évalué l'effet de la vitesse d'écriture sur la taille des motifs. Nous avons réalisé des dépôts avec des vitesses d'écriture allant de 0,5 à 0,05  $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . La Figure IV- 31.a présente la caractérisation par LFM du dépôt. Nous avons remarqué que contrairement au PMMA sur silicium, il n'y a aucune influence notable de la vitesse de dépôt sur la largeur des traits. La largeur moyenne des dépôts est de  $95 \pm 24$  nm, cette valeur est très inférieure à celle relevée dans le cas du PMMA. La

principale raison de cette différence est liée au caractère hydrophobe du diamant hydrogéné qui rend quasiment nulle la vitesse de diffusion des espèces en surface de ce dernier et qui réduit considérablement la taille du ménisque. La Figure IV- 31.b est une image AFM d'une ligne d'ADN déposée dans les mêmes conditions à une vitesse de  $0,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ . La hauteur du dépôt est évaluée à  $1,1 \pm 0,4 \text{ nm}$  ; cette valeur étant équivalente à celle de la rugosité du substrat, il n'est pas possible de tirer de conclusion quant à la hauteur de la couche déposée.

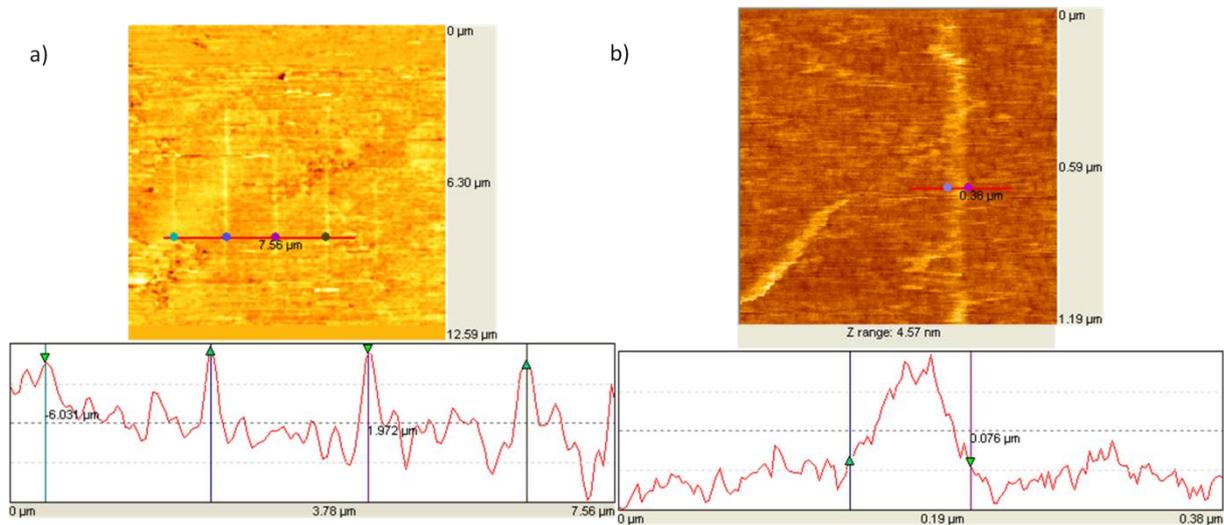


Figure IV- 31 : a) Image LFM et le profil associé d'un dépôt d'ADN sur un substrat diamant monocristallin (100), b) Image AFM et le profil associé d'une ligne d'ADN déposée à une vitesse de  $1 \mu\text{m}/\text{s}$ .

Nous avons montré qu'il était possible de déposer de l'ADN de manière localisée grâce à la technique du DPN. Bien que la présence d'un dépôt soit clairement mise en évidence, nous ne pouvons pas affirmer que le greffage soit effectif. Des expériences complémentaires de friction en LFM permettent d'évaluer la force d'accroche du dépôt apportant ainsi une conclusion claire quant au caractère covalent ou non de la liaison. Nous avons ensuite procédé à la révélation par spectroscopie de fluorescence des dépôts selon le même protocole que celui détaillé dans les parties III.F.1 et III.I.2.a, une image est présentée sur la Figure IV- 32. On peut y voir plusieurs matrices dont les plus visibles sont encadrées en blanc, on remarque notamment la matrice notée A. Cette dernière est une matrice du même type que celles présentées précédemment dans cette partie, on y distingue les lignes parallèles. On remarque que chaque matrice est noyée dans un fond fluorescent dû à la caractérisation en LFM. Les vitesses de lecture élevées que nous avons utilisées ( $4 \mu\text{m}/\text{s}$ ), ne semblent pas

totalemment prévenir le dépôt des espèces encore présentes sur la pointe. Le fond fluorescent des matrices provient donc de la phase de caractérisation LFM.

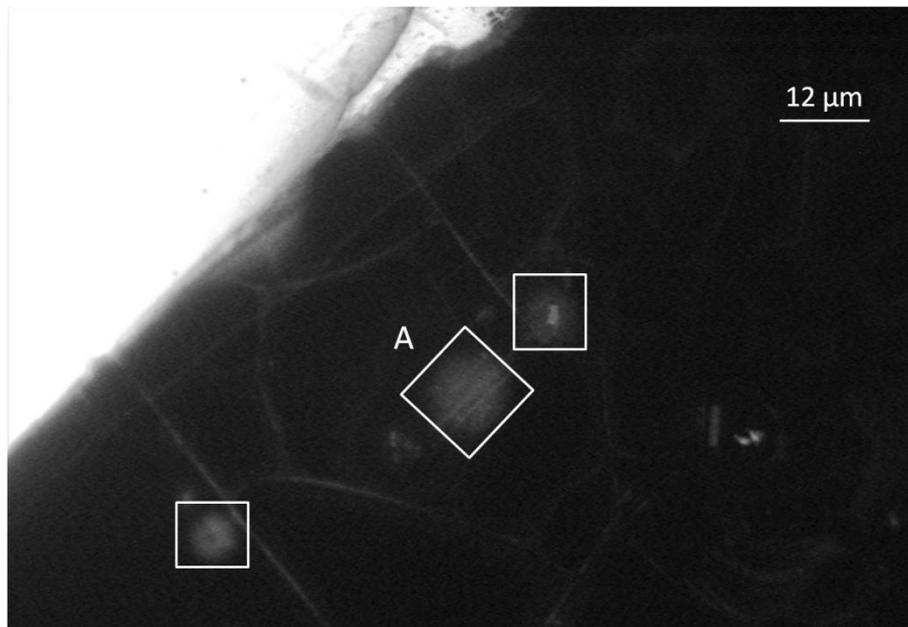


Figure IV- 32 : Image en microscopie de fluorescence de différentes matrices de lignes d'ADN déposées sur diamant monocristallin (100) hydrogéné.

Nous avons vu dans cette partie qu'il est possible de structurer les dépôts grâce à la technique du Dip-Pen Lithography. Il reste toutefois des manipulations complémentaires à effectuer pour montrer que les espèces déposées sont bien greffées sur la surface. La rugosité du substrat est un paramètre limitant de cette technique qui dans le cas des substrats diamant a rendu difficile la caractérisation ainsi que les dépôts. De plus la maîtrise du degré d'hygrométrie aurait permis de moduler d'avantage la largeur des dépôts. Nous avons pu voir que la technique affiche certaines limites comme le dépôt d'espèces lors de la caractérisation par LFM.

### III.J. Conclusion

A travers les différentes applications abordées dans cette partie nous avons mis en évidence les potentialités de la méthode de fonctionnalisation des amines en termes d'applications. Elle permet la mise au point de dispositif tel que les biopuces, les biocapteurs de manière simple et rapide. Elle rend également possible l'immobilisation directe de

molécules biologiques dans des conditions douces, sans en affecter les propriétés biologiques. Elle apparaît comme une méthode de choix pour une large gamme d'application qui s'étendent de la tribologie aux diagnostics cliniques. De plus la possibilité de contrôler la quantité immobilisée par l'intermédiaire du temps de greffage permet de ne pas altérer les propriétés électrochimiques remarquables des électrodes diamant.

Malgré ses propriétés, le diamant, comme les autres électrodes planaires, est limité par sa surface spécifique. La détection par des méthodes électrochimiques d'une espèce en solution, nécessite un transfert électronique entre la surface et cette dernière. Accroître la surface de l'électrode permettra d'augmenter le nombre de sites d'échange et donc réduire la limite de détection. La principale limite est liée à la faible surface spécifique des électrodes planaires. Plutôt que de structurer les électrodes diamant, nous avons choisi de développer un nouveau matériau composite à base de Nanotubes de Carbone et de Diamant.

- [1] O. Aucellio, W. Yang, J. E. Butler, W. Cai, J. A. Carlisle, J. E. Gerbi, D. M. Gruen, T. Knickerbocker, T. L. Lasseter, J. N. Russell, L. M. Smith AND R. J. Hamers\*, *Nature Materials*, **2002**. 1, 253–257.
- [2] C. Grossiord\*, F. Azek, \* M. Joannes, B. Limoges and P. Brossier\*, *Analytical Biochemistry*, **2000**. 284, 107–113.
- [3] G.J. Zhang, K.S. Song\*, Y. Nakamura, K. Furukawa, T. Hiraki, J.H. Yang, T. Funatsu, I. Ohdomari and H. Kawarada, *Physical Review E*, **2006**. 74.
- [4] K.S. Song\*, G.J. Zhang\*, Y. Nakamura, T. Ueno, T. Funatsu, I. Ohdomari and H. Kawarada, *Langmuir*, **2006**. 22, 3728-3734.
- [5] K.S. Song, J.H. Yang, G.J. Zhang, M. Degawa, Y. Sasaki, I. Ohdomari and H. Kawarada\*, *Langmuir*, **2006**. 22, 11245-11250.
- [6] V. Vermeeren, P. Christiaens, S. Wenmackers, M. Daenen, K. Haenen, M. Nesladek, M. vandeVen, M. Ameloot, L. Michiels, P. Wagner\*, *Biosensors and Bioelectronics*, **2006**. 22, 170–177.
- [7] Emmanuel Maillart, Thierry Livache\*, Nathalie Lassalle, Pascal Mailley, Bruno Corso, Philippe Guedon, André Roget, Yves Levy *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2003**. 32, 687-696.
- [8] Jérôme Chane-Tune, Elodie Fortin, Pascal Mailley\*, Sabine Szunerits, Bernadette Marcus, Jean-Pierre Petit, Michel Mermoux, Eric Vieil, *Bioelectrochemistry*, **2004**. 63, 303– 306.
- [9] M. Takahashi, N. Higashi, M. Niwa, *Langmuir*, **1999**. 15, (1), 111-115.
- [10] L. Bouffierb, B. Wanga, M. Demeunynckb, P. Mailleya,\*, A. Rogeta, T. Livachea, P. Dumyb, *Bioelectrochemistry*, **2004**. 63, 233– 237.
- [11] L. Bouffier, B. Wang, M. Demeunynck, P. Mailley\*, A. Roget, T. Livache, P. Dumy, *Bioelectrochemistry*, **2004**. 63, 233– 237.
- [12] Vladimir A. Tyurin, Valerian E. Kagan, Jianfei Jiang, Yulia Y. Tyurina, Vladimir B. Ritov, Andrew A. Amoscato, Anattoly N. Osipov, Natalia A. Belikova, Alexandr A. Kapralov, Vidisha Kini, Irina I. Vlasova, Qing Zhao, Meimei Zou, Peter Di, Dimitry A. Svistunenko, Igor V. Kurnikov and Gergory Borisenko., *Nature Chemical Biology*, **2005**. 1, (4), 223-232.
- [13] Xuesong Liu, Jie Yang, Kapil Bhalla, Caryn Naekyung Kim, Ana Maria Ibrado, Jiyang Cai, Tsung-I Peng, Dean P. Jones, Xiaodong Wang\*, *Science*, **1997**. 275, 1129-1132.
- [14] E. Bossy-Wetzel, R.M. Kluck, D.R. Green\*, D.D. Newmeyer\*, *Science*, **1997**. 275, 1132-1136.
- [15] N.A. Azarova, S. Basu, M.D. Font, S.B. King, N. Hogg, M.T. Gladwin, S. Shiva and D.B. Kim-Shapiro, *Journal of Biological Chemistry*, **2008**. 283, (47), 32590-32597.
- [16] Rene Hoffmann, Nianjun Yang, Waldemar Smirnov, Christoph E. Nebel, *Diamond & Related Materials*, **2011**. 20, 269–273.
- [17] Marco Borsari, Gianantonio Battistuzzi, Marco Sola\* and Francesco Francial, *Biochemistry*, **1997**. 36, 16247-16258.
- [18] David E. Reed and Fred M. Hawkrige\*, *Anal. Chem.* , **1987**. 59, 2334-2339.
- [19] C. Levy-Clement, I. Duo, A. Fujishima and C. Comminellis\*, *Journal of Applied Electrochemistry*, **2004**. 34, 935–943.
- [20] J. Hernando, J. Rubio-Retama\*, B. Lopez-Ruiz, A. Hartl, D. Steinmuller, M. Stutzmann, E. Lopez-Cabarcos and J. A. Garrido, *Langmuir*, **2006**. 22, 5837-5842.
- [21] I.K. Vijay, D. Sehgal, *Analytical Biochemistry*, **1994**. 218, (1), 87-91.
- [22] Lei Wang and David H. Waldeck\*, *J. Phys. Chem. C*, **2008**. 112, 1351-1356.
- [23] Hongjun Yue and David H. Waldeck\* Jelena Petrovic´ and Rose A. Clark\*, Edmond F. Bowden, *Langmuir*, **2005**. 21, 6308-6316.

- [24] Rosaria Ferrigno, Xiaoxi Chen, Jerry Yang, and George M. Whitesides\*, *Langmuir*, **2002**. 18, 7009-7015.
- [25] James P. Gosling, *Clin. Chem.*, **1990**. 36, (8), 1408-1427.
- [26] Elisabeth Csoregib, Tautgirdas Ruzgasa, Jenny Emn&usb, Lo Gortonb\*, Gy&gy Marko-Vargab, *Analytica Chimica Acta*, **1996**. 330, 123-138.
- [27] V. A. Cooper and J. A. Nicell\*, *Wat. Res.*, **1996**. 30, (4), 954-964.
- [28] Hiroyuki Tonami, Tokuma Fukuoka, Naoyuki Maruichi, Hiroshi Uyama, and Shiro Kobayashi\*, *Macromolecules*, **2000**. 33, 9152-9155.
- [29] Nicoletta Gaggero, Stefano Colonna, Carlo Richelmi and Piero Pasta, *Trends in Biotechnology*, **1999**. 17, 163-168.
- [30] Shaojun Dong\*, Jinghong Li, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **1997**. 431, 19-22.
- [31] Benoît Limoges\*, Murielle Dequaire, Jacques Moiroux\* and Jean-Michel Savéant\*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**. 124, (2), 240-253.
- [32] E. Puganova, E. Ferapontova\*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2002**. 518, 20-26.
- [33] Christiana A. Pessoa, Renato S. Freire, Lucilene D. Mello and Lauro T. Kubota\*, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**. 14, (2), 230-243.
- [34] T. Pourrostami, J. Hernando\*, J.A. Garrido, O.A. Williams, D.M. Gruen, A. Kromka, D. Steinmüller, M. Stutzmann *Diamond & Related Materials*, **2007**. 16, 138-143.
- [35] J. A. Carlisle, J. Wang\*, *Diamond & Related Materials*, **2006**. 15, 279 - 284.
- [36] J.; Guangjin Li, C.; Dong, S., *J. Electroanal Chem.*, **1996**. 416, 97-104.
- [37] J. Randles, *Transaction of the Faraday Society*, **1948**. 44, 327-338.
- [38] J. de Sanoit, E. Vanhove, J.C. Arnault, S. Saada, C. Mer, P. Mailley, P. Bergonzo, M. Nesladek, *Physica Status Solidi A-Applications and Materials Science*, **2007**. 204 (9), 2931-2939.
- [39] J. de Sanoit, E. Vanhove\*, P. Mailley, M.A. Pinault, F. Jomard and P. Bergonzo, *Phys. Status Solidi A*, **2009**. 206, (9), 2063-2069.
- [40] Qin Zhou, Nengqin Jia, Ling Liu, Manming Yan, Zhiyu Jiang\*, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **2005**. 580, 213-221.
- [41] N. Berthet-Durore, Y. Roupioz\*, T. Livache, J.B. Pourciel, P. Mailley, S. Cortes, M.B. Villiers, P.N. Marche and L. Nicu\*, *small*, **2009**. 5, (13), 1493-1497.
- [42] Kae Sato, Yo Tanaka, Tatsuya Shimizu, Masayuki Yamato, Teruo Okanob, Takehiko Kitamori\*, *Biosensors and Bioelectronics*, **2007**. 23, 449-458.
- [43] B.E. Silverstein, B.A. Barres\*, D.P. Corey\*, L.L.Y. Chun\*, *Neuron*, **1988**. 1, 791-803.
- [44] V. Forster C. Fuchs, E. Balse, J.A. Sahel, S. Picaud and L.H. Tessier, *IOVS*, **2005**. 46, (8), 2983-2991.
- [45] Q. Xu, B.D. Gates, M. Stewart, D. Ryan, C.G. Willson\* and G.M. Whitesides\*, *Chem. Rev.*, **2005**. 105, 1171-1196.
- [46] D. Shalon\*, M. Schena\*, R.W. Davis, P.O. Brownt, *Science*, **1995**. 270, 467-470.
- [47] R. G. Sweet, *US Patent*, **1971**. 3, (576), 275.
- [48] J. Leighton-Read, S.P.A. Fodor\*, M.C. Pirrung, L. Stryer, A. Tsai-Lu, D. Solas, *Science*, **1991**. 251, 767-773.
- [49] J.C.P. Gabriel, A. Star\*, K. Bradley and George Gruner, *Nano letters*, **2003**. 3, (4), 459-463.
- [50] M. Guirardel, P. Belaubre, and G. Garcia, J. B. Pourciel, V. Leberre, A. Dagkessamanskaia, E. Trévisiol, and J. M. Francois, C. Bergaud, *Applied Physics Letters*, **2003**. 82, (18), 3122-3124.
- [51] N.R. Tas, S. Deladi, J.W. Berenschot, G.J.M. Krijnen, M.J. de Boer, J.H. de Boer, M. Peter, and M.C. Elwenspoek, *Applied Physics Letters*, **2004**. 85, (22), 5361-5363.

- [52] Jin Zhu, Richard D. Piner, Feng Xu, Seunghun Hong, Chad A. Mirkin\*, *Science*, **1999**. 283, 661-663.
- [53] V.N. Truskett and M.P.C. Watts, *Trends in Biotechnology* **2006**. 24, (7), 312-317.
- [54] A. Bernard, B. Michel, A. Bietsch, E. Delamarche, M. Geissler, D. Junker, H. Kind, J.P. renault, H. Rothuizen, H. Schmid, P.Schmidt-Winkel, R. Stutz, H. Wolf, *IBM Journal of Research and Development*, **2001**. 45, (5), 697-719.
- [55] D. G. Hasko, Shazia Yasin, and H. Ahmeda, *Applied Physics Letters*, **2001**. 78, (18), 2760-2762.
- [56] Thierry Leichlé, Emeline Descamps, Bruno Corso, Sébastien Laurent, Pascal Mailley,\* Liviu Nicu, Thierry Livache, and Christian Bergaud\*, *Adv. Mater.*, **2007**. 19, 1816–1821.
- [57] Hua Zhang, David S. Ginger, and Chad A. Mirkin\*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2004**. 43, 30– 45.
- [58] Albena Ivanisevic and Chad A. Mirkin\*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**. 123, 7887-7889.
- [59] D.S. Ginger\*, L.M. Demers\*, S.J. Park, Z. Li, S.W. Chung, C. A. Mirkin, *Science*, **2002**. 296, 1836-1838.
- [60] Y. Yang, J.C. Garno, N.A. Amro, S. Cruchon-Dupeyrat, S. Chen\* and G.Y. Liu\*, *Nano Lett.*, **2003**. 3, (3), 389-395.
- [61] Marc P. Raphael, David J. Pena\*, and Jeff M. Byers, *Langmuir*, **2003**. 19, 9028-9032.
- [62] K. Salaita, Y. Zhang, J.H. Lim, K.B. Lee and C.A. Mirkin\*, *Langmuir*, **2004**. 20, 962-968.
- [63] Wolfgang Frey, John H. Slater, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **2007**. 176-195.
- [64] Paula M. Mendes, Æ Chun L. Yeung Æ Jon A. Preece, *Nanoscale Res Lett*, **2007**. 2, 373–384.
- [65] G. Dietler and B. Cappella, *Surface Science Reports*, **1999**. 34, 1-104.

***CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT D'UN  
NOUVEAU MATERIAU COMPOSITE  
NANOTUBES DE CARBONE/DIAMANT***

## V. Croissance de Nanotubes de carbone sur diamant

Un des axes de ma thèse était de concevoir un matériau fonctionnel dédié à l'étude de neurone unique permettant le suivi de l'activité neuronale. Cela implique que le matériau doit être sensible à l'activité bioélectrique générée par l'influx nerveux mais également à l'activité biochimique au travers de la détection des neurotransmetteurs présents au voisinage des synapses. De plus, ce dernier doit également pouvoir être utilisé comme dispositif biocompatible implantable pour la neurostimulation. Ce matériau doit donc être sensible aux signaux bioélectriques et biochimiques mais doit aussi être biocompatible. Le diamant est un bon candidat car il répond à la plupart des critères requis. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre I, il offre un large panel d'applications dans le domaine de la bioélectronique. Ses propriétés intrinsèques (inertie chimique, biocompatibilité, faible courant capacitif, conductivité de surface...) permettent l'utilisation directe d'échantillons diamant non modifiés pour la mise œuvre de dispositifs de détection opérationnels. De plus, nous avons vu qu'en immobilisant des espèces d'intérêts biologiques sur la surface du diamant, il est possible d'envisager son utilisation dans le domaine biomédical, des diagnostics cliniques ou encore de la biodétection. Bien que les propriétés électrochimiques particulières du diamant lui confèrent une grande sensibilité, elle est comme toutes les électrodes planaires limitée en termes de seuil de détection par sa surface développée. Une alternative consiste à structurer la surface de l'électrode diamant pour augmenter sa surface spécifique.

A la différence de métaux, qui pour la plupart sont sensibles aux traitements acides mais insensibles aux gravures plasmas, le diamant affiche un comportement contraire. L'approche « top-down » permet donc de nanostructurer des échantillons diamant, le plus souvent en ayant recours à des techniques plasmas et des masques métalliques. L'équipe de Fujishima [1] à réalisé des structures en nid d'abeilles, ils ont pour ce faire utilisé un masque d'aluminium puis ont procédé à une gravure du diamant par plasma (Figure V- 1.a). Il est également possible par gravure plasma d'obtenir des nanopiliers-nanopointes de diamant en utilisant des nanoparticules comme masque. Zou et al. ont déposé des nanoparticules d'or sur substrat diamant pour obtenir des nanopiliers [2] ( Figure V- 1.b), l'équipe de Nebel des nanoparticules de diamant qui ont abouties à la formation de nanopointes [3] (Figure V- 1.c). Récemment des nanofils, ainsi que des microdisques de diamant ont été réalisés à l'institut Néel par Etienne Gheeraert et al. suivant un procédé similaire à ceux détaillés précédemment

[4]. Le procédé permettant la formation des disques diamant consiste au dépôt physique en phase vapeur (Physical Vapor Deposition, PVD) d'un réseau de disques de Nickel d'une épaisseur d'une dizaine de nanomètres. Il s'en suit un traitement par plasma qui grave le diamant situé autour des plots, le Nickel joue le rôle de masque et empêche la gravure des zones qu'il recouvre. On retire ensuite le masque de Nickel par un traitement à l'eau régale pour dévoiler les disques de diamant (Figure V- 2.a). Dans le cas du réseau de nanofils, des billes de polystyrène d'un diamètre de l'ordre du micromètre sont déposées sur le diamant avant le dépôt PVD du Nickel. Ce dernier ne se dépose donc qu'aux espaces libres présents entre les billes de polystyrène. Il en résulte l'apparition de gouttelettes réparties selon un motif hexagonal (Figure V- 2.b).

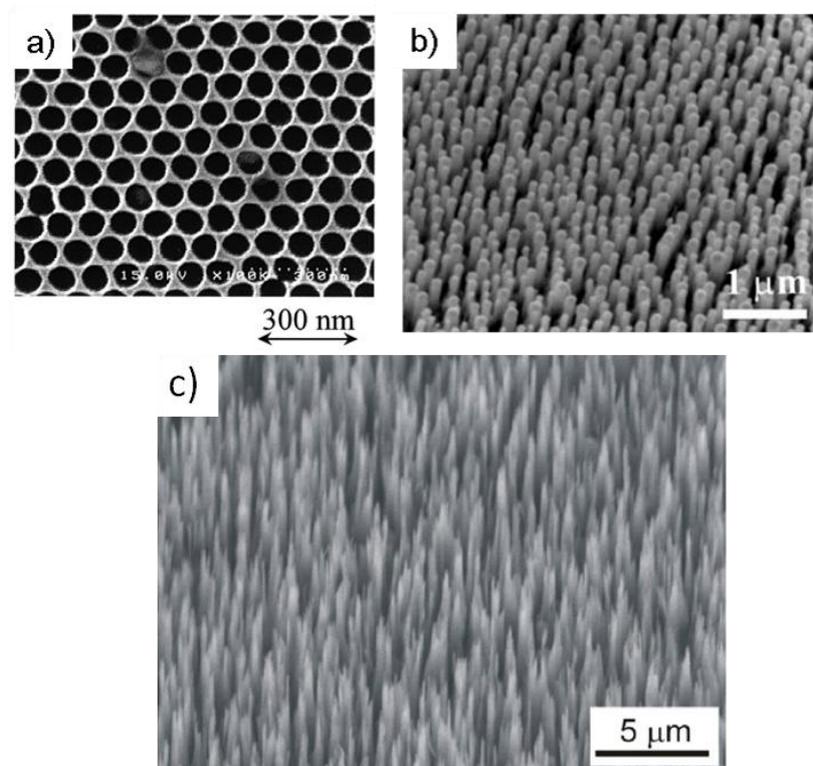
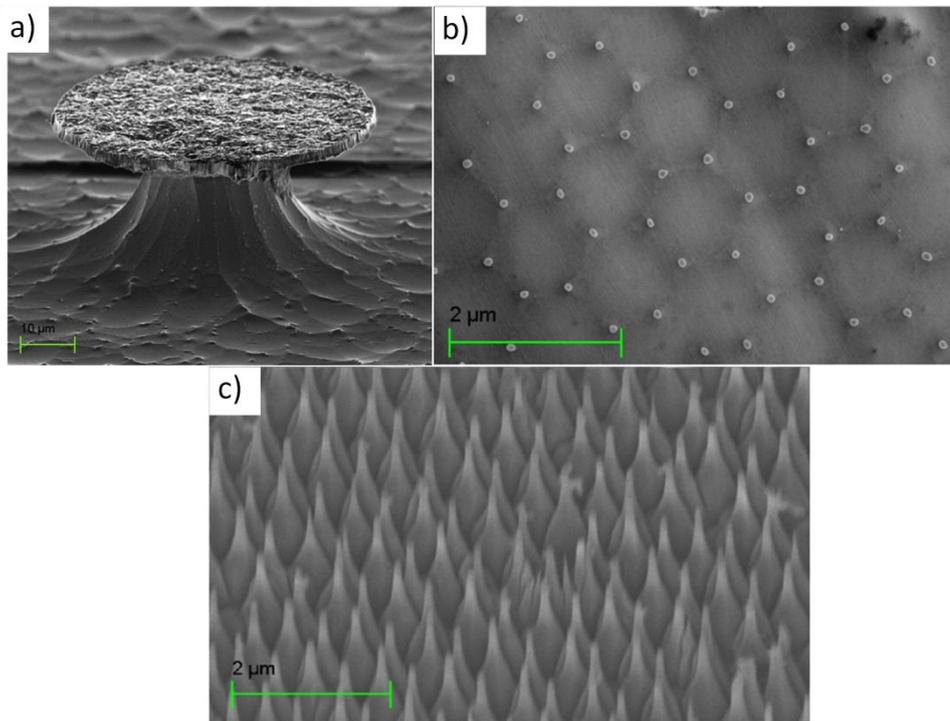


Figure V- 1 : Images MEB de : a) Structure en nid d'abeilles du diamant et b), c) nanopiliers de diamant

L'étape finale consiste à la gravure de l'échantillon par plasma et conduit à la formation de nanofils diamant à la pointe desquels on retrouve les particules de Nickel (Figure V- 2.c). Cette approche permet d'augmenter la surface développée des électrodes, la sensibilité électrochimique est subséquemment augmentée d'un facteur 10. Malgré cette amélioration, il existe peu d'applications basées sur l'utilisation de ces matériaux. La

structuration des échantillons nécessite de nombreuses étapes et donc un temps de conception élevé qui ne justifie pas le gain d'efficacité obtenu. Nous avons donc opté pour la conception d'un matériau composite.



*Figure V- 2 : Images MEB de : a) Microdisque de diamant supporté par un pilier silicium, b) gouttelettes de Nickel réparties selon un motif hexagonal sur substrat diamant, c) réseau de microfils de diamant après gravure plasma.*

Il a été montré que le dépôt de métaux nanostructurés sur des électrodes diamant par voie chimique ou électrochimique modifie les propriétés des électrodes diamant en agissant comme catalyseurs. Différents types de métaux ont été déposés (Ag, Cu, Au, Pd, and Pt) [5] et de nombreuses applications analytiques en ont découlées. Le dépôt d'or permet la détection d'arsenic en solution [6], l'oxyde d'iridium celle du peroxyde d'hydrogène [7] et le platine l'oxydation des alcools [8]. Ces matériaux composites métal-diamant élargissent la gamme des substances potentiellement détectables et améliorent la sensibilité. En revanche, ils ne sont utiles que pour les détections électrochimiques directes et n'offrent pas d'avantage dans le cadre de couplages enzymatiques directs. De plus ils n'augmentent pas la surface développée des électrodes.

Nous nous sommes donc orientés vers une approche « bottom-up » en mettant au point un matériau composite carboné diamant-nanotube de carbone. La famille des nanotubes de

carbone peut être subdivisée en deux groupes principaux, on trouve les nanotubes monoparois (Single-Walled Carbon Nanotube, SWCNT) et les nanotubes multiparois (Multi-Walled Carbon Nanotube, MWCNT). Les différences majeures entre ces deux groupes sont leurs diamètres et leurs propriétés électroniques. Ils ont en revanche de nombreuses caractéristiques attractives, telles que leur facteur de forme, leur conductivité, leur propriété mécanique, chimique ou encore optique [9]. Ils présentent également de grandes potentialités analytiques en améliorant les propriétés électrochimiques des matériaux sur lesquels ils sont déposés. Un des avantages majeurs des nanotubes est la simplicité de leurs fonctionnalisations. La majorité des nanotubes possèdent de manière intrinsèque des fonctions carboxyles qui peuvent être utilisées pour former une liaison amide avec toutes molécules comportant un groupement amine. Un autre avantage est lié à leur facteur de forme qui génère un accroissement de la surface d'échange active exceptionnel. Néanmoins leur cytotoxicité [10] impose une immobilisation forte des nanotubes sur le diamant pour que ce matériau puisse rester un bon candidat pour les applications in vivo.

Nous nous attacherons dans cette partie à développer et caractériser ce nouveau matériau composite en essayant de résoudre le problème d'accrochage des nanotubes sur le substrat. Une des solutions aurait été de fonctionnaliser les nanotubes sur le substrat diamant. Mais l'accroche des nanotubes par une simple liaison covalente n'est pas suffisante pour diminuer significativement les probabilités de décrochage des nanotubes de leurs substrats. Aussi, depuis quelques années, de nombreux travaux portent sur la mesure de la force d'adhésion des nanotubes sur leurs substrat [11, 12] et on voit aujourd'hui de nombreux groupes travailler sur l'amélioration de la force d'accroche des nanotubes [13-15]. De plus dans un souci de simplicité et de sécurité nous avons choisi de ne pas utiliser de nanotubes en suspension. Des lors une des voies les plus adapté est d'effectuer la croissance des nanotubes directement sur substrat.

## V.A. Nanotubes de carbone : Généralités

### V.A.1. Propriétés

La première observation de nanotube de carbone par Radushkevich et Lukyanovich remonte aux années cinquante mais la découverte de leurs structures en tube creux composés de feuillets de graphite ne viendra qu'en 1991 [16]. Un nanotube de carbone parfait est

constitué uniquement d'atomes de carbone hybridés  $sp^2$ ; il peut être décrit comme l'enroulement de façon concentrique d'un (SWCNT) ou plusieurs (MWCNT) feuillet de graphène selon une direction donnée, formant ainsi un cylindre. L'enroulement précédemment défini peut s'effectuer de plusieurs manières à condition que les atomes se superposent à la jointure des deux extrémités du feuillet. A partir du plan de graphène, une convention a donc été établie pour permettre de classifier les nanotubes en fonction de leur enroulement (Figure V-3). A partir d'une base  $(a_1, a_2)$  des vecteurs du réseau de Bravais hexagonal du graphène, il est alors possible de définir le vecteur chiral  $C_h$  reliant les atomes de carbone situés sur des sites équivalents du réseau et qui se superposent lors de l'enroulement du plan. Ce vecteur peut s'exprimer comme  $C_h = n_1a_1 + n_2a_2$ . Le couple  $(n_1, n_2)$  contient toute l'information sur la structure du nanotube de carbone et permet d'identifier chaque nanotube sans ambiguïté.

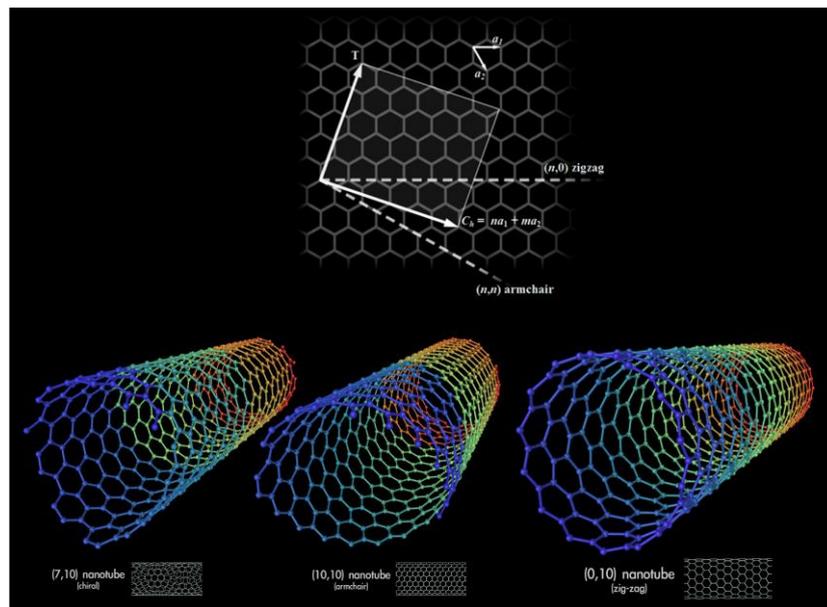


Figure V-3 : Modèle de l'enroulement du feuillet de graphène. Le vecteur chiral est le vecteur qui relie deux atomes qui se superposent lors de l'enroulement du feuillet. Les deux directions des droites représentées en pointillées sont particulières : un vecteur chiral selon l'une de ces directions correspond à un nanotube soit zigzag, soit armchair. Les trois familles de nanotubes de carbone selon leur structure (de gauche à droite) sont : les nanotubes chiraux ou  $n_1 \neq n_2$  et  $n_2 \neq 0$ , les armchair ayant une hélicité de type  $(n_1, n_2)$  ou  $n_1 = n_2$  et enfin les zigzag avec  $(n_1, 0)$ .

Toutes les configurations possibles sont regroupées en trois familles de nanotube distinctes :

- Les nanotubes armchair : ils sont définis par des hélicités telles que  $n_1 = n_2$ .

- Les nanotubes zigzag : ils sont obtenus lorsque la valeur de l'indice  $n_2=0$
- Les nanotubes chiraux : cette famille regroupe tous les nanotubes qui ne font pas partie d'une des deux familles précédemment citées.

Les propriétés électriques des SWCNT dépendent de leurs hélicité. Pour qu'un nanotube soit métallique il faut que  $n_1=n_2$ , si  $n_1-n_2$  est un multiple de 3 c'est un semi-conducteur avec un gap très faible [17]. Les autres nanotubes monoparois sont des semi-conducteurs dont le gap est inversement proportionnel au diamètre du tube. Cela implique donc que tous les armchair sont métalliques. Les MWCNT sont quant à eux connus pour être conducteur [18], [19] et peuvent donc être utilisés comme « fil électrique ».

De nombreuses applications basées sur l'utilisation de nanotubes sont aujourd'hui envisagées et particulièrement dans les domaines :

- Des supercondensateurs [20], [21]. En effet, la capacité élevée des nanotubes, associée à la grande surface développée dans les réseaux de nanotubes poreux et à leur conductivité, pourrait être utilisée dans le domaine du stockage de l'énergie (accumulateurs) ou des applications hautes puissances (interrupteurs hautes tensions).
  - Des émissions de champs [22], pour la conception de lampe ou d'écran plat.
  - Des « drugs delivery » [23].
  - De l'imagerie AFM [24], [25] à travers la croissance d'un nanotube unique sur l'apex d'une pointe traditionnelle permet d'obtenir des images AFM d'une grande résolution.
  - De l'électronique, à travers la conception de FET [26] ou encore de circuits électroniques nanométriques [27].
  - Des (bio)capteurs [28], on trouve une large gamme de capteur qui permettent entre autre la détection de l'acide ascorbique et la dopamine [29], du cytochrome c [30], d'anticorps [31]. On trouve également de nombreux capteurs réalisés à base de matériaux composites qui sont le plus souvent composés de nanotube dispersés à l'intérieur d'un polymère. Ce type de matériau composite a permis la détection du glutamate [32], du glucose [33,

34] de l'euporium [35], du peroxyde d'hydrogène [36], ou encore de bactéries [31].

Ces quelques exemples n'ont pas pour but de fournir une vue détaillée de la totalité des applications basées sur l'utilisation de nanotube mais de mettre en évidence la diversité des domaines applicatifs potentiels. Comme nous l'avons vu au début du chapitre, un des axes ciblés par ce nouveau matériau composite diamant/nanotube de carbone est celui des biocapteurs et des neurosciences. Il a été montré que les nanotubes sont des candidats de choix pour concevoir des dispositifs adaptés à l'étude fondamentale des interactions entre neurones. Différentes études ont montré que les nanotubes déposés sur substrat améliorent significativement la croissance, l'adhésion, ainsi que la durée de vie des neurones [37]. Pour exploiter pleinement toute la surface développée par les nanotubes, il est nécessaire de ne pas travailler avec des tapis de nanotubes alignés mais avec des nanotubes enchevêtrés [38]. De plus les nanotubes non modifiés étant très hydrophobes, il est donc nécessaire de les modifier avant de les placer en contact avec des neurones. Il a été montré que l'oxydation des nanotubes favorise la croissance des neurites [39]. On peut les oxyder, soit par voies chimiques conventionnelles ( $\text{HNO}_3$  et/ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [40] ou bien par traitement plasma [41].

En dépit de toutes les potentialités que présentent les nanotubes pour les applications dans le domaine des neurosciences, leur potentielle toxicité interdit toute perspectives d'applications in vivo. Les études sur la biocompatibilité des nanotubes sont légions et même si certains résultats sont contradictoires [42], de nombreuses études ont mis en évidence leur toxicité [10, 43]. Cette dernière est principalement due à l'agrégation des nanotubes en solution aqueuse, qui entraîne une accumulation puis une réponse inflammatoire de l'organisme. Il a été rapporté que la modification (oxydation, fonctionnalisation) des nanotubes permet de palier à ce phénomène [44] mais n'a pour effet que de reporter le problème sur les organes qui jouent le rôle de filtres. En effet lorsque les nanotubes ne forme pas d'agglomérat, ils s'accumulent dans les reins et la rate [45] sans que l'organisme ne parvienne à les éliminer. Une des solutions pour pouvoir envisager des applications in vivo est d'éviter le décrochage des nanotubes de leur substrat. C'est pour cette raison que nous chercherons dans cette étude à créer un lien fort entre le diamant et les nanotubes.

## V.A.2. Croissance

Les premiers nanotubes de carbone observés par S. Iijima en 1991, étaient de type multiparois (MWCNT) et ont été obtenus comme sous produit de la synthèse de fullerènes par la technique d'arc électrique. C'est en 1993 que Bethune [46] et Iijima [47] réalisèrent indépendamment la première synthèse de nanotubes monoparois (SWCNT) en utilisant cette même technique.

