

# THÈSE

**En vue de l'obtention du**

# DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

**Délivré par :**

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

**Discipline ou spécialité :**

Science et Génie des Matériaux

---

## Présentée et soutenue par :

Mme TIFANIA BORTOLAMIOL

le jeudi 12 mars 2015

## Titre :

NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS : FONCTIONNALISATION ET DETECTION IN VITRO

---

**Ecole doctorale :**

Sciences de la Matière (SDM)

**Unité de recherche :**

Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux (C.I.R.I.M.A.T.)

**Directeur(s) de Thèse :**

M. EMMANUEL FLAHAUT

MME ANNE MARIE GALIBERT

**Rapporteurs :**

M. ALBERTO BIANCO, CNRS

M. JEAN-LUC COLL, UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

**Membre(s) du jury :**

M. PHILIPPE SERP, INP TOULOUSE, Président

M. EMMANUEL FLAHAUT, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

M. ERIC DORIS, CEA SACLAY, Membre

Mme ANNE MARIE GALIBERT, UNIVERSITE TOULOUSE 3, Membre

*« Tout obstacle renforce la détermination.*

*Celui qui s'est fixé un but n'en change pas. »,*

Léonard De Vinci

# Remerciements

Tout d'abord, je souhaiterais remercier mes directeurs de thèse Emmanuel Flahaut et Anne-Marie Larsonneur-Galibert de m'avoir permis de vivre cette expérience inoubliable à leurs côtés. Je tiens à remercier Brigitte Soula et Jean-Marc Escudier qui m'ont également suivie de près tout au long de ma thèse. Merci à tous pour votre encadrement, vos conseils, votre disponibilité, vos qualités d'écoute et de transmission de savoir, et votre gentillesse pendant ces trois années. Merci infiniment de m'avoir permis, en parallèle de mon travail de recherche, de pratiquer l'enseignement tout au long de ma thèse ce qui a été pour moi une nouvelle expérience que j'ai beaucoup appréciée.

Je souhaite également remercier les membres de mon jury, Alberto Bianco, Jean-Luc Coll, Eric Doris et Philippe Serp, d'avoir accepté de juger mon travail, et ce malgré le volume que représentait mon manuscrit. Merci pour toutes vos remarques et la discussion qui en a suivi.

Je voudrais par la suite remercier tous les chercheurs, techniciens, ingénieurs et doctorants qui m'ont aidée, chacun dans sa discipline, à avancer pour mes travaux de recherche. Merci de m'avoir consacré de votre temps, de votre énergie et de votre savoir, et ce toujours dans la bonne humeur.

Je vais commencer par le personnel du CIRIMAT.

Un grand merci à toi, Pierre Lonchambon, car ton arrivée dans l'équipe au cours de ma deuxième année a été un véritable bol d'air frais et un soulagement. Tu m'auras fait découvrir un style musical bien à toi et surtout Foe. Merci pour ton aide précieuse, pour ces discussions de voyages et de voitures et pour ton amitié.

Merci à Aude Delagarde pour ta bonne humeur et ta joie de vivre communicatives. Je garderai en mémoire notre séjour à Guidel-Plages pour le GDRI-GNT 2013 et notre chasse aux dolmens, sans oublier nos nombreuses visites de concessions à la recherche de ta future voiture.

Un grand merci à mon ancienne collègue de bureau, Floriane Bourdiol, qui m'a prise sous son aile à mon arrivée au laboratoire. Merci pour tous tes petits conseils, pour ces bons moments à discuter, et pour cette belle amitié. Merci à toi et Adrien pour votre accueil et de nous avoir fait découvrir votre nouvelle vie.

Merci à Christophe Laurent, Alicia Weibel et David Mesguich, notamment pour vos nombreux conseils et remarques lors de la préparation de ma soutenance. Merci à Abdérahmane Brahmi et à Marie-Claire Barthélémy pour votre aide et votre gentillesse tout au long de ma thèse. Merci à Hoa Le Trong pour ta disponibilité à chaque fois que j'avais besoin du lyophilisateur. Merci à Geoffroy Chevallier sans qui l'impression de mon manuscrit n'aurait pas été possible. Merci à Murielle Soleillant, Nabila Smahi-Medjahri, Maryse Bellanger, Christiane Bonino, Sandrine Daunas-Cerny et Nicole Luga du service administratif du laboratoire, pour leur efficacité, leur accueil et leur disponibilité.

Je souhaiterais à présent remercier les membres du LSPCMIB. Merci à toute l'équipe du 1er étage, Pascal Hoffmann, Alain Vigroux, Christian Lherbet, Frédéric Rodriguez, Christophe et Cyril, qui m'ont ouvert les yeux sur la thèse et sans qui je ne serais probablement pas arrivée jusque là. Ce sont les deux stages que j'ai réalisés au sein de votre équipe qui m'ont donné envie de continuer dans la recherche après mon Master. Je n'oublierai pas la bonne ambiance qui y régnait et les goûters du vendredi après-midi. Merci à Corinne Payrastre de m'avoir permis de travailler à tes côtés et d'avoir pu bénéficier de tes conseils. Merci à Nadine Leygue de m'avoir laissé utiliser votre matériel pour essayer de purifier mes nanotubes.

Je voudrais également remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer durant ces trois années.

Merci à Lucien Datas et Laurent Weingarten de m'avoir formée au MET. Merci à Olivier Marsan (CIRIMAT) et Pascal Puech (CEMES) pour la formation à la spectroscopie Raman et pour votre expertise. Merci à Jean-Christophe Garrigues (IMRCP) pour tout le temps que vous m'avez consacré, vos conseils, votre savoir et votre aide précieuse. Merci à Muriel Golzio et Elizabeth Bellard (IPBS) de m'avoir initiée à la microscopie de fluorescence et d'avoir consacré de votre temps à mes travaux. Merci pour votre aide, votre efficacité et votre patience. Merci à Marc Poirot, Sandrine Silvente-Poirot, Michel Record et Maud Voisin (CRCT), pour votre collaboration et l'intérêt que vous avez porté à mes travaux. Maud, j'ai vraiment été heureuse que nous puissions travailler ensemble dans le cadre de nos thèses respectives, nous qui avions suivi le même cursus jusque là, et j'en garderai un excellent souvenir. Merci à Matthieu Paillet et Huy Nam Tran (Laboratoire Charles Coulomb), et à Monica Jimenez-Ruiz et Stéphane Rols (ILL), pour votre collaboration et votre aide quant à la caractérisation de mes NTCs.