Les techniques de croissance par arc électrique [48] et ablation laser [49] furent les premières techniques utilisées pour la synthèse des nanotubes. Elles sont toutes les deux basées sur la sublimation de carbone à partir d'une cible de graphite, à l'aide d'un arc électrique ou d'un faisceau laser. Ces méthodes requièrent l'utilisation d'un métal de transition (Fe, Ni, Co) jouant le rôle de catalyseur. Ce métal est dispersé dans le graphite avant la croissance. Le produit de la croissance est un mélange de nanotubes le plus souvent sous la forme de faisceaux associés à une forte quantité de carbone amorphe ainsi que des particules métalliques. Les nanotubes sont ensuite purifiés par des traitements acides et des bains à ultrasons visant à séparer les faisceaux, éliminer le carbone amorphe et les particules de métal. Cependant ces traitements induisent des défauts cristallins [50] et oxydent [51] les nanotubes. C'est pour cette raison que les techniques d'arc et d'ablation laser sont aujourd'hui délaissées en faveur d'autres voies de synthèse.

Parmi ces méthodes on trouve le procédé HiPCO (High Pressure Carbon Monoxide) mis au point par le groupe de Smalley dans les années 2000 qui est basé sur la décomposition du monoxyde de carbone à haute pression [52, 53]. Le procédé HiPCO constitue aujourd'hui la principale voie de synthèse industrielle des SWCNT car elle permet d'obtenir des nanotubes d'une très bonne qualité cristalline associée à des rendements élevés. C'est une technique dite à catalyseur flottant car elle utilise comme précurseur gazeux un composé organométallique ( $\text{Fe}(\text{CO})_5$ ) qui se décompose sous haute pression et haute température.

On trouve également les techniques de synthèses CVD qui sont aujourd'hui les plus largement répandues en laboratoire. La technique CVD est basée sur la réaction d'une vapeur contenant le précurseur carboné avec un catalyseur qui joue le rôle de site de nucléation des nanotubes. Il existe de nombreuses variantes qui dépendent de la nature de la source d'énergie utilisée, de la composition de la phase carbonée ( $\text{C}_2\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}\dots$ ), ainsi que de la nature et de la forme du catalyseur. C'est en 1994 qu'Ivanov et al. [54] furent les premiers à synthétiser des MWCNT par décomposition de l'acétylène. La décomposition des précurseurs carbonés peut être assistée par plasma. C'est le cas de la PECVD qui permet de déposer les nanotubes à

plus basse température [55]. Ils peuvent également être décomposés par voie thermique, comme par exemple à l'aide d'un filament chaud (HFCVD) [56]. Les catalyseurs les plus couramment utilisés sont le fer, cobalt, nickel sous forme métallique mais il est possible d'utiliser des précurseurs organométalliques, on parle alors de MOCVD [57]. Le principal avantage de la technique de dépôt chimique en phase vapeur est qu'elle n'induit que peu de pollution par des suies, ce qui évite les étapes de traitement (Ultrasons et chimique) et les problèmes associés. Elle permet aussi la réalisation de structures auto-assemblées à travers le contrôle du positionnement et de l'orientation des nanotubes [58] ou encore d'obtenir des nanotubes isolés sur un substrat [59]. En revanche le principal défaut de cette technique réside dans la faible sélectivité du diamètre des nanotubes synthétisés et dans la formation d'une zone de carbone amorphe autour de la particule lors de l'arrêt de la croissance. Il a été montré que l'ajout d'eau durant le procédé de croissance pallie à ces phénomènes. En 2004 Hata et al. ont montré que l'apport d'eau de manière contrôlée durant une croissance de nanotube par CVD augmentait la durée d'activité catalytique des particules et permettait d'obtenir des tapis denses de SWCNT de plusieurs millimètres de longueur. L'équipe d'Iijima a également montré que l'eau améliore la qualité cristalline des nanotubes, l'absence de carbone amorphe dans les particules catalytiques et permet un meilleur contrôle de la taille des particules et donc des tubes [60-62]. La technique CVD apparaît donc aujourd'hui comme la meilleure voie de synthèse à l'échelle industrielle des nanotubes.

Dans le cadre de ma thèse la technique de synthèse utilisée est la méthode CVD assistée par filament chaud. Elle est utilisée pour la croissance de MWCNT [63] mais également pour celle des SWCNT [64]. Bien que la HFCVD autorise l'utilisation de catalyseurs flottants, nous ferons appel dans notre cas et des catalyseurs métalliques solides qui permettent d'effectuer des croissances de nanotubes localisés.

### **V.A.3. La technique de croissance HFCVD**

La technique HFCVD, historiquement développée pour la croissance du diamant, permet d'élaborer divers types de matériaux carbonés. Le bâti de synthèse de dépôt chimique en phase vapeur est constitué d'un filament de tungstène de 0,3 mm de diamètre qui repose sur deux arrivées de courant. Il est positionné à environ un cm au-dessus du substrat. Ce dernier est posé sur un porte-échantillon en molybdène chauffé par contact avec une résistance chauffante de graphite recouverte de nitrure de bore. Le gaz précurseur est le méthane dilué dans de l'hydrogène, typiquement entre 5 et 15%. La principale différence de

cette technique par rapport aux autres procédés CVD, est qu'il est possible de contrôler séparément l'étape de dissociation des précurseurs qui dépend de la température du filament et la réaction des espèces avec la surface contrôlée par la température du substrat. En effet dans la plupart des techniques CVD, ces deux phénomènes sont indissociables. La HFCVD permet donc d'optimiser chacune de ces deux phases de manière distincte [65]. Notre procédé de synthèse se déroule en trois étapes, une première étape de « recuit » sous hydrogène pur à une température substrat de 400°C pendant 30 min, suivi d'une étape de carburation qui consiste à introduire le méthane à la concentration voulue puis appliquer une température filament de 1200°C et une température substrat de 200°C pendant une heure.

La première étape a pour but de retirer tous les gaz adsorbés sur le substrat et les particules de catalyseur, mais également d'éliminer les éventuels oxydes métalliques avant croissance. La deuxième est destinée à carburer le filament. Si cette étape n'est pas effectuée, il n'y aura pas de formation de nanotubes. En effet lors de l'introduction de carbone dans l'enceinte, une partie de ce dernier va immédiatement être capté par le filament qui va carburer, ce qui implique que la concentration de méthane dans la chambre ne sera pas celle désirée. L'étape de carburation permet de s'affranchir de ce phénomène. Enfin vient l'étape de croissance. Les paramètres utilisés lors des croissances nanotubes ont été reportés dans le Tableau V- 1, les conditions de croissance usuelles d'échantillon diamant y ont été ajoutés à titre de comparaison.

Paramètres	Nanotubes	Diamant
T substrat	750-850 °C	700-900°C
T filament	1800-2000°C	2000-2200°C
% CH <sub>4</sub> dans H <sub>2</sub>	7-11%	0,5-2%

*Tableau V- 1 : Tableau comparatif des paramètres de croissance des échantillons diamant et nanotubes de carbone.*

La technique HFCVD est bien connue et largement utilisée dans la production industrielle d'échantillon diamant polycristallin. La différence majeure de la croissance de nanotube par rapport à celle du diamant est l'utilisation d'un catalyseur. L'autre différence est liée aux types d'espèces actives que l'on retrouvera dans la phase vapeur et qui, dans le cas de la HFCVD sont régis par le taux de méthane et la température du filament. En effet pour la croissance nanotube, il s'agit de favoriser la décomposition du méthane vers des espèces telles

que l'éthylène [66] favorisant la croissance de phase  $sp^2$ . Pour ce faire, on augmente le rapport méthane/hydrogène à des valeurs de l'ordre de 10% pour la croissance nanotube alors qu'il est inférieur à 1% dans le cas du diamant. De plus comme nous l'avons vu précédemment, l'hydrogène atomique favorise l'apparition de phase  $sp^3$  car il grave rapidement les phases graphitiques. Or la formation d'hydrogène atomique est liée à la température du filament ; elle est de l'ordre 2200°C dans le cas de la croissance et de 1950°C dans le cas des nanotubes. Cet abaissement de température permet d'éviter une gravure trop rapide des nanotubes. Cela implique donc que le temps de croissance sera aussi un paramètre à prendre en compte. Dans le cas des croissances de nanotubes par HFCVD, la durée de vie des nanoparticules catalytiques est relativement faible car elles sont désactivées par l'apparition d'un amas de carbone [67] qui indique la fin de la croissance. Nous aurons donc à partir d'un certain temps un taux de gravure supérieur au taux de croissance qui se traduira par une disparition de la couche de nanotube. Enfin le dernier paramètre jouant un rôle sur l'apparition d'une phase plutôt que l'autre est la pression ; plus elle sera élevée, plus elle favorisera la formation de  $sp^2$ .

Il apparait donc que la technique HFCVD offre une multiplicité d'actions en termes de paramètres ajustables et permet donc la synthèse de formes variées de structures carbonées. Il sera donc possible de moduler la synthèse en modifiant les températures du filament et du substrat, le taux de méthane dans l'hydrogène, la pression, la durée de croissance ou encore le type de catalyseur utilisé. Dans le cas des techniques utilisant des catalyseurs métalliques sous forme solide, ces dernières sont introduites directement sous forme de nanoparticules sur le substrat. Dans notre cas le catalyseur est déposé sous forme de couche d'épaisseur nanométrique sur le substrat, les nanoparticules sont générées in situ dans les premiers instant de la phase de croissance. Lorsque l'étape de dépôt est initiée, les températures substrat et filament sont portés très rapidement aux températures choisies pour la croissance. Après quelques secondes, lorsque la température du substrat atteint des valeurs élevées les nanoparticules apparaissent ; c'est l'étape de démouillage. Quant la couche de catalyseur devient liquide, elle s'organise spontanément sous forme de gouttelette pour limiter l'énergie de surface. Dans le cas où le démouillage intervient lors d'une croissance la taille des particules dépendra principalement de l'épaisseur de la couche déposée et du type de substrat. Les espèces réactives carbonées en phase vapeur qui apparaissent simultanément, vont ainsi pouvoir diffuser dans les particules. Ces dernières initieront la formation des germes carbonés puis catalyseront la croissance [68] et leurs tailles détermineront le diamètre des nanotubes. Il existe deux modes de croissance possible. Dans le cas où la tension de surface entre la

particule et le substrat est élevée ou que la particule adhère peu sur le substrat apparait le mode top-base. La particule se retrouve au sommet du nanotube et la particule s'élève durant la croissance [68] (Figure V- 4.b). Le deuxième mode est le base-top ; la particule reste encrée sur le substrat et peut être assimilée à la racine d'un cheveu à partir duquel ce dernier croit. [69] (Figure V- 4.a).

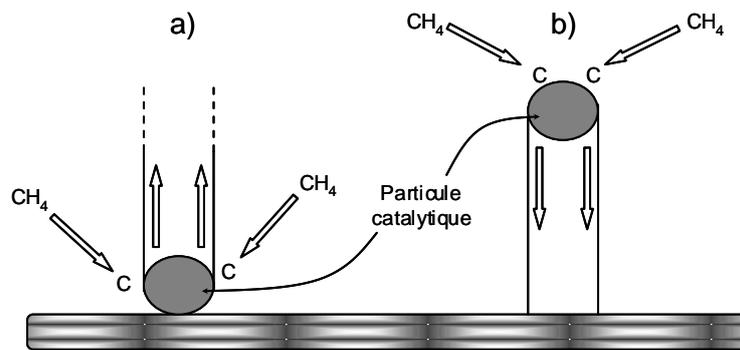


Figure V- 4 : Modèles de croissance d'un nanotube catalysé par une particule métallique : a) Croissance base-top ; la nanoparticule reste au contact du substrat, b) croissance top-base, la particule s'élève.

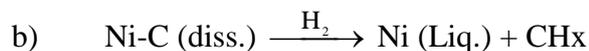
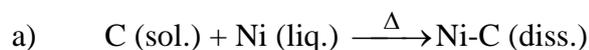
Comme nous l'avons vu, les techniques de synthèse CVD nécessite la présence de catalyseurs métalliques. Dans notre cas, ces particules sont générées in situ durant les premiers instants du processus de croissance. Le mélange gazeux présent dans la chambre à ce moment la contient déjà le taux de méthane nécessaire à la croissance des nanotubes. Nous avons remarqué qu'en retirant le méthane du mélange gazeux, il est possible d'effectuer une gravure du diamant catalysée par les nanoparticules métalliques. Cette gravure se caractérise par la formation de pores dans la couche diamant au fond desquels les nanoparticules se retrouvent enterrées à la fin du procédé. Ce phénomène sera l'objet d'étude de la partie suivante.

Dans ce chapitre nous commencerons par aborder une nouvelle méthode de gravure localisée du diamant qui permet d'enterrer les nanoparticules de catalyseurs dans la couche. Nous aborderons ensuite une partie basée sur la croissance de différents types de nanotubes sur substrat diamant. Puis, nous caractériserons les différents types de nanotubes mais également l'effet du dépôt de nanotubes sur le substrat diamant pour s'assurer qu'il ne soit pas dégradé durant le procédé HFCVD. Par la suite, nous nous pencherons sur les propriétés électriques du matériau composite, ainsi que sur l'adhésion des nanotubes sur leur substrat. La dernière partie sera consacrée à la mise au point d'un biocapteur.

## V.B. Gravure catalytique du diamant assistée par filament chaud

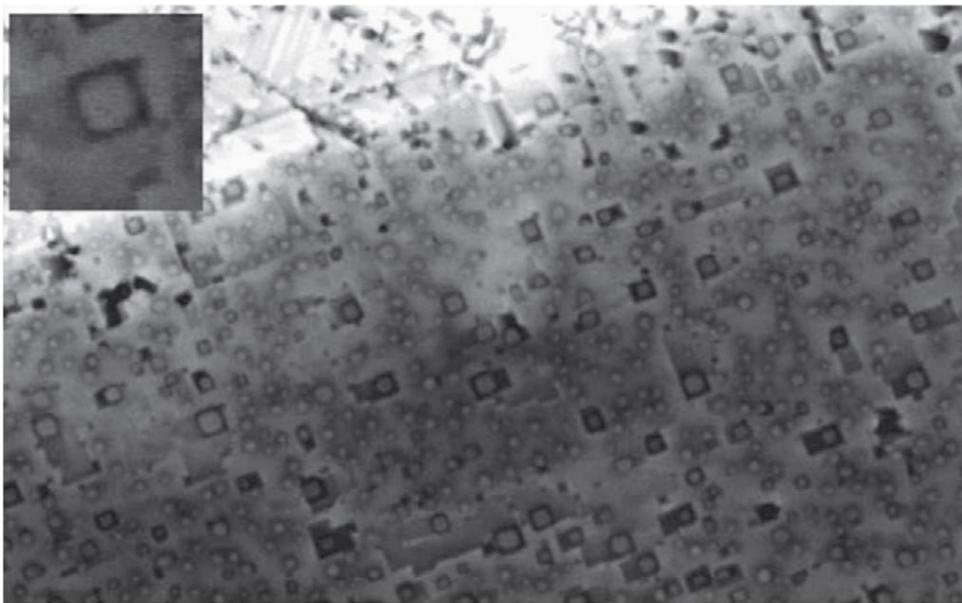
Cette nouvelle technique de gravure est basée sur les propriétés particulières des catalyseurs métalliques et en particulier celles du palladium et du nickel. Ces métaux sont connus et utilisés depuis longtemps pour leurs propriétés réductrices dans le domaine de l'industrie chimique au sens large (alimentation, pharmacie, savonnerie, parfumerie, peinture...). On les connaît également pour leur utilisation comme catalyseur en chimie organique. On pense au Nickel de Raney ou au charbon palladié. Leur activité catalytique s'effectue en phase hétérogène et consiste souvent en une hydrogénation. Au-delà de la chimie organique qui constitue leur domaine d'application historique en tant que catalyseur, ils possèdent également des propriétés intéressantes vis-à-vis de l'hydrogène, du carbone et de leurs mélanges. Ces métaux et en particulier le palladium, sont les meilleurs candidats en termes de potentialités pour les applications dans le domaine du stockage de l'hydrogène et de la dissociation du dihydrogène en hydrogène atomique [70, 71]. C'est sur cette propriété commune aux deux métaux que nous avons basés les études de cette partie. On trouve dans la littérature des exemples de gravures localisées du diamant assistées par des catalyseurs métalliques, comme le cobalt, le platine, le fer ou encore le nickel [71]. La technique de gravure utilisée est la même dans tous les travaux existants. Elle consiste au dépôt d'une couche de catalyseur métallique, puis au chauffage du substrat (600-900°C) dans un mélange gazeux contenant du dihydrogène. Cela engendre le démouillage et la gravure catalysée du diamant par les particules. Une image MEB de la gravure d'un échantillon monocristallin (100) assistée par du cobalt est présentée sur la Figure V- 5.

Le mécanisme de gravure résulte de la conjonction entre deux phénomènes :



Le premier phénomène consiste en la graphitisation des atomes de carbone de la surface du diamant par la particule. Le carbone dissous est ensuite gazéifié par l'action du dihydrogène. Dans la gamme de température utilisée, il a été montré que les particules métalliques peuvent dissoudre les atomes de carbone du substrat (a) [72]. Les atomes de carbone peuvent dès lors diffuser dans ou sur la surface de la particule ; la diffusion en surface

est souvent privilégiée, car bien plus rapide. Des études ont mis en évidence que les défauts surfaciques de la particule agissent comme centre de nucléation et engendrent la formation de graphite sur la surface de la particule [68]. La particule se retrouve dans ce cas encapsulée dans une enveloppe graphitique [73]. Si, dans le même temps il y a de l'hydrogène dans la phase gazeuse, il sera alors dissocié en hydrogène atomique à la surface des particules de catalyseur [70]. Cet hydrogène atomique pourra alors gazéifier les phases graphitiques (ou amorphes) en surface mais également les atomes de carbone dissous (b). L'action conjuguée de ces deux effets induit ainsi une gravure locale du diamant, catalysée par les particules métalliques.



*Figure V- 5 : Image MEB d'une gravure d'un échantillon diamant monocristallin (100) catalysée par le cobalt, l'échantillon a été chauffé à une température de 800°C pendant 2 heures dans un mélange gazeux composé d'azote/Hydrogène (90/10). [71]*

Smirnov et al. [74] ont expérimentalement constaté que la vitesse de gravure est d'autant plus grande que la pression d'hydrogène et que la température sont élevées. Cet effet est lié au taux de formation de l'hydrogène atomique qui augmente avec la température. Cela met donc en évidence l'importance du rôle de l'hydrogène atomique dans le mécanisme.

Nous avons donc tenté d'améliorer cette gravure catalysée pour enterrer profondément les particules de catalyseurs afin de pouvoir les utiliser dans un second temps pour la croissance de nanotubes. Mais la limite de la méthode précédemment citée est la vitesse de gravure. On remarque qu'au bout de deux heures de traitement les particules ne sont toujours pas enterrées dans le substrat diamant. Nous avons donc choisi d'utiliser la méthode HFCVD

pour essayer d'augmenter la vitesse de gravure et ainsi créer des pores de plusieurs centaines de nanomètres de profondeurs. Les paramètres standards utilisés durant l'étude sont reportés dans le Tableau V- 2. Comme pour la croissance de nanotubes, le nickel et le palladium ont tout deux été utilisés durant les expériences de gravures et présentent des conditions de gravure similaires. Les travaux qui seront présentés ici, sont basés sur les résultats obtenus avec le palladium.

Paramètres	Catalyseurs : Nickel, Palladium
Température filament (°C)	1850-1950
Température substrat (°C)	800
Pression (Torrs)	60
Epaisseur de catalyseur (nm)	3-5
Durée de la gravure (min)	5-45

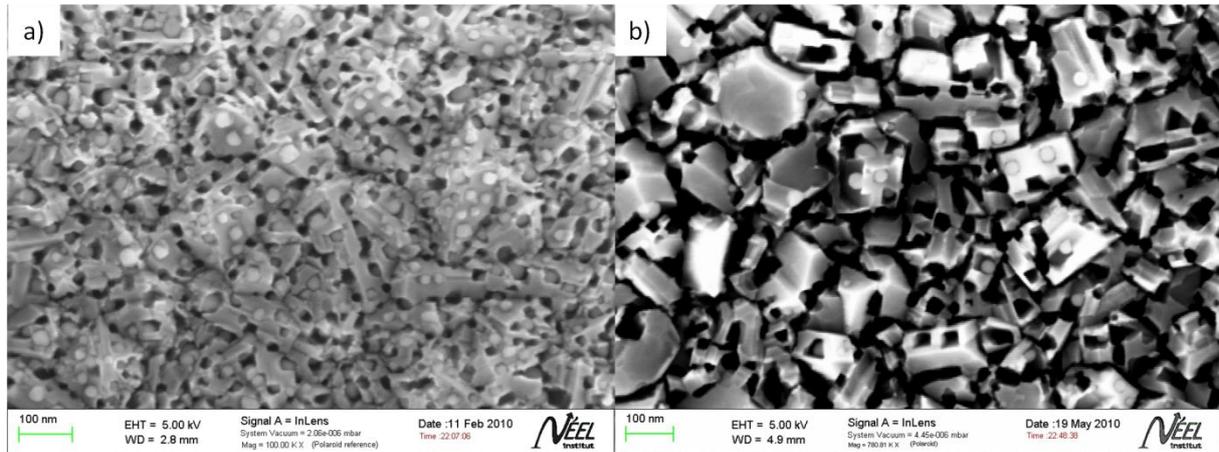
*Tableau V- 2 : Gamme de paramètres utilisée pour la gravure catalysée du diamant assistée par filament chaud.*

Sur les Figure V- 6.a et b, sont représentées les images MEB de deux échantillons diamant nanocristallins qui ont subi des gravures catalysées dans les conditions décrites dans le tableau précédent. Les temps de gravures sont de 10 (a) et 30 minutes (b).

On peut remarquer que dans le cas de l'échantillon gravé pendant 30 minutes la majorité des particules ne sont plus visibles. En revanche, dans le cas de l'image correspondant à un temps de gravure de 10 min, les particules ont commencé à pénétrer dans la couche diamant mais sont toujours visibles en vue de dessus. On constate aussi que la taille des pores générés par la particule est globalement de la taille de cette dernière.

La différence de vitesse de gravure entre la méthode thermique classique décrite dans la littérature et notre technique assistée par filament chaud, provient du taux d'hydrogène atomique mais également de la température surfacique du substrat. Dans le cas de la méthode thermique, l'hydrogène atomique est généré uniquement par la dissociation catalytique du dihydrogène gazeux par la particule métallique. Dans la méthode par filament chaud, une grande quantité d'hydrogène atomique est généré par le filament. Cet hydrogène atomique se retrouve en phase gazeuse et s'ajoute à celui issue de la décomposition catalytique de l'hydrogène par les particules. Comme nous l'avons vu, cet hydrogène atomique joue un rôle

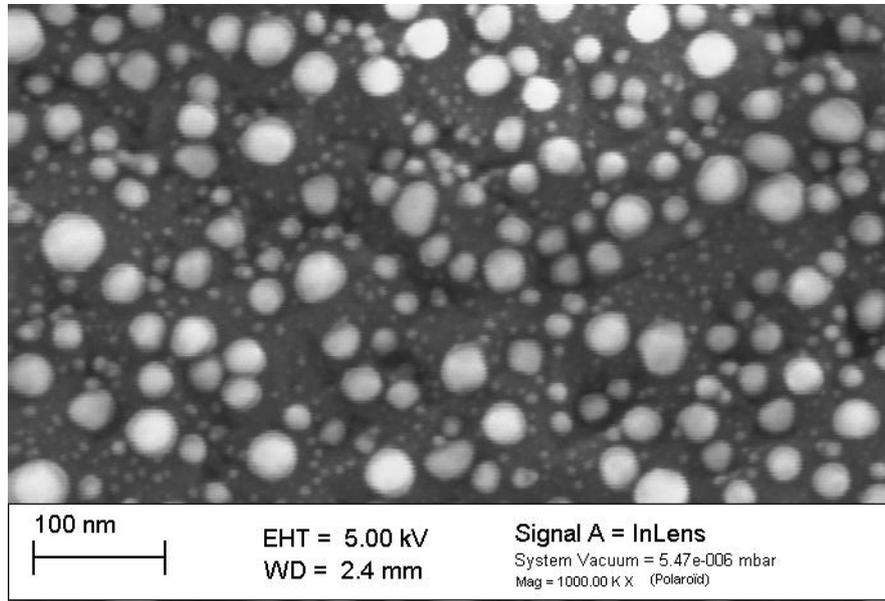
crucial dans le mécanisme de gravure, car il permet de gazéifier le carbone dissous dans la particule. Si sa concentration augmente, la cinétique de gravure augmente donc aussi.



*Figure V- 6 : Images MEB en électrons secondaires d'échantillons diamant nanocristallins gravés localement par HFCVD à l'aide de catalyseur palladium dans les conditions standards. Le temps de gravure est : a) de 10 min, b) de 30 min.*

La présence du filament chaud influe sur la température du substrat. Tankala [75] a montré que dans la gamme de pressions utilisée, le phénomène de conduction thermique dans la phase gazeuse est très faible. En revanche, la présence d'hydrogène atomique dans le milieu gazeux influe la température de la surface du substrat. La recombinaison de l'hydrogène atomique en dihydrogène étant très exothermique, elle contribue en grande partie à l'augmentation de la température surfacique du substrat diamant. Or, Anton [73] a mis en évidence un accroissement de la vitesse de dissolution des atomes de carbone du substrat dans la particule lorsque la température de la particule et de l'échantillon augmentait. La présence du filament chaud influe donc sur les deux phénomènes qui régissent la gravure et permet ainsi d'augmenter considérablement la cinétique de celle-ci. Pour mettre en évidence l'effet de l'hydrogène sur la gravure, nous avons réalisé une expérience dans les mêmes conditions que celle décrites précédemment, mais en l'absence d'hydrogène et avec comme support gazeux de l'azote. La Figure V- 7 montre une image MEB de l'échantillon après 15 minutes d'expérience. On peut voir que le film de catalyseur a démouillé, mais il n'y a pas eu de gravure du diamant par les particules. Si on s'intéresse aux grosses particules de l'image, on constate qu'elles sont composées d'un noyau très clair autour duquel apparaît une enveloppe présentant un contraste différent. Il s'agit en fait d'une couche de graphite ou de carbone amorphe. En effet, comme cela a été décrit plus haut [73], le palladium dissout le carbone du substrat qui cristallise ensuite à la surface de

la particule. En l'absence d'hydrogène, sa gazéification n'a plus lieu et la particule se retrouve donc rapidement encapsulée dans une enveloppe graphitique.



*Figure V- 7 : Images MEB en électrons secondaires d'un échantillon diamant nanocristallin traité par HFCVD dans les conditions de gravure standards sous une atmosphère d'azote gazeux. Le catalyseur utilisé est le palladium, le temps de gravure est de 15 min.*

Si on se reporte à la Figure V- 6.b, on observe que la majorité des particules sont enfouies dans la couche diamant mais on remarque aussi la présence de particule non enterrées en surface de certains grains diamant particuliers. Cela montre que la cinétique de gravure est différente en fonction de l'orientation cristalline du diamant. L'image MEB présentée sur la Figure V- 8.a montre clairement que seules les faces (100) n'ont pas été gravées. La Figure V- 8.b montre l'image MEB d'un grain diamant orienté (100) après gravure.

La différence de pénétration des particules selon l'orientation cristalline a également été observée par Takasu et al. [76]. Si on s'intéresse à la Figure V- 8.b, on remarque que la forme des pores engendrés par la gravure sur les faces (100) est tétraédrique. La Figure V- 9 illustre la représentation schématique du modèle tétraédrique associé à la forme des pores obtenus par la gravure assistée par le palladium des faces (100). La face supérieure correspondant à la base carrée de la pyramide et représente la surface du diamant dont l'orientation cristalline est (100), les quatre autres faces de la pyramide illustrent les plans (111). L'apparition des faces associées aux plans (111) semble indiquer que la vitesse de

gravure des plans (111) est limitante, ce qui induit une cinétique de gravure plus lente selon l'orientation (100). Takasu et al. ont conclu que les difficultés de gravure des plans (111) sont dues au fait que la distance interréticulaire  $d_{111}$  est la plus petite de toutes les familles de plan.

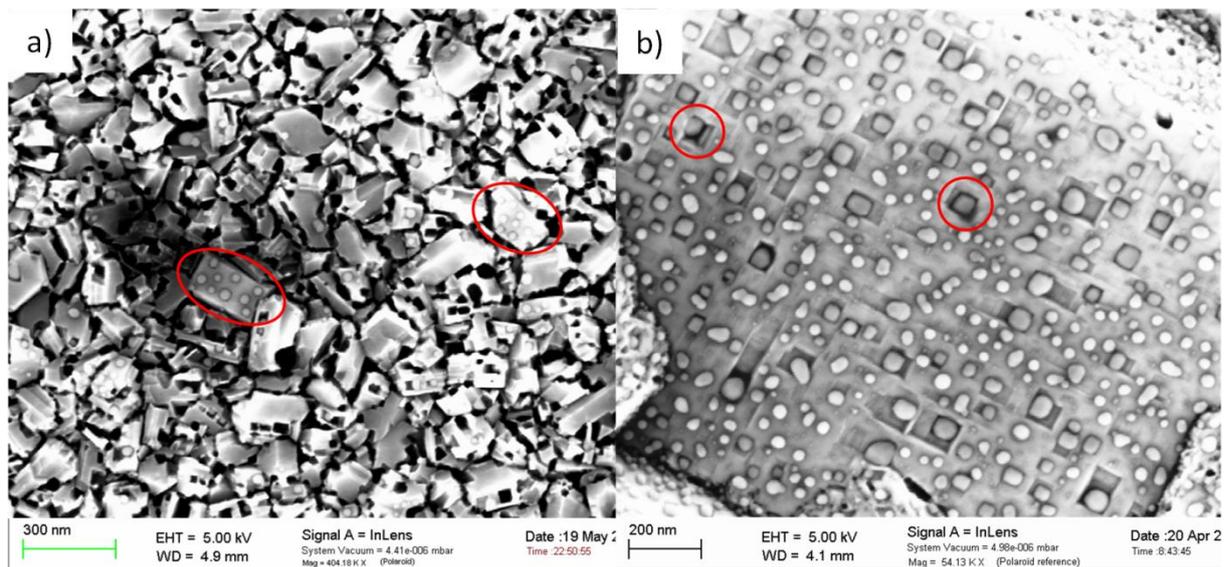


Figure V- 8 : Images MEB en électrons secondaires de la gravure catalysée par du palladium d'échantillons diamant nanocristallins.

Nous avons donc mis en évidence l'importance du rôle de l'hydrogène pendant la gravure. L'utilisation de la technique HFCVD permet d'augmenter la quantité d'hydrogène atomique et donc la vitesse de gravure. La technique assistée par filament chaud permet ainsi d'enterrer les particules de catalyseur dans le diamant à des profondeurs de l'ordre de la centaine de nanomètres.

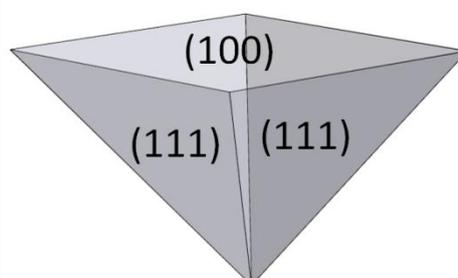
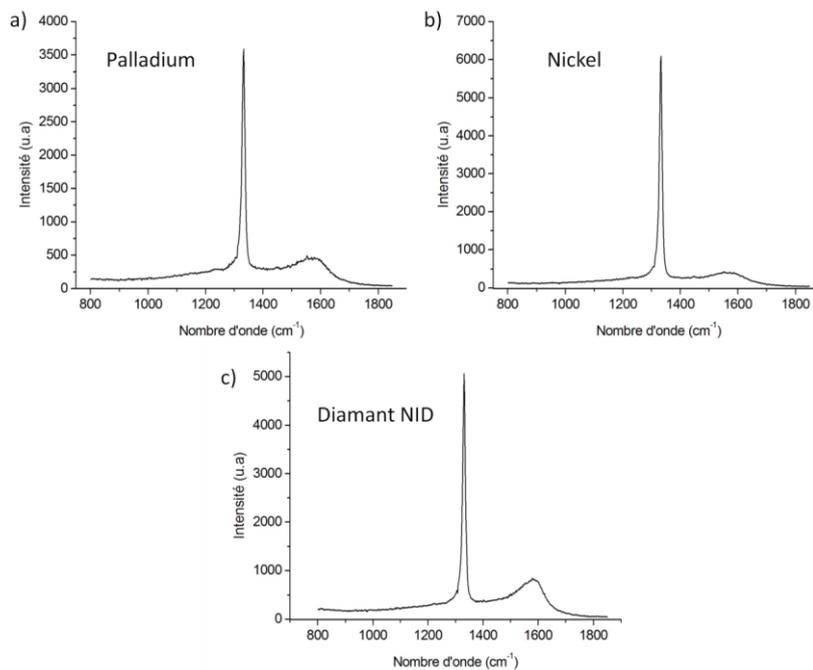


Figure V- 9 : Représentation schématique du modèle tétraédrique associé à la forme des pores obtenus par gravure du palladium sur les faces (100), les plans cristallins correspondant aux différentes faces de la pyramide y sont reportés.

Le mécanisme de gravure étant basé sur la dissolution des atomes de carbone du diamant dans la nanoparticule, il est donc possible qu'il y ait une graphitisation des surfaces des échantillons qui ont été en contact avec le catalyseur. Or le carbone en état d'hybridation  $sp^2$  ne présente pas un caractère biocompatible, cela implique donc que l'état de surface du diamant doit être conservé pour assurer la biocompatibilité du matériau composite final. Nous avons donc procédé à la caractérisation par spectroscopie Raman de la gravure d'échantillons diamant intrinsèques par HFCVD catalysée par du nickel et du palladium. Sur la Figure V- 10 sont présentés les spectres Raman des deux échantillons diamant gravés (a, b) et d'un échantillon diamant non gravé (c).



*Figure V- 10 : Spectres Raman d'échantillons diamant nanocristallins après gravure localisée par traitement HFCVD sous hydrogène catalysée par des nanoparticules de : a) Nickel, b) Palladium. La longueur d'onde de la source est de 244nm.*

Il faut tout d'abord noter que les trois échantillons diamant proviennent du même substrat de départ, ce qui implique que les différences observées ne peuvent être imputées qu'à l'étape de traitement HFCVD. Tous les spectres Raman sont identiques et caractéristiques des échantillons diamant nanocristallins. Le pic diamant est situé à  $1332\text{ cm}^{-1}$  et il affiche une largeur à mi-hauteur de  $9\text{ cm}^{-1}$ . La faible valeur de la largeur à mi-hauteur du pic diamant, indique la bonne qualité cristalline des échantillons diamant. L'absence de bande D est due à l'utilisation d'une source UV, peu sensible au carbone désordonné. On note tout

de même la présence de la bande G, ce signal provient des joints de grains du diamant composés d'atomes de carbone hybridés  $sp^2$ . Cette bande est caractéristique des échantillons diamant nanocristallins. Pour pouvoir déduire si le traitement HFCVD a entraîné une augmentation du taux de  $sp^2$ , il faut comparer le rapport de l'intensité de la bande G (associée au  $sp^2$ ) à celui du pic diamant appelé bande T. Après avoir ajusté la ligne de base nous avons calculé la valeur du rapport IG/IT qui est de 0,118 pour l'échantillon diamant non traité, de 0,078 pour celui dont la gravure a été catalysée par le palladium et de 0,041 dans le cas du nickel. On remarque que cette valeur est équivalente pour les trois échantillons et même légèrement inférieure dans le cas des échantillons gravés.

Cette légère différence peut s'expliquer par le fait que le traitement HFCVD sous hydrogène génère une quantité importante d'hydrogène atomique. Or la phase graphitique est très rapidement gravée par ce dernier, ce qui implique que durant le traitement il est possible qu'une partie des joints de grains sont également attaqués.

Nous avons également confirmé ce résultat par l'analyse XPS du carbone C1s d'un échantillon diamant lourdement dopé au bore dont la gravure a été catalysée par le palladium et d'un échantillon HBDD non traité. Comme dans le cas de l'étude Raman, les deux échantillons proviennent du même substrat diamant initial, leurs spectres sont présentés sur la Figure V- 11. Les détails liés à l'attribution des différentes composantes du pic C1s diamant sont présentés dans la partie II.C du chapitre II.

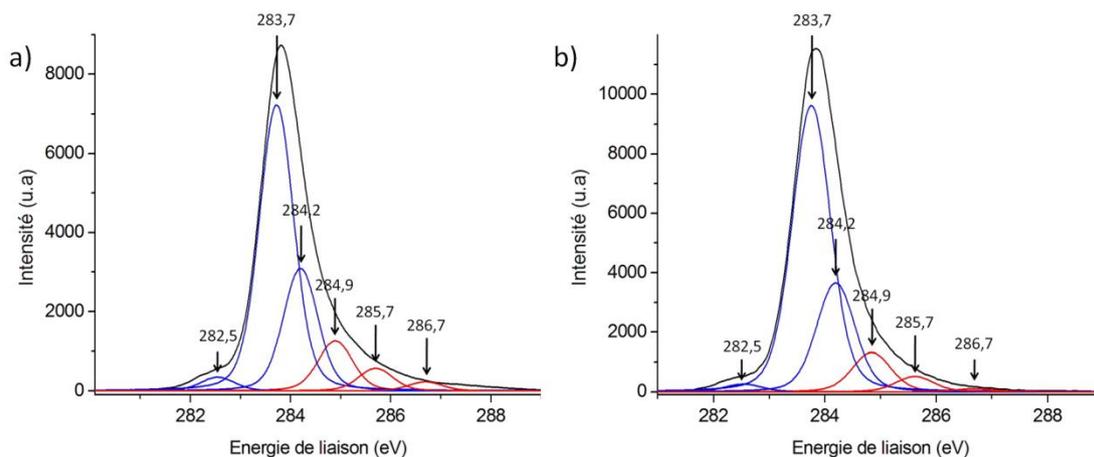


Figure V- 11 : Spectres XPS du pic C1s d'échantillons diamant nanocristallins lourdement dopés au bore : a) non traité, b) gravé par traitement HFCVD catalysé par du palladium.

On remarque que la position des différents pics associés aux groupements surfaciques du diamant obtenus par l'ajustement analytique des courbes expérimentales XPS du carbone C1s est identique pour les deux échantillons. Nous verrons dans la partie V.E, que la position du pic C1s associée au carbone  $sp^2$  se situe entre 284,2 et 284,6 eV [77], elle vaut 284,2 eV pour l'HOPG est 284,4 eV pour les nanotubes de [78]. Celle reliée au carbone amorphe se trouve entre + 1 et + 1,5 eV par rapport au carbone  $sp^2$  [79]. Aucune de ces composantes n'apparaît dans le cas de l'échantillon gravé. On remarque néanmoins une légère augmentation des aires associées aux fonctions hydrogénées et au carbone  $sp^3$  diamant et en parallèle une diminution des groupements relatifs aux dimères et aux oxydes de surface (Tableau V- 3). Ici encore, l'augmentation des composantes hydrogénées est liée à l'hydrogène atomique généré durant le processus de gravure. L'hydrogénation de la surface induite a pour effet de diminuer la valeur de l'aire associée aux composantes oxydées.

C1s	E (eV)	HBDD référence	HBDD gravé
C dimère	282,5	2,7	1,7
C $sp^3$ , CH	283,7	56,7	61,3
C (CH <sub>x</sub> , x= 2, 3)	284,2	24,3	26
C (C-OH)	284,9	10	8,2
C (C-O-C)	285,7	4,5	2,2
C (C=O)	286,7	1,8	0,6

*Tableau V- 3 : Tableau récapitulatif de la position, de l'assignation et de la contribution des composantes du carbone C1s de l'échantillon nanocristallin lourdement dopé après gravure.*

Les résultats XPS sont en corrélation avec les analyses Raman et confirment donc qu'il n'y a aucune modification de la structure du diamant lors de l'étape de gravure. Nous avons donc réussi grâce au procédé HFCVD, à réaliser une couche de diamant poreuse. La gravure localisée du diamant, permet d'enterrer les particules de catalyseur à l'intérieur de pores formés dans la couche. Même si nous n'avons pas cherché dans cette étude à optimiser les conditions de gravure de manière à ce que le catalyseur traverse entièrement la couche, la mise au point d'un matériau poreux semble concevable.

En parallèle, nous avons constaté que, dans certaines conditions, il était possible de procéder à la croissance de nanotubes en utilisant les nanoparticules enterrés. Nous verrons que l'ajustement des paramètres de synthèse permet de réaliser des dépôts de MWCNT par voie classique et à partir de particules enterrées. En nous appuyant sur une méthode développée dans l'équipe du SC2G, basée sur l'association de certains catalyseurs, nous

verrons qu'il est également possible d'obtenir des SWCNT. La partie suivante sera consacrée à la comparaison des conditions de croissance des nanotubes SWCNT avec les MWCNT obtenus par voie classique et à partir des catalyseurs enterrés.