Merci à tous mes amis qui m'ont entourée pendant ces années de thèse, qui ont toujours répondu présent et que je suis heureuse de compter dans mon entourage proche : merci à Fanny, Maud, Kristie, Louise, Pipas, …

Je ne remercierai jamais assez ma famille qui m'a soutenue tout au long de mes études et quels que soient mes choix, qui ont toujours su me réconforter dans les moments difficiles. Merci Maman, Nounours, Mamie et Papi pour votre amour, votre soutien et votre confiance qui m'ont poussé à toujours faire du mieux que je pouvais pour réussir. Vous avoir tous à mes côtés, en ce jour important de soutenance, ne pouvait me combler davantage. Merci également à Sophie et Jacques pour vos encouragements et d'être venus spécialement pour moi. Merci Estelle et Philippe pour tous ces bons moments passés ensemble, toujours dans la joie de vivre et la décontraction.

Enfin, je te remercie de tout mon cœur, Thomas, de m'avoir accompagnée dans cette aventure. Il y a un peu plus de trois ans, tu ne devais probablement pas imaginer ce que nous allions traverser, mais tu as toujours été à mes côtés dans les moments heureux comme difficiles, toujours à mon écoute dans les moments de doute. Ce sont ta patience, ta compréhension, ton indulgence, ta confiance et ton soutien qui m'ont donné les moyens de tenir jusqu'au bout, et je sais que cela n'a pas toujours été facile pour toi. Je suis heureuse d'avoir pu, et de pouvoir encore, partager tous ces moments avec toi.

# TABLE DES MATIERES


**LISTE DES ABREVIATIONS ..... 19**

**INTRODUCTION GENERALE ..... 23**

**CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE ..... 29**

**A. Les nanotubes de carbone ..... 31**

A.I. Structure des nanotubes de carbone ..... 31

A.I.1. Formes allotropiques du carbone ..... 31

A.I.2. SWNTs, DWNTs et MWNTs ..... 34

A.II. Synthèse des nanotubes de carbone ..... 35

A.II.1. Synthèse par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD) ..... 35

A.II.2. Autres méthodes de synthèse ..... 37

*A.II.2.a. Synthèse par arc électrique ..... 37*

*A.II.2.b. Synthèse par ablation laser ..... 37*

A.III. Propriétés et applications des nanotubes de carbone ..... 38

A.III.1. Propriétés et applications mécaniques ..... 38

A.III.2. Propriétés et applications électroniques ..... 38

A.III.3. Propriétés et applications thermiques ..... 39

A.III.4. Propriétés et applications biomédicales ..... 39

A.III.5. Toxicité des nanotubes de carbone ..... 44

**B. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone ..... 45**

B.I. Purification des nanotubes de carbone ..... 45
B.I.1. Purification par la voie humide ..... 45
B.I.2. Purification par la voie sèche ..... 47
B.II. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone ..... 48
B.II.1. Fonctionnalisation covalente ..... 48
*B.II.1.a. Estérification-Amidation ..... 48*
*B.II.1.b. Halogénation ..... 50*
*B.II.1.c. Cycloaddition ..... 51*
*B.II.1.d. Addition radicalaire ..... 51*
*B.II.1.e. Addition nucléophile ..... 53*
B.II.2. Fonctionnalisation non-covalente ..... 54
*B.II.2.a. Interactions avec des tensio-actifs et des polymères ..... 54*
*B.II.2.b. Composés aromatiques polycycliques ..... 56*
*B.II.2.c. Interactions avec des biomolécules ..... 59*
B.II.3. Remplissage ..... 61
C. Détection *in vitro* et *in vivo* des nanotubes de carbone ..... 61
D. Bibliographie du Chapitre 1 ..... 67

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES ..... 87
A. Synthèse des DWNTs par CCVD ..... 89
A.I. Synthèse de la poudre de catalyseur $Mg_{0,99}Co_{0,0075}Mo_{0,0025}O$ ..... 89
A.I.1. Préparation de la poudre de catalyseur par combustion à l'acide citrique ..... 89
A.I.2. Calcination de la poudre de catalyseur ..... 90

A.II.Synthèse des DWNTs par CCVD à partir de la poudre de catalyseur $Mg_{0,99}Co_{0,0075}Mo_{0,0025}O$ ..... 90

A.III. Extraction des DWNTs à partir de la poudre composite ..... 92

**B. Purification des DWNTs ..... 93**

B.I. Oxydation ..... 93

B.I.1. Oxydation à l'acide nitrique (Méthode 1) ..... 93

B.I.2. Oxydation par un mélange d'acides nitrique et sulfurique ..... 93

*B.I.2.a. Oxydation par un mélange $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) à 70°C (Méthode 2) ..... 93*

*B.I.2.b. Oxydation par un mélange $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) à 130°C (Méthode 3) ..... 94*

*B.I.2.c. Oxydation par un mélange $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) à 130°C utilisant les micro-ondes (Méthode 4) ..... 95*

B.I.3. Double oxydation : combinaison de l'acide nitrique puis du mélange d'acides nitrique et sulfurique (Méthode 5) ..... 96

B.I.4. Traitement thermique à sec (Méthode 6) ..... 96

B.II. Elimination des fragments carbonés carboxylés (CCFs) par un lavage à la soude . 97

*B.II.1. Reflux dans une solution de soude (Méthode A) ..... 97*

*B.II.2. Incubation et ultra-sonication dans une solution de soude (Méthodes B et C) . 97*

**C. Fonctionnalisation des DWNTs ..... 98**

C.I. Fonctionnalisation covalente ..... 98

C.I.1. Création des fonctions acides par une double oxydation suivie d'un lavage à la soude ..... 98