## V.C. Croissance des nanotubes

### ➤ *Nanotubes de carbone mono-paroi*

Nous nous sommes appuyés sur les travaux de Laetitia Marty et d'Anne-Marie Bonnot pour procéder aux premières croissances nanotubes dans le bâti HFCVD [58]. Ces travaux étaient portés sur la croissance de SWCNT basée sur une technique particulière faisant appel à une bicouche de catalyseur [80]. Cette méthode de croissance repose sur l'utilisation d'une bicouche de catalyseur Titane/cobalt. L'ordre de dépôt des couches est important, le titane doit être en contact direct avec le substrat. Les épaisseurs de chacun des catalyseurs déposés sont comprises entre 0,5 et 3 nm pour chaque catalyseur, avec une valeur standard de 1nm.

Nous avons utilisé dans cette partie des échantillons diamant microcristallins lourdement dopés comme substrats pour la croissance des nanotubes. Les conditions de croissance utilisées dans le cadre de cette étude sont présentées dans le Tableau V- 4.

Paramètres	
Epaisseur de la couche de catalyseur	1nm/3 nm (Ti/Co)
Température substrat	800°C
Température Filament	1920°C
% CH <sub>4</sub> dans H <sub>2</sub>	9%
Pression	60 Torr
Durée du dépôt	15 min

*Tableau V- 4 : Conditions de croissance des nanotubes de carbone monofeuillet en HFCVD.*

La Figure V- 12 montre une image MEB du dépôt de nanotubes effectué dans les conditions précédemment citées.

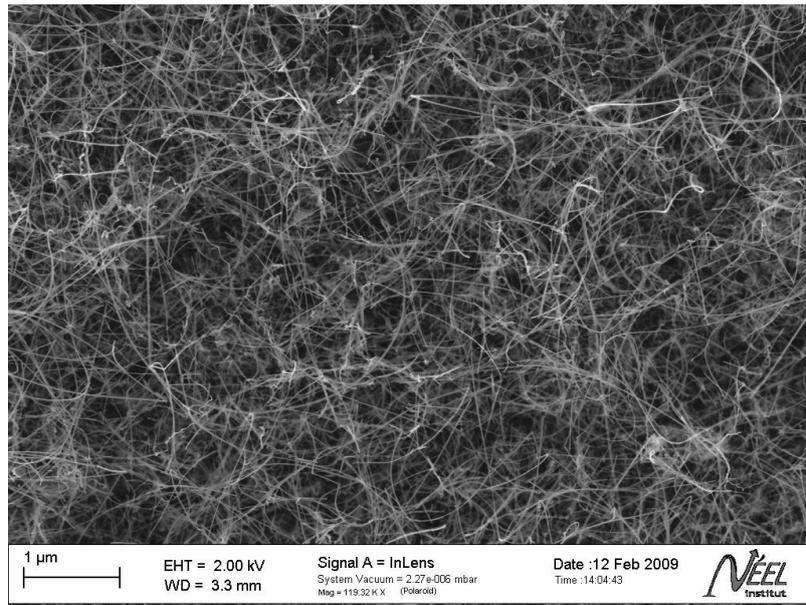


Figure V- 12 : Image MEB en électrons secondaires d'une croissance de SWCNT par HFCVD avec comme catalyseur une couche de Titane/Cobalt (1nm/1nm).

On remarque que la croissance n'aboutit pas sur un tapis dense de nanotubes alignés mais sur une couche de nanotubes enchevêtrés, appelé aussi réseau de nanotubes poreux. L'épaisseur de la couche de nanotubes est de l'ordre de quelques micromètres. On peut remarquer l'aspect rectiligne et très peu coudé des nanotubes, ce qui semble indiquer que les nanotubes présentent peu de défauts [81].

### ➤ *Nanotubes de carbone multi-parois obtenus par voie classique*

Nous avons dans un premier temps procédé à la croissance de nanotubes en testant un large panel de catalyseurs, tel que l'or, l'aluminium, le cobalt, le palladium et le nickel. Nous avons porté notre attention sur le nickel et le palladium pour les propriétés particulières qu'ils ont vis-à-vis de l'hydrogène. Ces propriétés ont permis de développer une méthode de gravure originale qui sera détaillée dans la partie V.B. Tous les substrats diamant que nous avons utilisés pour le reste de l'étude sont des échantillons nanocristallins lourdement dopés. Le choix d'utiliser des échantillons nanocristallins au profil des microcristallins, est basé sur deux critères. Le premier est la faible rugosité de surface, le deuxième est lié à la très bonne biocompatibilité des échantillons nanocristallins. Les conditions de croissance des nanotubes sont détaillées dans le Tableau V- 5.

Paramètres	Palladium	Nickel	Cobalt
T Substrat	800	800	800
T Filament	1900	1800	1920
% CH <sub>4</sub> /H <sub>2</sub>	9%	9%	9%
Temps de croissance	15 min	15 min	15 min
Epaisseur de catalyseur	3 nm	3 nm	3 nm
Pression	60 Torr	60 Torr	60 Torr

Tableau V- 5: Condition de croissance des nanotubes en HFCVD à partir de catalyseur Palladium et Nickel.

On remarque que les conditions de croissance sont quasiment identiques pour chacun des catalyseurs, on peut tout de même noter que la température filament appliquée dans le cas du nickel est un peu inférieure à celle requise pour le cobalt et le palladium. La caractérisation MEB des nanotubes obtenus par HFCVD selon les conditions de croissance décrites dans le Tableau V- 5, est présentée respectivement sur la Figure V- 13.a, b et c.

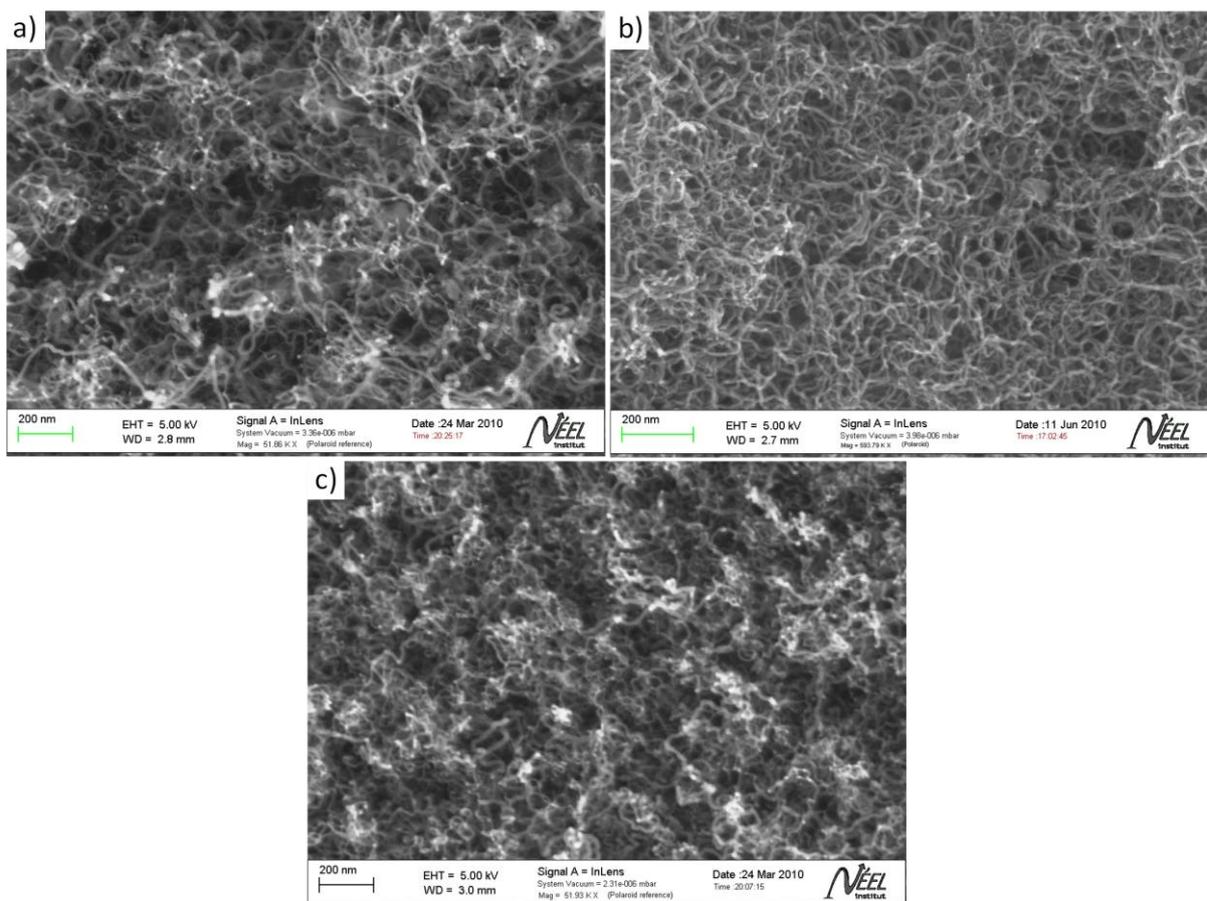
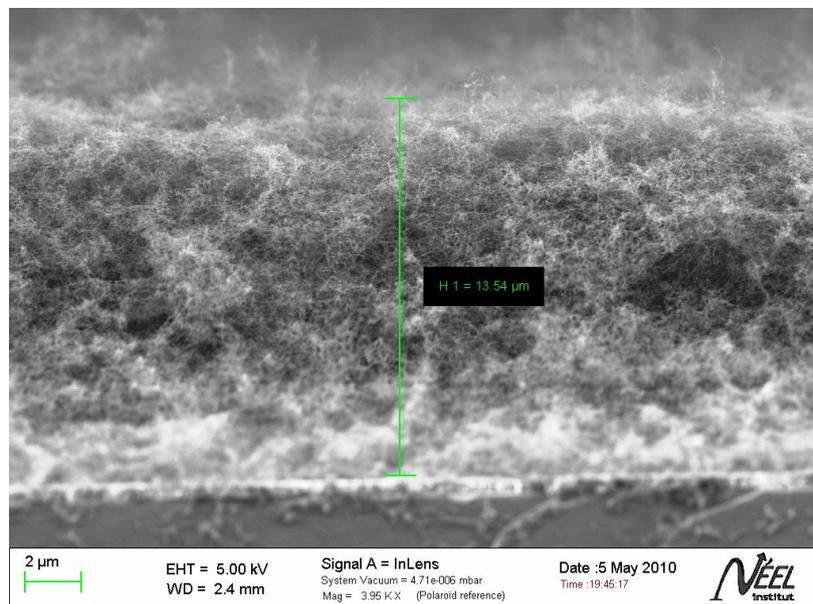


Figure V- 13 : Images MEB en électrons secondaires d'un tapis de nanotubes obtenu par croissance HFCVD à partir de catalyseur de : a) Nickel, b) Palladium, c) Cobalt.

La morphologie des CNT est identiques pour chacun des trois catalyseurs, on remarque également que les nanotubes ont une structure « coudée » qui indique la présence de défauts inhérent aux MWCNT [81].

L'épaisseur du tapis obtenu dans le cas des synthèses des MWCNT est supérieure à celle des SWCNT ; elle est de l'ordre de la dizaine de micromètres. La Figure V- 14 montre une image MEB vue de côté, du bord d'un échantillon diamant/nanotubes multiparois. Sans avoir réalisé d'étude approfondie, nous avons observé expérimentalement qu'il est possible d'influer sur la densité du tapis en modifiant les paramètres de croissance. Il est en revanche impossible de contrôler précisément l'épaisseur du tapis de MWCNT avec le type de catalyseur utilisé dans cette étude.



*Figure V- 14 : Image MEB en électrons secondaires du bord d'un échantillon diamant/MWCNT en vue de côté, mettant en évidence l'épaisseur du tapis de nanotubes. Le catalyseur utilisé pour la croissance est le palladium.*

En se reportant à la Figure V- 13, on peut constater la présence d'une quantité importante de zones claires qui révèlent la présence de particules de catalyseurs situées dans la partie supérieure du tapis. La Figure V- 15 est une image MEB en électrons rétrodiffusés des nanotubes ayant comme catalyseur le palladium. On peut aisément distinguer sur la Figure V- 15, un nombre important de points clairs dispersés sur la surface du tapis. Ce sont les particules de catalyseurs qui se trouvent sur la partie supérieure du tapis. Cela signifie que la croissance des nanotubes s'effectue majoritairement selon le mode top-base. Le fait que la croissance soit gouvernée par ce mécanisme implique qu'un grand nombre de particules se

retrouveront systématiquement en « surface » du tapis et donc directement exposées aux espèces biologiques lors des applications. Bien que la toxicité des nanoparticules soit encore à l'étude, de nombreuses études ont déjà mis en évidence leur nocivité au travers, notamment, des réactions inflammatoires et du stress oxydant qu'elles engendrent dans l'organisme [82], [83]. Il sera toutefois possible de faire appel à des traitements chimiques oxydants tels que l'eau régale, de manière à dissoudre les nanoparticules avant les expériences d'implantation. Il reste néanmoins le problème majeur de l'adhésion des nanotubes qui constitue un verrou pour certaines des applications visées.

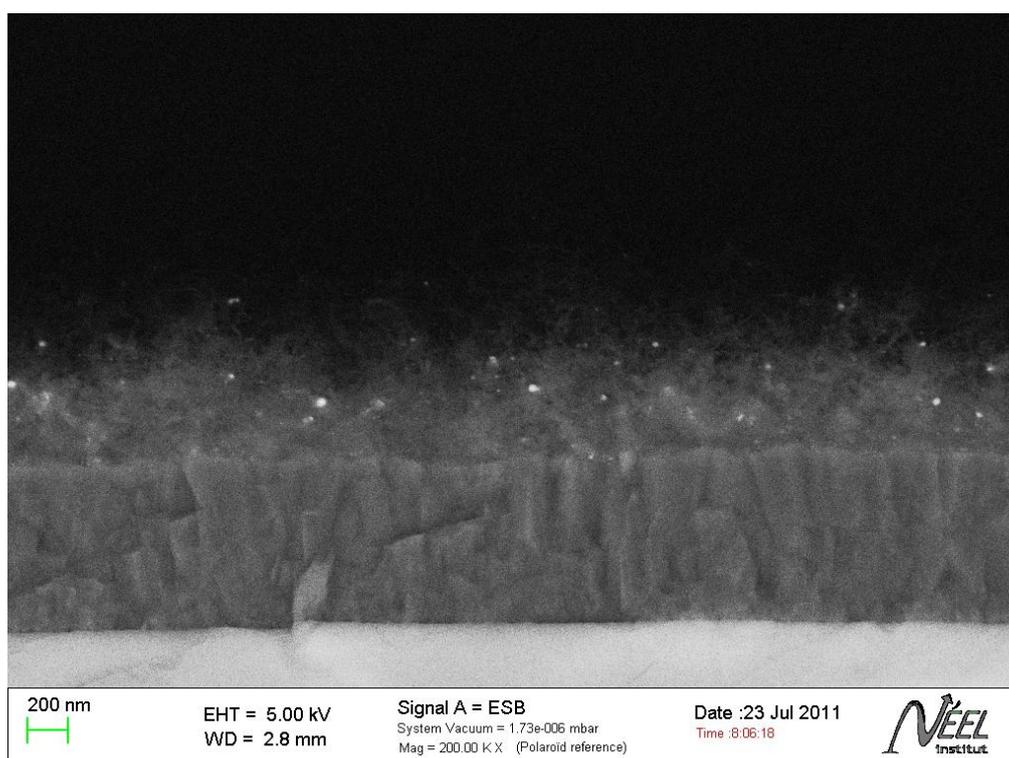


Figure V- 15 : Image MEB en électrons rétrodiffusés, du tapis de nanotubes obtenu en HFCVD avec comme catalyseur le palladium.

### ➤ *Nanotubes de carbone multi-parois enterrés*

Une série de manipulations visant à optimiser les paramètres a donc été menée et a montré que la croissance de nanotubes à partir des particules de catalyseurs enterrées était possible. Les conditions optimales pour la croissance des nanotubes à partir des catalyseurs palladium et nickel enterrés sont reportées dans le Tableau V- 6. On remarque que la température du filament nécessaire pour assurer la croissance des nanotubes dans les pores est

supérieure à celle utilisée dans le cas où ils ne sont pas enterrés. Cette augmentation de la température du filament a pour effet d'augmenter le taux de décomposition catalytique du méthane par le filament et donc d'augmenter la quantité d'espèces carbonées radicalaires et d'éthylène qui sont directement impliqués dans la croissance des nanotubes [84]. Le fait que ces espèces actives doivent diffuser à l'intérieur du pore pour pouvoir rentrer en contact avec la particule de catalyseur diminue nettement le temps de vie de ces dernières. Augmenter la quantité d'espèces carbonées permet donc de palier à ce problème.

Paramètres	Palladium	Nickel
T Substrat	800	800
T Filament	1930	1860
% CH <sub>4</sub> /H <sub>2</sub>	9%	9%
Temps de croissance	15 min	15 min
Epaisseur de catalyseur initiale	3 nm	3 nm
Pression	60 Torr	60 Torr

*Tableau V- 6 : Paramètres de la croissance HFCVD des nanotubes de carbone, catalysée par les particules enterrées.*

Sur la Figure V- 16.c est présentée une image MEB en électrons secondaires de l'interface diamant-nanotubes en vue de côté. On voit clairement sur cette image que la base des nanotubes se trouve bien dans la couche diamant, on les voit également sortir du film en remontant dans les pores générés lors de l'étape de gravure. On observe également à la base du pore la nanoparticule de palladium qui se retrouve encapsulée dans une enveloppe de carbone en fin de croissance. Les Figure V- 16.b et d, montrent des images MEB en SE2 d'une interface diamant-nanotube semblable à la précédente. Le contraste de phase entre les particules et le diamant permet d'affirmer que ce sont bien les particules métalliques de palladium qui se trouvent au sein de la couche diamant. La profondeur moyenne à laquelle se situent les particules enterrées que l'on observe sur la Figure V- 16.d est d'une centaine de nanomètres. L'expérience a montré que lorsque la distance entre la particule et la surface excède les 300 nanomètres il n'est plus possible d'obtenir un tapis de nanotube dense et uniforme.

Nous avons vu que dans le cas des nanotubes obtenus directement à partir du film de catalyseur, le mode de croissance était de type top-base. Les images MEB semble indiquer que dans le cas de la croissance des nanotubes dans les pores, le mode soit de type base-top. Ce modèle peut être comparé aux cheveux qui croissent à partir de leurs racines qui se

trouvent dans le cuir chevelu. Cette hypothèse est confirmée par l'image MEB en SE2 présentée sur la Figure V- 16.a, qui montre un tapis de nanotubes en vue de dessus sans aucune particule métallique dans sa partie supérieure.

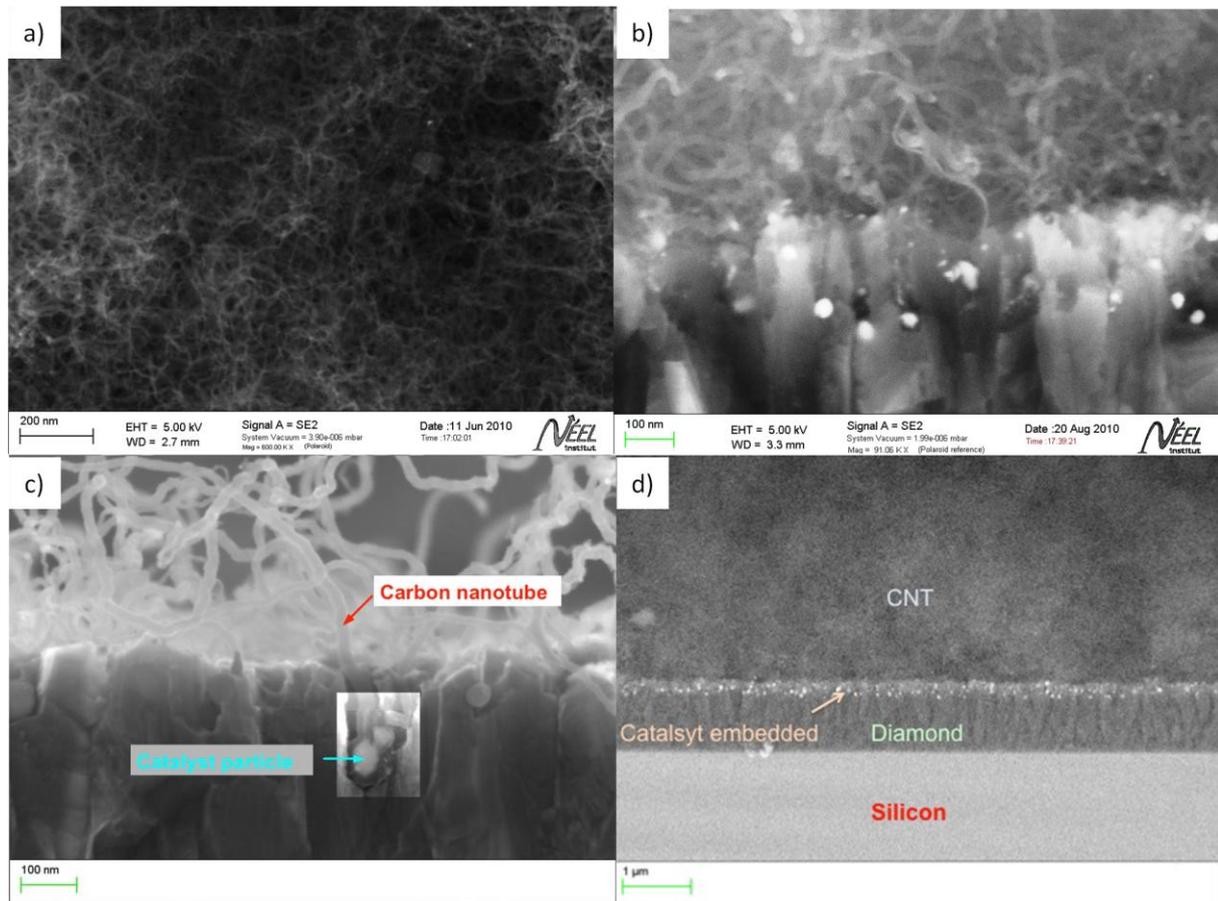
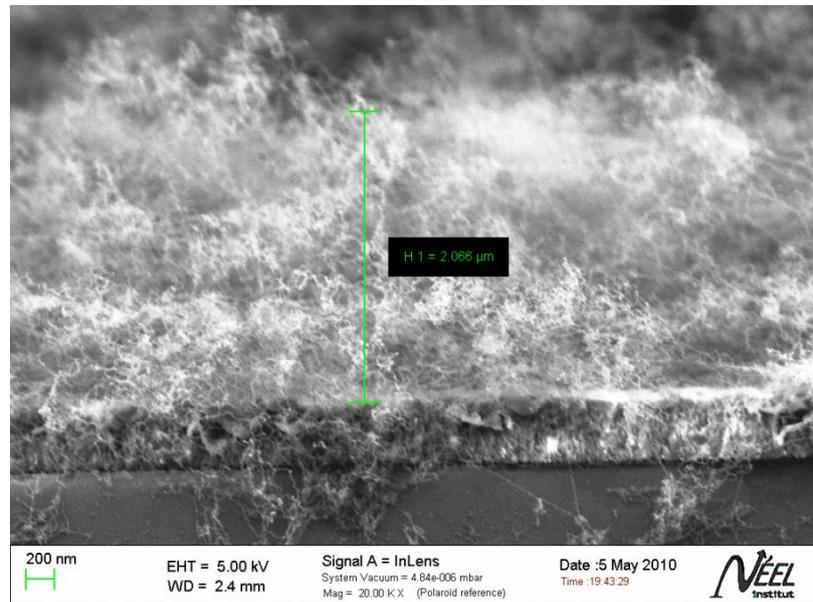


Figure V- 16 : Images MEB de nanotubes obtenus par HFCVD à partir de particules de palladium préalablement enterrés. a) Image en SE2 d'un tapis de nanotube en vue de dessus, b) et d) Images en SE2 de l'interface diamant-nanotube en vue de côté, c) Image en électrons secondaires de l'interface diamant-nanotube.

Au vu du type de croissance et de la position de la particule lors de celle-ci, il est possible que l'apport en précurseur carboné jusqu'au catalyseur soit rapidement limité. Cela aurait pour effet d'interrompre rapidement la croissance, donc de diminuer la longueur des nanotubes et d'obtenir des tapis de faible épaisseur. Or comme le montre l'image MEB de la Figure V- 17, l'épaisseur des tapis de nanotubes qui ont cru à partir des particules enterrées est de l'ordre du micron. Même si cette épaisseur est un ordre de grandeur en dessous des

croissances directes à partir du film de catalyseur, elle reste suffisante pour les applications visées.



*Figure V- 17 : Image MEB en électrons secondaires mettant en évidence l'épaisseur d'un tapis de nanotube obtenus par croissance HFCVD à partir de catalyseur enterrés.*

Cette étude MEB a permis de montrer que la morphologie des nanotubes qui ont crû dans les pores est similaire à celle des CNT obtenus directement à partir du film de catalyseur. Nous avons également mis en évidence que les nanotubes prennent racine sur la nanoparticule de palladium qui se trouve au sein de la couche diamant et croît selon le mode base-top. De plus l'épaisseur des tapis de nanotubes est suffisante pour les applications visées dans le cadre de cette étude.

Nous avons vu dans cette partie qu'il est possible d'utiliser les nanoparticules enterrées pour procéder à la croissance de nanotubes. La croissance de chaque type de nanotubes aboutit sur la formation d'un tapis de nanotubes poreux et non sur une forêt dense de nanotubes alignés. Ce type de tapis permet d'augmenter significativement la surface spécifique de l'électrode et convient parfaitement aux applications envisagées.

La résolution du MEB ne nous permettant pas de mettre en évidence le caractère mono ou multiparois des nanotubes, nous avons donc fait appel à la spectroscopie Raman pour vérifier que l'utilisation de la bicouche de catalyseur Ti/Co permet bien d'obtenir des

SWCNT. D'autre part, la caractérisation des couches par spectroscopie Raman nous permettra d'évaluer la qualité de nos tapis de nanotubes.

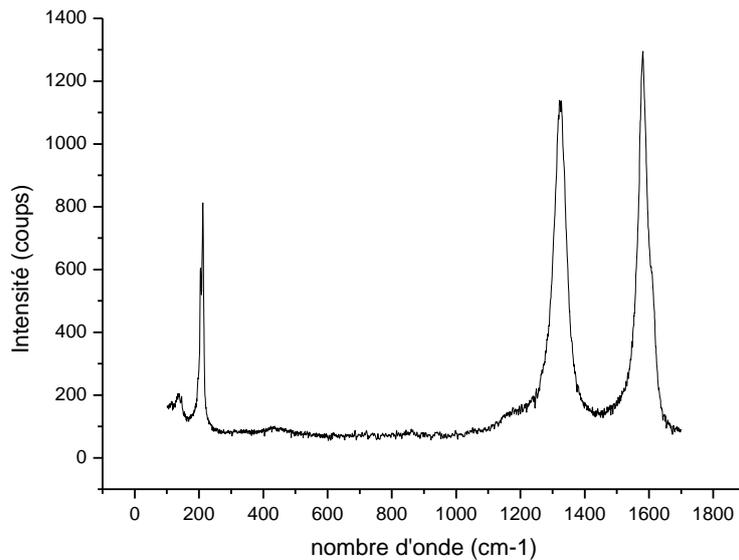
## V.D. Caractérisation des nanotubes par spectroscopie Raman

### ➤ *Nanotubes mono-paroi*

La spectroscopie Raman fait apparaître sur les SWCNT, les « Double-walled CNT » (DWCNT) ou les nanotubes à faibles nombres de parois des modes de vibrations de respiration des nanotubes ou « Radial Breathing Mode » (RBM) [85]. Ces modes sont liés au mouvement de vibration des atomes perpendiculairement à l'axe du tube. Ce mode de vibration nous renseigne sur le diamètre du tube, ainsi que sur la nature semiconductrice ou métallique de ce dernier [86].

Sur la Figure V- 18 est présenté le spectre Raman d'un dépôt de nanotube de carbone par HFCVD sur un échantillon diamant microcristallin. La longueur d'onde de la source utilisée est de 633nm.

Le spectre Raman des nanotubes de carbone sur diamant fait apparaître trois bandes distinctes, la bande G centrée à  $1580\text{ cm}^{-1}$ , la bande D centrée à  $1324\text{ cm}^{-1}$  et le pic associé au mode de respiration à  $211\text{ cm}^{-1}$ . La bande G est caractéristique de l'hybridation  $sp^2$  des nanotubes ; sa position est en accord avec les valeurs attribuées aux SWCNT dans la littérature [87]. La valeur de la largeur à mi-hauteur de la bande G des SWCNT isolés est faible ( $6\text{ cm}^{-1}$ ) [88], elle augmente dans le cas de paquet de nanotubes ( $80\text{ cm}^{-1}$ ) et peut être déconvoluée en plusieurs composantes [89]. La bande D est caractéristique du carbone désordonné, sa position, sa largeur à mi-hauteur, ainsi que sa dispersion en énergie varie en fonction de l'énergie de la source excitatrice [90]. Cette notion de carbone désordonné peut être liée à la présence de carbone amorphe, mais peut également refléter la présence de défauts cristallins qui détruisent la périodicité et donc l'ordre à grande distance. Il faut également noter la faible valeur de la largeur à mi-hauteur de la bande G qui indique la bonne qualité cristalline des nanotubes. Cette valeur augmente dans le cas où le nombre de défauts et d'impuretés présents dans le tapis est élevé [91].



*Figure V- 18 : Spectre Raman d'un tapis de nanotubes déposé par HFCVD sur un substrat diamant microcristallin. La longueur d'onde de la source est de 633nm.*

Comme nous l'avons vu dans la partie II.B, le choix de l'énergie du faisceau incident utilisé est important. En effet, les longueurs d'ondes excitatrices situées dans le rouge ou le proche infrarouge seront sensibles à la bande D alors que celles situées dans l'UV seront sensible au pic diamant. Néanmoins, l'utilisation d'un laser dans le rouge permet de faire apparaître les RBM des nanotubes. L'utilisation d'un laser à 633 nm, nous permet de mettre en évidence la présence d'un pic RBM qui indique clairement que le tapis contient un nombre important de nanotube SWCNT et/ou DWCNT. Il est caractéristique des SWCNT et des nanotubes avec un faible nombre de parois. Or, le diamètre des nanotubes de carbone issuent des synthèses basées sur l'utilisation de catalyseur métallique est de l'ordre de celui de la particule [92]. Dans notre cas, nous ne procédons pas à une étape de démouillage préalable. Ce dernier s'effectue durant les premiers instants de l'expérience. Il est donc difficile de contrôler parfaitement la taille des particules. Il a été montré que le diamètre des particules est à peu près dix fois supérieur à l'épaisseur du film déposé [74], ce qui implique que dans le cas d'un démouillage classique les particules de cobalt devraient avoir une taille d'une trentaine de nanomètres. La Figure V- 19 illustre le spectre Raman d'une croissance d'un tapis de nanotubes sur un substrat nanocristallin dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la croissance des SWCNT. En revanche, nous n'avons pas utilisé le couple Titane/Cobalt

comme catalyseur, mais seulement le Cobalt. Une épaisseur de 3 nanomètres de Cobalt a été déposée sur diamant. La longueur d'onde de source excitatrice utilisée est de 633nm.

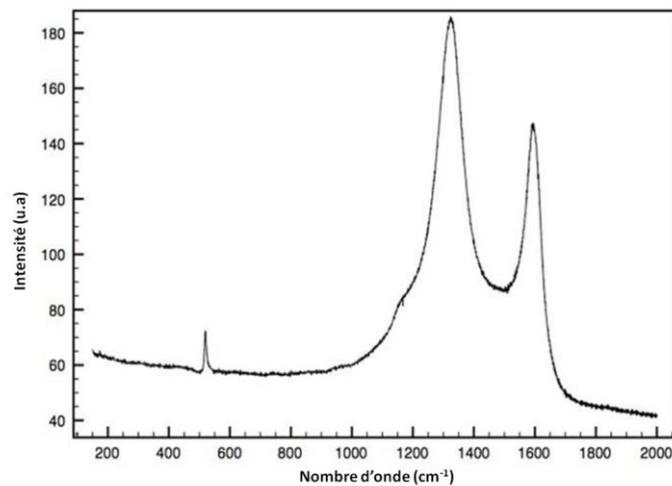


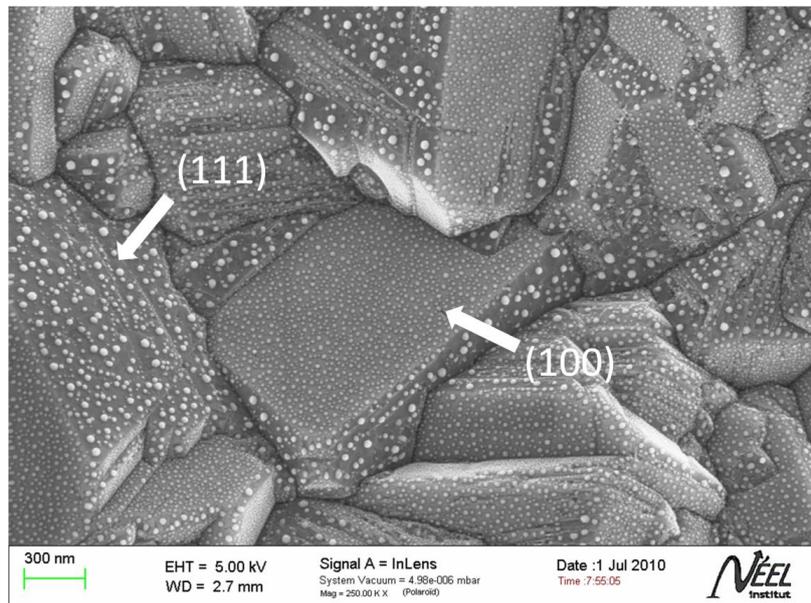
Figure V- 19 : Spectre Raman d'un tapis de nanotubes déposé par HFCVD, à partir d'une couche de cobalt de 3 nm, sur un substrat diamant nanocristallin. La longueur d'onde de la source est de 633nm.

On peut tout d'abord remarquer l'absence de pic associé aux modes de respiration des nanotubes, ce qui indique l'absence ou du moins la très faible quantité de tubes de type SWCNT. On observe deux pics prédominants centrés en 1323 et 1590 cm<sup>-1</sup>, ils correspondent respectivement à la bande D et G. On peut également observer un pic à 520 cm<sup>-1</sup> qui reflète la signature Raman du premier ordre du silicium. L'épaisseur du tapis de nanotubes est de l'ordre du micromètre ; elle est comparable à celle observée dans le cas du couple Ti/Co. L'épaisseur du diamant est quant à elle comprise entre 400 et 600 nm. Il faut également noter la présence d'un épaulement à 1160 cm<sup>-1</sup>, qui est caractéristique des couches de diamant nanocristallin et qui est associé aux phases de type transpolyacétylène présentes aux joints de grain [93].

On peut donc en déduire que l'utilisation du cobalt seul comme catalyseur lors des croissances HFCVD aboutit majoritairement à la formation de MWCNT. Cela montre donc l'importance du rôle du titane dans l'obtention de SWCNT. Il faut noter que le dépôt de SWCNT basé sur l'utilisation de catalyseur métallique est très compliqué lorsque l'étape de démouillage est effectuée in situ.

Le mécanisme précis de la croissance de nanotubes avec le couple de catalyseur Ti/Co n'est pas clairement mis en évidence. Néanmoins, l'expérience a montré qu'il est impossible de procéder à la croissance de CNT avec seulement du titane comme catalyseur. De plus le

titane est connu pour former une couche de carbure avec le diamant même à très basse température (400°C) [94], c'est pour cette raison que la plupart des contacts ohmiques réalisés lors de la conception de dispositifs sur diamant consiste à un dépôt de titane suivi d'un recuit [95]. Il semble donc que durant le dépôt, le titane forme un carbure à la surface du diamant et que le cobalt assure la croissance des nanotubes. La principale cause de l'inhomogénéité est due au fait que les tensions de surface sont différentes selon l'orientation cristalline des grains du diamant. La Figure V- 20 est une image MEB qui illustre le démouillage, par chauffage du substrat à une température de 600°C, d'une couche de cobalt de 3 nanomètres déposée sur un échantillon nanocristallin. La rampe de température appliquée est de 15°C/min puis la température est maintenue à 600°C pendant 20 min.



*Figure V- 20 : Image MEB du démouillage d'une couche de Cobalt métallique de 3 nanomètres déposée sur un échantillon diamant nanocristallin. Le démouillage est effectué par chauffage de l'échantillon à une température de 600°C pendant 20 min.*

La formation des nanoparticules est engendrée par la minimisation de la tension de surface du film métallique de catalyseur à l'interface « film/diamant » [96]. On peut remarquer la différence de taille des nanoparticules en fonction de l'orientation des grains de diamant, une évaluation de la distribution moyenne en taille des nanoparticules a été effectuée à l'aide du logiciel Image j. Nous nous sommes intéressés au démouillage sur les orientations cristallines (100) et (111), qui sont les plus représentées dans nos couches. Les résultats sont présentés sous formes d'histogrammes sur les Figure V- 21.a et b.

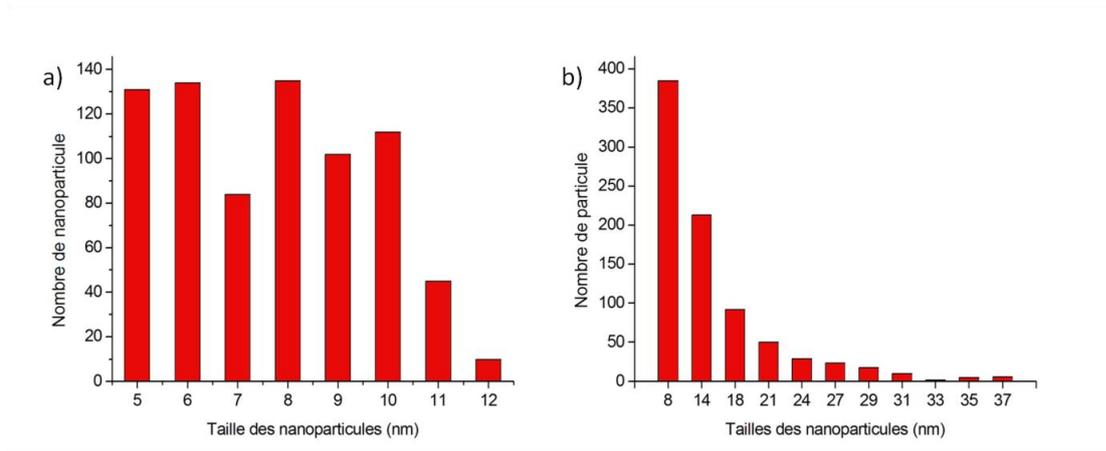


Figure V- 21 : Histogrammes de la distribution en taille des nanoparticules après démouillage d'une couche de cobalt de 3 nanomètres sur les orientations cristallines : a) (100) et b) (111).

La dispersion en taille sur les faces (111) est supérieure à celle des faces (100). De plus la taille moyenne des nanoparticules est plus élevée pour les orientations (111). Ce résultat est en accord avec ceux observés par Gheeraert et al. [97].

Nous avons ensuite procédé au démouillage d'une bicouche de catalyseur composée de 1 nanomètre de titane et de 3 nanomètres de Cobalt dans les mêmes conditions que l'expérience précédente. Deux images MEB du résultat sont présentées sur les Figure V- 22 Figure V- 24.

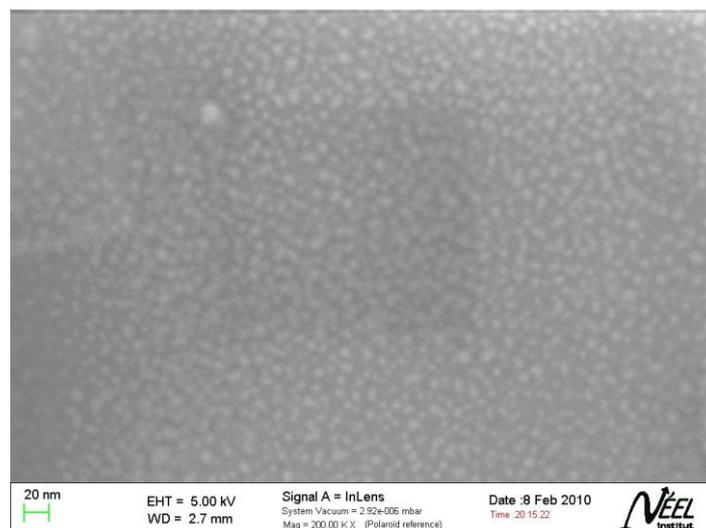


Figure V- 22 : Image MEB en électrons secondaires du démouillage d'une bicouche de catalyseurs Ti/Co (1/3 nm) déposée sur un échantillon microcristallin. Le démouillage est effectué par chauffage de l'échantillon à une température de 600°C pendant 20 min.

Contrairement au démouillage du cobalt sans titane, la première constatation est que l'on observe plus de différences significatives entre la taille des nanoparticules sur les différentes faces du diamant (Figure V- 24). De plus, comme le montre la Figure V- 22, la taille des particules est très inférieure à celle du démouillage du cobalt seul dans les mêmes conditions. La Figure V- 23 illustre la dispersion en taille des particules.