C.I.2. Activation des fonctions acides ..... 98

C.I.3. Greffage d'une diamine ..... 99

C.I.4. Greffage du fluorophore ..... 100

C.II. Fonctionnalisation non-covalente ..... 100
C.II.1. Adsorption de l'isothiocyanate de fluorescéine ..... 101
C.II.2. Adsorption de la 1-pyrène-méthylamine ..... 101
C.II.3. Comparaison des fonctionnalisations covalente et non-covalente : le cas du FITC 102
C.II.4. Adsorption d'un dérivé du cholestérol : le 25-hydroxycholestérol ..... 102
D. Tests sur cellules ..... 103
D.I. Incubation en présence de macrophages de souris ..... 103
D.II. Incubation en présence de cellules B16 ..... 103
D.III. Incubation en présence de cellules MCF7 ..... 104
E. Caractérisation ..... 105
E.I. Caractérisations spectroscopiques et microscopie électronique ..... 105
E.I.1. Spectroscopie Raman ..... 105
E.I.2. Spectroscopie Infrarouge ..... 107
E.I.3. Spectroscopie UV-visible-IR ..... 108
E.I.4. Spectroscopie de photoluminescence ..... 110
E.I.5. Microscopie électronique à transmission ..... 113
E.II. Analyses chimiques ..... 114
E.II.1. Microanalyse élémentaire ..... 114
E.II.2. Dosage indirect des fonctions acides ..... 115
E.II.3. Chromatographie liquide à haute performance et à haute pression ..... 116
E.II.4. Tests de Kaiser ..... 118
E.III. Autres analyses ..... 120
E.III.1. ATG ..... 120

E.III.2. Diffusion de neutrons .....122
E.III.3. Mesure de la radioactivité par scintillation liquide .....124
E.IV. Détection des DWNTs in vitro ..... 125
E.IV.1. Microscopie de fluorescence à champ large .....125
E.IV.2. Microscopie confocale à fluorescence.....127
E.IV.3. Microscopie confocale Raman .....129
E.IV.4. Microscopie bi-photonique de fluorescence .....130
F. Bibliographie du chapitre 2 ..... 132

CHAPITRE 3 : PURIFICATION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS.....135

A. Introduction ..... 137
B. Présentation des DWNTs bruts et des méthodes de purification ..... 138
B.I. Les DWNTs bruts ..... 138
B.II. Méthodes de purification ..... 141
C. Effets des différentes méthodes d'oxydation sur les DWNTs ..... 144
C.I. Elimination des métaux ..... 144
C.II. Modification des parois des DWNTs et formation des fragments carbonés carboxylés (CFFs) ..... 147
C.III. Le cas particulier de la Méthode 5 ou Double-oxydation ..... 154
C.IV. Création de groupements fonctionnels..... 155
C.V. Elimination des CCFs après l'étape d'oxydation ..... 159

D. Bibliographie du chapitre 3 ..... 168

CHAPITRE 4 : FONCTIONNALISATION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS..... 171

A. Introduction ..... 173

B. Fonctionnalisation covalente..... 174

B.I. Etapes de fixation du fluorophore ..... 174

B.I.1. Activation des fonctions carboxyliques .....174

B.I.2. Fixation d'une diamine.....176

B.I.3. Greffage du fluorophore .....179

B.II. Analyses qualitatives..... 183

B.II.1. Mise en évidence des greffages successifs par MET .....183

B.II.2. Mise en évidence de la fonctionnalisation covalente par spectroscopie IR.....185

B.II.3. Mise en évidence de la fonctionnalisation covalente par spectroscopie Raman ..191

B.II.4. Mise en évidence par spectrophotométrie UV-Vis-IR .....195

B.II.5. Mise en évidence par spectroscopie de photoluminescence.....199

B.II.6. Mise en évidence par diffusion de neutrons .....204

B.III. Analyses quantitatives..... 206

B.III.1. Quantification par microanalyse élémentaire .....206

B.III.2. Quantification des fonctions amines primaires par le test de Kaiser.....209

B.III.3. Quantification indirecte par UPLC .....213

C. Fonctionnalisation non-covalente ..... 221

C.I. Etude des différents états de surface des DWNTs ..... 222

C.I.1. Adsorption du FITC et de la $PyMeNH_2$ .....222

C.I.2. Mise en évidence d'une cinétique de désorption au cours des lavages par spectroscopie UV-visible.....223
C.I.3. Analyse quantitative.....225
*C.I.3.a. Détermination de la quantité de FITC adsorbé par spectroscopie UV-Vis.....225*
*C.I.3.b. Détermination de la quantité de FITC adsorbé par ATG.....226*
*C.I.3.c. Détermination de la quantité de $PyMeNH_2$ adsorbée par le test de Kaiser ....229*
*C.I.3.d. Détermination des quantités de FITC et de $PyMeNH_2$ adsorbées par microanalyse élémentaire.....231*
C.II. Comparaison des fonctionnalisations covalente et non-covalente : le cas du FITC ..... 233
C.II.1. Fonctionnalisations covalente et non-covalente réalisées dans les mêmes conditions.....233
C.II.2. Analyse qualitative.....234
*C.II.2.a. Comparaison par MET.....234*
*C.II.2.b. Comparaison par spectroscopie IR.....235*
*C.II.2.c. Analyse par spectroscopie Raman .....236*
*C.II.2.d. Analyse par spectrophotométrie d'absorption UV-Vis-IR.....238*
*C.II.2.e. Analyse par spectroscopie de photoluminescence .....240*
C.II.3. Analyse quantitative .....244
*C.II.3.a. Comparaison basée sur les résultats de microanalyse élémentaire.....244*
*C.II.3.b. Comparaison par ATG.....245*
C.III. Adsorption d'un dérivé du cholestérol : le 25-Hydroxycholestérol ..... 248
C.III.1. Quantification indirecte du taux d'adsorption par mesure de la radioactivité par scintillation liquide.....250
C.III.2. Quantification indirecte du taux d'adsorption par UPLC.....252

D. Bibliographie du chapitre 4 ..... 258

CHAPITRE 5 : DETECTION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS DANS LES CELLULES DE MAMMIFERES ..... 263

A. Introduction ..... 265

B. Détection de la fluorescence par microscopie de fluorescence à champ large ..... 266

B.I. Observation de suspensions de DWNTs fonctionnalisés par le FITC ..... 266

B.II. Incubation des DWNTs avec des macrophages ..... 269

B.III. Observation des cellules MCF7 ..... 271

B.III.1. Fonctionnalisation par le FITC ..... 272

B.III.2. Fonctionnalisation par la streptocyanine Cy* ..... 275

B.III.3. Fonctionnalisation par la Cy5 ..... 277

C. La microscopie confocale au service de la détection et de la co-localisation des DWNTs dans les cellules ..... 279

C.I. Mise en évidence par microscopie confocale de fluorescence ..... 279

C.I.1. Observation des contrôles ..... 279

C.I.2. Fonctionnalisation par le FITC ..... 281

C.I.3. Fonctionnalisation par la Cy* ..... 285

C.I.4. Fonctionnalisation par la Cy5 ..... 286

C.II. Mise en évidence de la présence des DWNTs par microscopie confocale Raman ..... 288

C.II.1. Analyse des cellules MCF7 ..... 289

*C.II.1.a. Recherche des conditions opératoires ..... 289*

*C.II.1.b. Profils en z ..... 293*

C.II.2. Analyse des cellules B16 ..... 294

*C.II.2.a. Profils en z ..... 294*

*C.II.2.b. Cartographies ..... 297*

**D. Détection de l'autofluorescence des DWNTs *in vitro* par microscopie bi-photonique de fluorescence ..... 300**

D.I. Recherche des conditions optimales d'observation ..... 301

D.II. Observation de suspensions de DWNTs seuls en microscopie bi-photonique .... 303

D.III. Observation des cellules B16 ..... 305

**E. Bibliographie du chapitre 5 ..... 312**

**CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 315**

# LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|---|---|
| **25-HC** | 25-hydroxycholestérol |
| **25-HC-$^{3}$H** | 25-hydroxycholestérol tritié |
| **ACN** | Acétonitrile |
| **ADN** | Acide DésoxyriboNucléique |
| **ARN** | Acide Ribonucléique |
| **ARNm** | Acide Ribonucléique messager |
| **ATG** | Analyse Thermo-Gravimétrique |
| **ℭ** | Cellule |
| **CCFs** | Fragments carbonés carboxylés |
| **CCVD** | Dépôt Chimique Catalytique en phase Vapeur |
| **$CH_2Cl_2$** | Dichlorométhane |
| **Cy*** | Streptocyanine Cy* |
| **DAPI** | 4',6'-diamidino-2-phénylindole |
| **DIEA** | N,N-diisopropyléthylamine |
| **DMEM** | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| **DMSO** | Diméthylsulfoxyde |
| **DOC** | Désoxycholate de sodium |
| **DOX** | Doxorubicine |
| **DWNTs** | Nanotubes de carbone biparois |
| **EtOH (abs)** | Ethanol (absolu) |
| **FITC** | Isohtiocyanate de fluorescéine |
| **Fluo** | Fluorescéine |
| **HCl** | Acide chlorhydrique |
| **$HNO_3$** | Acide nitrique |
| **$H_2O_2$** | Peroxyde d'hydrogène |

| | |
|---|---|
| **$H_2SO_4$** | Acide sulfurique |
| **HPLC** | Chromatographie Liquide à Haute Performance |
| **IR** | Infra-rouge |
| **KBr** | Bromure de potassium |
| **$KMnO_4$** | Permanganate de potassium |
| **$K_2Cr_2O_7$** | Dichromate de potassium |
| **MET** | Microscopie Electronique à Transmission |
| **MWNTs** | Nanotubes de carbone multi-parois |
| **NaOH** | Hydroxyde de sodium (soude) |
| **NTCs** | Nanotubes de carbone |
| **PEG** | Polyéthylène glycol |
| **PBS** | Tampon phosphate salin |
| **PFA** | Paraformaldéhyde |
| **$PyMeNH_2$** | 1-pyrène-méthylamine |
| **RBM** | Radial Breathing Mode ou Mode de vibration radiale |
| **RPMI** | Roswell Park Memorial Institute medium |
| **siRNA** | ARN interférent |
| **SVF** | Sérum de Veau Fœtal |
| **SWNTs** | Nanotubes de carbone monoparois |
| **THF** | Tétrahydrofurane |
| **UPLC** | Chromatographie Liquide à haute Pression |
| **UV** | Ultra-violet |

# INTRODUCTION

# GENERALE

Le travail de recherche entrepris dans le cadre de cette thèse se situe au centre de l'intérêt grandissant que portent les scientifiques aux nanotubes de carbone (NTCs). En effet, depuis leur découverte en 1991 par Iijima **[1]**, les NTCs ont pris une place très importante dans de nombreux domaines scientifiques (matériaux, électronique, chimie, biomédical, etc…) de fait de leurs propriétés très particulières (chimiques, optiques, mécaniques, électroniques, magnétiques, etc…), leur conférant ainsi un avenir très prometteur. Ces travaux de recherche sont focalisés sur les potentialités des nanotubes de carbone biparois (DWNTs : Double-Walled carbon NanoTubes), dans le domaine des applications biomédicales (imagerie, vectorisation, etc…). Le but est ainsi de fonctionnaliser ces DWNTs, de plusieurs manières, avec différentes molécules fluorescentes afin de pouvoir les détecter et les suivre *in vitro*. La qualité du greffage, son taux de réussite ainsi que sa stabilité seront par conséquent étudiés.

Les deux principales voies de fonctionnalisation, covalente et non-covalente, généralement utilisées sont caractérisées par des interactions de natures bien différentes et les modifications au niveau des NTCs qui en découlent sont de ce fait plus ou moins importantes. Avec la fonctionnalisation covalente, qui est la méthode la plus largement répandue, des liaisons fortes et stables (liaisons covalentes) sont créées entre les NTCs et les molécules d'intérêt, conduisant par conséquent à des altérations des parois des NTCs donc à des variations de leurs propriétés intrinsèques. Pour ce qui est de la fonctionnalisation non-covalente, celle-ci est basée sur des interactions faibles (interactions hydrophobes, $\pi$-$\pi$ stacking, interactions ioniques, etc…) n'affectant pas la structure des NTCs.

Notre choix pour cette étude s'est porté sur les DWNTs pour plusieurs raisons. D'une part, l'équipe « Nanocomposites et Nanotubes de Carbone » du CIRIMAT a développé un processus de synthèse des DWNTs par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD : Catalytic Chemical Vapour Deposition) à partir d'un catalyseur de type solution solide à base de magnésie et d'oxydes de cobalt et de molybdène $MgO_{1-x}(Co,Mo)_xO$, sous atmosphère réductrice d'un mélange de dihydrogène et de méthane **[2-3]**. D'autre part, les DWNTs ont l'avantage de représenter à la fois les nanotubes de carbone monoparois (SWNTs : Single-Walled carbon NanoTubes), leurs morphologie et taille étant similaires, et les nanotubes de carbone

multiparois (MWNTs : Multi-Walled carbon NanoTubes) de façon plus générale. De plus, le tube externe des DWNTs peut être fonctionnalisé sans que cela n'affecte la structure et les propriétés du tube interne.