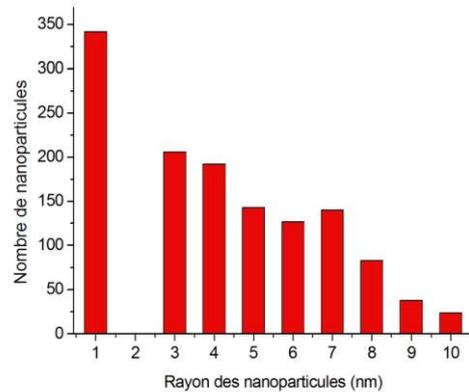


Figure V- 23 : Histogramme de la distribution en taille des nanoparticules après démouillage d'une bi-couche de 1 nanomètre de titane et de 3 nanomètres de cobalt.

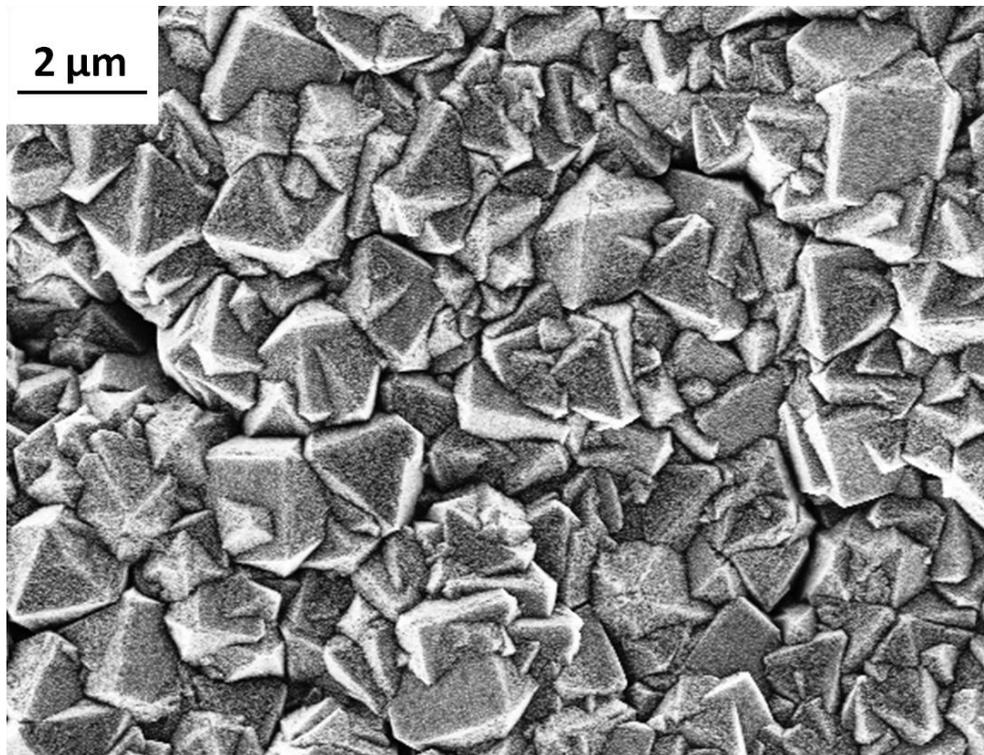


Figure V- 24 : Image MEB en électrons secondaires du démouillage d'une bi-couche de Ti/Co (1/3 nm), déposée sur un échantillon diamant microcristallin. Le démouillage est effectué par chauffage de l'échantillon à une température de 600°C pendant 20 min.

La formation du carbure pourrait modifier les tensions de surface et expliquer la bonne régularité et la faible taille des particules générées durant les croissances de nanotubes avec les Ti/Co.

Nous avons montré que la croissance des nanotubes est possible sur substrat diamant et que la technique choisie permet l'obtention d'un tapis enchevêtré majoritairement composé de nanotubes de carbone monoparoi. Dans la prochaine partie nous aborderons la caractérisation des nanotubes multiparois obtenus par voie classique

### ➤ *Nanotubes multi-parois par voie classique*

Sur la Figure V- 25 sont présentés respectivement les spectres Raman des nanotubes issus du nickel (a) et du palladium (b) ; la longueur d'onde de la source excitatrice utilisée est de 633 nm.

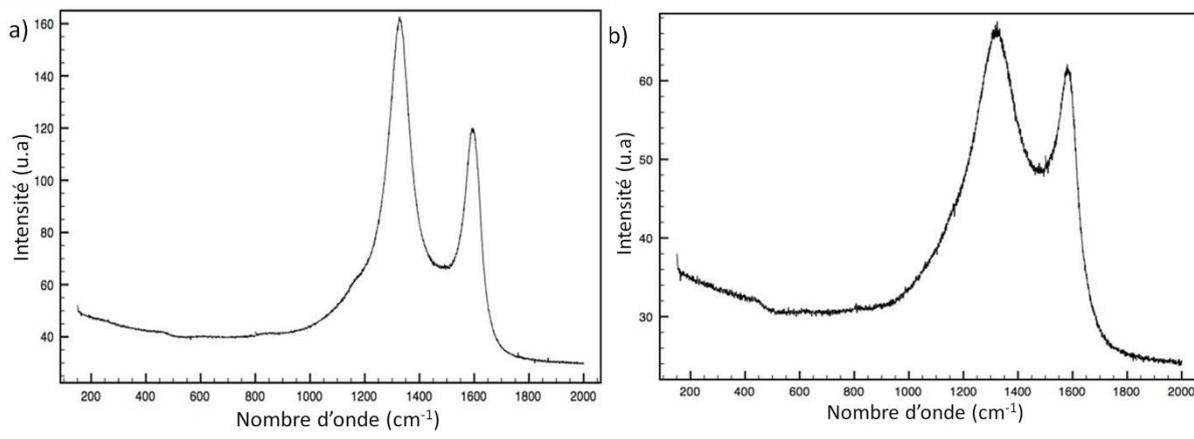


Figure V- 25 : Spectres Raman d'un tapis de nanotubes déposé par HFCVD sur un substrat diamant nanocristallin, avec comme catalyseur : a) du Nickel, b) du palladium. La longueur d'onde de la source est de 633nm.

On peut tout d'abord remarquer que sur chacun des deux spectres il n'y a pas de bande associée au RBM, cela signifie que le tapis obtenu est majoritairement composé de MWCNT. On peut ensuite noter la présence de deux pics présent dans le cas du nickel et du palladium, ce sont les bandes G et D. Dans le cas du Nickel les bandes D et G sont positionnées respectivement à 1322 et 1590  $\text{cm}^{-1}$  pour le nickel et à 1321 et 1582  $\text{cm}^{-1}$  pour le palladium. La position de ces pics est en accord avec les valeurs que l'on trouve dans la littérature [87,

98] et correspond à la signature du carbone dans les phases  $sp^2$ . Il faut également souligner la présence d'un épaulement à  $1160\text{ cm}^{-1}$  qui met en évidence la présence de phases de type transpolyacétylène caractéristiques des échantillons nanocristallins.

Il est bon de rappeler que les tapis de nanotubes peuvent contenir du carbone amorphe qui provient, entre autre, de l'encapsulation de la particule métallique en fin de croissance. Or en spectroscopie Raman, il est peu évident de différencier les défauts cristallins des nanotubes du carbone amorphe éventuellement présent dans le tapis. Néanmoins, cette quantité est communément évaluée en comparant le rapport de l'intensité des bandes G et D et la largeur à mi-hauteur des bandes D et G [91]. Cela permet de comparer deux types d'échantillons analysés dans les mêmes conditions mais ne permet pas de tirer de conclusion univoque sur la présence ou non de carbone amorphe dans le tapis.

La différence majeure qu'il existe entre les deux spectres est liée au rapport ID/IG, ce rapport est de 1,4 dans le cas du nickel et de 1,1 pour le palladium. Ce rapport ne peut être comparé que pour des études utilisant des sources excitatrices de mêmes énergies car comme nous l'avons vu, l'utilisation des longueurs d'onde dans le rouge et le proche infrarouge permet de faire apparaître les modes de respiration des nanotubes mais en revanche elles exaltent la bande D. La valeur de ce rapport est généralement supérieur à 1 dans le cas des MWCNT et inférieur à 1 pour les SWCNT [43]. Nous avons ensuite calculé la largeur à mi-hauteur de la bande G et D. Les valeurs trouvées pour les bandes D et G respectivement sont dans le cas du palladium de 125 et  $90\text{ cm}^{-1}$  et de 103 et  $65\text{ cm}^{-1}$  dans le cas du nickel. La différence entre les largeurs à mi hauteur des bandes G montre clairement que la qualité cristalline des nanotubes issus du nickel est meilleure que celle provenant du palladium.

L'étude Raman nous a permis de montrer le caractère multiparois des nanotubes obtenus par croissance HFCVD en utilisant comme catalyseur le nickel et le palladium. Cette étude a permis de mettre en évidence que la qualité du tapis dans le cas des SWCNT est supérieure à celle des MWCNT. Nous avons également constaté que la qualité du tapis de nanotubes obtenu à partir du nickel est supérieure à celle associée au palladium. En revanche les croissances catalysées par le nickel aboutissent sur des nanotubes de meilleure qualité cristalline. Nous allons procéder à la caractérisation des nanotubes enterrés.

### ➤ *Nanotubes multi-parois enterrés*

Nous avons donc procédé à la caractérisation des nanotubes qui ont crû à partir des catalyseurs Nickel et Palladium implanté. La longueur de la source utilisée pour la caractérisation est de 514 nm, les spectres obtenus sont présentés sur la Figure V- 26.

On peut tout d'abord noter l'apparition de la bande diamant située à  $1333\text{ cm}^{-1}$  qui apparaît plus nettement sur le spectre du palladium. A la différence des études Raman précédentes où la longueur d'onde de la source était de 633 nm, l'utilisation du laser Argon permet d'être plus sensible au carbone  $\text{sp}^3$  et moins au carbone amorphe. On note ensuite la présence de la bande D associée au carbone désordonné à  $1350\text{ cm}^{-1}$ . Si on s'intéresse au spectre Raman du Nickel, on remarque la présence de la bande G associée au carbone  $\text{sp}^2$  qui apparaît à  $1580\text{ cm}^{-1}$ , on peut aussi noter la présence de l'épaule à  $1610\text{ cm}^{-1}$ . Ce dernier correspond à la bande D2 ou D' reflète la présence de défauts cristallins qui détruisent la symétrie et font apparaître des modes éteints en l'absence de défaut [91, 99]. En revanche dans le cas du palladium, on observe un pic unique associé à la bande G à  $1595\text{ cm}^{-1}$ . La largeur à mi-hauteur de la bande G dans le cas du palladium est de  $88\text{ cm}^{-1}$ , elle est de  $65\text{ cm}^{-1}$  pour le nickel. Ce résultat indique que les nanotubes issus de la croissance à partir de catalyseur de nickel présentent une meilleure structure cristalline que ceux basés sur l'utilisation de palladium. Ce résultat confirme les résultats observés lors de l'étude de la croissance de nanotubes non enterrés traités précédemment.

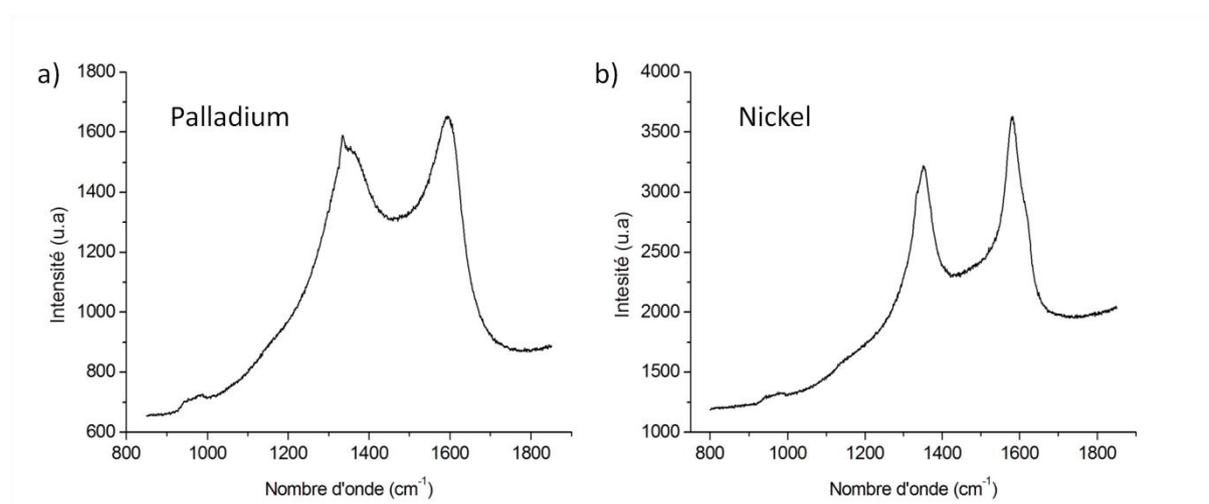


Figure V- 26 : Spectres Raman de tapis de nanotube obtenus par croissance HFCVD à partir des catalyseurs enterrés : a) Palladium, b) Nickel. La longueur d'onde de la source est de 514 nm.

Cette étude Raman nous a montré que les nanotubes dont la croissance est catalysée par des nanoparticules de nickel enterrées ont une meilleure qualité cristalline que ceux dont la croissance est catalysée par le palladium. Il reste néanmoins à comparer les nanotubes issus de nanoparticules enterrées et non enterrées en utilisant le même catalyseur dans les deux cas. La Figure V- 27 montre les spectres Raman de tapis de nanotubes provenant du catalyseur palladium enterré et non enterré. On remarque que les nombres d'ondes associés aux bandes D et G sont identiques pour les deux spectres, leurs valeurs sont  $1321$  et  $1590\text{ cm}^{-1}$  respectivement. La valeur du rapport ID/IG vaut  $1,1$  dans le cas du palladium non enterré et  $1,4$  pour le palladium enterré. La largeur à mi-hauteur de la bande G des spectres vaut  $83,8\text{ cm}^{-1}$  dans le cas des nanotubes qui ont crû à partir des catalyseurs non enterrés et  $88,7\text{ cm}^{-1}$  dans le cas des enterrés. Au vue de l'évolution des largeurs à mi-hauteur et des rapports ID/IG, nous pouvons affirmer que la qualité du tapis de nanotubes enterrés est inférieure à celui obtenu par voie classique.

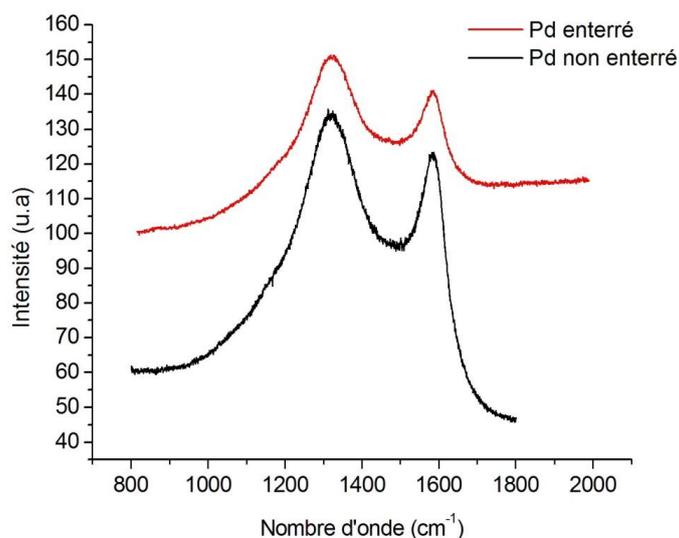


Figure V- 27 : Spectres Raman de tapis de nanotubes obtenus par croissance HFCVD à partir du catalyseur palladium enterré et non enterré. La longueur d'onde de la source est de  $514\text{ nm}$ .

Cette étude Raman a permis de mettre en évidence que les tapis de nanotubes obtenus à partir des particules de nickel enterrées sont de meilleure qualité que ceux issus de la croissance à partir du palladium enterré. Les augmentations concomitantes des largeurs à mi-hauteur de la bande G et des rapports ID/IG, ne permettent pas de conclure quant à un accroissement de la quantité de carbone amorphe ou à une diminution de la qualité cristalline

des nanotubes. Or, la spectroscopie Raman ne nous permet pas de conclure quant à la nature de ce carbone désordonné. De plus, la profondeur sondée par spectroscopie Raman est trop importante pour nous permettre de mettre en évidence la localisation de ce carbone désordonné. Nous devons donc faire appel à une technique de caractérisation plus surfacique telle que l'XPS.

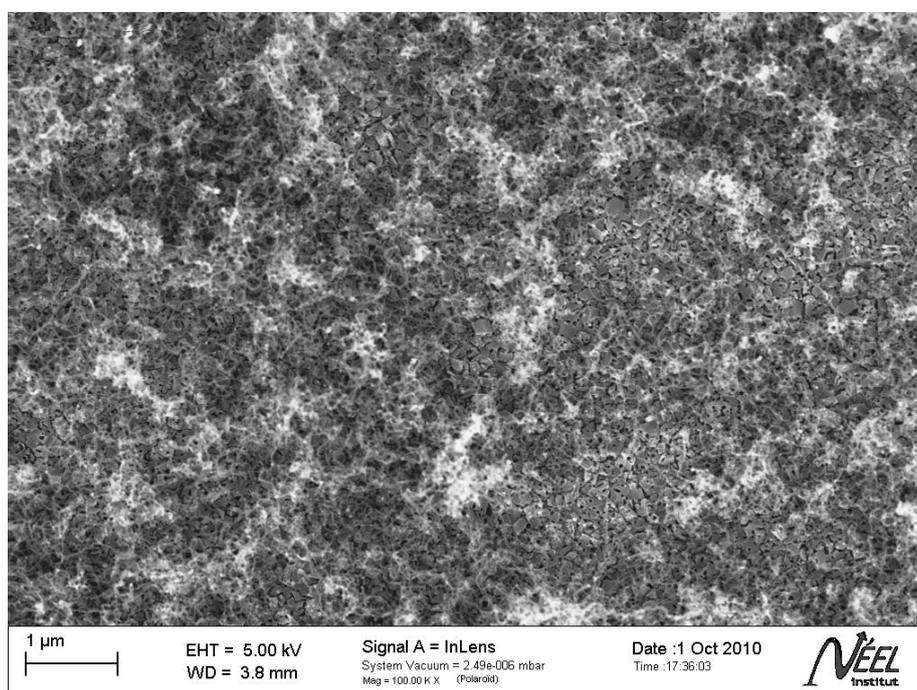
## V.E. Caractérisation des nanotubes par XPS et XEELS

Aucuns travaux antérieurs portant sur les MWCNT n'ayant été menés au sein de l'équipe, nous avons procédé à la caractérisation des nanotubes multiparois par différentes techniques permettant de sonder les états énergétiques des niveaux de cœur des atomes de carbone. A la différence du Raman qui nous renseigne sur l'ordre à grande échelle, l'XPS et le XEELS permettent de sonder l'état énergétique des atomes. Les nanotubes ont également été caractérisés par spectroscopie Auger, cette étude est reportée dans les annexes. Les détails de ces différentes techniques ont été abordés dans le chapitre I.

Afin de pouvoir déterminer l'origine de l'augmentation du taux de carbone désordonné observé en spectroscopie Raman dans le cas de la croissance des nanotubes à partir des catalyseurs, nous avons dû procéder à une caractérisation XPS sur un échantillon partiellement recouvert par les nanotubes pour pouvoir recueillir un signal provenant du diamant et des nanotubes. De plus, pour que la comparaison soit tangible, il faut que la croissance s'effectue avec les paramètres standards de croissance des nanotubes dans les pores. Or l'obtention de tapis de nanotubes de très faible densité en HFCVD est extrêmement compliquée car après seulement quelques secondes de croissance, une forte quantité de nanotubes est déjà présente sur le substrat. Nous avons donc opté pour utiliser un échantillon dont les nanoparticules de palladium ont été enterrées trop profondément pour assurer une croissance uniforme des nanotubes. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la profondeur de pénétration optimale moyenne pour s'assurer d'obtenir un tapis dense et homogène est de l'ordre de 150 à 200 nanomètres. Nous avons observé que le temps de gravure permettant d'atteindre une profondeur d'enterrement moyenne des particules comprise entre 150 et 200 nanomètres est de 8 minutes. Nous avons donc procédé à une gravure catalytique assistée par filament chaud dans les conditions classiques pendant une durée de 30 min. Le temps de traitement appliqué ici nous assure que la majorité des

particules ne pourront pas assurer la croissance des nanotubes. Une image MEB de l'échantillon après croissance est présentée sur la Figure V- 28.

On peut constater sur l'image MEB que le tapis de nanotubes obtenu n'est pas continu ; on aperçoit de nombreuses zones du substrat diamant non recouverte. Cela montre bien qu'un nombre réduit de particules a participé à la croissance des nanotubes. Il semble donc possible dans ces conditions de pouvoir recueillir un signal XPS des nanotubes et du diamant.



*Figure V- 28 : Image MEB en électrons secondaires d'un tapis de nanotubes épars obtenu par HFCVD à partir de nanoparticules de palladium enterrées dans le substrat diamant par gravure catalytique assistée par filament chaud.*

Nous avons dans cette étude comparé les spectres XPS d'un échantillon de nanotubes obtenus par voie classique à partir d'une couche de palladium de 3 nm (Figure V- 29.a) et celui du tapis épars (Figure V- 29.b) correspondant à l'image MEB de la Figure V- 28. L'angle d'incidence entre la source et les échantillons nanotubes est comme pour le diamant de 51°. Dans le cas des nanotubes obtenus par voie classique, l'épaisseur du tapis étant de 2 micromètres, on peut considérer sans approximation que les photoélectrons X collectés ne proviennent que des nanotubes.

Le spectre XPS du pic du carbone C1s des nanotubes de carbone non enterrés est centré à 284,4 eV et à 283,3 eV pour les nanotubes enterrés. Nous avons choisi comme largeur à mi-hauteur pour la lorentzienne 0,5 eV. Ce qui correspond dans notre cas à une largeur à mi-hauteur totale du pic de 0,86 eV. La valeur associée au graphite est de 1 eV et de 1,1 eV pour les MWCNT [100], on trouve généralement une fourchette de valeur qui va de 0,75 eV pour les SWCNT purifiés à 1,4 eV pour les MWCNT [101]. Cette valeur augmente également lorsque l'état d'oxydation des nanotubes augmente [102]. L'ajustement analytique des données expérimentales fait apparaître six composantes distinctes pour le tapis épais et sept pour le tapis épars. Les six pics associés aux nanotubes sont identiques pour chacun des spectres. La composante principale apparaît à 284,3 eV ; elle correspond aux atomes de carbone hybridés  $sp^2$  des nanotubes. Cette valeur est en accord avec les valeurs reportées dans la littérature pour les nanotubes de carbone multiparois [77, 103, 104]. Il est établi que la composante du carbone  $sp^2$  des MWCNT diffère de celle du graphite. La valeur du pic associé au graphite est de 284,6 eV et celle des nanotubes de carbone multiparois est décalée de -0,3 eV [100]. On remarque ensuite un pic situé à 285,2 eV qui est associé au carbone  $sp^3$  amorphe [105]. On trouve ensuite une série de trois composantes, caractéristiques des différents fonctions oxydées présentes sur les nanotubes [102, 103]. Ces pics apparaissent à 286.2, 287.3 et 288.8 eV; ils sont respectivement associés aux fonctions C-O (alcools et éthers), aux fonctions C=O (cétone, aldéhydes) et aux fonctions carboxyliques. Enfin on trouve un dernier pic centré en 290,3 eV provenant des pertes d'énergies associées aux transitions électroniques interbandes  $\pi$ -plasmons [101]. Ce pic sera étudié dans le cadre de l'étude des pertes en énergie relatives aux tapis de nanotubes de carbone. Comme nous le verrons dans le cadre de l'étude EELS, l'écart entre ce pic et le pic du carbone  $sp^2$  centré à 284,3 eV est de + 6 eV. Le spectre correspondant aux nanotubes enterrés, fait apparaître une composante supplémentaire située à 283,7 eV qui correspond à la position du pic diamant des échantillons diamant nanocristallins (conf. Chapitre I).

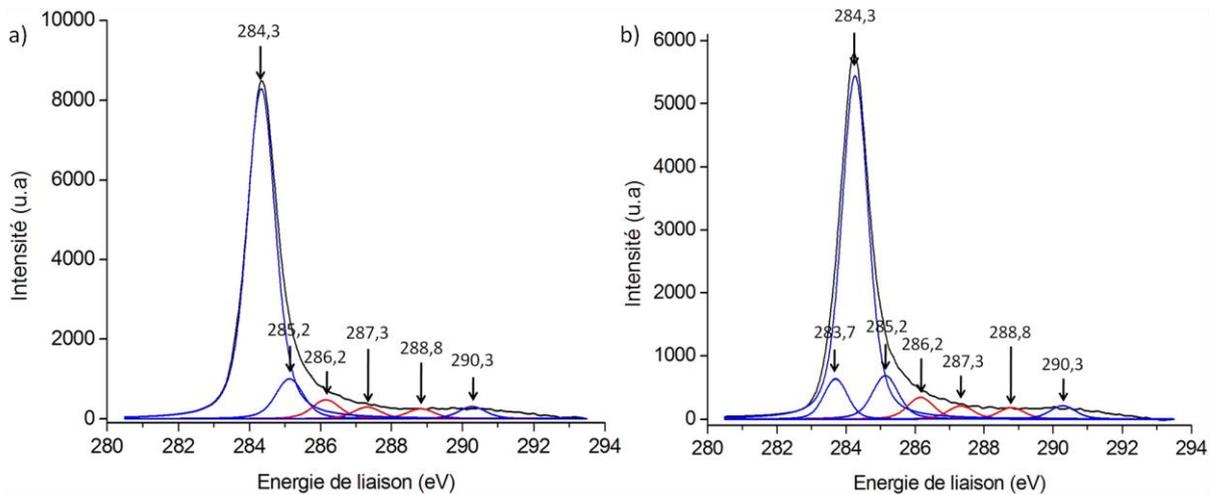


Figure V- 29 : a) Spectre XPS du pic C1s d'un tapis de nanotubes multiparois obtenu par croissance HFCVD classique sur une couche diamant nanocristallin lourdement dopé au bore, b) Spectre XPS du pic C1s d'un tapis de nanotubes épars obtenu par croissance HFCVD à partir de particules de palladium enterrés dans une couche diamant nanocristallin lourdement dopé au bore.

La contribution de chaque composantes du pic C1s est présentée dans le Tableau V-7.

C1s	E (eV)	CNT classiques Aire (%)	CNT enterrés Aire (%)
C sp <sup>3</sup> (diamant)	283,7	-	7,2
C sp <sup>2</sup> (NTC)	284,3	77,9	69
C (sp <sup>3</sup> ) (amorphe)	285,2	9,5	11
C-O	286,2	4,5	4,7
C=O	287,3	2,8	2,9
O-C=O	288,8	2,4	2,4
π-plasmon	290,3	2,9	2,8

Tableau V- 7 : Tableau récapitulatif de la position, de l'assignation et de la contribution des pics du carbone C1s du tapis de nanotubes obtenus par voie classique et du matériau composite diamant/nanotubes de carbone enterrés.

Le rapport des contributions des composantes associées au carbone sp<sup>2</sup> (284,3) et au carbone sp<sup>3</sup> (285,2) amorphe vaut 6,2 dans le cas du tapis dense (nanotubes non enterrés) et 8,2 dans le cas du tapis épars. Comme pour la caractérisation par spectroscopie, on observe une augmentation de la quantité de carbone désordonné. Aux vues des profondeurs sondées, on peut exclure la possibilité que cette composante provienne des pores ou des particules de catalyseurs, mais il n'est toujours pas possible de dire si elle provient des nanotubes ou de la surface du diamant.

Pour pouvoir répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à la région des pertes d'énergie. Les spectres des deux échantillons nanotubes, celui d'un échantillon HOPG et diamant sont présentées sur la Figure V- 30. Les pertes d'énergie proviennent de transitions électroniques interbandes ; les signatures énergétiques associées à ces transitions ont des valeurs en énergie bien séparées (dizaine d'électronvolt) contrairement à celles des différentes composantes XPS du pic carbone (de l'ordre de la dizaine de milliélectronvolts). Cette méthode est bien adaptée pour différencier les matériaux carbonés (Diamant like carbon DLC, Tetra amorphous carbon (ta-C, Carbone vitreux, graphite...) en fonction de leurs taux d'hybridation  $sp^2/sp^3$  sans avoir recours à un ajustement analytique [78, 106].

En se reportant à la Figure V- 30, on remarque que la signature des nanotubes est similaire à celle de l'HOPG mais qu'elles sont toutes les deux différentes de celles du diamant. Comme nous l'avons vu dans le chapitre I, on remarque sur le spectre diamant un pic à + 34 eV et un autre à + 24 eV qui sont associés respectivement aux transitions  $\sigma-\sigma^*$  et aux  $(\pi+\sigma)$  plasmons. Le spectre des nanotubes présente également deux pics distincts [107], le premier pic est situé à + 6 eV et correspond aux  $\pi$  plasmons et le deuxième à + 27 eV aux transitions  $\pi + \sigma$ . L'étude de ces pics permet d'évaluer le type de nanotubes, ainsi que la présence ou non de défauts dans les nanotubes [108]. La position du deuxième pic associé  $(\pi+\sigma)$  plasmons permet de distinguer les MWCNT des nanotubes contenant peu de parois ou Few-Walled Carbon Nanotube (FWCNT). Il a été montré que sa position ne dépend pas du diamètre du tube mais de son nombre de parois [109] et que dans le cas des MWCNT, sa position est identique à celle du graphite. La valeur en énergie des pertes du premier est invariable quelque soit le type de nanotubes (multiparois ou monoparois). En revanche, son intensité et sa largeur à mi-hauteur renseignent sur la qualité cristalline et les défauts [110]. Ce pic disparaît même lors de l'introduction volontaire de défauts sur les nanotubes. Après soustraction de la ligne de base, nous avons calculé la largeur à mi-hauteur du pic des  $\pi$  plasmons pour l'HOPG et les nanotubes ; elle est évaluée à + 2,5 eV pour l'HOPG, à + 3,2 eV pour les nanotubes non enterrés et à + 4,4 eV pour les nanotubes enterrés. L'augmentation de cette valeur reflète la présence de défauts cristallins.

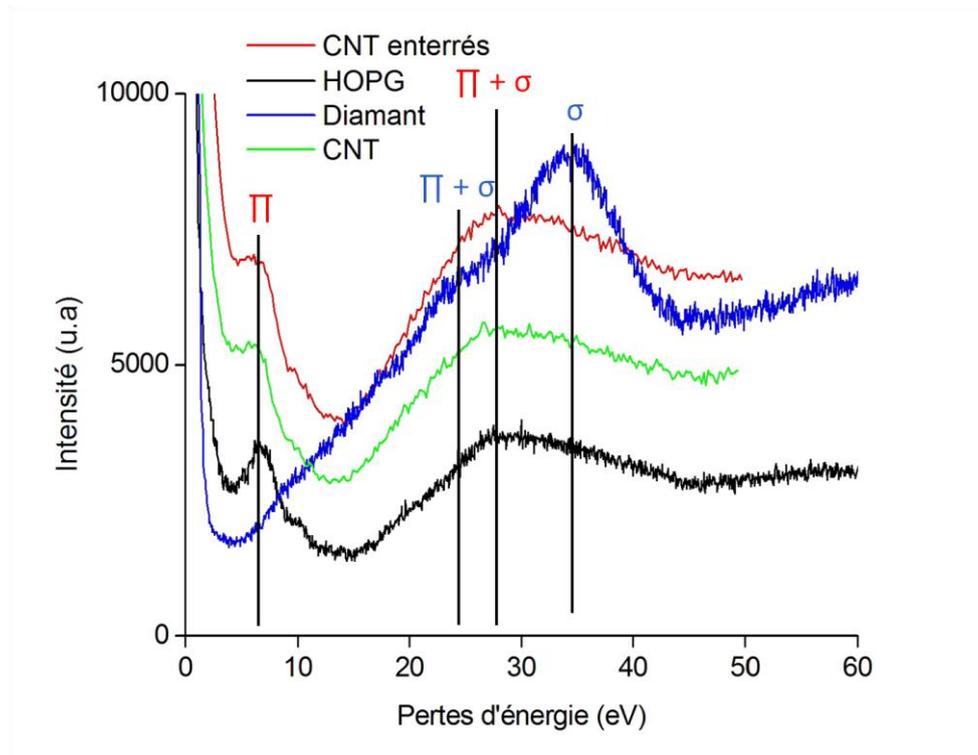


Figure V- 30 : Spectres des pertes en énergie du carbone du tapis de nanotube, d'un échantillon HOPG et d'un échantillon nanocristallin lourdement dopé au bore.

Ce constat montre que la différence du taux de carbone amorphe observé en spectroscopie Raman entre les nanotubes issus de particules enterrées et non enterrées est majoritairement liée à la structure même des nanotubes et non à une modification de l'état de surface du diamant. La présence d'une quantité plus importante de carbones désordonnés dans les nanotubes provenant de la croissance des nanotubes à partir des particules enterrées peut être imputée à une mauvaise cristallisation des nanotubes durant la synthèse. A la différence des synthèses base-top classiques, la croissance des nanotubes dans les pores nécessite que les espèces carbonées actives doivent diffuser le long du pore pour arriver jusqu'à la particule. Il faut également noter que tous les phénomènes de convection liés au flux de gaz qui permettent de renouveler l'apport en espèces vers la particule dans le cas des croissances classiques sont limités dans le pore. Cet ensemble de phénomènes qui entrave la diffusion des espèces jusqu'à la particule modifie donc l'environnement local de la particule et favorise l'apparition de défauts de cristallisation du nanotube.

Nous avons montré qu'il est possible d'utiliser les particules enterrées par gravure catalytique du diamant assistée par filament chaud comme catalyseurs pour une croissance ultérieure des nanotubes. L'existence d'une profondeur optimale d'enterrement des particules

a également été mise en évidence. Les caractérisations MEB menées sur les nanotubes obtenus à partir de ces particules enterrées ont montré que le mode de croissance était de type base-top. Enfin, nous n'avons observé que la croissance à partir de ces particules enterrées n'engendrait aucune modification notable de l'état de surface du diamant, mais que les nanotubes obtenus présentaient un nombre de défauts plus important. Après avoir caractérisé la structure et la qualité des tapis des nanotubes, nous allons nous intéresser aux propriétés électriques du matériau composite. La prochaine partie portera sur la comparaison des caractéristiques électrochimiques des SWCNT et des nanotubes multiparois obtenus par voie classique et à partir des particules de catalyseur enterrés.

## V.F. Propriétés électriques des nanotubes

L'étude des propriétés électrochimiques du matériau composite nécessite l'utilisation d'une sonde électrochimique. L'objectif de cette caractérisation est d'évaluer les propriétés électrochimiques intrinsèques des nanotubes synthétisés, mais également le transfert électrique entre ces derniers et le substrat diamant. Autrement dit, de caractériser la résistance de transfert de charge entre les sites actifs des nanotubes et la sonde électrochimique d'une part, et celle entre les nanotubes et le diamant d'autre part. L'emploi d'une sonde électrochimique redox en solution soulève plusieurs problèmes. Le principal est lié à l'effet lotus inhérent à tous les nanotubes non traités. Cet effet est lié au caractère hydrophobe de ces derniers qui empêche les solutions aqueuses de pénétrer à l'intérieur du tapis. Dans ces conditions, le transfert de charge entre la sonde redox et le tapis de nanotubes est limité à l'enveloppe externe du tapis. On peut toutefois palier à ce problème en oxydant les nanotubes pour les rendre hydrophile par l'intermédiaire de traitement oxydant, acido-basique ou plasma.

Ces traitements génèrent sur les parois des nanotubes un certain nombre de fonctions polaires qui améliorent la mouillabilité interne du tapis de nanotubes et permettent alors la diffusion de la sonde dans le volume du matériau carboné. Consécutivement, le transfert de charge entre cette sonde redox et l'interface électrochimique se complexifie énormément en devenant multiéchelle. Dans notre cas, cela sous-entend au moins trois voies d'échange électronique non équivalentes : l'enveloppe externe du tapis de nanotubes soumise à une diffusion linéaire semi-infinie, les parois des nanotubes contenues dans le volume du tapis et

insérés dans un champ diffusionnel nanoscopique et enfin la surface du matériau support en diamant. Lors des caractérisations par impédance, la modélisation de la fonction de transfert via des circuits électriques équivalents s'en retrouve fortement complexifiée via la multiplication du type et du nombre de composants passifs que l'on peut associer à l'interface électrochimique. Ce constat nous incite à simplifier cette étude afin que les modèles proposés correspondent au mieux à la réalité physique de notre système. Afin de contourner les phénomènes induits par la diffusion multi-échelles de la sonde, nous avons choisi d'immobiliser directement celle-ci sur les nanotubes pour se placer dans le cas simple où les électrons transitent directement de la sonde au nanotube puis du nanotube vers le substrat et inversement.

Parmi les voies de fonctionnalisation les plus utilisées, on trouve notamment la click chemistry [111, 112] et les réactions basées sur le couplage de molécules aminées avec les fonctions carboxyles présentes sur les nanotubes [40, 85]. Bien que les fonctions carboxyliques soient présente en faible quantité, il est possible d'augmenter leurs nombres par l'intermédiaire de traitements chimiques acides [113] ou par plasma [102]. Nous avons opté pour la méthode de fonctionnalisation mettant en jeu les fonctions carboxyles des nanotubes pour la simplicité du couplage car c'est une méthode adéquate pour l'immobilisation de molécule biologique. Nous avons choisi d'oxyder les nanotubes par traitement plasma avant le greffage pour en augmenter la mouillabilité. La sonde électrochimique est identique à celle utilisée dans la partie 5.b.2 du chapitre II, il s'agit du ferrocène-(peg)<sub>3</sub>-aminé. Le choix de l'agent de couplage s'est tourné vers le (Benzotriazol-1-yloxytris(diméthylamino)phosphonium hexafluorophosphate (BOP) car il permet de coupler les amines aussi bien sur les fonctions carboxyliques que sur les aldéhydes [114]. Nous avons choisi le Diméthylformamide (DMF) comme solvant car il permet un très bon mouillage des nanotubes. De plus, le ferrocène aminé utilisé ne présentant qu'une seule fonction susceptible de réagir durant l'étape de couplage, nous avons pu procéder à son arrimage in situ. La solution de couplage est composée de ferrocène-(peg)<sub>3</sub>-aminé à 50 mM et de BOP à 5 mM dans du DMF. L'échantillon est placé en contact avec la solution pour une durée de 12 heures, puis rincé successivement au DMF et à l'eau ultra pure.

### V.F.1. Greffage du ferrocène

Avant de procéder à l'étude des propriétés électrochimiques du matériau, nous avons caractérisé le greffage du ferrocène(peg)<sub>3</sub> aminé par spectroscopie infrarouge. La Figure V-

31 illustre le spectre infrarouge réalisé à l'aide d'un accessoire ATR d'un tapis de nanotubes obtenu par voie classique.

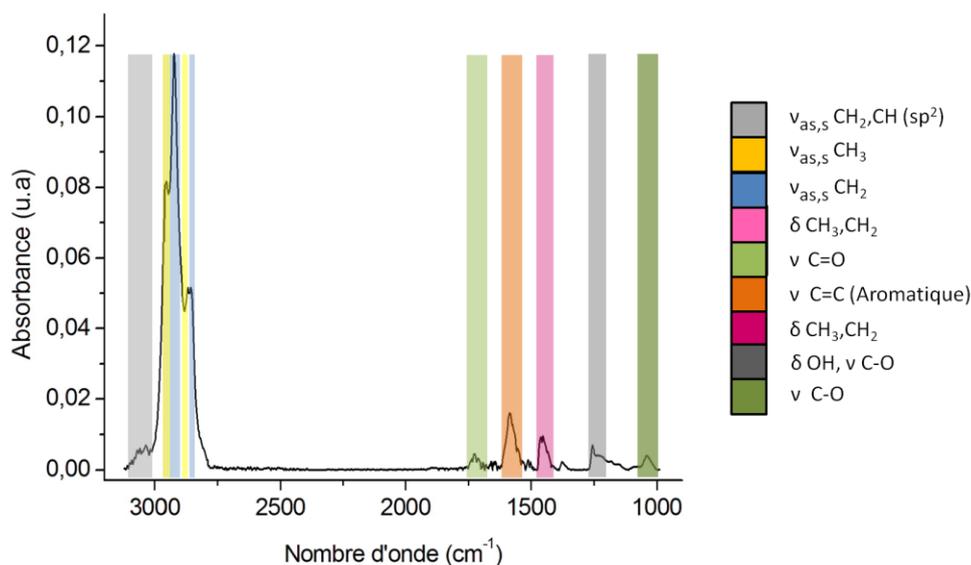


Figure V- 31 : Spectre infrarouge, réalisé en ATR avec un cristal Germanium, d'un échantillon de MWCNT obtenu par HFCVD sur diamant à partir d'une couche de catalyseur palladium de 3 nm.

On trouve sur le spectre infrarouge du tapis de nanotubes tous les pics associés aux différents modes de vibration correspondant aux fonctions présentes sur les nanotubes actives en infrarouge [40, 113, 115]. On trouve une bande comprise entre 3000 et 3100  $\text{cm}^{-1}$  qui est attribuée aux étirements symétriques et asymétriques des fonctions C-H et  $\text{CH}_2$  des carbones  $\text{sp}^2$ . Il vient ensuite une série de pics situés à 2955, 2925, 2871 et 2858  $\text{cm}^{-1}$  qui sont respectivement associés au « stretch » asymétrique des fonctions  $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$  puis au « stretch » symétrique des mêmes fonctions portées par un carbone hybridé  $\text{sp}^3$ . On remarque une bande de faible intensité à 1730  $\text{cm}^{-1}$  qui est la signature des fonctions C=O de types carbonyles et carboxyles. Il apparait ensuite le pic caractéristique des nanotubes qui est assigné aux liaisons C=C aromatiques et qui est centré en 1580  $\text{cm}^{-1}$ . On note ensuite la présence d'une bande centrée en 1450  $\text{cm}^{-1}$  qui est dû au cisaillement des liaisons  $\text{CH}_2$  et  $\text{CH}_3$ . On trouve une bande large centrée 1240  $\text{cm}^{-1}$  qui est assignée à un mélange de différents types de fonctions oxydées que l'on trouve dans les nanotubes. Il s'agit majoritairement des fonctions C-O associées aux phénols ainsi qu'aux acides carboxyliques et aussi aux éthers aromatiques. Enfin on remarque la présence d'une dernière bande à 1040  $\text{cm}^{-1}$  qui peut être associée aux alcools primaires et aux éthers aliphatiques.

Pour oxyder les nanotubes, nous avons opté pour l'utilisation d'une technique plasma [102] car elle présente plusieurs avantages vis-à-vis des traitements chimiques oxydant. C'est une technique très rapide, la durée du plasma n'excède pas quelques secondes et de plus elle permet une très bonne reproductibilité du traitement. Les traitements plasma ont été effectués à l'aide d'un appareil commercial Femto de la marque Diener qui est dédié aux nettoyages de surfaces. Le traitement par plasma RF (Radiofréquence) est effectué sous une pression de 0,6 bars d'oxygène, avec une polarisation de 20W et pendant 10 secondes. Nous avons caractérisé le matériau composite après le traitement par spectroscopie infrarouge en ATR dans les mêmes conditions que précédemment. Le spectre est présenté sur la Figure V- 32. On retrouve sur ce spectre les mêmes pics que sur l'échantillon non traité, en revanche l'intensité de certain a évoluée. On remarque tout d'abord une augmentation de l'intensité du pic des fonctions C=O ( $1730\text{ cm}^{-1}$ ). De la même manière dans la large bande centrée à  $1240\text{ cm}^{-1}$ , il est maintenant possible de séparer trois pics distincts situés à  $1250$ ,  $1230$  et  $1180\text{ cm}^{-1}$ . Ils peuvent respectivement être associés à l'étirement des liaisons C-O des acides carboxyliques, des éthers aromatiques et des phénols.

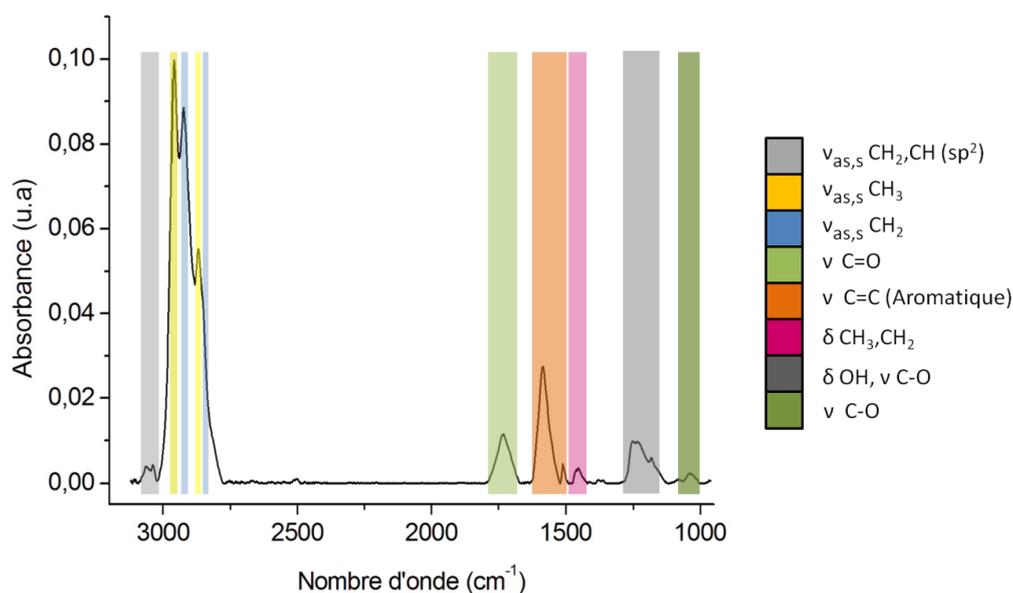


Figure V- 32 : Spectre infrarouge, réalisé en ATR avec un cristal Germanium, d'un échantillon de MWCNT oxydé par traitement plasma.

Les conditions d'expériences ne nous autorisant pas à tirer de valeurs quantitatives, nous ne pouvant pas statuer sur l'augmentation de la quantité des fonctions carboxyles ou

carbonyles des nanotubes. Nous avons ensuite procédé au couplage du ferrocène-(peg)<sub>3</sub> aminé avec les fonctions carboxyliques et aldéhydes des nanotubes. La solution de couplage est composée de BOP 5 mM et de ferrocène 50mM dans du DMF, elle est placée en contact avec l'échantillon diamant/nanotubes de carbone pendant 12 heures. L'échantillon est ensuite abondamment rincé au DMF et à l'eau ultrapure. Le greffage est ensuite caractérisé par ATR, le spectre obtenu est présenté sur la Figure V- 33. Il est important de noter que nous avons dans ce cas utilisé comme référence le spectre du matériau composite après oxydation par traitement plasma. On remarque tout d'abord la présence de deux pics dans la zone des CH<sub>x</sub> aliphatiques, situés à 2938 et 2871 cm<sup>-1</sup>. Ils sont assignés au « stretch » asymétrique et symétrique des CH<sub>2</sub> en alpha des atomes d'oxygène du bras espaceur du ferrocène. Le nombre d'onde des pics associés aux « stretch » des groupements méthylènes des chaînes alcanes aliphatiques (2925, 2855 cm<sup>-1</sup>), se différencie de ceux des fonctions éthers aliphatiques (situés en alpha de l'atome d'oxygène) par un décalage vers les hauts nombres d'onde. La présence du groupement amide formé durant le couplage est mis en évidence par la présence des pics à 1650 et 1560 cm<sup>-1</sup> [85, 116]. Le premier est associé à l'étirement de la liaison C=O de la fonction amide, le deuxième est caractéristique des amides monosubstitués acycliques (trans). Ce pic est lié aux effets conjugués du « stretch » de la liaison C-N et du « bend » de la liaison N-H. Enfin on trouve un dernier pic à 1100 cm<sup>-1</sup> associé à l'étirement asymétrique des liaisons O-C-O des éthers aliphatiques.

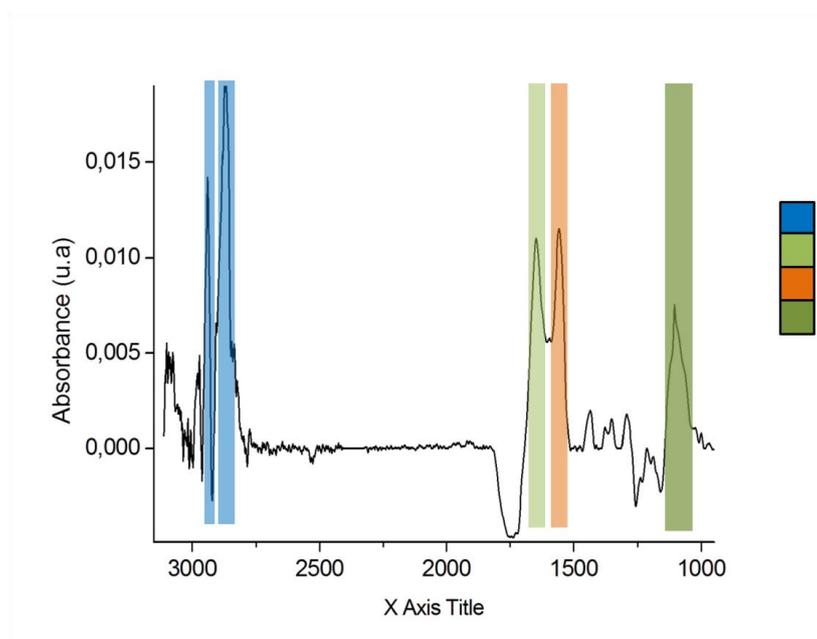


Figure V- 33 : Spectre infrarouge, réalisé en ATR avec un cristal Germanium, d'un échantillon de MWCNT oxydé par traitement plasma, puis fonctionnalisé avec du ferrocène(peg)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>.

L'étude du greffage par spectroscopie infrarouge nous a permis de mettre en évidence l'efficacité du greffage. L'analyse du spectre de l'échantillon fonctionnalisé montre la présence du ferrocène sur l'échantillon mais également l'apparition des signatures associées à la fonction amide qui démontre l'immobilisation covalente du ferrocène sur les nanotubes. Nous allons maintenant réaliser l'étude électrochimique du ferrocène greffé, de manière à caractériser les propriétés électriques du matériau.

## V.F.2. Caractérisation électrochimiques des nanotubes

### ➤ *Nanotubes de carbone mono-paroi*

Après greffage du ferrocène sur le matériau composite SWCNT/diamant microcristallin lourdement dopé au bore, nous avons procédé à la caractérisation par voltammétrie cyclique dans une solution aqueuse de  $\text{LiClO}_4$  0,2M. Les voltampérogrammes obtenus sont présentés sur la Figure V- 34.a.

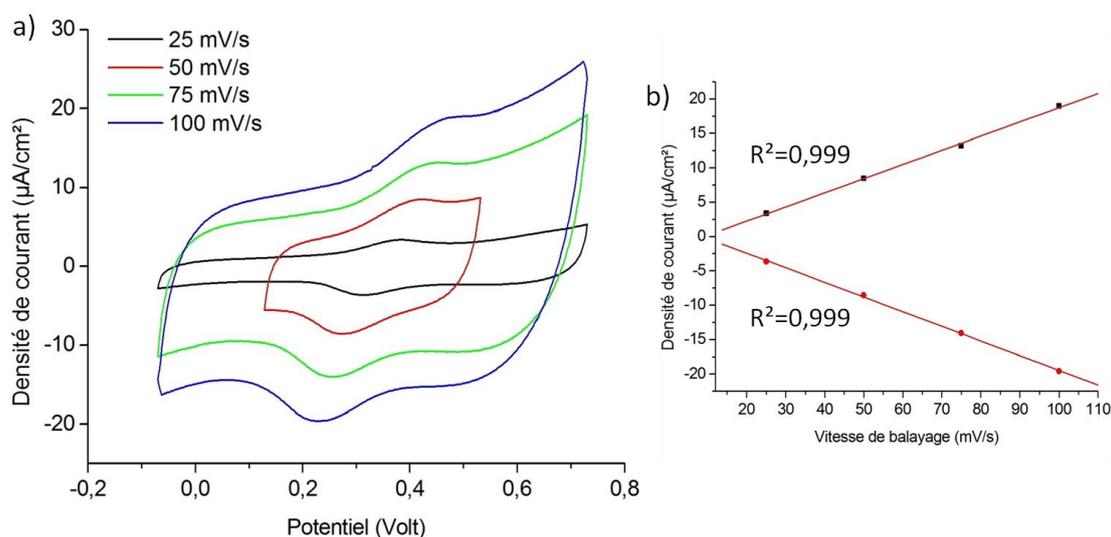


Figure V- 34 : a) Voltampérogrammes du ferrocène-(peg)<sub>3</sub> aminé (vs Ag/AgCl) greffé sur le matériau composite SWCNT/diamant, solution électrolytique de  $\text{LiClO}_4$  0,2M. b) Courbe illustrant l'évolution de la densité de courant des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage.

Les voltampérogrammes mettent clairement en évidence la présence d'un couple redox ayant un potentiel de demi vague de + 0,36V vs Ag/AgCl. Le potentiel standard du couple observé correspond bien à celui du ferrocène précédemment décrit dans la partie 5.b.2 du chapitre II. Sur la Figure V- 34.b sont reportées les densités de courant correspondant aux pics d'oxydations et de réduction du ferrocène en fonction de la vitesse de balayage. Comme nous l'avons vu précédemment l'évolution linéaire de l'intensité des pics en fonction de la vitesse de balayage indique que l'espèce est bien immobilisée. En se reportant aux voltampérogrammes, on remarque la valeur élevée du courant capacitif qui a pour effet de noyer les pics dans la composante capacitive lorsque la vitesse de balayage augmente.

Nous avons ensuite procédé à l'acquisition des spectres d'impédances en se plaçant au potentiel expérimental de demi vague du ferrocène observé (+0,36V) pour une excitation de 10 mV rms et pour une gamme de fréquence variant entre 200kHz et 200mHz. Le spectre d'impédance recueilli est présenté dans le plan de Nyquist sur la Figure V- 35.

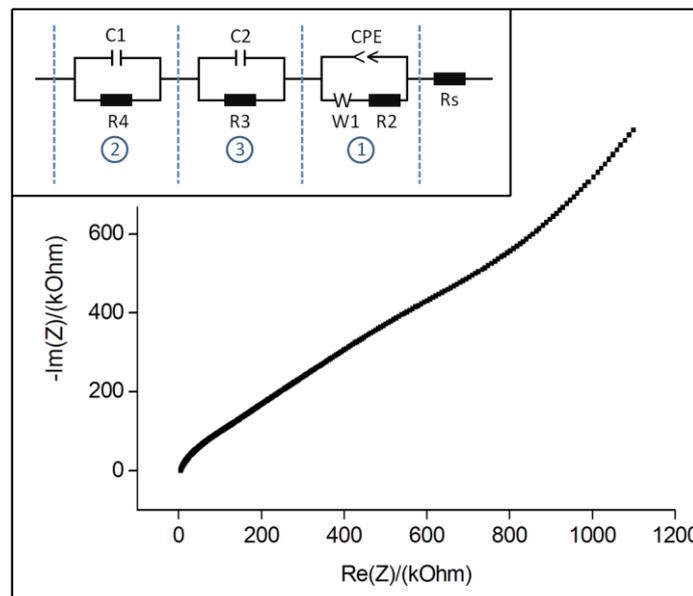


Figure V- 35 : Spectre d'impédance représenté dans le plan NYQUIST du matériau composite, réalisé à un potentiel de + 0,36V vs Ag/AgCl dans une solution aqueuse de LiClO4 0,2M. Encart : Circuit électrique équivalent associé aux matériaux composites Nanotubes de carbone monoparois/Diamant.

Les mesures expérimentales d'impédance sont interprétées à l'aide d'un modèle qui se présente sous la forme d'un circuit équivalent dont les composantes sont reliées aux phénomènes physiques qui se déroulent aux différentes interfaces du matériau. Toutefois, plusieurs circuits peuvent conduire à des spectres d'impédance similaires, le choix du modèle affecte donc significativement les résultats obtenus. Nous nous sommes attachés dans toutes

les études d'impédance à axer le choix du modèle de manière à ce qu'il soit le plus proche possible de la réalité physique. Il faut rappeler que lors de l'ajustement analytique des paramètres issus du modèle choisi aux valeurs expérimentales, il apparaît deux variables d'erreur. La première est la valeur du taux d'erreur ( $\chi^2$ ), qui relate l'écart entre les données expérimentales et celles issues de l'ajustement analytique, nous avons choisi de considérer comme valables les valeurs étant inférieures ou égales à  $10^{-2}$ . La deuxième est la déviation des valeurs des composants électriques du circuit équivalent associé au modèle, on estime qu'elles doivent être inférieures à 5 %. Il existe une multitude de circuits équivalents associés aux matériaux composites [31] mais dans le cas des matériaux à base de nanotube le plus répandu est présenté sur la Figure V- 36 [104]. Dans ce circuit figurent 3 zones distinctes, tout d'abord la résistance série notée  $R_s$  est associée à la résistance de l'électrolyte, la zone 1 reflète l'interface entre l'espèce électrochimiquement active et le nanotube ; enfin la zone 2 représente l'interface entre le nanotube et le substrat. Dans notre cas ce circuit équivalent n'a pas pu être corrélé aux données expérimentales des spectres d'impédance enregistrés. Nous avons donc du modifier le circuit en gardant toujours comme base de réflexion la réalité physique du matériau. Le modèle le plus simple permettant de corrélérer au mieux les données expérimentales correspondant au circuit équivalent représenté dans l'encart de la Figure V- 35.

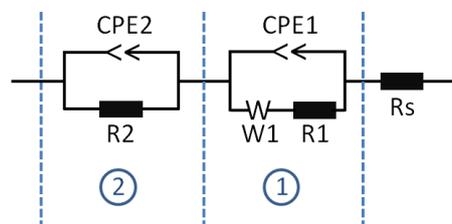


Figure V- 36 : Circuit électrique équivalent généralement associé aux matériaux composites à base de nanotubes de carbone.

Ce circuit équivalent assure un ajustement analytique optimal des paramètres expérimentaux aux composants électriques du modèle associé, les différentes valeurs obtenues sont reportées dans le Tableau V- 8. On retrouve dans ce circuit les zones 1, 2 et le  $R_s$  du circuit équivalent traditionnellement associé (Figure V- 36). Dans le cas de notre étude une zone supplémentaire notée 3 apparaît. Il faut garder à l'esprit que dans ce travail le matériau est composé de nanotubes de carbone monoparois qui sont majoritairement semiconducteurs, ils ne peuvent donc pas être assimilés à un fil électrique. De plus, le

ferrocène étant immobilisé directement sur le nanotube, le transfert de charge ne peut s'effectuer qu'au travers du nanotube. D'autre part il n'existe que deux interfaces physiques qui sont l'interface ferrocène/nanotubes et nanotubes/diamant. Nous avons donc choisi d'associer l'impédance (R3/C2) au caractère semi-conducteur des nanotubes. La valeur de la résistance R1 associée au transfert de charge entre le ferrocène et le nanotube est en accord avec celles que l'on trouve dans la littérature dans le cas des CNT non modifiés [117], [116]. En revanche, la valeur R4 qui caractérise le transfert de charge entre le nanotube et le substrat est très élevée. Cela dénote la formation d'une interface complexe entre le diamant et les nanotubes de carbone qui résulte de la modification de la surface du diamant durant l'étape de croissance des nanotubes. Comme nous l'avons vu précédemment il est possible qu'un carbure se forme en surface du diamant. Ce dernier pourrait expliquer l'augmentation de la résistance de transfert de charge. Enfin l'impédance associée aux nanotubes fait apparaître une résistance R2 de 30kΩ, ce qui est un peu inférieur aux valeurs standards rapportées dans la littérature [41].

Eléments	Valeurs	Déviaton	$\chi^2$
Rs (Ohm)	4983	0,2	0,01
R2 (Ohm)	29980	6	
C2 (Farad)	$4,3 \cdot 10^{-9}$	$1 \cdot 10^{-12}$	
S1 (Ohm/ $\sqrt{s}$ )	$1,3 \cdot 10^3$	7	
R3 (Ohm)	16773	7	
C1 (Farad)	$3,3 \cdot 10^{-8}$	$1 \cdot 10^{-11}$	
R4 (Ohm)	304509	27	
Q1 (Farad.s <sup>(a-1)</sup> )	$3,2 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-9}$	
a1	0,65	0,5	

Tableau V- 8 : Valeurs des composants électriques issues de l'ajustement analytique du modèle associé au matériau composite SWCNT/diamant avec les données expérimentales.

Les résultats de la caractérisation électrochimique du matériau composite SWCNT/diamant a montré que les nanotubes monoparois ne sont pas les meilleurs candidats aux vus des applications ciblées. Nous avons pu à l'aide de la spectroscopie d'impédance, évaluer les propriétés électrochimiques du matériau et mettre en évidence qu'elles ne répondent pas aux critères requis. La principale limite est la valeur élevée de la résistance de transfert de charge associée à l'interface nanotubes/diamant.

Il apparait donc que l'utilisation de la bicouche de catalyseur Titane/Cobalt permet l'obtention de Nanotubes monoparois mais modifie la surface du diamant et dégrade

l'accroche des nanotubes sur le substrat. On peut donc conclure que l'utilisation de la bicouche de catalyseur Titane/Cobalt pour la croissance de SWCNT sur diamant ne peut pas être mise en œuvre pour concevoir un matériau composite répondant au cahier des charges établi. Malgré les problèmes d'interface nanotubes/diamant, ce matériau peut néanmoins être utile pour des applications dans le domaine du photovoltaïque ou encore des supercondensateurs.

### ➤ *Nanotubes de carbone multiparois*

Après avoir oxydé les nanotubes par plasma, puis immobilisé le ferrocène-(peg)<sub>3</sub> aminé par couplage peptidique, comme décrit dans la partie V.F.1, nous avons procédé à la caractérisation électrochimique des matériaux composites diamant/nanotubes enterrés et diamant/nanotubes non enterrés. La mise en évidence du couplage entre le ferrocène et les nanotubes est illustré par voltamétrie cyclique sur les Figure V- 37.a et Figure V- 38.a. Le support électrolytique utilisé est une solution aqueuse de Perchlorate de Lithium 0,2M, l'électrode de référence est Ag/AgCl.

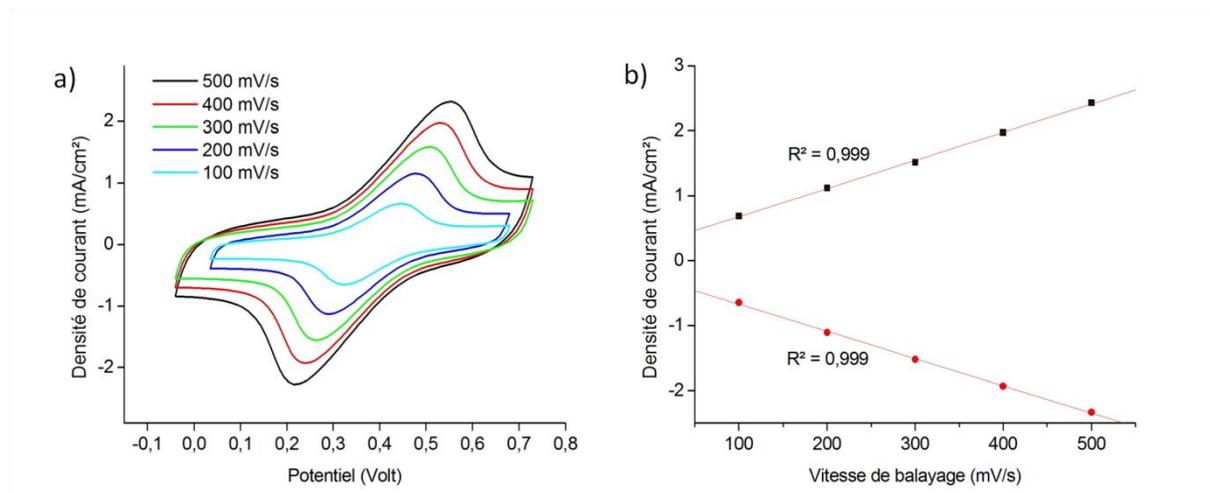


Figure V- 37 : a) Voltampérogrammes du ferrocène fonctionnalisé sur le matériau composite diamant nanocristallin/MWCNT, réalisés dans une solution aqueuse de LiClO<sub>4</sub> 0,2M avec une électrode de référence Ag/AgCl. b) Courbe illustrant l'évolution de la densité de courant des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage.

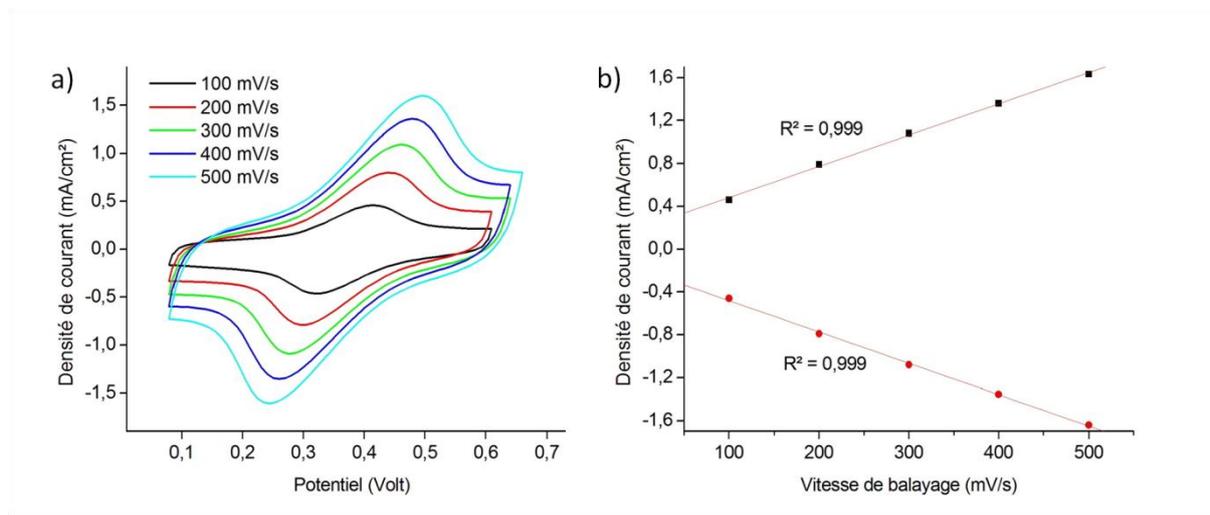


Figure V- 38 : a) Voltampérométries du ferrocène fonctionnalisé sur le matériau composite diamant nanocristallin/CNT enterrés, réalisés dans une solution aqueuse de  $\text{LiClO}_4$  0,2M avec une électrode de référence Ag/AgCl. b) Courbe illustrant l'évolution de la densité de courant des pics anodiques et cathodiques en fonction de la vitesse de balayage.

Les voltampérométries font apparaître un couple redox quasi-réversible à un potentiel de +0,38V vs Ag/AgCl. Comme nous l'avons vu dans la partie 5.b.2, il s'agit bien du couple  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  du ferrocène modifié. Pour vérifier que le ferrocène est bien immobilisé sur les nanotubes, nous avons reporté la densité de courant des pics anodiques et cathodiques des voltampérométries en fonctions de la vitesse de balayage. Les graphiques sont présentés sur les Figure V- 37.b et Figure V- 38.b. L'évolution linéaire des courbes obtenues montre que l'intensité n'est pas limitée par la diffusion et donc que le ferrocène est bien immobilisé sur les nanotubes. Notons toutefois l'évolution marquée et quasi linéaire de la différence de potentiel interpics avec la vitesse de balayage. Ce comportement est typique de l'existence d'une impédance de contact qui est classiquement éludée par compensation de chute ohmique. A partir des voltampérométries nous avons également pu calculer la quantité d'espèces immobilisées en intégrant l'aire sous les pics et en utilisant la loi de l'électrolyse de Faraday. Cette quantité est évaluée à  $6 \cdot 10^{-9}$  mole/cm<sup>2</sup> dans le cas du tapis de nanotubes classique et de  $3,98 \cdot 10^{-9}$  mole.cm<sup>-2</sup> pour le tapis de nanotubes enterrés. Nous avons ensuite caractérisé les échantillons par spectroscopie d'impédance en utilisant comme sonde le ferrocène immobilisé sur les nanotubes. Les spectres d'impédance sont reportés sur la Figure V- 39. Le potentiel appliqué est celui du ferrocène (+0,38V vs Ag/AgCl) et la solution électrolytique support est une solution aqueuse de  $\text{LiClO}_4$  0,2M.

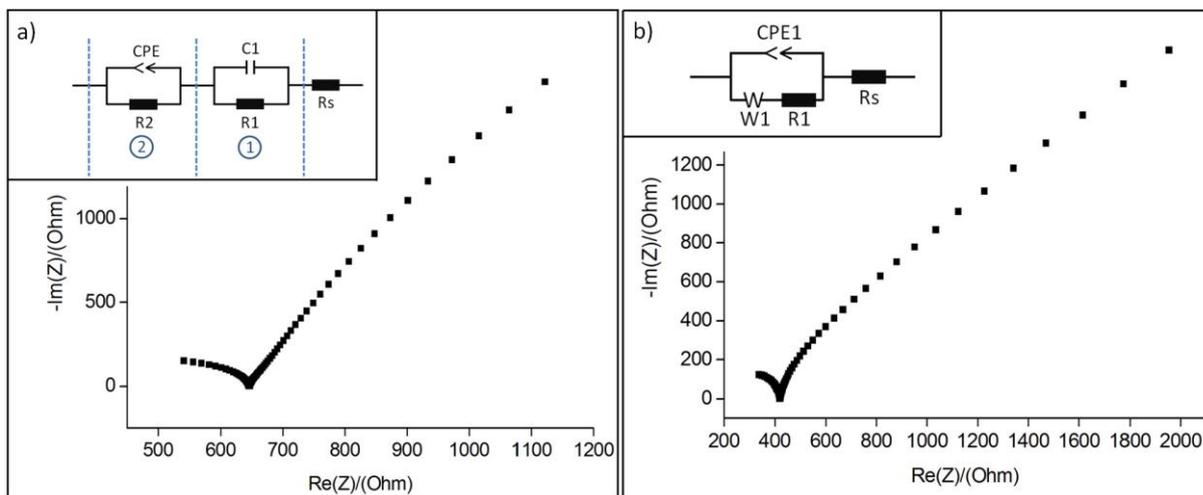


Figure V- 39 : a) Spectre d'impédance représenté dans le plan NYQUIST du tapis de nanotubes obtenu par voie classique, b) de nanotubes enterrés, réalisés au potentiel standard du couple  $Fe^{II}/Fe^{III}$  du ferrocène (+0,38V vs Ag/AgCl) dans une solution aqueuse de  $LiClO_4$  0,2M. Encart : Circuits électriques équivalents associés.

Si l'on observe le spectre d'impédance associé au tapis de nanotubes obtenus par voie classique (Figure V- 39.a), on remarque la présence de deux arcs de cercle distincts de rayons différents alors qu'il n'y en a qu'un seul dans le cas des nanotubes enterrés (Figure V- 39.b). Lors des études d'impédance, la valeur de la partie réelle de l'impédance complexe associée à la résistance, correspond au diamètre du cercle. La présence de deux arcs de cercle distincts met en évidence la présence de deux impédances (R/C). Les schémas des circuits équivalents associés au modèle physique choisi pour décrire le matériau composite sont illustrés en insert des Figure V- 38 et Figure V- 39.a et b.

Dans le cas des nanotubes classiques, le circuit équivalent choisi correspond au modèle le plus couramment utilisé pour représenter le comportement électrique des matériaux composites à base de nanotubes de carbone. De plus, il reflète au mieux la réalité physique des échanges électroniques qui prennent place dans le matériau composite. La partie 1 correspond à l'interface entre les nanotubes et le ferrocène et la partie 2 à celle entre le diamant et les nanotubes. Contrairement au cas du spectre correspondant aux nanotubes non enterrés où l'on observe la présence de deux arcs de cercle de rayons distincts, le spectre associé aux nanotubes enterrés ne fait apparaître qu'un seul cercle. Cela semble donc indiquer que le comportement électrique du matériau ne se caractérise que par une seule impédance. Nous avons donc opté pour un modèle électrique simple composé d'une seule impédance. Comme dans le cas des SWCNT, nous avons expérimenté plusieurs modèles adaptés à la

réalité physique lors de l'ajustement analytique. Aucun n'a permis d'obtenir de meilleurs résultats que ceux présentés sur la Figure V- 39, que ce soit en termes de taux d'erreur ou en déviation standard.

Les valeurs des composantes des circuits équivalents issues de l'ajustement analytique des paramètres expérimentaux sont présentées dans le Tableau V- 9

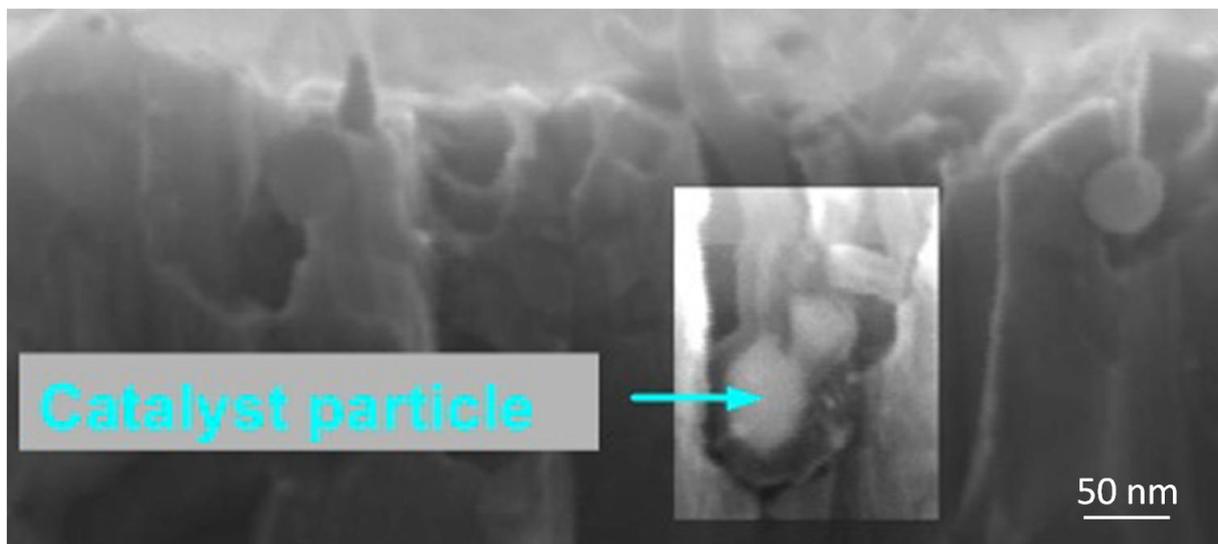
	<b>Eléments</b>	<b>Valeurs</b>	<b>Déviaton</b>	$\chi^2$
CNT classiques	Rs (Ohm)	662,2	0,3	3. 10 <sup>-4</sup>
	R2 (Ohm)	1100	44	
	C1 (Farad)	5,8.10 <sup>-3</sup>	1.10 <sup>-4</sup>	
	R1 (Ohm)	28877	475	
	Q1 (Farad.s <sup>(a-1)</sup> )	9,1.10 <sup>-4</sup>	4.10 <sup>-5</sup>	
	a1	0,86	0,58	
CNT enterrés	Rs (Ohm)	421,1	0,3	5.10 <sup>-4</sup>
	R1 (Ohm)	22186	796	
	Q1 (Farad.s <sup>(a-1)</sup> )	7,87.10 <sup>-4</sup>	1.10 <sup>-6</sup>	
	a1	0,92	0,51	

*Tableau V- 9 : Valeurs des composants électriques issues de l'ajustement analytique du modèle associé au matériau composite MWCNT/diamant avec les données expérimentales*

En comparant le modèle correspondant au SWCNT abordé précédemment à celui des MWCNT classique de cette partie, on remarque la disparition de l'impédance que nous avons associée aux transports électroniques dans les nanotubes. La valeur de R1, qui reflète la résistance de transfert de charge associée à l'interface ferrocène/nanotube, est similaire à celle trouvée dans le cas des SWCNT. En revanche R2, qui est associée au transfert électronique entre le diamant et les nanotubes (impédance de transfert électronique visible sur la voltammétrie de la figure Figure V- 37.a), est très inférieure à celle obtenue dans le cas des nanotubes monoparois. L'évolution des voltampérogrammes avec la vitesse de balayage peut ainsi être expliquée par cette mauvaise connectivité électrique.

Dans le cas des nanotubes enterrés, la modélisation du comportement électrique du matériau par le circuit de Randles met en évidence la présence de la seule interface ferrocène/nanotubes de carbone. De plus, on remarque que les valeurs des composantes de la résistance de transfert de charge (R1) et de la capacitance (Q1) sont similaires à celles observées dans le cas des nanotubes non enterrés et des SWCNT. Par ailleurs, notons que comme pour les nanotubes non implantés, nous observons une évolution linéaire de la

différence de potentiel interpics avec la vitesse de balayage. Toutefois, la variation observée est de moindre amplitude et souligne qualitativement une interface électrique nanotube de carbone/diamant améliorée. L'enterrement des nanotubes a donc permis, d'un point de vue électrique, d'améliorer significativement l'interface diamant/nanotubes. On peut imaginer de manière assez instinctive que les zones de contact entre le nanotube et le diamant sont démultipliées dans le pore. A la différence des croissances classiques où l'interface diamant/nanotubes est considérée comme bidimensionnelle et où l'on parle de surface de contact ; dans le cas des nanotubes enterrés on peut parler d'interface 3D. Ce constat est illustré par l'image MEB présentée sur la Figure V- 40, montrant l'interface diamant nanotube dans le pore. Comme on peut le constater la majorité des zones de contact se situe dans la région proche du catalyseur.



*Figure V- 40 : Image MEB en électrons secondaires d'un nanotube qui a crû dans un pore et de son catalyseur enterré dans une couche de diamant nanocristallin.*

A travers l'étude électrochimique du ferrocène greffé sur les nanotubes, nous avons pu mettre en évidence l'amélioration des propriétés électriques apportée par la croissance de nanotubes dans les pores. L'étude par spectroscopie d'impédance a montré la disparition de la résistance de transfert de charge associée à l'interface diamant/nanotubes qui existait dans le cas des tapis de nanotubes obtenus par croissance classique. Après avoir mis en évidence que la croissance de nanotubes à partir de catalyseurs enterrés a amélioré les propriétés électriques du matériau composite, nous allons maintenant voir si elle a également permis d'augmenter l'adhésion des nanotubes sur le substrat.

## V.G. Analyse qualitative de l'adhésion des nanotubes

### V.G.1. Etude électrochimique

Nous allons maintenant aborder un autre problème majeur qui est l'accroche des nanotubes sur leur substrat. Afin d'éprouver la stabilité de l'accroche entre le diamant et les nanotubes nous avons fait appel à deux méthodes différentes. Une première méthode électrochimique est basée sur le suivi du décrochage des nanotubes lors de rinçages successifs, la deuxième sur l'effet des bains à ultrasons sur l'interface nanotube/substrat.

Pour le suivi du décrochage des nanotubes par électrochimie, nous avons utilisé les échantillons fonctionnalisés avec le ferrocène que nous avons caractérisé par électrochimie dans la partie précédente (V.F.2). L'adhésion des nanotubes a été évaluée de manière simple en procédant à des rinçages successifs de l'échantillon. Pour ce faire les échantillons n'ont pas été retirés de la cellule électrochimique durant les étapes de rinçages. Ces dernières ont été effectuées à l'aide d'une micro-pipette et le solvant utilisé était du DMF (reconnu pour être un bon solvant/dispersant des nanotubes). La phase de rinçage a simplement consisté à soumettre la surface de l'échantillon à un flux soutenu de DMF, puis à répéter cette étape une dizaine de fois successivement. L'échantillon est ensuite rincé abondamment à l'eau, séché puis caractérisé à nouveau par voltamétrie cyclique dans une solution de  $\text{LiClO}_4$  0,2M. Nous avons réalisé trois cycles de rinçages successifs. Les voltampérogrammes du couple  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{III}}$  du ferrocène correspondant à l'échantillon de nanotubes non enterrés et enterrés obtenus après chaque rinçage sont présentés sur la Figure V- 41.

Dans le cas des nanotubes obtenus par voie classique, on remarque que l'intensité des pics anodiques et cathodiques observées sur les voltampérogrammes, diminue après chaque étape de rinçage. Cette diminution reflète une variation de la concentration en ferrocène au sein du matériau composite. La réduction de la quantité du ferrocène ne peut pas être imputée à un décrochage de ce dernier, car nous avons mis en évidence par spectroscopie infrarouge la formation d'une liaison covalente peptidique stable entre les nanotubes et la sonde redox. Les énergies de liaisons associées au groupement (C-C=O, C-N) sont équivalentes aux liaisons C-C [118, 119] et il est donc peu probable qu'un simple rinçage puisse les rompre. La diminution de la quantité est donc liée au décrochage des nanotubes du substrat.