Ce manuscrit de thèse est divisé en cinq parties. Le premier chapitre est une introduction bibliographique visant à expliquer au lecteur de quelle nature sont les NTCs, quelles sont leurs propriétés intrinsèques les rendant si intéressant aux yeux des scientifiques appartenant à des domaines distincts, et quelles sont les différentes voies de synthèse des NTCs. Puis, nous verrons quelles sont les méthodes déjà existantes afin de purifier et de fonctionnaliser les NTCs, et enfin ce que les études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont apporté sur la compréhension du comportement des NTCs en milieu biologique.

Dans le chapitre 2 ont été détaillés tous les protocoles expérimentaux ainsi que les nombreuses techniques de caractérisation utilisées dans ce travail de thèse.

Le chapitre 3 est quant à lui consacré à la purification des DWNTs. En effet, les échantillons récupérés à la fin du processus de synthèse par CCVD contiennent des NTCs mais également des impuretés provenant du catalyseur de départ (nanoparticules métalliques, carbone désorganisé), ce qui peut être gênant dans le cadre d'applications biologiques. D'autre part, le but étant de fonctionnaliser les DWNTs avec des fluorophores, il est nécessaire de travailler sur les DWNTs dépourvus de toute impureté pour être certain que le greffage a uniquement eu lieu sur les parois des DWNTs et non sur les impuretés carbonées. Plusieurs pistes sont ainsi explorées dans ce chapitre afin d'obtenir les DWNTs les plus purs possibles (étude qualitative et quantitative).

Le quatrième chapitre traite de la fonctionnalisation réalisée sur les DWNTs et comporte ainsi deux parties. La première partie est centrée sur la fonctionnalisation covalente des DWNTs oxydés et purifiés (obtenus à la fin du chapitre 3) par trois molécules fluorescentes différentes (FITC, streptocyanine, Cy5). Des analyses qualitatives et quantitatives ont été entreprises afin de déterminer si ce type de greffage est une réussite, et si les trois fluorophores ont été correctement liés aux DWNTs et dans quelles proportions. Dans la deuxième partie sont abordées plusieurs études qualitative et quantitative sur la fonctionnalisation non-covalente des

DWNTs. Dans un premier temps, l'affinité de plusieurs états de surface vis-à-vis de deux molécules couramment utilisées (FITC et un dérivé du pyrène) est évaluée. Puis, les fonctionnalisations covalente et non-covalente avec le FITC sont comparées afin de déterminer quel type de greffage est le plus efficace et quelle est la proportion de molécules adsorbées lorsque la fonctionnalisation covalente est sélectionnée. Enfin, deux types de DWNTs sont fonctionnalisés par un dérivé lipidique de façon non-covalente dans le but d'évaluer leur potentiel comme vecteur.

La détection des DWNTs fonctionnalisés in vitro est abordée dans le dernier et cinquième chapitre. Plusieurs sortes de cellules animales sont incubées avec les DWNTs fonctionnalisés par les différents fluorophores (obtenus à la fin du chapitre précédent), puis les préparations sont observées par microscopies de fluorescence à champ large et confocale et analysées par microscopie confocale Raman. Les buts de ces expériences sont de savoir si les DWNTs fonctionnalisés sont détectables par ces trois techniques de microscopie, quelle est la stabilité en milieu biologique des greffages en fonction des interactions mises en jeu et quels sont les comportements de ces DWNTs vis-à-vis des cellules en fonction de leur état de surface et de leur fonctionnalisation. Les données collectées par microscopies confocales de fluorescence et Raman sont par la suite recoupées afin de permettre une co-localisation des DWNTs au niveau des cellules. Enfin, la microscopie bi-photonique de fluorescence, très peu utilisée pour la visualisation des NTCs, est présentée comme une technique prometteuse pour la localisation in vitro des DWNTs, même non fonctionnalisés.

## Bibliographie de l'introduction générale

[1] Iijima S, *Helical microtubules of graphitic carbon.* Nature, **1991**, 354, 56-58.

[2] Flahaut E, Peigney A, Bacsa R and Laurent Ch, *Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes.* Chem Commun, **2003**, 1442-1443.

[3] Flahaut E, Peigney A, Bacsa WS, Bacsa RR and Laurent Ch, *CCVD synthesis of carbon nanotubes from (Mg Co, Mo)O catalysts: influence of the proportions of cobalt and molybdenum.* J Mater Chem, **2004**, 14, 646-653.

# CHAPITRE 1

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

# A. Les nanotubes de carbone

## A.I. Structure des nanotubes de carbone

### A.I.1. Formes allotropiques du carbone

Le carbone constitue l'un des atomes les plus répandus dans le monde du vivant puisqu'il est la base de la plupart des molécules biologiques (protéines, acides nucléiques, lipides, etc…). Cependant, le carbone existe également à l'état naturel sous d'autres formes cristallines ou moléculaires. Celles-ci sont appelées formes allotropiques et se divisent en deux catégories en fonction de leur provenance (naturelle ou synthétique).

A l'état naturel, deux formes cristallisées peuvent être rencontrées, le diamant (**Figure 1.1. a**) et le graphite (**Figure 1.1. b**), ainsi que des structures carbonées très désordonnées regroupées sous le nom de carbone désorganisé (**Figure 1.1. c**). Le diamant est un arrangement polyédrique d'atomes de carbone hybridés $sp^3$. Le graphite, quant à lui, est formé d'une superposition de feuillets de graphène constitués eux-mêmes d'un réseau hexagonal d'atomes de carbone $sp^2$ (structure en nid d'abeille). Les atomes de carbone sont reliés entre eux, au sein d'un même feuillet de graphène, par liaison covalente (longueur de liaison de 1,4 Å), alors que ce sont des interactions faibles de type $\pi$-$\pi$ stacking qui assurent la cohésion des feuillets de graphène entre eux (distance inter-feuilles de 3,4 Å) **[1]**. Ce sont ces interactions faibles qui rendent le graphite peu résistant et permettent ainsi une exfoliation des feuillets de graphène **[2]**.

Deux autres formes allotropiques du carbone, de nature artificielle, ont été découvertes à partir des années 80. En effet, Kroto *et al.* **[3]** met en évidence les fullerènes $C_{60}$, synthétisés par ablation laser du graphite, et constitués comme leur nom l'indique de soixante atomes de carbone arrangés en forme de sphère (**Figure 1.1. d**). En 1991, Iijima **[4]** publie des images de microscopie électronique à transmission (MET) de produits secondaires, alors appelés « microtubules de carbone », apparus au cours de la synthèse des fullerènes par arc électrique. Il s'agit des nanotubes de carbone (NTCs) (**Figure 1.1. e**).