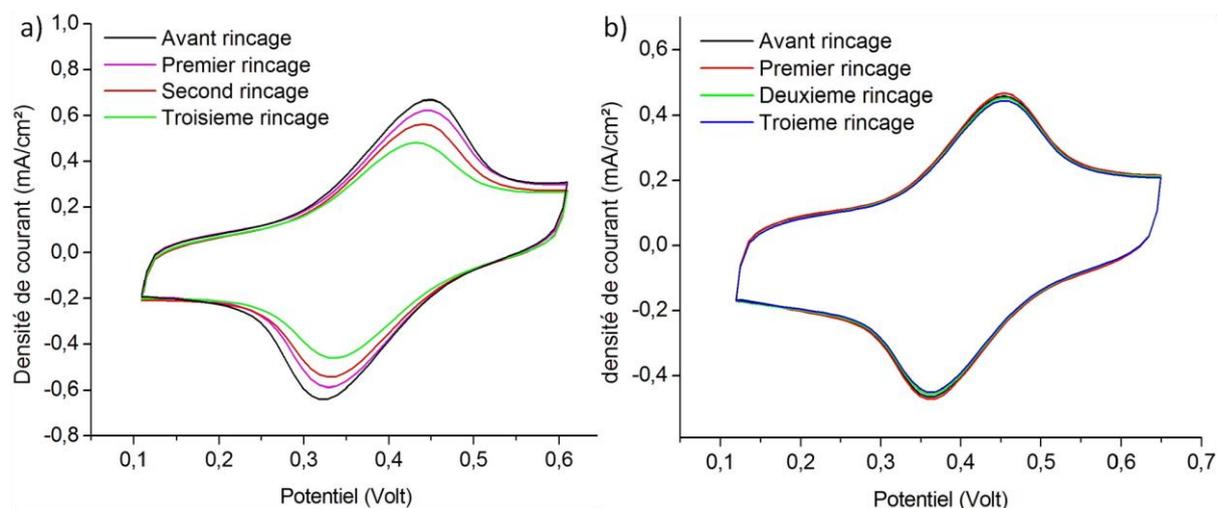


Figure V- 41 : Voltampérométries du ferrocène fonctionnalisé sur le matériau composite, a) diamant/MWCNT non enterrés et b) diamant/MWCNT enterrés, réalisés après trois étapes de rinçage successives. Solution électrolytique de LiCLO4 en milieu aqueux, électrode de référence Ag/AgCl, vitesse de balayage : 100mV/s.

En utilisant la loi de l'électrolyse de Faraday nous avons calculé la quantité de ferrocène pour chaque voltampérométrie en intégrant l'aire sous le pic. Les résultats sont reportés dans le Tableau V- 10. La décroissance de la quantité de ferrocène induite par les rinçages est de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-9}$  moles soit environ un tiers des sondes redox immobilisées. Nous ne pouvons en revanche rien conclure quant à la quantité de nanotubes décrochés. Néanmoins, au regard de la faible force de cisaillement générée par un flux de solvant engendré par pipetage, il est évident que la force d'adhésion des nanotubes sur leurs substrat est excessivement réduite. Il n'est donc pas possible d'envisager l'utilisation de ce matériau pour les applications in vivo au vu de la tenue mécanique actuelle des nanotubes. En effet, les forces de friction entre un matériau implanté et des tissus mous seraient suffisantes pour arracher les nanotubes de leur substrat et induire leur insertion dans les cellules environnantes et à terme l'apparition de phénomènes immunitaires et/ou inflammatoires.

Dans le cas des nanotubes enterrés, on remarque que l'évolution de la quantité de ferrocène détectée est relativement faible. Si on la compare à la variation observée dans le cas des nanotubes non enterrés on peut la considérer comme une fluctuation. A la suite de cette expérience, on peut déjà affirmer que l'adhésion des nanotubes dans les pores est supérieure à celle des nanotubes non implantés. Même si aucune valeur quantitative ne peut être tirée de cette étude, nous avons montré que la stabilité des nanotubes enterrés est meilleure. Pour éprouver un peu plus fortement l'accroche des nanotubes, nous avons choisi de soumettre les nanotubes à des traitements ultrasons.

Echantillon	Nombres de rinçage	Quantité de ferrocène (mol/cm <sup>2</sup> )
CNT non enterrés	0	6,6.10 <sup>-9</sup>
	1	5,7.10 <sup>-9</sup>
	2	5,2.10 <sup>-9</sup>
	3	4,3.10 <sup>-9</sup>
CNT enterrés	0	4.10 <sup>-9</sup>
	1	4,1.10 <sup>-9</sup>
	2	3,9.10 <sup>-9</sup>
	3	3,8.10 <sup>-9</sup>

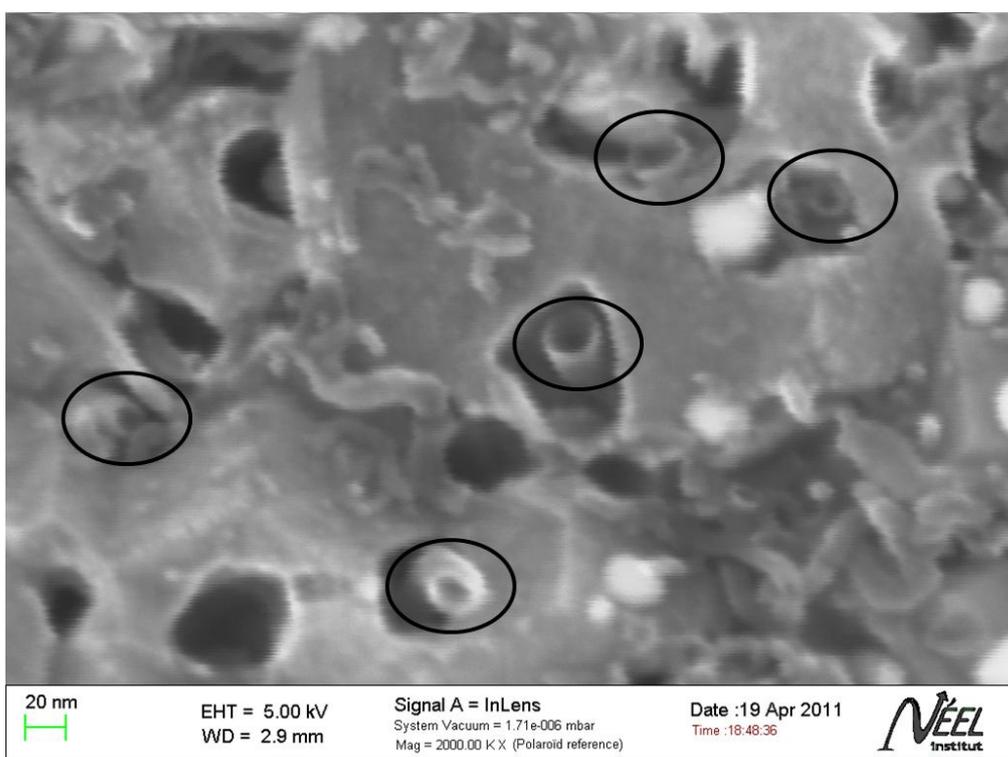
Tableau V- 10 : Evolution de la quantité de ferrocène détecté lors des rinçages successifs des tapis de nanotubes enterrés et non enterrés au DMF.

### V.G.2. Traitement des nanotubes par ultrasons

L'action des bains à ultrasons utilisés pour le nettoyage de surface est basée sur le processus de cavitation acoustique [120]. Lorsque l'on soumet des nanotubes en suspension à un traitement ultrasons, cela induit une scission de ces derniers. Cette technique est utilisée pour diminuer leur longueur [121, 122]. Dans le cas des nettoyages de surface, son effet peut être modélisé par l'application d'une force de cisaillement appliquée sur la surface de l'échantillon.

Nous avons donc placé un échantillon de nanotubes enterrés dans un substrat diamant dans du DMF puis il a été soumis à un bain à ultrasons pendant 45 minutes. Une image MEB de l'échantillon après traitement est présentée sur la Figure V- 42.

On remarque la disparition du tapis de nanotubes et on distingue maintenant la surface du diamant. De plus, on aperçoit qu'à l'intérieur des pores, la base des nanotubes est toujours présente. Cela signifie qu'ils ne se sont pas décrochés, mais qu'ils ont été sectionnés à la limite de la surface du diamant. La partie des nanotubes qui se trouve dans le pore est toujours présente mais la partie externe du nanotube qui constituait le tapis a été décrochée de l'échantillon. Cette expérience montre donc que l'énergie générée par le traitement ultrasons est suffisante pour sectionner les nanotubes, mais insuffisante pour arracher les nanotubes de leurs pores. Cela signifie que l'adhésion des nanotubes sur le diamant n'est plus limitée par la force d'accroche de ce dernier sur le substrat, mais de la force tangentielle de scission des nanotubes.



*Figure V- 42 : Image MEB en électrons secondaires d'un échantillon nanotubes enterrés après traitement par bain ultrasons dans du DMF pendant 45 minutes.*

Au travers de ces études qualitatives nous avons montré que les tapis de nanotubes obtenus à partir des particules de catalyseur enterrées offrent une adhésion bien supérieure comparée à ceux obtenus par la voie classique. La seule voie permettant de quantifier la force d'accroche des nanotubes sur le substrat, est la caractérisation par AFM. Elle nécessite tout de même la mise en place d'une méthodologie particulière qui n'a pas été développée dans le cadre de cette étude.

Afin d'évaluer les propriétés et les perspectives applicatives du matériau composite, la partie suivante sera basée sur la mise en œuvre d'un biocapteur au peroxyde d'hydrogène de troisième génération.

## V.H. Mise au point d'un biocapteur de troisième génération au peroxyde d'hydrogène

Dans la partie précédente, nous avons caractérisé le matériau composite et ses propriétés électriques. Pour envisager son utilisation dans le domaine de la bioélectronique et plus particulièrement pour l'étude de neurone unique, ce matériau doit pouvoir détecter de manière sélective et sans médiateur des composés tels que le glutamate ou la dopamine. Pour ce faire, une des voies les plus adaptées est de concevoir un biocapteur de troisième génération. Nous avons choisi le cas simple et connu de la détection du peroxyde d'hydrogène qui nous permettra de comparer les performances du matériau composite à celle du diamant. Pour que la comparaison soit acceptable, nous avons conçu un biocapteur au peroxyde d'hydrogène de troisième génération basé sur le couplage direct de la peroxydase (conf. Chap II, partie III.G). La mise en œuvre du biocapteur est basée sur l'utilisation de la HRP-avidine et du couplage direct du centre prosthétique de la HRP avec le diamant. Comme dans le cas du diamant, nous avons dans un premier temps procédé au couplage de la biotine-(peg)<sub>3</sub> aminée avec les fonctions aldéhydes et carboxyliques des nanotubes. La solution de couplage est composée de biotine-(peg)<sub>8</sub> aminée à 20 mM et de BOP à 5 mM dans du DMF. Le greffage de la biotine a été caractérisé par spectroscopie infrarouge, le spectre est présenté sur la Figure V- 43.

On retrouve des pics identiques à ceux observés dans le cas du greffage du ferrocène, comme les deux pics dans la zone des CH<sub>x</sub> aliphatiques, situés à 2938 et 2871 cm<sup>-1</sup> qui sont assignés au « stretch » asymétrique et symétrique des CH<sub>2</sub> en alpha des atomes d'oxygène du bras espaceur du ferrocène, mais également les pics à 1650 et 1560 cm<sup>-1</sup> qui mettent en évidence la présence du groupement amide formé durant le couplage au travers de l'étirement de la liaison C=O et des effets conjugués du « stretch » de la liaison C-N et du « bend » de la liaison N-H. Enfin on trouve un dernier pic à 1100 cm<sup>-1</sup> est associé à l'étirement asymétrique des liaisons O-C-O des éthers aliphatiques. On peut noter que le pic à 1650 cm<sup>-1</sup> est très intense comparé au cas du ferrocène, car la contribution du stretch des groupements carbonyles de la biotine s'y ajoute.

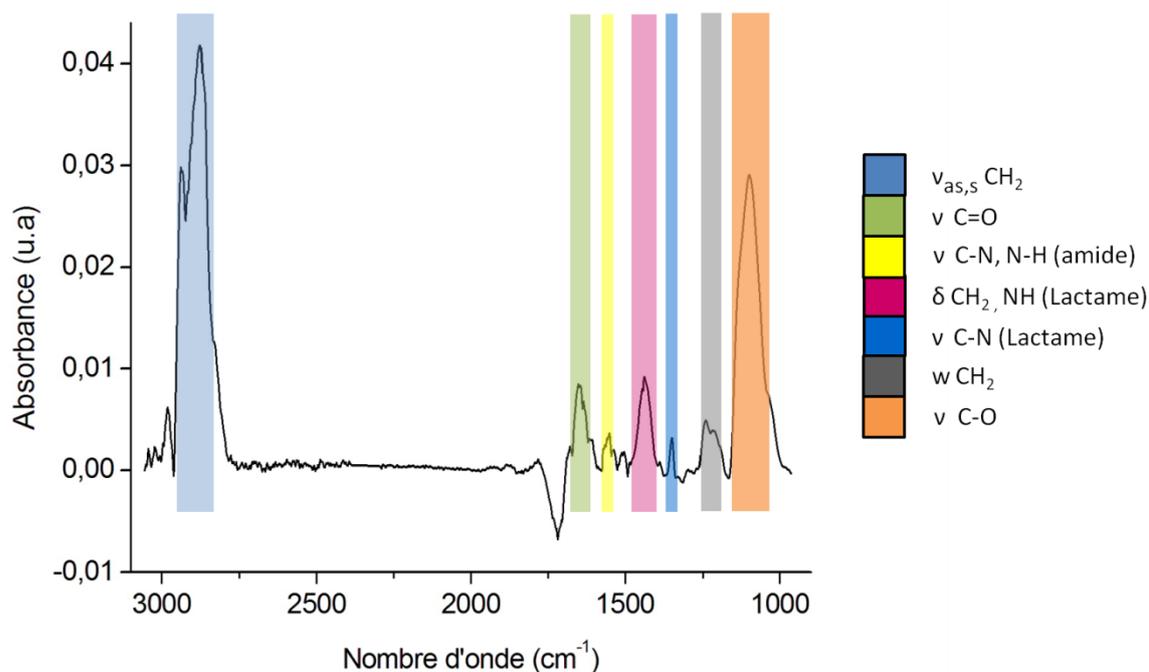


Figure V- 43 : Spectre infrarouge, réalisé en ATR avec un cristal Germanium, d'un échantillon de MWCNT enterrés dans une couche diamant nanocristallin fonctionnalisés par la biotine(peg)<sub>8</sub> aminée.

Les pics supplémentaires qui sont absents des spectres du ferrocène proviennent essentiellement des groupements lactames (-NH-CO-NH-) de la biotine. Ces groupements font apparaître un pic centré à  $1435\text{ cm}^{-1}$  qui est attribué au « bend » de la liaison N-H, ainsi qu'un pic à  $1350\text{ cm}^{-1}$  associé à l'étirement de la liaison C-N. On peut également imputer au pic à  $1435\text{ cm}^{-1}$  les contributions liées à la déformation des  $\text{CH}_2$  en alpha de l'oxygène des éthers et en alpha du soufre de la biotine. Enfin le pic à  $1240\text{ cm}^{-1}$  met en évidence l'agitation des liaisons C-H des groupements  $\text{CH}_2$  en alpha du soufre de la biotine.

La caractérisation par spectroscopie infrarouge nous permet d'affirmer que la biotine est fonctionnalisée sur les nanotubes. Nous avons ensuite immobilisé le conjugué HRP-Avidine sur les nanotubes en utilisant les propriétés de reconnaissance spécifique entre la biotine et l'avidine. Nous avons tout d'abord placé au contact de l'échantillon, une solution de BSA  $10\text{ mgr.mL}^{-1}$  pendant 20 min à température ambiante pour nous affranchir de l'adsorption non spécifique de l'enzyme, puis une solution de HRP-Avidine  $0,1\text{ mgr.mL}^{-1}$  dans du PBS, pendant deux heures à une température de  $4^\circ\text{C}$ . L'échantillon est ensuite caractérisé

par voltamétrie cyclique dans une solution de PBS, le voltampérogramme enregistré pour une vitesse de balayage de 100 mV/s est présenté sur la Figure V- 44-a.

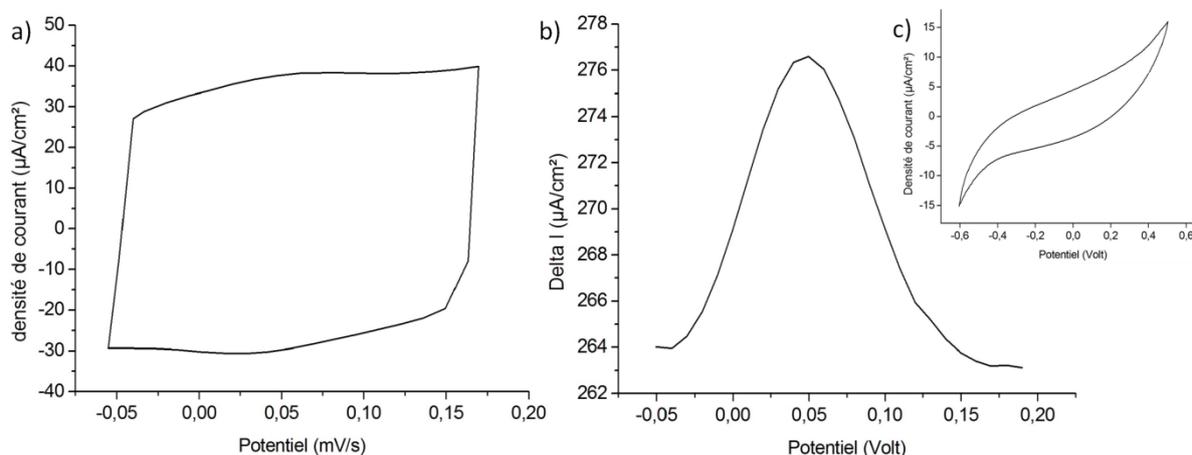
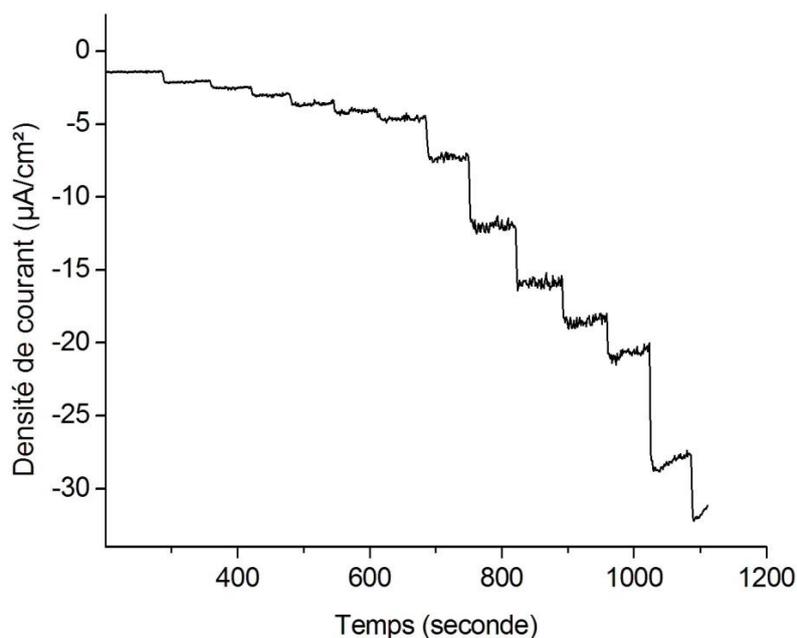


Figure V- 44 : a) Voltampérogramme de la peroxydase immobilisée sur un tapis de nanotubes enterrés dans un échantillon diamant nanocristallin fonctionnalisé par la biotine puis couplé avec la HRP-Avidine. Vitesse de balayage 100 mV/s, solution support de PBS, électrode de référence Ag/AgCl. b) Voltamétrie à onde carré du même échantillon, c) Voltampérogramme d'un tapis de nanotubes enterrés dans un échantillon diamant nanocristallin non fonctionnalisé par la biotine mais mis en contact avec la solution d'HRP-Avidine, solution support de PBS, électrode de référence Ag/AgCl.

On remarque sur le voltampérogramme la présence d'un couple redox à +0,05V vs Ag/AgCl. Comme nous l'avons vu dans la partie III.G, ce couple correspond bien à celui de la peroxydase. Les pics anodiques et cathodiques ne sont pas très marqués en raison du fort courant capacitif dans lequel ils sont noyés. Afin de confirmer la présence du système de pics associés au centre hème de la HRP, nous avons caractérisé l'échantillon par voltamétrie à onde carré (Square Wave Voltametry, S.W.V), cette technique permet de s'affranchir de la composante capacitive du courant. A la différence de la voltamétrie cyclique, la S.W ne fait pas apparaître un pic anodique et cathodique, car les espèces sont successivement réduites et oxydées durant l'application du créneau carré surimposé à l'évolution linéaire du potentiel. On observe donc un seul pic centré au potentiel  $E^\circ$  du couple associé. Le voltampérogramme de l'échantillon de nanotubes modifié avec la HRP est présenté sur la Figure V- 44.b. Il fait apparaître un pic centré en +0,05 V qui confirme qu'il s'agit bien de l'hème de la peroxydase. Afin de vérifier que la HRP n'est pas seulement adsorbée sur les nanotubes nous avons mis en contact un échantillon de nanotubes enterrés non fonctionnalisé par la biotine avec la solution HRP-Avidine 0,1mgr.mL<sup>-1</sup> dans du PBS, pendant deux heures à une température de 4°C, puis nous avons caractérisé l'échantillon par voltammétrie cyclique. Le voltampérogramme obtenu

est présenté sur la Figure V- 44-c. On observe l'apparition d'aucun pic correspondant à la HRP, ce qui montre que l'enzyme est bien immobilisée sous sa forme active sur les nanotubes via la biotine.

Après nous être assurés que la HRP était bien immobilisée et que le couplage électronique avec le substrat était effectif nous avons procédé à la caractérisation du biocapteur par chronoampérométrie. L'échantillon est placé dans une solution de PBS ajustée à pH 6,2 et mise en convection par agitation magnétique. On applique ensuite un potentiel constant de - 0,05 V puis on procède à l'injection de quantités connues de peroxyde d'hydrogène dans la solution. Comme dans le cas du biocapteur réalisé sur diamant, chaque injection se traduit par l'augmentation du courant cathodique enregistré à l'électrode. Le chronoampérogramme recueilli est présenté sur la Figure V- 45. Les concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solution lors des différentes injections vont de : 10 à 10000 µM.



*Figure V- 45 : Chronoampérogramme réalisé sur l'échantillon modifié par la HRP-Avidine durant l'injection successive d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la solution de PBS ajustée à pH 6,2 et agitée. Le potentiel appliqué est de -0,05V vs Ag/AgCl.*

Pour obtenir la courbe d'étalonnage du biocapteur, on reporte la valeur du courant cathodique observé sur le chronoampérogramme en fonction de la valeur de la concentration de peroxyde d'hydrogène en solution correspondante. La courbe obtenue est présentée sur la

Figure V- 46. L'allure de la courbe correspond à celle des cinétiques enzymatiques dégradées par la diffusion du substrat qui sont décrites en première approximation par l'équation de Michaelis-Menten :  $\frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$ . Comme le montre l'équation, lorsque les valeurs de la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont faibles devant K<sub>M</sub>, la vitesse de dégradation du peroxyde d'hydrogène par la peroxydase est proportionnelle à la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

L'encart de la Figure V- 46 montre les premiers points de la courbe d'étalonnage, on constate qu'il existe bien une zone linéaire comprise entre 10 et 150 μM. Cette partie de la courbe d'étalonnage correspond à la gamme dynamique du capteur, dans le cas du biocapteur diamant cette gamme était comprise entre 1 et 40 mM. La sensibilité du biocapteur est décrite par le coefficient directeur de cette partie linéaire ; elle vaut 52 μA/mM/cm<sup>2</sup> pour l'échantillon nanotube et 2 μA/mM/cm<sup>2</sup> pour le diamant soit une amélioration des caractéristiques analytiques par un facteur 25 environ (comme cela était attendu au travers de l'augmentation de la surface d'échange mais aussi des quantités immobilisées de HRP).

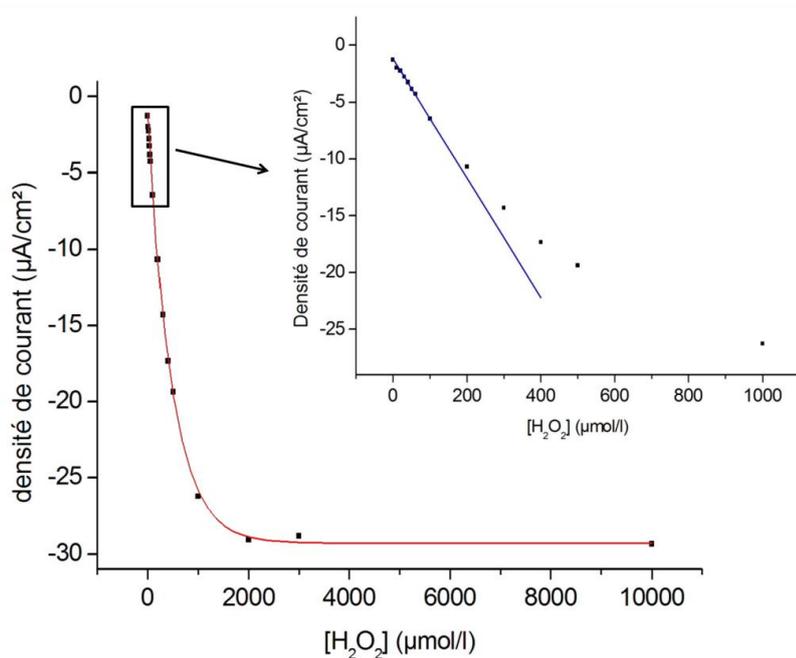


Figure V- 46 : Courbe d'étalonnage du biocapteur représentant l'évolution du courant cathodique en fonction de la concentration de peroxyde d'hydrogène en solution.

Les caractéristiques des biocapteurs au peroxyde d'hydrogène diamant et nanotubes mis au point durant ma thèse sont différentes, autant en terme de gamme linéaire que de sensibilité. La gamme linéaire du biocapteur réalisé sur nanotubes est de l'ordre du micromolaire alors que celle du biocapteur réalisé sur diamant est le millimolaire. De plus le biocapteur mis au point à partir du matériau composite offre une bien meilleure sensibilité que le diamant. La mise au point d'un biocapteur au peroxyde d'hydrogène à partir du matériau composite est une preuve de concept qui nous permet de pouvoir envisager la conception de biocapteur à glutamate ou à dopamine. Si l'on compare ces performances à celles des biocapteurs nanotubes à base de peroxydase, elles sont au moins équivalentes aux valeurs reportées dans la littérature [36, 123] et peuvent être améliorées en fonctionnalisant directement l'enzyme sur les substrats sans utiliser le couple biotine-Avidine.

Cette étude a mis en évidence que l'utilisation d'un substrat diamant est compatible avec les techniques de croissance par HFCVD, ce qui nous a permis de mettre au point un nouveau matériau composite carboné. Nous avons montré qu'il est possible de faire croître des SWCNT en utilisant une bicouche de catalyseur Titane/cobalt, mais que le matériau obtenu ne correspondait pas aux critères exigés en terme de tenue mécanique et de propriétés électriques. Ce matériau SWCNT/diamant peut tout de même s'avérer intéressant pour les applications dans le domaine des supercondensateurs ou du photovoltaïque.

Nous avons également démontré que les propriétés électrochimiques du matériau composite diamant/nanotubes multiparois est plus adapté aux applications visées, mais que les tapis obtenus par les méthodes de croissance classiques ne l'est pas. En effet, nous avons vu que le mode de croissance top-base induisait la présence d'un nombre élevé de particule de catalyseur sur la partie supérieure du tapis. Ce qui constitue une limite au vu de la toxicité des nanoparticules et de la possibilité qu'elles puissent être relarguées dans le corps lors de potentielles implantations. De plus, l'adhésion réduite des nanotubes sur la surface interdisait d'envisager de pouvoir utiliser ce matériau dans le cadre d'applications in vivo.

Pour remédier au problème d'adhésion des nanoparticules nous avons donc mis au point une nouvelle méthode de gravure du diamant catalysée par des nanoparticules de palladium ou de nickel et assistée par filament chaud. Cette méthode permet d'enterrer dans le diamant en quelques minutes et à des profondeurs comprises entre 100 et 200 nm les particules de catalyseur. Ces particules peuvent ensuite être utilisées pour catalyser la croissance de nanotubes à l'intérieur des pores ainsi formés sans modifier l'état de surface du

diamant. Bien que cet axe n'ait pas été exploité dans le cadre de ce travail, on peut envisager d'utiliser cette méthode pour mettre au point des membranes de diamant poreuses. Nous avons mis en évidence que cette étape d'enterrement des particules augmentait la force d'accroche des nanotubes sur le substrat et de manière concomitante les propriétés électriques du matériau composite. D'autre part, le mode de croissance des nanotubes à partir des particules enterrées a été identifié comme étant de type base-top, ce qui implique que toutes les particules restent donc enterrées dans la couche diamant durant la croissance évitant ainsi les problèmes liés à la toxicité de ces dernières.

Enfin, nous avons immobilisé la peroxydase sur les nanotubes et montré qu'il était possible de connecter directement le centre prosthétique de cette dernière avec les nanotubes. Nous avons ensuite réalisé un biocapteur au peroxyde d'hydrogène de troisième génération, affichant de meilleures caractéristiques que celui réalisé selon le même schéma à partir d'une électrode diamant. Ce résultat constitue une preuve de concept et démontre qu'il est possible de réaliser des biocapteurs adaptés à la détection de neurotransmetteurs. On pense notamment à l'immobilisation de manière directe de la glutamate oxydase pour la détection du glutamate.

Cette partie de ma thèse est le fruit d'un travail commun réalisé avec Clement Hebert Doctorant à l'Institut Néel dans l'équipe SC2G. La caractérisation des propriétés du matériau composite ont permis de montrer que le matériau composite conçu répond aux exigences du cahier des charges imputées aux applications visées. Des études AFM visant à quantifier la force d'accroche des nanotubes sont en cours d'étude. En parallèle, des croissances de neurones ainsi que des implantations vont être réalisées à l'Institut Neurosciences de Grenoble (GIN).

- [1] H. Masuda, M. Watanabe, K. Yasui, D. Tryk, T. Rao, A. Fujishima, *Advanced Materials*, **2000**. 12 (6), 444.
- [2] Y.S. Zou, Y. Yang, W.J. Zhang, Y.M. Chong, B. He, I. Bello, S.T. Lee, *Applied physics letters*, **2008**. 92, (5).
- [3] Nianjun Yang\*, Hiroshi Uetsuka, Eiji Osawa, and Christoph E. Nebel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**. 47, 5183–5185.
- [4] Wiebke Janssen, Sebastian Faby, Etienne Gheeraert\*, *Diamond & Related Materials*, **2011**. 20, 779–781.
- [5] J.S. Gao, T. Arunagiri, J.J. Chen, P. Goodwill, O. Chyan, J. Perez, D. Golden, *Chemistry of materials*, **2000**. 12, (11), 3495-3500.
- [6] Yang Song, Greg M. Swain\*, *Analytica Chimica Acta*, **2007**. 593, 7–12.
- [7] C. Terashima, T.N. Rao, B.V. Sarada, N. Spataru, A. Fujishima, *journal of electroanalytical chemistry*, **2003**. 544, 65-74.
- [8] J. Wang, G.M. Swain, T. Tachibana, K. Kobashi, *Electrochemical and solid state letters*, **2000**. 3, (6), 286-289.
- [9] Ray H. Baughman\*, Anvar A. Zakhidov, Walt A. de Heer, *Science*, **2002**. 297, 787-792.
- [10] G. Jia, H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan, Y. Zhao\* and X. Guo \*, *Environmental Science & Technology*, **2005**. 39, (5), 1378-1383.
- [11] Jed D. Whittaker, Ethan D. Minot, David M. Tanenbaum, Paul L. McEuen, and Robert C. Davis\*, *Nano letters*, **2006**. 6, (5), 953-957.
- [12] I. Lahiri, D. Lahiri, S. Jin, A. Agarwal\* and Wonbong Choi\*, *ACS Nano*, **2011**. 5, (2), 780-787.
- [13] Seong Chu Lim, Ha Kyu Choi, Hee Jin Jeong, Young Il Song, Gil Yong Kim, Kyung Taek Jung, Young Hee Lee\*, *Carbon*, **2006**. 44, 2809–2815.
- [14] Woo Yong Sung, Seung Min Lee, Wal Jun Kim, Jong Girl Ok, Ho Young Lee, Yong Hyup Kim, *Diamond & Related Materials*, **2008**. 17, 1003-1007.
- [15] Huan-Chieh Su, Chang-Hsiao Chen, Yung-Chan Chen, Da-Jeng Yao, Hsin Chen, Yen-Chung Chang, Tri-Rung Yew, *Carbon*, **2010**. 48 (3), 805-812.
- [16] Lijima, S., *Nature*, **1991**. 354, (6348), 56-58.
- [17] Louie S.G., *Topics in applied physics*, **2001**. 80, 113-145.
- [18] T.W. Ebbesen, H.J. Lezec, H. Hiura, J.W. Bennett, H.F. Ghaemi, T. Thio, *Nature*, **1996**. 382, (6586), 54-56.
- [19] H.J. Dai, E.W. Wong, C.M. Lieber, *Science*, **1996**. 272, (5261), 523-526.
- [20] K.H. An, W.S. Kim, Y.S. Park, J.M. Moon, D.J. Bae, S.C. Lim, Y.S. Lee, Y.H. Lee, *Advanced functional materials*, **2001**. 11, (5), 387-392.
- [21] R.H. Baughman\*, C. Changxing, A.A. Zakhidov, Z. Iqbal, J.N. Barisci, G.M. Spinks, G.G. Wallace, A. Mazzoldi, D. De Rossi, A.G. Rinzler, O. Jaschinski, S. Roth, M. Kertesz, *Science*, **1999**. 284, 1340-1344.
- [22] W.A. Deheer, A. Chatelain, D. Ugarte, *Science*, **1995**. 270, (5239), 1179-1180.
- [23] Marianna Foldvari, DPharmSci\*, Mukasa Bagonluri, MScb, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **2008**. 4, 173–182.
- [24] J.H. Hafner, C.L. Cheung, C.M. Lieber, *Nature*, **1999**. 398, (6730), 761-762.
- [25] L. Marty, A. Iaia, M. Faucher, V. Bouchiat, C. Naud, M. Chaumont, T. Fournier, A.M. Bonnot\*, *Thin Solid Films*, **2006**. 501, 299 – 302.
- [26] L. Marty, V. Bouchiat, C. Naud, M. Chaumont, T. Fournier, A.M. Bonnot, *Nano letters*, **2003**. 3, (8), 1115-1118.
- [27] L. Marty, V. Bouchiat\*, A.M. Bonnot, M. Chaumont, T. Fournier, S. Decossas, S. Roche, *Microelectronic Engineering*, **2002**. 61–62, 485–489.

- [28] Arben Merkoçi, Martin Pumera, Xavier Llopis, Briza Pérez, Manel del Valle, Salvador Alegret, *Trends in Analytical Chemistry*, **2005**. 24, (9), 826-838.
- [29] Z.H. Wang, J. Liu, Q.L. Liang, Y.M. Wang, G. Luo, *Analyst*, **2002**. 127, (5), 653-658.
- [30] J. X. Wang, M.X. Li, Z.J. Shi, N.Q. Li, Z.N. Gu, *Analytical chemistry*, **2002**. 74, (9), 1993-1997.
- [31] Madhukar Varshney, Yanbin Li\*, *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**. 24, 2951–2960.
- [32] E.S. McLamore, S. Mohanty, J. Shi, J. Claussen, S.S. Jedlick, J.L. Rickus, D.M. Porterfield\*, *Journal of Neuroscience Methods*, **2010**. 189, 14–22.
- [33] Yun-Long Zeng\*, Yu-Fang Huang, Jian-Hui Jiang\*, Xiao-Bing Zhang, Chun-Ran Tang, Guo-Li Shen, Ru-Qin Yu\*, *Electrochemistry Communications*, **2007**. 9, 185–190.
- [34] A. Callegari, S. Cosnier, S. M. Marcaccio, D. Paolucci, F. Paolucci, V. Georgakilas, N. Tagmatarchis, E. Vazquez, M. Prato, *Journal of materials chemistry*, **2004**. 14, (5), 807-810.
- [35] Chengguo Hu, Shuai Yuan, Shengshui Hu\*, *Electrochimica Acta*, **2006**. 51, 3013–3021.
- [36] Ying Liu, Jianping Lei, Huangxian Ju\*, *Talanta*, **2008**. 74, 965–970.
- [37] G. Cellot, E. Cilia, S. Cipollone, V. Rancic, A. Sucapane, S. Giordani, L. Gambazzi, H. Markram, M. Grandolfo, D. Scaini, F. Gelain, L. Casalis, M. Prato, M. Giugliano and L. Ballerini\*, *Nature nanotechnology*, **2009**. 4, 126-133.
- [38] V. Lovat, D. Pantarotto, L. Lagostena, B. Cacciari, M. Grandolfo, M. Righi, G. Spalluto, M. Prato, L. Ballerini, *Nano letters*, **2005**. 5, (6), 1107-1110.
- [39] Mark P. Mattson\*, Robert C. Haddon, and Apparao M. Rao, *Journal of Molecular Neuroscience*, **2000**. 14, 175-182.
- [40] Saleh\* Tawfik A., *Applied Surface Science*, **2011**. 257, 7746–7751.
- [41] Jie Liu\*, Olivier Bibari, Pascal Mailley, Jean Dijon, Emmanuelle Rouvière, Fabien Sauter-Starace, Patrice Caillat, Françoise Vinet and Gilles Marchand, *New J. Chem.*, **2009**. 33, 1017–1024.
- [42] S.K. Smart, A.I. Cassady, G.Q. Lu, D.J. Martin\*, *Carbon*, **2006**. 44, 1034–1047.
- [43] Aneta Fraczek\*, Elzbieta Menaszek, Czeslawa Paluszkiwicz, Marta Blazewicz, *Acta Biomaterialia*, **2008**. 4, 1593–1602.
- [44] T. Coccini\*, E. Roda, D.A. Sarigiannis, P. Mustarelli, E. Quartarone, A. Profumo, L. Manzoa, *Toxicology*, **2010**. 269, 41–53.
- [45] M.L. Schipper, N. Nakayama-Ratchford, C.R. Davis, N.W.S. Kam, P. Chu, Z. Liu, X. Sun, H. Dai and S.S. Gambhir\*, *nature nanotechnology*, **2008** 8, 216-221.
- [46] D.S. Bethune, C.H. Kinag, M.S. Devries, G.Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers, *Nature*, **1993**. 363, (6430), 605-607.
- [47] S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature*, **1993**. 363, (6430), 603-605.
- [48] C. Journet, W.K. Maser, P. Bernier, A. Loiseau, M.L. de la Chapelle, S. Lefrant, P. Deniard, R. Lee, J.E. Fischer, *Nature*, **1997**. 388, (6644 ), 756-758.
- [49] A. Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H.J. Dai, P. Petit, J. Robert, C.H. Xu, Y.H. Lee, S.G. Kim, A.G. Rinzler, D.T. Colbert, G.E. Scuseria, D. Tomanek, J.E. Fischer, R.E. Smalley, *Science*, **1996**. 273, (5274), 483-487.
- [50] K.L. Lu, R.M. Lago, Y.K. Chen, M.L.H. Green\*, P.J.F. Harris and S.C. Tsang, *Carbon*, **1996**. 34, 814-816.
- [51] M.T. Martinez, M.A. Callejas, A.M. Benito, M. Cochet, T. Seeger, A. Anson, J. Schreiber, C. Gordon, C. Marhic, O. Chauvet, W.K. Maser, *Nanotechnology*, **2003**. 14 (7), 691-695.

- [52] M.J. Bronikowski, P.A. Willis, D.T. Colbert, K.A. Smith, R.E. Smalley, *Journal Of Vacuum Science & Technology A-Vacuum Surfaces And Films*, **2001**. 19, (4), 1800-1805.
- [53] Pavel Nikolaev, Michael J. Bronikowski, R. Kelley Bradley, Frank Rohmund, Daniel T. Colbert, K.A. Smith, Richard E. Smalley\*, *Chemical Physics Letters*, **1999**. 313, 91–97.
- [54] V. Ivanov, J.B. Nagy, Ph. Lambin, A. Lucas, X.B. Zhang, X.F. Zhang , D. Bemaerts, G. Van Tendeloo, S. Amelinckx, J. Van Landuyt, *Chemical physics Letters*, **1994**. 223, 329-335.
- [55] Y.M. Li, D. Mann, M. Rolandi, W. Kim, A. Ural, S. Hung, A. Javey, J. Cao, D.W. Wang, E. Yenilmez, Q. Wang, J.F. Gibbons, Y. Nishi, H.J. Dai, *Nano letters*, **2004**. 4, (2), 317-321.
- [56] A.M. Bonnot\*, M. Deldem, E. Beaunon, T. Fournier, M.C. Schouler, M.Mermoux *Diamond and Related Materials*, **1999**. 8, 631–635.
- [57] C.B. Xu, J. Zhu, *Nanotechnology*, **2004**. 15 (11), 1671-1681.
- [58] Martry, L., *Thèse de doctorat*, **2004**. Université Joseph Fourier, Grenoble.
- [59] J. Kong, H.T. Soh, A.M. Cassell, C.F. Quate, H.J. Dai, *Nature*, **1998**. 395 (6705), 878-881.
- [60] T. Yamada, T. Namai, K. Hata, D.N. Futaba, K. Mizuno, J. Fan, M. Yudasaka, M. Yumura, S. Iijima, *Nature Nanotechnology*, **2006**. 1, (2), 131-136.
- [61] H. Nishino, S. Yasuda, T. Namai, D.N. Futaba, T. Yamada, M. Yumura, S. Iijima, K. Hata, *Journal Of Physical Chemistry C*, **2007**. 111, (48), 17961-17965.
- [62] T. Yamada, A. Maigne, M. Yudasaka, K. Mizuno, D.N. Futaba, M. Yumura, S. Iijima, K. Hata, *Nano letters*, **2008**. 8, (12), 4288-4292.
- [63] Hussain A., *Nanotechnology*, **2003**. 14 (8 ), 925-930.
- [64] A.H. Mahan, J.L. Alleman, M.J. Heben, P.A. Parilla, K.M. Jones, A.C. Dillon, *Applied physics letters*, **2002**. 81 (21), 4061-4063.
- [65] H.F. Winters, H. Seki, R.R. Rye, M.E. Coltrin, *Journal of applied physics*, **1994**. 76 (2), 1228-1243.
- [66] Hsu W. L., *Appl. Phys. Lett.* , **1991**. 59, (12), 1427-1429.
- [67] Nguyen Tuan Hong, Ken Ha Koh, Ngo Thi Thanh Tam, Phan Ngoc Minh, Phan Hong Khoi, Soonil Lee *Thin Solid Films*, **2009**. 517, 3562–3565.
- [68] Stig Helveg, Carlos Lopez-Cartes\*, Jens Sehested, Poul L. Hansen, Bjerne S. Clausen, Jens R. Rostrup-Nielsen, Frank Abild-Pedersen & Jens K. Nørskov, *Nature*, **2004**. 427, 426-429.
- [69] Y.M. Li, W. Kim, Y.G. Zhang, M. Rolandi, D.W. Wang, H.J. Dai, *Journal of physical chemistry B*, **2001**. 105 (46), 11424-11431.
- [70] T. Mitsui, M. K. Rose, E. Fomin, D. F. Ogletree & M. Salmeron, *Nature*, **2003**. 422, 705-707.
- [71] Tatsuya Ohashi, Wataru Sugimoto, Yoshio Takasu\*, *Diamond & Related Materials*, **2011**. 20, 1165–1170.
- [72] F.C. Schouten, E.T. Brake, O.L.J. Gijzeman and G.A. Bootsma, *Surface Science*, **1978**. 74, 1-12.
- [73] Anton, R., *Carbon*, **2008**. 46, 656-662.
- [74] W. Smirnov, J. J. Hees, D. Brink, W. Müller-Sebert, A. Kriele, O. A. Williams, C. E. Nebel, B. Rezek, D. Shin, H. Watanabe and T. Yamamoto, *Applied Physics Letters*, **2010**. 97.
- [75] DebRoy K. Tankala and T., *J. Appl. Phys.*, **1992**. 72, (2), 712-718.
- [76] S. Konishi, T. Ohashi, W. Sugitomo, Y. Takasu, *Chemistry letters*, **2006**. 35, (11), 1216.

- [77] N.H. Tran\*, M.A. Wilson, A.S. Milev, J.R. Bartlett, R.N. Lamb, D. Martin, G.S.K. Kannangara *Advances in Colloid and Interface Science*, **2009**. 145, 23–41.
- [78] Paul K. Chu\*, Liuhe Li *Materials Chemistry and Physics*, **2006**. (96), 253–277.
- [79] Yamamoto, Kazuhiro, *Vacuum*, **2010**. 84, 638–641.
- [80] A. M. Bonnot, V. Bouchiat, M. Faucher. Patent number: WO 2004 094690.
- [81] Popov, Valentin N., *Materials Science and Engineering R*, **2004**. 43, 61-102.
- [82] S.M. Hussain, K.L. Hess, J.M. Gearhart, K.T. Geiss, J.J. Schlager, *Toxicology in Vitro*, **2005**. 19, 975–983.
- [83] Justin G. Teegarden, Paul M. Hinderliter, Galya Orr, Brian D. Thrall, and Joel G. Pounds, *Toxicological sciences*, **2007**. 2 (95), 300–312.
- [84] E.H. Wahl\*, T.G. Owano, C.H. Kruger, U. Lommatzsch, D. Aderhold and R.N. Zare, *American Institute of Aeronautics and Astronautics*.
- [85] Jian Chen, Mark A. Hamon, Hui Hu, Yongsheng Chen, Apparao M. Rao, Peter C. Eklund, Robert C. Haddon\*, *Science*, **1998**. 282, (5386), 95-98.
- [86] A. M. Rao, E. Richter, Shunji Bandow, Bruce Chase, P. C. Eklund\*, K. A. Williams, S. Fang, K. R. Subbaswamy, M. Menon, A. Thess, R. E. Smalley, G. Dresselhaus, M. S. Dresselhaus, *Science*, **1997**. 275, (5297), 187-191.
- [87] H. M. Heise, R. Kuckuk, A. K. Ojha, A. Srivastava, V. Srivastava and B. P. Asthana\*, *J. Raman Spectrosc.*, **2009**. 40, 344–353.
- [88] A. Iaiia\*, L. Marty, C. Naud, V. Bouchiat, A. Loiseau, E. Di Muoio, T. Fournier, A.M. Bonnot, *Thin Solid Films*, **2006**. 501, 221 – 223.
- [89] A. M. Rao\*, J. Chen, E. Richter, U. Schlecht, P. C. Eklund, R. C. Haddon, U. D. Venkateswaran, Y.-K. Kwon and D. Tománek, *Physical Review Letters*, **2001**. 86, (17), 3895-3898.
- [90] Andrea C. Ferrari, *ds "Tribology of diamond-like carbon films: fundamentals and applications"*, **2008**. Ed. Christophe Donnet and A. Erdemir, (Springer Science), 25-82.
- [91] E.F. Antunes\*, A.O. Lobo, E.J. Corat\*, V.J. Trava-Airoldi, A.A. Martin, C. Verissimo, *Carbon*, **2006**. 44, 2202–2211.
- [92] E.F. Kukovitsky, S.G. L'vov, N.A. Sainov, V.A. Shustov, L.A. Chernozatonskii\*, *Chemical Physics Letters*, **2002**. 355, 395–399.
- [93] A.C. Ferrari, J. Robertson, *Physical review B*, **2001**. 63, (12), 121405.
- [94] J. Wan, R.Q. Zhang \*, H.F. Cheung, *Computational Materials Science*, **2002**. 23 73–79.
- [95] M. Werner, O. Dorsch, H.H. Baerwind, E. Obermeier, C. Johnston, P.R. Chalker and S. Romani, *Ieee Transactions on Electron Devices*, **1995**. 42, (I), 1344-1351.
- [96] J. Bischof, D. Scherer, S. Herminghaus, P. Leiderer, *Physical review letters*, **1996**. 77, (8), 1536-1539.
- [97] Wiebke Janssen, Etienne Gheeraert\*, *Diamond & Related Materials*, **2011**. 20, 389–394.
- [98] C.A. Cooper, R.J. Young, \*, M. Halsall, *Composites: Part A*, **2001**. 32, 401–411.
- [99] M.S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, R. Saito, A. Jorio, *Physics Reports*, **2005**. 409, 47–99.
- [100] P. Chen, X. Wu, X. Sun, J. Lin,\* W. Ji, and K. L. Tan, *Physical Review Letters*, **1999**. 82, (12), 2548-2551.
- [101] Yu. V. Fedoseeva, L. G. Bulusheva, A. V. Okotrub, D. V. Vyalikh, and A. Fonseca, *The Journal of Chemical Physics*, **2010**. 133, 224706.
- [102] Changlun Chen, Bo Liang, Akihisa Ogino, Xiangke Wang\*, and Masaaki Nagatsu\*, *J. Phys. Chem. C*, **2009**. 113, 7659–7665.

- [103] T.I.T. Okpalugo\*, P. Papakonstantinou, H. Murphy, J. McLaughlin, N.M.D. Brown, *Carbon*, **2005**. 43, 153–161.
- [104] E. Luais, C. Thobie-Gautier, A. Tailleur, M.-A. Djouadi, A. Granier, P.Y. Tessier, D. Debarnot, F. Poncin-Epaillard, M. Boujtita\*, *Electrochimica Acta*, **2010**. 55, 7916–7922.
- [105] Y. Tanga\*, Y.S. Li, Q. Yanga\*, A. Hirose, *Applied Surface Science*, **2011**. 257, 4699–4705.
- [106] A. Dementjev, K. Maslakov, I. Kulakova, V. Korolkov\*, V. Dolmatov, *Diamond & Related Materials*, **2007**. 16, 2083–2086.
- [107] Nagraj Shankar, Nick G. Glumac\*, Min-Feng Yu, S.P. Vanka, *Diamond & Related Materials*, **2008**. 17, 79–83.
- [108] F. Xu\*, M. Minniti, C. Giallombardo, A. Cupolillo, P. Barone, A. Oliva, L. Papagno, *Surface Science*, **2007**. 601, 2819–2822.
- [109] M.H. Upton\*, R.F. Klie, J.P. Hill, T. Gog, D. Casa, W. Ku, Y. Zhu, M.Y. Sfeir, J. Misewich, G. Eres, D. Lowndes, *Carbon*, **2009**. 47, 162–168.
- [110] M.M. Brzhezinskaya\*, E.M. Baitinger, V.V. Shnitov, *Physica B*, **2004**. 348, 95–100.
- [111] Thomas Palacin, Hung Le Khanh, Bruno Jousseme, Pascale Jegou, Arianna Filoramo, Christian Ehli, Dirk M. Guldi\* and Stephane Campidelli\*, *J. AM. CHEM. SOC.*, **2009**. 131, 15394–15402.
- [112] N. Tagmatarchis, M. Prato, *Journal of materials chemistry*, **2004**. 14, (4), 437–439.
- [113] Li Wang, Lei Ge, Thomas E. Rufford, Jiuling Chen, Wei Zhou, Zhonghua Zhu\*, Victor Rudolph, *Carbon*, **2011**. 49, 2022–2032.
- [114] B. Castro, J.R. Dormoy, G. Evin, C. Selve, *Tetrahedron Letters*, **1975**. (14), 1219–1222.
- [115] A.M. Shanmugaraj, J.H. Bae, Kwang Yong Lee, Woo Hyun Noh, Se Hyoung Lee, Sung Hun Ryu\*, *Composites Science and Technology*, **2007**. 67, 1813–1822.
- [116] D.R. Shobha Jeykumari, S. Ramaprabhu, S. Sriman Narayanan\*, *Carbon*, **2007**. 45, 1340–1353.
- [117] Chang-Hsiao Chen, Huan-Chieh Su, Shih-Chang Chuang, Shiang-Jie Yen, Yung-Chan Chen, Yu-Tao Lee, Hsin Chen, Tri-Rung Yew, Yen-Chung Chang, Shih-Rung Yeh and Da-Jeng Yao, *Nanotechnology*, **2010** 21, 485501.
- [118] Sanderson, R.T, dans "*Chemical bonds and bond energy 2d ed.*", **1976**. Ed. Academic Press, (New york), 218.
- [119] Sanderson, R.T, dans "*Polar Covalence*", **1983**. Ed. Academic Press, (New york), 240.
- [120] Lohse D., *Nature*, **2005**. 434, 33–34.
- [121] F. Hennrich, R. Krupke, K. Arnold, J.A.R. Stutz, S. Lebedkin, T. Koch, T. Schimmel, M.M. Kappes, *Journal of physical chemistry*, **2007**. 111, (8), 1932–1937.
- [122] Yan Y. Huang, Tuomas P. J. Knowles, and Eugene M. Terentjev\*, *Adv. Mater.*, **2009**. 21, 3945–3948.
- [123] Zhijuan Wang, Meiye Li, Pingping Su, Yuanjian Zhang, Yanfei Shen, Dongxue Han, Ari Ivaska, Li Niu\*, *Electrochemistry Communications*, **2008**. 10, 306–310.

## ***CONCLUSION GENERALE***

Les propriétés physico-chimiques exceptionnelles du diamant le positionne aujourd'hui comme candidat idéal pour une quantité grandissante d'applications dans les domaines de la biologie, de la biochimie, de l'environnement ou encore de la santé. La maîtrise des techniques de synthèse, associée à son faible coût de revient, permet d'envisager des applications industrielles à grande échelle. Parallèlement, le développement de matériaux composites à base de nanotubes de carbone s'impose comme l'un des axes de recherche majeurs des prochaines années. L'association des propriétés mécaniques et électroniques des nanotubes de carbone à celles du diamant au sein d'un matériau composite tout carboné permet d'en accroître de manière significative les performances, en particulier dans le domaine de la bioélectronique.

L'aspect pluridisciplinaire de mon travail de thèse est illustré au travers des différentes parties abordées dans le manuscrit, qui sont axées sur des domaines scientifiques distincts. On trouve un aspect physique associé à la croissance du diamant, des nanotubes et au développement de la technique de gravure assistée par filament chaud. Un aspect chimie, avec la mise au point d'une nouvelle technique de fonctionnalisation et les différentes étapes de couplage chimique. Enfin, un aspect biologie avec la conception des biopuces et de biocapteurs. Ce caractère pluridisciplinaire a nécessité l'utilisation d'une large variété d'outils scientifiques mais également le développement d'une méthodologie de synthèse et de caractérisation des nanotubes. Mon travail de thèse constitue une étude complète nécessitant la maîtrise des étapes de synthèses, de fonctionnalisations et de caractérisations, permettant d'envisager la mise au point de dispositifs dans un avenir proche. Une partie de cette entreprise s'appuie sur le savoir faire des deux laboratoires au sein desquels s'est déroulé ma thèse.

L'absence de travaux antérieurs concernant d'une part, la nouvelle méthode de fonctionnalisation des amines et d'autre part, le développement du matériau composite, du fait de leurs caractères innovants, a nécessité d'identifier les besoins nécessaires à leurs caractérisations puis de s'approprier les techniques choisies (FTIR, XPS). Dans le cas du matériau composite diamant/nanotubes, le cahier des charges établi a imposé une rupture avec les techniques de dépôt utilisées pour la conception des matériaux composites actuels. J'ai donc dû définir une stratégie nouvelle permettant de s'affranchir des problèmes d'adhésion récurrents des nanotubes sur leurs substrats.

Le taux de dopage des échantillons diamant polycristallin lourdement dopés au bore confère au diamant un comportement métallique qui permet son utilisation comme électrode pour l'électrochimie. Les propriétés électrochimiques du diamant associées à son inertie chimique et sa biocompatibilité donnent naissance à de nombreux projets dans le domaine de la neurostimulation, ou la conception de rétines artificielles. Néanmoins la conception de dispositifs fonctionnels dédiés au domaine de la médecine implique également d'être capable d'immobiliser des biomolécules sur la surface des échantillons.

Bien que différentes méthodes de fonctionnalisation aient été décrites sur diamant, l'absence de méthode simple et adaptée au greffage direct d'espèces biologiques nous a incité à travailler sur l'élaboration d'une nouvelle technique répondant à ces critères. Après avoir constaté les interactions atypiques des amines avec les surfaces de diamant hydrogénées, nous avons développé une méthodologie de fonctionnalisation basée sur le greffage direct des composés aminés aliphatiques sur les échantillons hydrogénés. L'analyse des données expérimentales a montré que celle-ci engendrait l'obtention d'une monocouche stable et compacte sans toutefois pouvoir mettre en évidence le type de liaison. Le recouplement des observations émanant des caractérisations par spectroscopie infrarouge et de l'étude du suivi du greffage en temps réel par SG-FET réalisé au WSI (Université de Munich) m'a permis d'émettre une hypothèse sur le mécanisme réactionnel et la formation d'une liaison C-C. Le mécanisme de greffage proposé s'apparente à une réaction de type substitution nucléophile où les carbones de la surface du diamant jouent le rôle de carbanions et l'amine celui du nucléofuge. Ce schéma laisse donc apparaître la possibilité d'immobiliser des molécules au travers d'autres groupements partant potentiels tels que des composés halogénés. Comme le mécanisme proposé le présumait, j'ai par la suite réussi à immobiliser d'autres composés comportant différents groupements fonctionnels et ainsi validé le mécanisme précédemment suggéré. Cette méthode présente plusieurs avantages. Elle permet d'immobiliser des espèces biologiques de manière directe, spontanée et en une seule étape. Elle rend également possible la modulation de la quantité d'espèces greffées (via la maîtrise du temps de dépôt et de la concentration en espèces aminées) et diminue donc l'impact de la modification de surface sur les propriétés électrochimiques du diamant lorsque l'obtention d'une monocouche compacte n'est pas nécessaire.

J'ai ensuite procédé à la mise en œuvre de dispositifs en utilisant cette nouvelle chimie afin de démontrer les potentialités et l'apport de cette technique dans le cadre de l'immobilisation d'espèces biologiques. Pour ce faire, j'ai conçu une biopuce à ADN en

procédant au greffage direct par drop casting et en une étape de brins d'ADN modifiés par une amine. Si l'on se réfère à la littérature, la mise en œuvre de biopuces basée sur les méthodes de fonctionnalisations classiques du diamant nécessite en moyennes trois étapes et une vingtaine d'heures de manipulation. De la même manière, il a été possible d'immobiliser sans bras espaceur, de manière localisé et en une seule étape des Immunoglobulines sur diamant. De plus, j'ai montré que ces protéines dont les propriétés de reconnaissance sont intimement liées à leurs structures tertiaires, conservent leur activité biologique après avoir été immobilisé sur le diamant. Il n'existe à ma connaissance sur aucun matériau une technique de fonctionnalisation permettant d'immobiliser de manière covalente par réaction spontanée des protéines sans dénaturation de cette dernière (ce qui est le cas pour la modification des protéines par des diazoniums).

En parallèle, j'ai pu réaliser un biocapteur de troisième génération pour la détection du peroxyde d'hydrogène basé sur l'utilisation du complexe enzymatique HRP-avidine et sur les propriétés de reconnaissance du couple biotine/avidine. La conception de ce biocapteur est originale car l'immobilisation de la HRP sur le substrat s'effectue au travers de la reconnaissance avec la biotine préalablement immobilisée sur le diamant. La stabilité de la biotine dans le temps et l'inertie chimique du diamant associées à la versatilité de l'association biotine/avidine permettent de réutiliser un grand nombre de fois l'échantillon en régénérant la surface.

Enfin, le caractère spontané de cette méthode de fonctionnalisation donne accès à des techniques permettant de densifier et miniaturiser les greffages. J'ai montré qu'il est possible d'utiliser la technique de dip-pen lithography et de localiser les dépôts de manière structuré à l'échelle nanométrique. Ce résultat permet de réaliser des biopuces ou biocapteurs de taille nanométrique mais également d'envisager la mise en œuvre de dispositifs dans le domaine de l'électronique moléculaire. Ce travail a été réalisé au NIBEC (Université d'Ulster) à Dublin sur des substrats diamant monocristallins intrinsèques.

Une partie de mon travail de thèse est axé sur la conception d'un matériau composite à base de nanotubes de carbone pour des applications en neurologie. Les propriétés électrochimiques des nanotubes, en particulier leur capacité double couche, s'avèrent être très intéressantes pour les applications en neurostimulation basées sur l'approche d'injection de charge par couplage capacitif. En revanche, l'une des limites de ces matériaux est la conjoncture du caractère toxique des nanotubes et de la mauvaise adhésion de ces derniers sur

leurs substrats, ce qui exclut toutes perspectives d'application *in vivo* en l'état actuel des choses. La base de ce projet est fondée sur l'idée qu'il est possible, en utilisant deux matériaux carbonés, de mettre au point une méthodologie permettant de créer une interface carbonée continue entre le diamant et les nanotubes.

Toutes les croissances de nanotubes par CVD, quelles soient à catalyseur flottant ou solide, aboutissent sur le dépôt d'un tapis très faiblement lié au substrat. Nous avons montré que le substrat est compatible avec les techniques de synthèse HFCVD et qu'il est possible d'obtenir des tapis de nanotubes mono-parois. Ce type de nanotubes est relativement compliqué à synthétiser par HFCVD avec des catalyseurs non flottants et ils sont très convoités en raison de leurs propriétés électroniques particulières. Néanmoins, nous avons montré que ces mêmes propriétés rendent leur usage inadapté aux applications ciblées. Par la suite, des dépôts de tapis de nanotubes multi-parois ont été réalisés mais nous avons rapidement mis en évidence que leur accroche sur le substrat est extrêmement réduite. Ce constat reflète la présence d'une interface hétérogène entre le diamant et les nanotubes, qui se caractérise par la présence d'une impédance complexe en spectroscopie d'impédance.

Nous avons donc mis au point une méthode de gravure HFCVD catalysée par des particules métalliques et assistée par filament chaud, qui a pour effet d'enterrer les nanoparticules à quelques centaines de nanomètres dans la couche de diamant. Elle consiste en la gravure localisée du diamant par des particules de palladium ou de nickel et induit la formation de pores dans le diamant au fond desquels les nanoparticules se retrouvent à la fin du processus. Cette technique ouvre également des perspectives pour la conception de membranes en diamant poreuses.

Nous avons ensuite mis en évidence que les nanoparticules enterrées peuvent être utilisées dans un second temps pour catalyser la synthèse de nanotubes qui croissent le long des pores puis poursuivent leur croissance hors de la couche diamant. L'augmentation de la force d'accroche des nanotubes a été mise en évidence par des méthodes expérimentales qualitatives visant à éprouver l'adhésion de ces derniers. L'amélioration de l'accroche peut être imputée à l'augmentation significative des zones de contact entre les nanotubes et le diamant à l'intérieur du pore. Ce résultat est corroboré par les expériences de spectroscopie d'impédance qui montre la disparition de l'impédance associée à l'interface diamant/nanotubes. Même si des manipulations AFM supplémentaires sont nécessaires pour

quantifier la force d'accroche des nanotubes, nous avons réussi à trouver une solution originale permettant d'augmenter l'adhésion des nanotubes sur le diamant.

Enfin, pour caractériser les propriétés de ce matériau composite en termes de détection et pouvoir évaluer la contribution des nanotubes dans l'amélioration des performances du matériau composite, j'ai réalisé un biocapteur au peroxyde d'hydrogène selon le même schéma que celui réalisé sur diamant. Il s'avère que ce biocapteur affiche une sensibilité supérieure et une limite de détection inférieure à celui réalisé sur diamant, ce qui démontre l'apport de l'augmentation de la surface spécifique due au tapis de nanotube.

Les applications en neurologie nécessitent in fine le transfert de la technique sur microélectrode, cet axe de travail fait partie intégrante du projet de thèse de Clément Hébert avec qui cette étude a été menée en étroite collaboration.

## ***ANNEXES***

# I. X-ray Photoelectrons Spectroscopy (XPS)

La technique XPS est particulièrement adaptée aux analyses de surfaces des échantillons. Elle s'avère être une technique de choix pour la caractérisation des fonctions de surfaces ou d'interfaces modifiées par des molécules fonctionnelles. Elle fait appel à une source de rayons X monochromatique dirigée sur l'échantillon sous ultravide ( $10^{-10}$  torr). L'énergie des rayons X étant de l'ordre de grandeur de l'énergie d'ionisation des électrons de cœur, ils peuvent ainsi ioniser ces derniers. Seuls les électrons arrachés aux atomes de la surface et de la subsurface (3 à 10 nm) sont émis dans la chambre. Les électrons éjectés possèdent ainsi différentes énergies cinétiques, caractéristiques de chaque type d'atome. Cette énergie est également influencée par l'environnement chimique auquel cet atome est lié; elle sera décalée (« shiftée ») en fonction de la nature de ce dernier. Ce shift en énergie reflétera le degré d'oxydation de l'atome observé et permettra donc de déduire la nature des atomes liés, mais aussi quel type de liaison à l'élément avec les atomes voisins. La Figure VI- 1.a illustre le mécanisme d'éjection des photoélectrons.

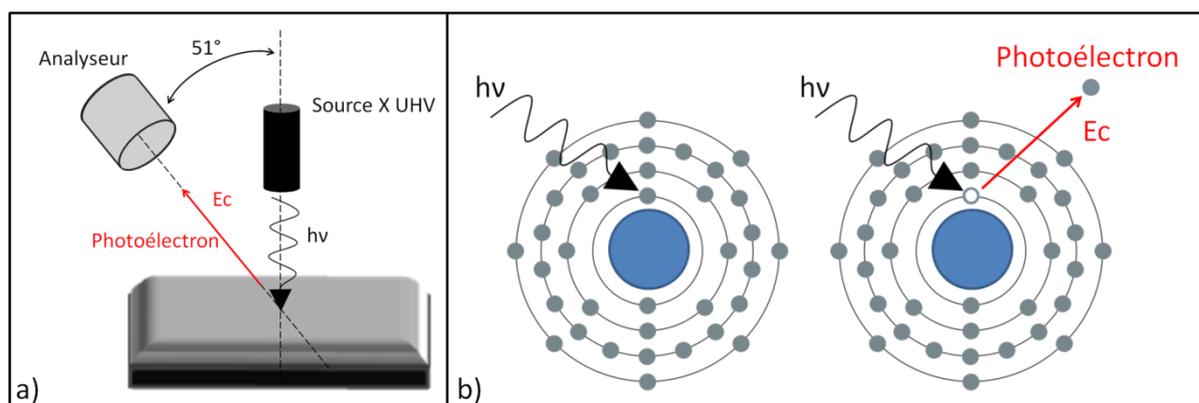


Figure VI- 1: a) Schéma de principe de la caractérisation XPS, b) mécanisme d'émission du photoélectron.

L'équation reliant l'énergie cinétique des électrons récoltés à l'analyseur et l'énergie de liaison de ces derniers est la suivante :

$$E_L = hv - E_c - \Phi$$

$E_L$  : Energie de liaison de l'électron du niveau de cœur

$E_c$  : Energie cinétique de l'électron éjecté

$hv$  : Energie de la source des Rayon X

$\Phi$  : travail de sortie du matériau

Les caractérisations de surface par photoélectrons ont été menées en collaboration avec Jean-Charles Arnault (LCD-LIST). Le rayonnement monochromatique sonde,  $AlK_{\alpha}$  d'une énergie de 1486,5 eV, est émis selon la normale à l'échantillon par bombardement électronique d'une anticathode en aluminium. La collecte des photoélectrons s'effectue grâce à un analyseur hémisphérique décrivant un angle de  $51^{\circ}$  par rapport au faisceau RX incident (Figure VI- 1.b). Ce dernier est injecté sur la surface à sonder avec un angle d'incidence défini, qui permet de moduler la sélectivité de la mesure en termes de profondeur. Dans notre cas, l'angle d'incidence a toujours été émis selon la normale à l'échantillon.

En préambule à nos études, les énergies de liaison ont été référencées sur or avec pour référence le pic  $Au4f_{7/2}$  localisé à 83,6 eV. La procédure de déconvolution des différents spectres a été effectuée à l'aide du logiciel « peakfit » après lissage des spectres.

Il faut noter que la résolution en énergie des spectres dépend de l'appareillage et de l'élément sondé. Cette valeur notée  $\Delta E_m$  est égale à :  $\Delta E_m^2 = \sqrt{(\Delta E_a^2 + \Delta E_s^2 + \Delta E_e^2)}$  ou

$$\Delta E_s = \Delta E_{source} = 0,25 \text{ eV,}$$

$$E_a = \Delta E_{analyseur} = 0,6 \text{ eV}$$

et  $\Delta E_e = \Delta E_{élément}$ , cette valeur relate la largeur d'émission naturelle de l'élément qui compose le matériau.

Cette notion de résolution est cruciale et doit être prise en compte lors du traitement des spectres. Nous avons utilisé la fonction de Voigt lors des ajustements analytiques, cette fonction est le produit de convolution d'une gaussienne et d'une lorentzienne. Lors de nos études, la largeur à mi-hauteur de la lorentzienne correspond à la largeur d'émission naturelle de l'élément, et la largeur de la gaussienne est liée à la résolution de l'appareillage et vaut 0,7 eV ( $\sqrt{(0,25^2 + 0,6^2)}$ ).

## II. Spectroscopie des pertes d'Énergie des Electrons

La spectroscopie des pertes en énergie des électrons est basée sur la mesure de diffusion inélastique subie par un faisceau d'électrons incidents monochromatiques, en interaction avec le matériau caractérisé. Il existe différents moyens pour bombarder l'échantillon. Il est donc possible de travailler en transmission ou en réflexion. Une majorité des électrons vont être diffusés de manière élastique ou ne pas interagir avec le matériau. Ils

auront donc la même énergie que le faisceau incident. Ils apparaissent sur le spectre sous forme d'un pic sans perte d'énergie (Zero Loss Peak) (Figure VI- 2.a). La diffusion inélastique subie par certains électrons peut engendrer différents phénomènes dans le matériau. Ils peuvent alors générer des phonons, des transitions de bande, des plasmons ou encore ioniser des électrons du matériau. L'ionisation par perte électronique des électrons de cœur est très intéressante car elle permet de déduire la composition de l'échantillon.

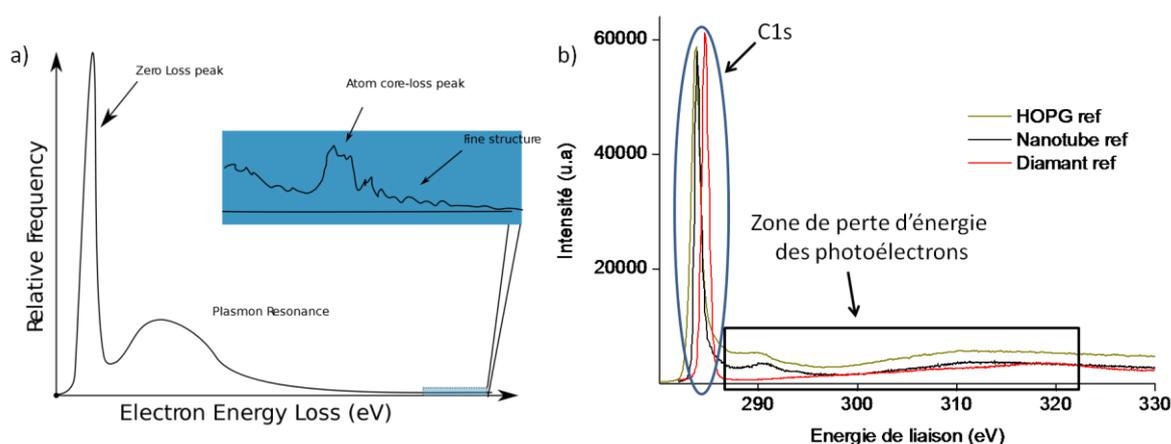


Figure VI- 2 : a) Spectre EELS caractéristique, b) Spectres XPS-XEELS d'un échantillon HOPG, Nanotube et diamant.

Dans notre cas, la méthode utilisée est la XEELS (X-ray Energy Electron Loss Spectroscopy). Les expériences se déroulent dans le bâti XPS, où la source excitatrice n'est pas un faisceau d'électrons mais un faisceau de rayons X. Le spectre des pertes d'énergie du carbone apparaît peu après le pic XPS C1s (Figure VI- 2.b) et il s'agit dans ce cas des pertes en énergie des photoélectrons émis par le matériau. La nature des interactions entre les photoélectrons et le matériau, observée lors d'une étude XEELS, est la même que celle d'une étude EELS classique. Dans notre cas, nous nous intéressons uniquement aux faibles pertes en énergie (0 - 40 eV) associées au pic C1s. La majorité des interactions que nous observons entraînent des transitions électroniques faisant passer un électron du niveau de cœur C1s vers des états inoccupés des orbitales C2s ou C2p. Selon l'état d'hybridation des atomes de carbone, les niveaux d'énergie des orbitales 2s ou 2p inoccupés seront différents. M. Knupfer [1] et Waidmann [2] ont étudié en détail les différentes transitions possibles dans les structures carbonées. Les spectres XEELS auront donc comme zéro la valeur de l'énergie de liaison du pic concerné. Le spectre représente le shift en énergie des transitions observées, par rapport à l'énergie de liaison de l'atome.

Enfin, à la différence des études EELS classiques où l'on sonde le « bulk », les études XEELS sont des études de surface. En effet, les photoélectrons émis sont peu énergétiques et ils subissent également des pertes énergétiques lors de leur diffusion avec le matériau, impliquant que seuls ceux provenant des couches superficielles pourront être recueillis.

### III. Spectroscopie Auger

#### III.A. Principe

Comme l'XPS, la spectroscopie Auger est une technique de choix pour les analyses de surface. A contrario, les électrons analysés suite à l'interaction de la sonde avec le matériau sont issus d'une double ionisation consécutive à la relaxation électronique de l'atome suite à l'éjection d'un photoélectron (celui-là même qui est utilisé pour l'analyse XPS). Cette technique est basée sur l'interaction d'un faisceau d'électrons incidents dans notre cas, avec les électrons de cœur des atomes de surface du matériau. Ce faisceau d'électrons est produit par un canon à électrons similaire à celui d'un MEB, l'énergie des électrons étant ajustable et usuellement fixée à des énergies autour de 5 keV pour minimiser la poire d'interaction du faisceau avec le matériau. On peut donc tabler sur une profondeur sondée de l'ordre de 2 nm. Cette valeur correspond non pas à l'épaisseur d'interaction des électrons primaires avec le matériau, mais à la profondeur maximale de sortie des électrons Auger. L'émission d'un électron Auger étant basée sur un processus de relaxation électronique intra-atomique, l'énergie cinétique des électrons Auger est indépendante de l'énergie de la sonde excitatrice. Ainsi, le faisceau incident va éjecter un des électrons de cœur, et le trou ainsi généré va pouvoir être comblé par le transfert d'un électron provenant d'une orbitale du même atome Figure VI- 3. Cette transition énergétique peut être couplée à un troisième électron (Electron Auger) provenant d'une orbitale de même, ou de plus faible, énergie (orbitale plus externe). Il sera émis à condition que l'énergie mise en jeu par le transfert électronique de relaxation soit supérieure ou égale à l'énergie de liaison de l'électron éjecté. On peut alors exprimer, par exemple, l'énergie cinétique de l'électron Auger émis pour une transition  $KL_1L_2$  comme étant :

$$E_c = E_{1s} - E_{2s} - E_{i2p} - e\Phi$$

$E_c$  : Energie cinétique de l'électron Auger émis

$E_{1s}$  : Energie de l'électron de cœur (couche K) éjecté par impact direct de la sonde (X ou électron)

$E_{2s}$  : Energie de l'électron impliqué dans la relaxation électronique de l'atome impacté (transition d'un électron de la couche L1, orbitale 2s, vers la couche K orbitale 1s)

$E_{i2p}$  : Energie de liaison de l'électron Auger émis depuis une couche L2, orbitale 2p.

$e\Phi$  : Energie correspondant au travail d'extraction de l'électron Auger

L'état atomique final est donc constitué de deux trous, un sur l'orbitale 2s et un sur l'orbitale 2p.

Le formalisme utilisé dans la notation de l'électron Auger émis est celui des rayons X. Dans le cas présent on notera donc  $KL_1L_{2,3}$ .

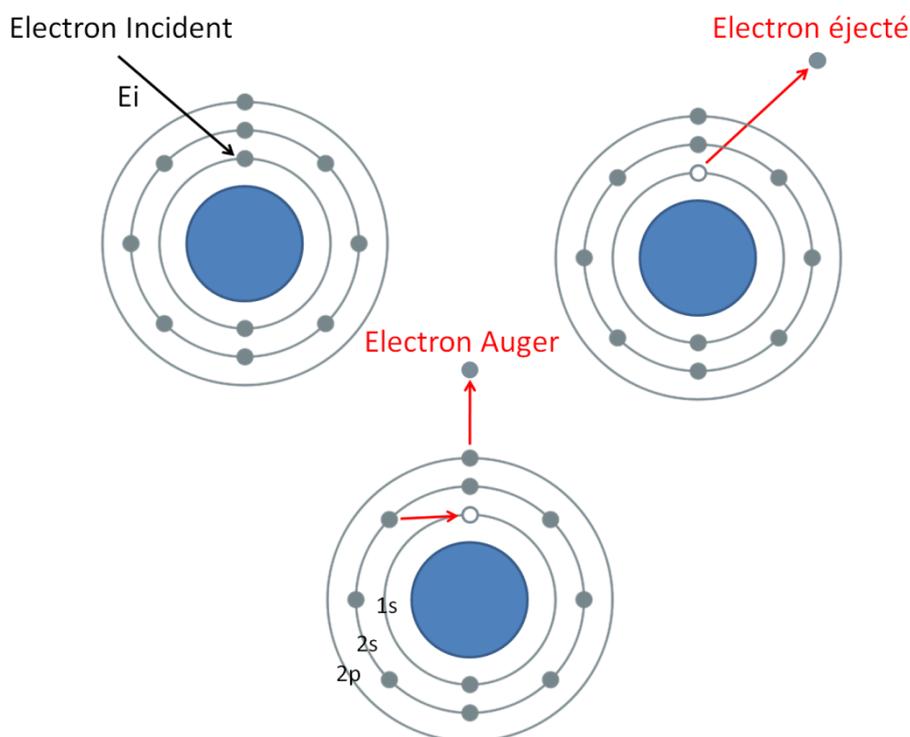


Figure VI- 3: Schéma du mécanisme d'émission d'un électron Auger.

Il faut cependant noter que l'émission d'un électron Auger n'est pas le seul mécanisme de relaxation atomique possible. Il existe aussi une voie de relaxation radiatif qui est la fluorescence X. La Figure VI- 4 montre le taux d'émission radiatif (fluorescence X) et non radiatif (électron Auger) en fonction du numéro atomique des éléments. On voit très clairement que la spectroscopie des électrons Auger n'est envisageable que pour les éléments

ayant un faible numéro atomique. Elle sera donc parfaitement adaptée pour les études surfaciques des matériaux carbonés.

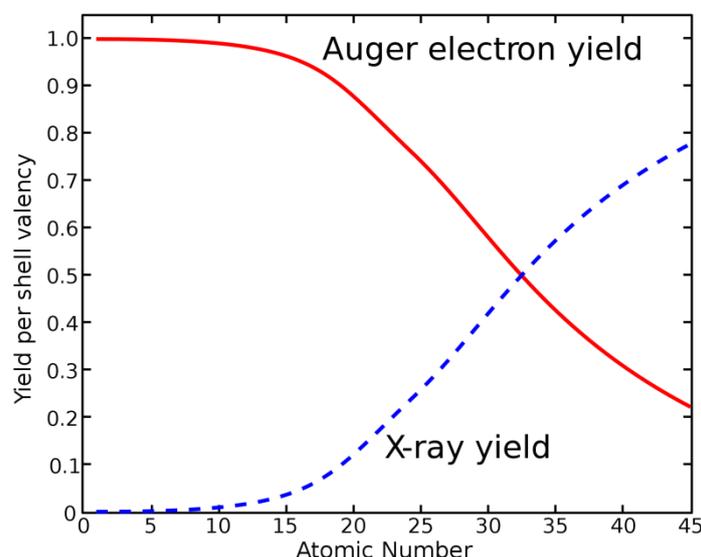


Figure VI- 4 : Comparaison entre le taux d'émission de fluorescence X et d'électron Auger en fonction du numéro atomique.

L'appareillage utilisé pour les caractérisations Auger comprend un faisceau d'électron primaire incident d'une énergie de 1,5 keV et d'un analyseur de champ retardateur. Il faut noter que l'intensité des pics Auger est souvent faible comparativement au bruit de fond. Ce dernier provient des électrons secondaires aspécifiques issus d'une extraction en volume que l'on utilise pour l'imagerie en microscopie électronique. Pour accéder à la structure fine, l'acquisition des spectres s'effectue en mode dérivatif  $dN/dE$  à l'aide d'un mode de détection de type lock-in. Cela permet d'exacerber les pics et faire apparaître la structure fine du spectre. Cette dernière correspond à la levée partielle de la dégénérescence d'un niveau d'énergie, et se traduit par la séparation en plusieurs composantes de la raie spectrale d'un atome. Pratiquement, l'émission d'un électron Auger provenant d'un atome de carbone, et correspondant à la transition KLL, devrait donner une seule raie d'émission. Cela se traduira en fait par une série de raies positives ou négatives (Figure VI- 5). Ces raies seront décalées selon l'état d'hybridation de ces atomes de carbone. Il existe une méthode basée sur l'utilisation d'un paramètre noté D (D-parameter) [3]. Ce paramètre représente la différence d'énergie cinétique séparant les maxima positifs et négatifs (Figure VI- 5). Pour tout élément, chaque état d'hybridation différent donnera une valeur du D-paramètre différente.