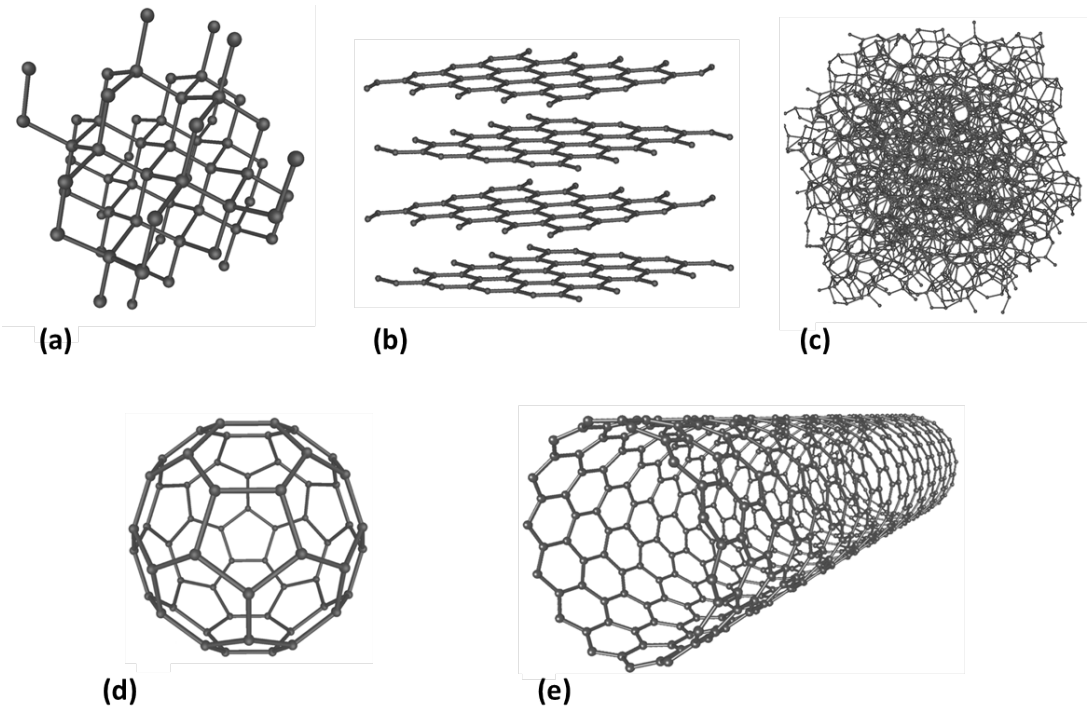



*Figure 1.1 : Formes allotropiques du carbone : (a) diamant, (b) graphite (ici avec quatre feuillets de graphène), (c) carbone désorganisé, (d) fullerène ($C_{60}$) et (e) nanotube de carbone.*

Les nanotubes de carbone sont constitués d'une ou plusieurs feuillets de graphène enroulés sur eux-mêmes formant ainsi un cylindre creux fermé à chacune des deux extrémités par un demi-fullerène. Les NTCs sont ainsi formés de carbone hybridés $sp^2$, néanmoins il existe un certain nombre de défauts dans la structure correspondant à des pentagones, des heptagones et mais également des carbones hybridés $sp^3$. Ces défauts, principalement localisés aux extrémités des NTCs, sont responsables, lorsqu'ils se situent sur la paroi, de courbures au niveau des NTCs.

La façon dont est enroulé le NTC définit sa structure. Les différentes façons d'enrouler le feuillet de graphène pour former un nanotube de carbone sont définies par un vecteur et un angle d'hélicité, respectivement notés $C_h$ et $\theta$. Le vecteur de chiralité est défini par la relation suivante : $C_h = n.a_1 + m.a_2$, avec n et m deux entiers positifs caractéristiques du tube, et $a_1$ et $a_2$ les deux vecteurs unitaires définissant le plan de graphène (**Figure 1.2**) **[1]**.

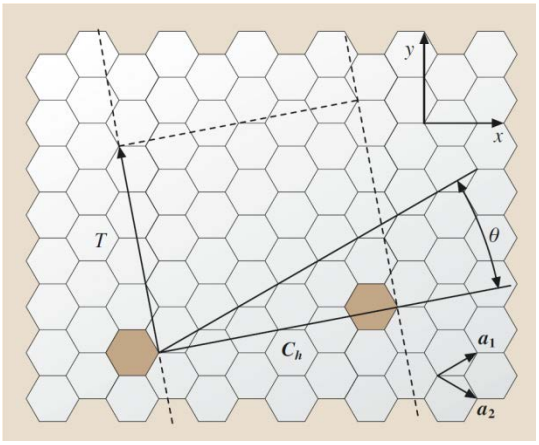



*Figure 1.2 : Schéma représentant les vecteur $C_h$ et angle $\theta$ d'hélicité ou de chiralité d'un nanotube de carbone, obtenu à partir de l'enroulement d'un feuillet de graphène.*

A partir de ce vecteur d'hélicité, il est possible de distinguer trois catégories de NTCs (**Figure 1.3**) :

- NTC de type zigzag : (n,0) et $\theta = 0°$,
- NTC de type armchair : (n,n) et $\theta = 30°$,
- NTC chiral : (n,m) et $0 < \theta < 30°$.

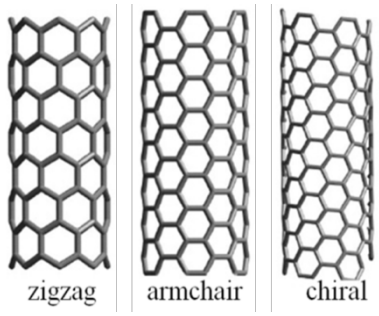



*Figure 1.3 : Schémas des différentes structures de NTCs.*

D'autre part, le diamètre des NTCs peut être calculé à partir du vecteur d'hélicité, et plus précisément à partir du couple (n,m), suivant la formule suivante : $d = \frac{|C_h|}{\pi} = \frac{a_{C=C}\sqrt{3(n^2+m^2+nm)}}{\pi}$, sachant que $a_{C=C}$ correspond à la longueur de la liaison entre

deux atomes de carbone d'un NTC ($a_{C=C} \approx 1{,}42$ Å). Le diamètre des NTCs est compris entre 0,4 nm et quelques dizaines de nanomètres, en fonction du nombre de parois qu'ils possèdent, et leurs longueurs sont de l'ordre de la centaine de nanomètres à quelques microns.