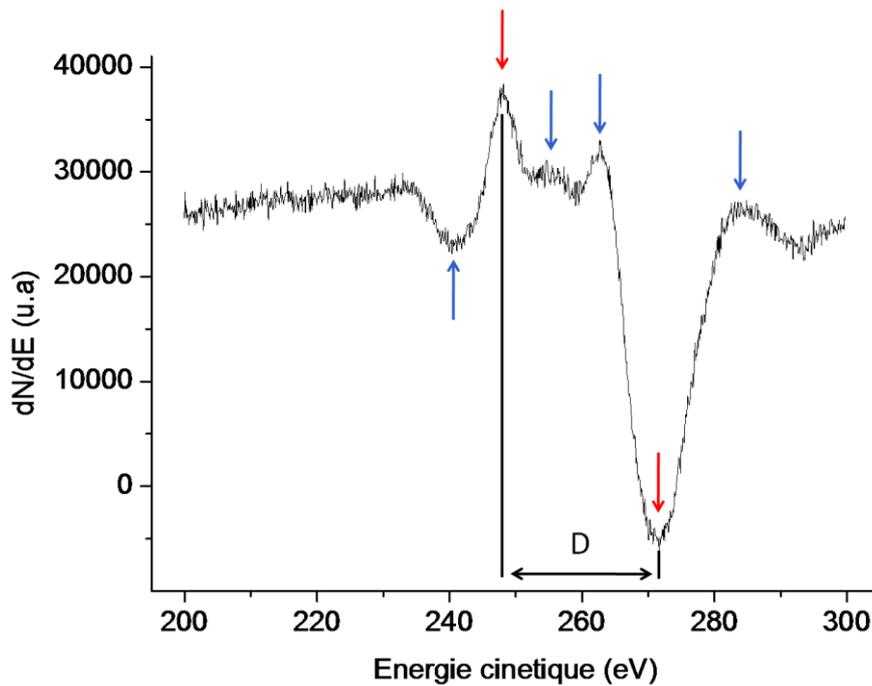


Figure VI- 5 : Spectre Auger d'un échantillon diamant microcristallin lourdement dopé au bore.

### III.B. Caractérisation des nanotubes de carbone

Nous avons réalisé une étude en spectroscopie Auger afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus en spectroscopie des pertes d'énergie. Sur la Figure V- 47 sont présentés les spectres Auger d'un échantillon de nanotubes multiparois obtenus par voie classique et de l'échantillon diamant nanocristallin. Comme nous l'avons vu au chapitre I, les spectres Auger font apparaître une série de pic mettant en évidence la structure fine des atomes de carbone. On voit en général apparaître sur les spectres des différents matériaux carbonés existant 5 pics distincts [4] dont un pic majoritaire (e) dont la position varie entre 260 et 280 eV et qui est présent sur tous les échantillons carbonés. Il est le pic référence à partir duquel on calcule la valeur du paramètre D (conf. Annexes). Les valeurs associées à ce paramètre dans le cas du diamant et des nanotubes (13,4 et 23,3 eV) sont identiques à celle de la littérature [5, 6]. Les composantes notées a et b sont généralement associées aux atomes de carbone hybridés  $sp^2$  et la composante c à ceux hybridés  $sp^3$  [7]. En utilisant l'intensité du pic principal (e) comme référence et en calculant les ratios a/e et c/e, il est possible de corréler ces valeurs aux taux de carbone désordonné dans le matériau [8]. Dans notre cas la résolution de

l'appareil ne permet pas d'exploiter ces rapports. On trouve enfin un dernier pic noté d qui est directement relié à la présence de carbone amorphe dans l'échantillon [9]. On peut noter que pour chacun des spectres ce pic est très peu visible. Il apparait de manière plus prononcé sur le spectre diamant que sur celui des nanotubes. Cela dénote donc la présence de carbone amorphe en faible quantité dans le tapis nanotube. Les résultats des études Auger corréntent donc parfaitement ceux de l'étude EELS.

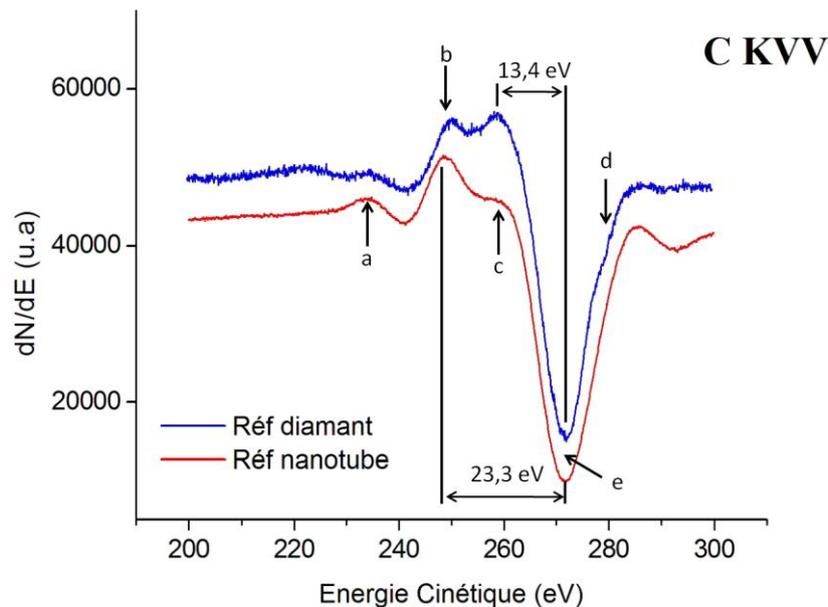


Figure V- 47 : Spectre Auger du carbone associé à la transition KL1L2 du tapis de nanotubes et de l'échantillon diamant nanocristallin lourdement dopé au bore.

La caractérisation Auger corréle les résultats obtenus par XPS et EELS. Nous avons également montré que la synthèse HFCVD permet d'obtenir des nanotubes multiparois d'une qualité cristalline convenable et qui semblent présenter un taux de carbone amorphe relativement faible.

## IV. FTIR

### IV.A. La spectroscopie infrarouge

Le domaine infrarouge correspond à des longueurs d'ondes comprises entre 0,74 et 300  $\mu\text{m}$ . La gamme infrarouge est divisée en trois domaines : le proche infrarouge 0,74 – 3  $\mu\text{m}$  (near-infrared, NIR), le moyen infrarouge 3 – 50  $\mu\text{m}$  (mid-infrared, MIR) et l'infrarouge

lointain 50 – 300  $\mu\text{m}$  (far-infrared, FIR). La gamme que nous avons utilisée est le moyen infrarouge. La spectroscopie infrarouge consiste à mesurer l'absorption d'un matériau à chaque longueur d'onde dans une gamme donnée. Autrefois utilisée, la spectroscopie dispersive va illuminer l'échantillon avec une seule longueur d'onde, enregistrer l'absorption, puis changer de longueur et répéter le même processus. En spectroscopie par Transformée de Fourier, l'échantillon est irradié par un faisceau polychromatique, puis l'absorption est mesurée pour chaque fréquence par un dispositif interférentiel. Le spectromètre est en fait constitué d'une source d'émission à large spectre et d'un interféromètre de Michelson qui module les longueurs d'ondes incidentes via la mise en œuvre d'un miroir mobile. Le spectre brut est un interférogramme, qui sera traité par une Transformée de Fourier pour donner le spectre infrarouge.

Le principe de l'absorption infrarouge est basé sur les mêmes fondements que la spectroscopie Raman, c'est-à-dire l'interaction molécule-photon. La gamme de longueur d'onde couverte dans l'infrarouge étant importante, on ne regardera pas tout à fait les mêmes phénomènes selon la gamme de fréquence ciblée. Pour le FIR, l'énergie mise en jeu ciblera plutôt les propriétés rotationnelles, le MIR les couplages rovibrationnels, le NIR les harmoniques. Dans notre cas, ce sont les couplages rovibrationnels auxquels nous nous intéresserons. Dans une approche quantique, on pourra donc associer aux niveaux d'énergies discrets (modes vibratoires ou états vibrationnels) de la molécule, une fréquence spécifique pour laquelle elle vibre ou tourne. Par analogie, pour les matériaux (bulk) on ne parlera plus d'états vibrationnels mais de phonon. On peut néanmoins utiliser la mécanique quantique et approximer un oscillateur harmonique à la géométrie de la molécule. On associera alors les fréquences de vibrations à une liaison particulière. Ces approximations impliquent que pour qu'un mode vibrationnel soit actif en IR, il doit être associé à un changement du dipôle de la molécule. On pourra donc trouver  $3N-6$  degrés de modes vibrationnels pour une molécule constituée de  $N$  atomes. Dans la pratique, en particulier pour les caractérisations de surface, on considère trois degrés de liberté et on y associe les vibrations suivantes (Figure VI- 6) :

- a) Etirement symétrique (stretching)
- b) Etirement antisymétrique (stretching)
- c) Cisaillement (scissoring)
- d) Bascule (rocking)
- e) Agitation (wagging)
- d) Torsion (Twisting)

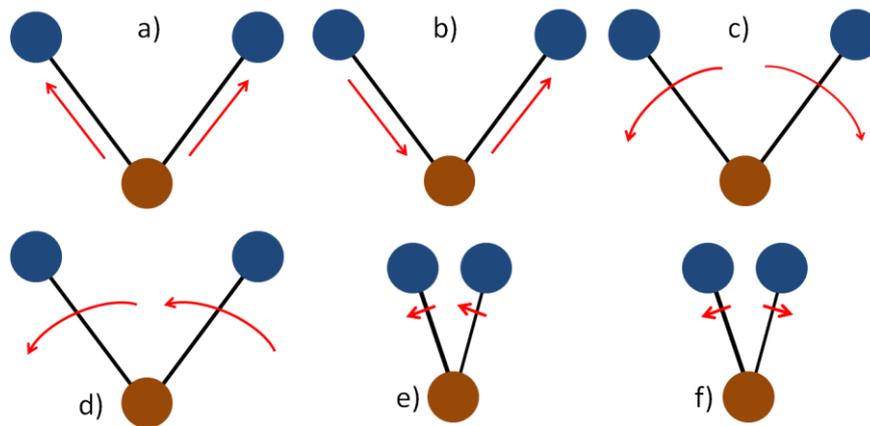


Figure VI- 6 : Modes vibrationnels actifs en Spectroscopie Infrarouge.

Tous les spectres infrarouges ont été recueillis en prenant comme référence le spectre de l'échantillon Diamant hydrogéné avant fonctionnalisation, nous permettant de nous affranchir de la ligne de base souvent marquée sur diamant. Ils ont ensuite subi une modification de la ligne de base par lissage de type polynomial. De plus, tous les échantillons diamant utilisés lors de caractérisations IR sont des échantillons non dopés, car le bore incorporé dans les couches induit de fortes bandes d'absorptions. Toutes nos études ont été réalisées avec un détecteur Mercure Cadmium Tellure (MCT), refroidis à l'azote liquide. Ils sont différents des détecteurs Deuterium TriGlycine sulfate (DTGS) qui fonctionnent à température ambiante. Les MCT offrent un bien meilleur rapport signal sur bruit.

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé le spectromètre *vertex 80/80v* de la marque *Brucker*. Le traitement des spectres a été effectué avec la version 6.5 du logiciel *OPUS*.

#### IV.A.1. Le spectre infrarouge du diamant :

L'étude par spectroscopie infrarouge du diamant, peut être subdivisée suivant le nombre de phonons qui interviennent lors des transitions vibrationnelles. Il existe les zones à un, deux et trois phonons (Figure VI- 7.a). Pour plus de trois phonons, les probabilités de transition sont plus faibles et donnent rarement lieu à une absorption mesurable. La zone à un phonon s'étend de 400 à 1500  $\text{cm}^{-1}$ . Pour des raisons de symétrie, cette zone est interdite en infrarouge, alors qu'elle est permise en spectrométrie vibrationnelle de diffusion Raman. Cette zone est appelée aussi 'zone des défauts' ou par abus de langage « région de l'azote ». Les signaux observés dans cette région sont associés aux défauts présents au sein du réseau

du diamant (azote,  $sp^2$ ...). Certains éléments ou association d'éléments (molécules), présents à l'état de trace, vont ainsi générer leurs propres absorptions qui vont se superposer au spectre du diamant « parfait ». Certains défauts permettent souvent de faire apparaître la raie Raman du premier ordre (à  $1332\text{ cm}^{-1}$ ) sur le spectre infrarouge.

La zone à deux phonons est comprise entre  $1500$  et  $2700\text{ cm}^{-1}$  environ. Dans cette zone, on trouve les bandes d'absorptions intrinsèques du diamant. Des absorptions liées à la présence du bore (à  $2456\text{ cm}^{-1}$ ) en substitution dans le réseau ou à la présence de  $\text{CO}_2$  peuvent aussi être observées (Figure VI- 7.a).

La zone à trois phonons s'étend de  $2700$  à  $3900\text{ cm}^{-1}$  environ. Dans cette région on peut observer des absorptions dues au bore, à la liaison carbone-hydrogène (C-H), azote-hydrogène (N-H) etc. Au-delà de  $3900\text{ cm}^{-1}$ , on peut également observer des bandes dans les diamants riches en hydrogène (la deuxième harmonique de la déformation angulaire) et les centres colorés ou « amber centers » (centre substitutionnels hétéroatomiques) (à  $4168\text{ cm}^{-1}$  par exemple). De nombreuses bandes sont aussi observées dans les diamants traités et les diamants synthétiques. Plus de détails sur ces bandes peuvent être obtenus dans le Zaitsev, 2001 [10].

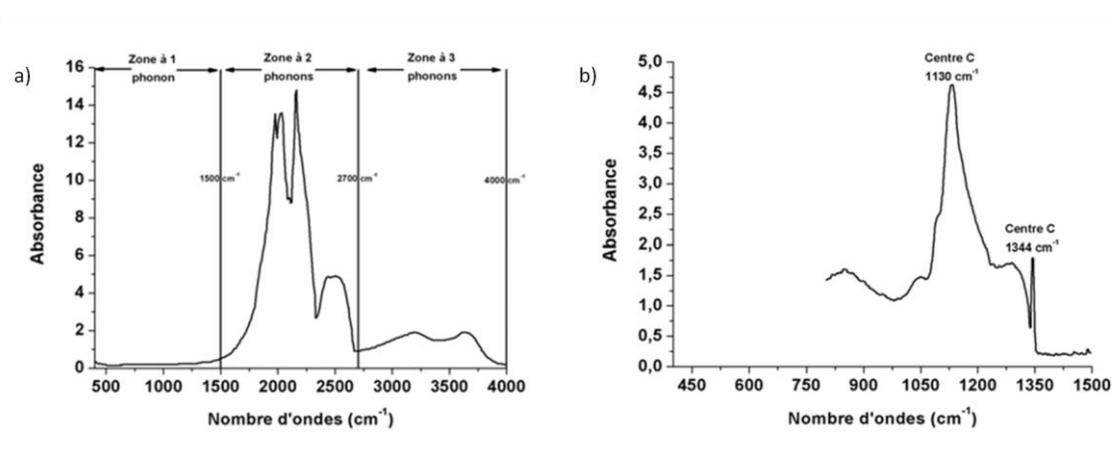


Figure VI- 7 : a) Spectres Infrarouges d'échantillons diamant mettant en évidence : a) les zones à 1, 2 et 3 phonons, b) le centre C. [11]

Avant de commencer la classification des diamants, il est bon de rappeler la notion de centre. Dans un matériau, un centre est associé à un défaut cristallin résultant de la substitution d'un atome de la maille par un atome étranger au matériau. Dans le cas du diamant, le centre le plus connu est le centre N ou un atome d'azote vient substituer un atome de carbone. On trouvera pour le diamant une multitude de centres différents associés à des défauts induits par la présence dans le réseau d'atomes tel que l'azote, l'hydrogène, le bore...

#### IV.A.2. Défauts utilisés pour la classification des diamants par type :

- Centre C ou N

Dans ce défaut, un atome d'azote remplace un atome de carbone en laissant une liaison insaturée (défaut N). En infrarouge (Figure VI- 7.b), la zone à un phonon présente un maximum à  $1130\text{ cm}^{-1}$  (probablement associée à un mode de vibration quasi-local des atomes d'azote en substitution) et un pic fin à  $1344\text{ cm}^{-1}$  (probablement associé à un mode de vibration de l'atome de carbone localisé sur la liaison C-N contenant l'électron non apparié). Ce centre est très souvent présent dans les diamants contenant de très grandes quantités d'azote (Zaitsev, 2001).

- Agrégat A

L'agrégat A représente l'association de deux atomes d'azote substitués (défauts N-N). En infrarouge (Figure VI- 8.a), la zone à un phonon est représentée par un continuum débutant à  $1332\text{ cm}^{-1}$ , sur lequel sont superposés le pic principal à  $1280\text{ cm}^{-1}$  et des pics annexes à  $1212$  [12],  $1096$  et  $484\text{ cm}^{-1}$  (Zaitsev, 2001). Les pics à  $484$  et à  $1280\text{ cm}^{-1}$  sont corrélés en fonction de la teneur en agrégat A dans les diamants.

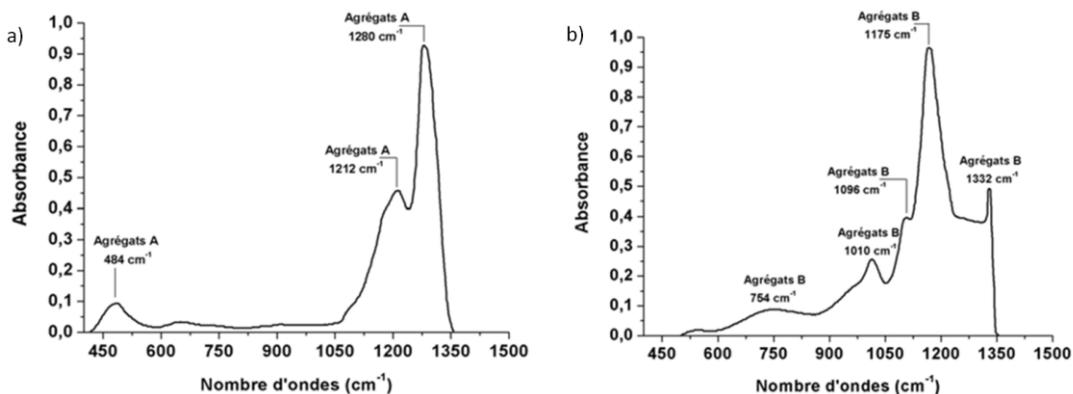


Figure VI- 8 : Spectres Infrarouges d'échantillons diamant mettant en évidence la présence : a) Agrégats A, b) Agrégats B. [11]

- Agrégat B

L'agrégat B représente l'association de quatre atomes d'azote dans un site tétraédrique autour d'une lacune de carbone (défaut 4N-V). En infrarouge, (Figure VI- 8.b), la zone à un phonon est représentée par une zone d'absorption débutant à  $1332\text{ cm}^{-1}$ , sur laquelle se superposent un pic fin à  $1332\text{ cm}^{-1}$ , un pic large à environ  $1175\text{ cm}^{-1}$  (accompagné par un épaulement à  $1096\text{ cm}^{-1}$ ), un pic à  $1010\text{ cm}^{-1}$  [13] mais aussi des pics à  $780\text{ cm}^{-1}$  et à  $754\text{ cm}^{-1}$  (Zaitsev, 2001).

- Le bore

L'élément bore (B) se présente dans les diamants en substitution sur un site carbone. En infrarouge, la zone à un phonon présente une bande faible à  $1290$ ,  $1330$ , ainsi qu'à  $1510\text{ cm}^{-1}$  [14] et dans la zone à deux et trois phonons des bandes à environ  $2455$ ,  $2805$ ,  $2931$  et  $4090\text{ cm}^{-1}$  (zone de  $\pm 3500$  à  $\pm 5500\text{ cm}^{-1}$ ), toutes liées à la substitution de bore dans le réseau.

#### IV.A.3. Les différents types de diamant :

- Type I :

Ce type est caractérisé par la présence de l'azote (N) donneur d'électrons, comme principale impureté au sein du réseau diamant. L'azote dans ce type de diamants peut se trouver agencé de plusieurs façons. Selon cet arrangement et leur spectre infrarouge, on distingue deux sous types des diamants de type I (et plusieurs sous-catégories) :

- Type Ia :

Les atomes d'azote, dont la concentration sous forme monoatomique est généralement importante (entre  $200$  et  $2500\text{ ppm}$ , même si elle peut parfois atteindre  $4000\text{ ppm}$  ; Zaitsev, 2001 et références associées), peuvent migrer et former des agrégats. La grande majorité des diamants naturels appartiennent à ce type. En infrarouge, suivant l'analyse de la zone à un phonon, il est possible de distinguer un grand nombre de sous-catégories.

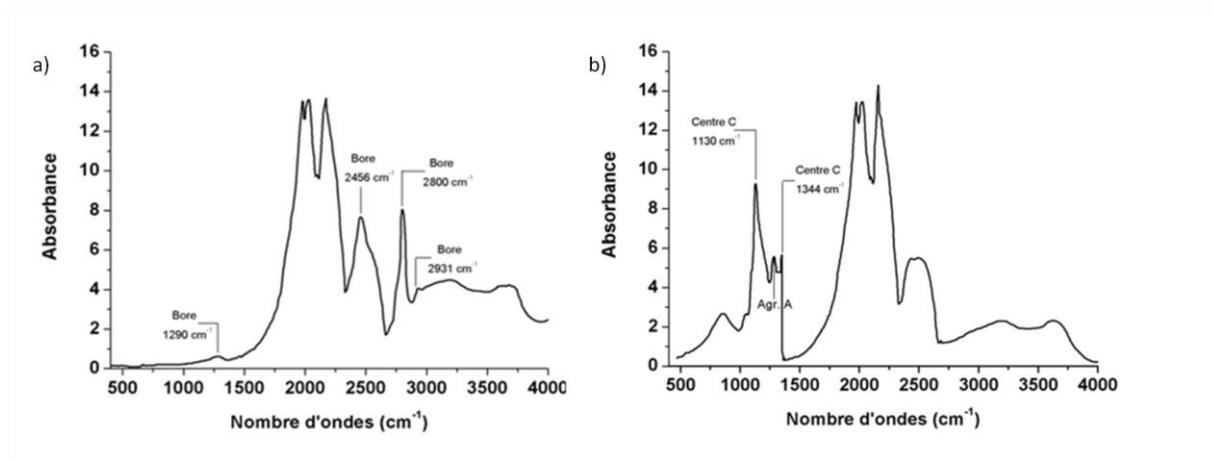


Figure VI- 9 : Spectres Infrarouges d'échantillons diamant mettant en évidence la présence : a) de Bore, b) de centre C. [11]

- Type Ib :

Les diamants de ce type contiennent de l'azote qui est assimilé, lors de la croissance, sous la forme d'atomes d'azote isolés (centre C, voir plus haut), substitués aux atomes de carbone. De tels atomes sont actifs en résonance paramagnétique électronique. La concentration de l'azote est généralement de 25 à 500 ppm, mais des teneurs de 500 ppm ont été décrites dans des diamants type Ib synthétiques [15]. Les diamants de type Ib purs sont très répandus pour les synthétiques (où l'azote est incorporé sous forme atomique). Le caractère Ib est très fréquemment détecté dans les diamants de type Ia (Figure VI- 9.b). Donc, le spectre infrarouge des diamants de ce type est un mélange des pics intrinsèques des diamants (Figure VI- 7.a) et de ceux du centre C (Figure VI- 7.b et Figure VI- 9.b). Une bande à  $1240\text{ cm}^{-1}$  est observée dans les diamants du type Ib (ou qui ont un caractère Ib) [16] et aussi dans ceux du même type riches en hydrogène [17]. Cette bande est probablement corrélée à une absorption à 2.6 eV (480 nm) [16].

- Type II :

L'azote est ici en trop petite quantité pour être détecté à l'aide d'un spectromètre infrarouge classique. Les diamants de type II sont transparents aux ultraviolets jusqu'à 230 nm. On distingue deux sous types au type II :

- Type IIa :

Les diamants de type IIa sont dits purs. Idéalement ils ne contiennent que du carbone, bien que de petites quantités d'azote puissent être présentes. La zone à un phonon du spectre

infrarouge (et du visible) ne présente, en principe, pas d'absorption. Ces diamants sont par conséquent en principe incolores (parce que leur spectre visible ne présente pas d'absorption). Les diamants de ce type ne présentent que les pics intrinsèques des diamants (Figure VI- 7.a). En théorie, ils peuvent contenir aussi du bore. Néanmoins, à cause de la présence d'azote il y a une compensation donneur-accepteur et la présence du bore ne s'exprime pas sous la forme d'accepteur.

- Type IIb :

Les diamants de type IIb sont des diamants ayant des propriétés de conduction électrique (les porteurs de charges étant les électrons) dues à la présence de l'élément bore (B) en substitution sur un site carbone. Pour obtenir une propriété de conduction électrique, le bore (accepteur d'électron) doit être en concentration supérieure à celle de l'azote (donneur d'électron) [18]. Sur les spectres infrarouges des diamants de type IIb, on retrouve la forme d'un type IIa (absorptions intrinsèques du diamant ; figure 1) associée aux pics liés à la substitution de bore dans le réseau. L'hydrogène est aussi observé dans les diamants de ce type. La présence de bore en concentration suffisante induit une absorption dans l'infrarouge qui s'étend jusque dans le visible.

#### **IV.A.4.Absorption Infrarouge d'intérêts supplémentaires :**

- L'hydrogène :

L'hydrogène est, après l'azote, la principale impureté (observée en utilisant la spectroscopie infrarouge) du diamant. Les pics dus à la présence d'hydrogène actif en infrarouge ne se trouvent pas seulement dans la zone à un phonon mais principalement dans les zones à deux et trois phonons. Ces pics se superposent donc aux absorptions intrinsèques du diamant. Les principaux pics de l'hydrogène sont à : 687 [19], 1405, 2786, 3107  $\text{cm}^{-1}$  [20]. Pour les diamants contenant de l'hydrogène en quantités inhabituellement élevées, Fritsch et ses collègues ont défini une catégorie « riche en hydrogène » en se fondant sur un critère descriptif : la hauteur du pic à 3107  $\text{cm}^{-1}$  y est plus élevée que la bande intrinsèque du diamant à 2450  $\text{cm}^{-1}$ . On voit apparaître dans les diamants riches en hydrogène une série de bandes comprises entre 2720 et 3520  $\text{cm}^{-1}$

- Centres dans la zone à un phonon :
  - Centre D : Le centre D est observé dans les diamants du type I [21]. En infrarouge, les pics liés à ce centre se trouvent à environ 1210 et 1332  $\text{cm}^{-1}$  (mais ne sont pas aussi fins que le pic Raman). Ce centre n'est observé que dans des diamants présentant des agrégats B (Zaitsev, 2001).
  - Centre E : Le centre E est observé dans les diamants du type I [21]. En infrarouge, le pic lié à ce centre se trouve à environ 1050  $\text{cm}^{-1}$ .
  - Centre F : Le centre F est observé dans les diamants de type I [21]. En infrarouge, les pics liés à ce centre se trouvent à environ 976, 1155, 1235 (1250 selon Zaitsev, 2001), 1267 et 1325  $\text{cm}^{-1}$ .
  - Centre G : Ce centre est observé dans les diamants de type I [22]. En infrarouge, les pics liés à ce centre se trouvent à environ 950 et 1120  $\text{cm}^{-1}$ .
  - Centre H : Ce centre est observé dans les diamants du type I [22]. En infrarouge, les pics liés à ce centre se trouvent à environ 590, 865 et 1020  $\text{cm}^{-1}$ .
  - Centre I : Ce centre est observé dans les diamants de type I [22]. En infrarouge, le pic lié au centre se trouve à environ 300  $\text{cm}^{-1}$ .
  - Centre X (ou N+) : Ce centre est observé dans les diamants synthétiques de type I. Ce centre est causé par l'existence d'une autre forme d'azote, chargée positivement ( $\text{N}^+$ ). En infrarouge, les pics liés à ce centre se trouvent à environ 945, 1045, 1115 et 1332  $\text{cm}^{-1}$ .

#### IV.B. Accessoire ATR (Attenuated Total Reflectance)

L'ATR (Attenuated Total Reflectance, Réflexion Totale Interne) est une technique nécessitant l'utilisation d'un cristal (typiquement en germanium). Le faisceau incident issu de l'interféromètre est dans ce cas injecté sur la surface du cristal en contact avec l'échantillon à sonder, sous un angle de réflexion totale (c.a.d. au delà de l'angle critique par rapport à la normale de la face du cristal en contact avec l'échantillon) et sera alors totalement réfléchi pour poursuivre son trajet vers le détecteur. Bien que la réflexion totale empêche l'existence d'une onde réfractée dans le milieu extérieur, il existe néanmoins une onde évanescente créée

au niveau de l'interface. Cette onde a une amplitude exponentiellement décroissante lorsque l'on s'éloigne du dioptre. Selon l'hypothèse des milieux continus et via l'utilisation des équations de Maxwell et des équations de passage, il est possible de calculer l'expression de cette onde évanescente. Si l'on place un échantillon (liquide, solide ou gazeux) en contact intime avec la surface du cristal où a lieu la réflexion interne totale, et que l'indice de réfraction de cet échantillon est inférieur à l'indice de réfraction du cristal, alors il y aura propagation de l'onde évanescente à l'intérieur de l'échantillon fig.10. C'est le phénomène de réflexion totale frustrée. La profondeur de pénétration est de l'ordre de 400 nm à 2  $\mu\text{m}$ . En réalité, il est plus juste de considérer un système à 3 milieux en insérant une couche d'air entre le cristal et l'échantillon. Plus la couche d'air sera mince, plus l'intensité de l'onde pénétrant dans l'échantillon sera importante. Pour de très faible épaisseur de la couche d'air, l'intensité de l'onde sera même amplifiée. C'est donc ce phénomène qui rend l'ATR plus sensible que la réflexion ou la transmission. De plus, si l'on polarise le faisceau incident parallèlement au sens de propagation de l'onde incidente (polarisation p), on pourra amplifier le champ  $E_p$  par un facteur dix ou cent fois supérieur à une onde non polarisée.

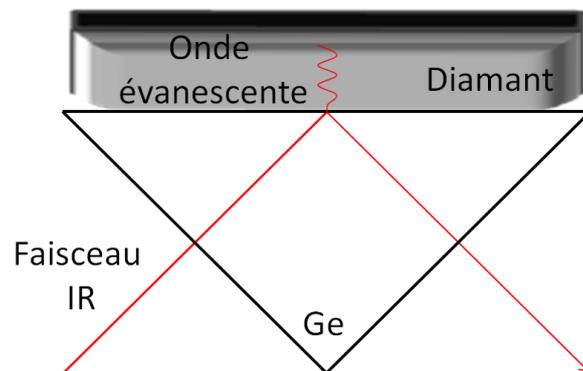


Figure VI- 10 : Schéma de principe d'une mesure Infrarouge par ATR.

Dans le cadre de nos études, nous avons utilisé un accessoire ATR large surface, le *VariGATR* (Variable grazing angle ATR accessory) produit par *Harrick* et adapté aux spectromètres de la marque *brucker*.

- [1] Martin Knupfer, *surface Science Reports*, **2001**. 42, 1-74.
- [2] M. Knupfer, S.Waidmann\*, J. Fink, B. Kleinsorge, J. Robertson, *Diamond and Related Materials*, **2000**. 9, 722–727.
- [3] J.-C. Arnault, A. Chavanne\*, J. Barjon, J. Arabski, *Surface Science*, **2011**. 605, 564–569.
- [4] T. Miyasato, Y. Mizokawa, S. Nakamura, K. M. Geib and C. W. Wilmsen, *Surface Science*, **1987**. 182, 431-438.
- [5] W. Kulisch, C. Popov, S. Bliznakov, B. Mednikarov, G. Spasov, J. Pirov, M. Jelinek, T. Kocourek, J. Zemek, *Appl. Phys. A*, **2007**. 89, 209–212.
- [6] E.M. Baitinger, M.M. Brzhezinskaya, V.I.Kormilets, *Physics of the solid state*, **1999**. 41, (8).
- [7] A. Gutiérrez, I. Garcia, A. Vazquez\*, *Surface and Coatings Technology*, **1996**. 88, 172-177.
- [8] T. Tanabe, N. Kangai, K. Niwase, *Journal of Nuclear Materials*, **1994**. 212, 1234-1238.
- [9] E.M. Baitinger, M.M. Brzhezinskaya\*, V.V. Shnitov, *Physica B*, **2004**. 348, 95–100.
- [10] A.M. Zaitsev, *"Optical Properties of Diamond"*, **2001**. Ed. Springer.
- [11] L. Massi, *Thèse de doctorat*, **2006**. Université de Nantes, Nantes.
- [12] G.S. Woods, *ds 'Properties and Growth of Diamond'*, **1992**. Editor : G. Davies, EMIS Datareviews Series No.9, IEE, Inspec, London, (The A aggregate of nitrogen in diamond).
- [13] G.S. Woods, *ds 'Properties and Growth of Diamond'*, **1992**. Editor : G. Davies, EMIS Datareviews Series No.9, IEE, Inspec, London, (The B aggregate of nitrogen in diamond).
- [14] C. Stavis, R. J. Hamers\*, A. Pokhrel, R. Franking, R. E. Ruther, X. Wang, M. C. Cooperrider, H. Zheng, J. A. Carlisle, J. E. Butler, *Diamond & Related Materials*, **2011**. 20 733–742.
- [15] Scarratt K., Fritsch E., *Gems & Gemology*, **1992**. 28, (1), 35-42.
- [16] Mohamed K., Collins A.T., *Journal of Physics: Solid State Physics*, **1982**. 15, (1), 147-158.
- [17] Collins A.T., Woods G.S., *Journal of Physics of Chemistry of Solids*, **1983**. 44, (5), 471-475.
- [18] Collins A.T., *Properties and growth of diamond*, **1993**.
- [19] Fritsch E., Reinitz I.M., Shigley J.E., *Diamond and Related Materials*, **1998**. 7, 313-316.
- [20] Scarratt K., Fritsch E., Collins A.T., *MRS International Conference Proceeding*, **1991**. MRS Pittsburgh 671-676.
- [21] Davey S.T., Clark C.D., *Journal of Physics C: Solid State Physics*, **1984**. 17, (6), 1127-1140.
- [22] S.T. Davey, C.D. Clark, *Journal of Physics C: Solid State Physics*, **1984**. 17, (15), 399-403.

# *Communications*

## **Publications :**

### **Fonctionnalisation de surfaces à base de carbone, de silicium et/ou de Germanium hybridées $sp^3$ .**

C. Agnes, P. Mailley, F. Omnés, S. Ruffinatto.

*Brevet PCT, N° de publication : FR 2947544, 2009.*

### **High sensitivity of diamond resonant micro-cantilevers for direct detection in liquids as probed using molecular electrostatic surface interactions.**

C. Agnes A. Bongrain, L. Rousseau, E. Scorsone, J.C. Arnault, S. Ruffinatto, F. Omnés, P. Mailley, G. Lissorgues, P. Bergonzo.

*Langmuir, 2011. 27, (19), 12226-12234.*

### **New one step functionalization of polycrystalline diamond films using amine derivatives.**

Charles Agnes, Sébastien Ruffinatto, Emma Delbarre, André Roget, Jean-Charles Arnault, Franck Omnés and Pascal Mailley.

*Materials Science and Engineering, 2010. 16, 012001.*

### **Procédé de fonctionnalisation d'un substrat par une molécule ou un objet d'intérêt portant un groupement nucléofuge, ledit substrat ainsi fonctionnalisé et ses utilisations.**

C. Agnes, P. Mailley, F. Omnés, S. Ruffinatto.

*Demande de Brevet d'invention N° : 12 54169, 2012.*

## **Conférences orales :**

### **MRS Fall Meeting**

**2009**

S. Ruffinatto, C. Agnés, P. Mailley and F. Omnés.

*One step Diamond functionalization for bioelectronics applications.*

**2010**

C. Agnes, S. Ruffinatto, A. Bongrain, E. Scorsone, J.C. Arnault, F. Omnés, P. Mailley and P. Bergonzo.

*Diamond functionalization on amine chemistry applied to dual electrochemical and MEMs biosensing.*

- 2011** Agnes, S. Ruffinatto, A. Bongrain, J.C. Arnault, F. Omnés, P. Mailley, S. Cosnier and P. Bergonzo.  
*New diamond surface derivatization for biosensor applications.*

### **EMRS Spring Meeting**

- 2010** S. Ruffinatto, C. Agnes, F. Omnés, J.C. Arnault and P. Mailley.  
*Amine chemistry as new functionalization route for the design of bioresponsive diamond interfaces.*
- 2011** C. Hébert, S. Ruffinatto, D. Eon, A.M. Bonnot, F. Omnés, P. Mailley.  
*Carbon Nanotubes/Nanocrystalline diamond composite material.*
- 2011** P. Mailley, S. Ruffinatto, C. Agnes, F. Omnés, J.C. Arnault, A. Roget and P. Bergonzo.  
*Bioelectronic on diamond: From surface derivatization to third generation biosensor.*

### **International Society of Electrochemistry**

- 2010** P. Mailley, C. Agnes, S. Ruffinatto, E. Vanhove, R. Kiran, J.C. Arnault, J. de Sanoit, F. Omnés and P. Bergonzo.  
*Bioelectronic on diamond: stabilization of the electrochemical activity and surface derivatization for the design of electrochemical sensors.*

### **SBDD XV (Hasselt Diamond Workshop)**

- 2010** C. Agnes, S. Ruffinatto, F. Omnés, P. Mailley and P. bergonzo.  
*A new route of diamond functionalization towards enzymatic biosensors fabrication.*

### **Diamond**

- 2011** C. Hébert, S. Ruffinatto, D. Eon, F. Omnés and P. Mailley.  
*Carbon nanotubes growth inside diamond.*

Le contexte scientifique de cette thèse s'inscrit dans le domaine de la bioélectronique et l'objectif vise la mise au point de dispositifs diamant pour des applications en chimie analytique, diagnostic clinique ou encore dans le domaine médical. Un des axes de travail est basé sur la mise au point d'une nouvelle technique de fonctionnalisation du diamant hydrogéné. Cette méthode est rapide, simple, mono-étape et ne nécessite pas d'apport extérieur d'énergie. La caractérisation du greffage par FTIR a permis de proposer un mécanisme réactionnel qui a été corroboré par l'étude de la cinétique réactionnelle. Nous avons mis en évidence que ce procédé permet l'obtention d'une liaison covalente stable carbone-carbone. Elle se révèle particulièrement adaptée à l'immobilisation directe d'espèces biologiques. En utilisant cette technique de greffage, il a été possible de concevoir des biopuces à ADN et protéines, ainsi qu'un biocapteur au peroxyde d'hydrogène de troisième génération. Enfin, le procédé étant basé sur la simple mise en contact de la solution de greffage avec le substrat, il est possible de structurer les dépôts à l'échelle nanométrique en faisant appel au Dip-Pen Nanolithography. En parallèle, un nouveau matériau composite diamant/nanotubes de carbone a été mis au point pour augmenter la surface développée des électrodes de diamant dopé au bore et en accroître ainsi les performances. Dans ce cadre, une technique de gravure catalytique assistée par filament chaud a été utilisée pour enterrer des nanoparticules dans la couche diamant. Ces dernières assurent par la suite la croissance des nanotubes de carbone par dépôt chimique en phase vapeur. Cette méthodologie assure ainsi une meilleure adhérence des nanotubes sur leur substrat et permet de pallier aux problèmes de toxicité des nanotubes vis-à-vis des milieux biologiques. Dans une dernière partie, ce matériau composite sera utilisé pour mettre au point un biocapteur enzymatique de troisième génération au peroxyde d'hydrogène.

The scientific context of this thesis is related to the field of bioelectronics. The objective is the development of diamond devices for applications in analytical chemistry, clinical diagnostic or medical devices. One of the axes deals with a new technique of functionalization of hydrogenated diamond surface. This method is fast, simple, one step and does not require contribution of exogenous energy. The characterization of the grafting by FTIR allowed us to suggest a mechanism which was confirmed by the study of the reaction kinetic. We brought to light that this process ensures the achievement of a stable covalent carbon-carbon bond. This methodology is particularly well adapted to the direct immobilization of biological species. By using this grafting technic, it was possible to design DNA and proteins biochips, as well as a hydrogen peroxide third generation biosensor. Finally, the process being based on the simple stake in contact of the grafting solution with the substrate, it is possible to structure functionalized areas at the nanometric scale using Dip-Pen Nanolithography. In parallel, a new composite diamond /carbon nanotubes material was developed to increase the specific surface of the boron doped diamond electrodes and so to increase its efficiency. In this frame, a new technic of catalytic etching assisted by hot filament was used to embed nanoparticles in the diamond layer. This process allowed afterward the growth of the carbon nanotubes by chemical vapor deposition. This methodology ensures markedly enhanced adhesion of the nanotubes on their substrate and obviates the problems of nanotubes toxicity towards their biological environment. In a last part, this composite material will be used to achieve hydrogen peroxide third generation enzymatic biosensor.