### A.I.2. SWNTs, DWNTs et MWNTs

Il existe deux sortes de NTCs selon le nombre de parois qui les compose. D'une part, les nanotubes de carbone monoparois ou Single-Walled carbon NanoTubes (SWNTs) sont formés d'un seul feuillet de graphène enroulée sur elle-même (**Figure 1.4**). Ils ont été pour la première fois synthétisés par arc électrique en 1993 par Bethune *et al.* **[5]** et Iijima *et al.* **[6]**.

D'autre part, les nanotubes de carbone multi-parois ou Multi-Walled carbon NanoTubes (MWNTs) sont constitués de plusieurs tubes concentriques, dont le nombre peut varier entre 2 et 50. On distingue ainsi les nanotubes de carbone biparois ou Double-Walled carbon NanoTubes (DWNTs) ne possédant que deux parois et représentant ainsi une forme de NTCs entre les SWNTs et les MWNTs.

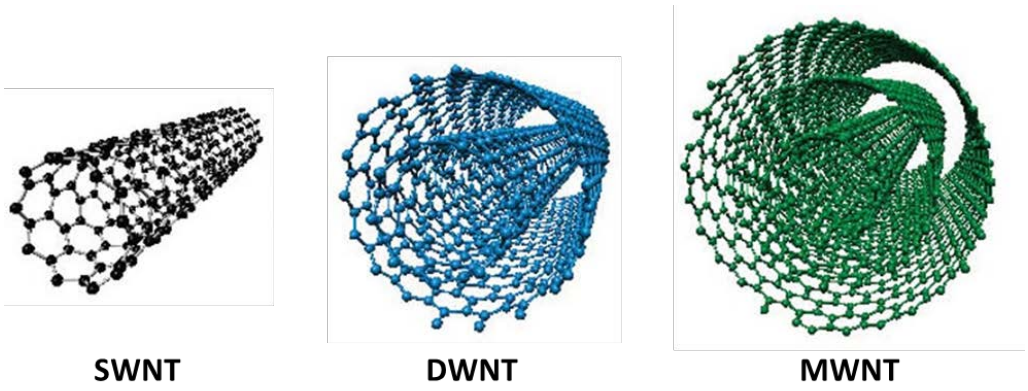



*Figure 1.4 : Représentation des différents NTCs synthétisés, à savoir les NTC monoparois (SWNTs), biparois (DWNTs) et multi-parois (MWNTs).*

Les SWNTs ont un diamètre compris entre 0,4 et 2,5 nm **[1]** alors que les MWNTs ont des diamètres interne et externe variant respectivement entre 0,5 et 50 nm et entre 1,2 et plus de 100 nm. La distance inter-tube est égale à 3,4 Å **[7-8]**, soit la même distance déjà déterminée entre les feuillets de graphène qui forment le graphite. Les SWNTs et les DWNTs ont tendance à s'agglomérer en faisceaux ou fagots pouvant atteindre un diamètre supérieur à 30 nm et une longueur de plusieurs microns, voire même de l'ordre du centimètre. Les MWNTs, quant à eux, ont plutôt tendance à former des genres de pelotes désordonnées.

## A.II. Synthèse des nanotubes de carbone

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour synthétiser les NTCs, cependant elles sont toutes basées sur le même principe nécessitant : une source carbonée, sous forme solide ou gazeuse ; de l'énergie, sous forme de chaleur et/ou de pression ; et un catalyseur. Ce sont les techniques de synthèse, les conditions opératoires et les types de source carbonée et de catalyseur utilisés qui vont déterminer la nature (SWNTs, DWNTs, MWNTs), la chiralité, la qualité et la pureté des NTCs synthétisés. Les NTCs sont essentiellement synthétisés selon trois techniques : par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD), par arc électrique et par ablation laser. La première méthode est une voie de synthèse dite à température modérée, alors que les deux autres sont considérées comme des voies de synthèse à haute température. Il existe cependant d'autres méthodes de synthèse, qui ne seront pas détaillées par la suite, à savoir par combustion d'hydrocarbures **[9]**, par décharge électrique en solution aqueuse **[10]**, par rayonnement solaire **[11]**, etc…

### A.II.1. Synthèse par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD)

Cette technique de synthèse est à ce jour l'une des méthodes de synthèse des NTCs la plus répandue, notamment à l'échelle industrielle **[12]**, permettant de synthétiser des SWNTs ou des MWNTs, selon les conditions opératoires, et ce dans de grandes quantités (de l'ordre du kg), et sans forcément avoir besoin de purifier les NTCs par la suite.

Le principe de cette méthode de synthèse des NTCs est basé sur la décomposition d'un gaz carboné sur des nanoparticules métalliques **[13]**, à des températures comprises entre 600 et 1200°C **[14]**. Le carbone diffuse ainsi au sein ou à la surface des nanoparticules catalytiques, puis précipite lorsque la saturation est atteinte **[15]**. Il se forme alors un chapeau de graphène sur le dessus de la particule. Alors que le carbone continue à diffuser dans la nanoparticule, le chapeau se décolle au moment où la paroi du SWNT commence à se former et croitre. Plusieurs chapeaux superposés peuvent se former à la surface d'une même particule, conduisant ainsi à la formation d'un MWNT. La taille de la particule catalytique détermine le diamètre du NTC synthétisé. La nanoparticule métallique se retrouve à l'une des deux extrémités du NTC, en fonction du mécanisme de croissance **[16]**.

Les sources de carbone généralement utilisées sont des gaz, tels que le monoxyde de carbone (CO) **[14]** ou des hydrocarbures comme le méthane ($CH_4$) **[17]**, l'acétylène ($C_2H_2$) **[18-19]**, l'éthylène ($C_2H_4$) **[19]** et le propylène ($C_3H_6$) **[19]**. Des synthèses ont également été réalisées à partir de sources carbonées liquides comme le benzène ($C_6H_6$) **[20]** ou l'éthanol (EtOH, $C_2H_5OH$) **[21]**.

Les types de catalyseur sont également très variés en forme et composition. Les catalyseurs sont généralement formés de particules métalliques, incorporées dans un substrat, soit directement mises en contact avec le gaz carboné, soit placées sous forme de précurseurs qui seront activées au cours de la synthèse. Les catalyseurs sont composés habituellement uniquement de nanoparticules d'un seul métal comme le fer (Fe) **[18]**, le cobalt (Co) **[19]** et le nickel (Ni), ou de mélanges de nanoparticules métalliques Co/Mo **[22]**, Fe/Co **[17,18,23]**, Co/Ni **[17]**. L'association de métaux permet d'éviter un regroupement du catalyseur métallique principal, mais aussi d'augmenter le rendement de la réaction, ce qui est le cas par l'ajout de Mo **[15]**. Soit le catalyseur, sous forme solide, est synthétisé préalablement (cas le plus courant), soit il est injecté directement dans le milieu sous une forme gazeuse, comme le ferrocène **[24-25]**. Dans le cas des catalyseurs classiques solides, les nanoparticules métalliques sont mélangées dans un oxyde réfractaire, tel que la magnésie (MgO) **[17]** ou l'alumine ($Al_2O_3$) ou la silice ($SiO_2$) **[23]**, afin d'éviter la coalescence des nanoparticules métalliques. La poudre de catalyseur peut ainsi être préparée par combustion pour donner une solution solide d'oxydes métalliques dans laquelle les nanoparticules catalytiques sont dispersées de manière homogène **[26]**. Les oxydes métalliques sont par la suite activés au cours de la synthèse par un gaz réducteur tel que le

dihydrogène ($H_2$) **[15,26]**. Un substrat solide supportant les nanoparticules métalliques peut également être utilisé afin de synthétiser des « fôrets » de NTCs alignés, dont la densité et la longueur peuvent être contrôlées **[27-29]**.

### A.II.2. Autres méthodes de synthèse

#### *A.II.2.a. Synthèse par arc électrique*

Cette méthode consiste à créer un arc électrique entre deux électrodes en graphite, sous atmosphère inerte et faible pression. Le plasma (dont la température peut atteindre 6000°C) alors engendré entre les deux électrodes permet la sublimation de l'anode, et les produits carbonés de différentes natures se condensent pour finalement se déposer dans le réacteur. La technique de synthèse par arc électrique était en premier lieu utilisée dans le cadre de la synthèse de fullerènes **[30]**, jusqu'à ce que, en 1991, Iijima ait reporté la présence de produits secondaires, les MWNTs **[4]**. L'ajout de catalyseurs métalliques dans l'anode a permis par la suite de synthétiser les premiers SWNTs **[5-6]**.

Ce procédé de synthèse est difficilement adaptable à la production industrielle à cause de l'hétérogénéité des produits obtenus, du rendement faible en SWNTs et de la contamination des échantillons par toutes sortes de formes carbonées (fullerènes, suie, graphite, etc…), impliquant de ce fait des étapes supplémentaires de purification.

#### *A.II.2.b. Synthèse par ablation laser*

La synthèse par ablation laser est basée sur un principe proche de celui de la synthèse par arc électrique. En effet, dans un four chauffé à une température avoisinant les 1200°C, une pastille de graphite est vaporisée sous l'action d'un rayonnement laser (continu ou pulsé), de forte énergie. Les produits carbonés obtenus par la sublimation du graphite sont ensuite entraînés par un flux de gaz inerte et récupérés au niveau d'un collecteur en cuivre refroidi à l'eau **[31]**. Des SWNTs peuvent être synthétisés en ajoutant un catalyseur métallique dans la pastille de graphite **[1]**.

Cette méthode de synthèse par ablation laser permet d'obtenir des NTCs de pureté élevée, cependant elle reste très coûteuse avec des rendements de synthèse faibles.

## A.III. Propriétés et applications des nanotubes de carbone

### A.III.1. Propriétés et applications mécaniques

La structure, la forme tubulaire et le diamètre nanométrique confèrent aux NTCs leur caractère unidimensionnel, les rendant très intéressants pour de multiples applications. En effet, les scientifiques se sont rapidement intéressés aux propriétés mécaniques de ces nanoparticules particulières et se sont rendus compte à quel point elles étaient exceptionnelles. Leur résistance aux déformations, sans modification structurale, s'est révélée 100 fois supérieure à celle de l'acier, à section égale, avec une masse 6 fois plus faible **[32]**. Les NTCs sont dotés d'une grande flexibilité, les SWNTs pouvant subir des déformations de flexion importantes et réversibles jusqu'à un angle critique de 110° **[33]**, ainsi que d'une dureté supérieure à celle du diamant dans certains cas **[34]**. Toutes ces caractéristiques en font de très bons candidats comme additifs à des matériaux composites utilisés dans les domaines de l'aérospatial et de l'automobile.

### A.III.2. Propriétés et applications électroniques

Les propriétés électroniques des NTCs dépendent fortement de leur angle d'enroulement et leur diamètre, ce qui leur donne un caractère semi-conducteur ou métallique. Tous les NTCs de configuration « Armchair » sont métalliques, alors que les NTCs de types « Zigzag » ou « chiraux » sont soit semi-conducteurs soit métalliques. Dans le cas des SWNTs, on retrouve 2/3 de NTCs semi-conducteurs pour 1/3 de NTCs métalliques **[35]**. Avec les MWNTs, chacun des feuillets peut présenter des propriétés électriques différentes (soit semi-conductrice, soit métallique). Les NTCs présentent un grand potentiel dans le domaine de la microélectronique, ceux-ci pouvant transporter des densités de courant supérieures à $10^9$ A/cm², donc 100 fois supérieures à celles transportées par les métaux couramment utilisés tels que le cuivre ou l'argent **[36]**.

### A.III.3. Propriétés et applications thermiques

Les NTCs possèdent également des propriétés thermiques remarquables, supérieures à celles du cuivre, de l'argent et du diamant (entre 1000 et 2600 $W.m^{-1}.K^{-1}$) **[34]** : ce sont ainsi les meilleurs conducteurs thermiques connus. Leur utilisation dans des matériaux composites en tant que dissipateurs de chaleur constitue l'une des nombreuses applications potentielles des NTCs.

### A.III.4. Propriétés et applications biomédicales

Un grand intérêt a été porté aux NTCs ces dernières années dans les domaines de la biologie et de la recherche médicale.

Les propriétés électroniques remarquables des NTCs, leur sensibilité à l'environnement extérieur et leur dimension nanométrique, en font des composés très attrayants pour les biocapteurs pour la détection de biomolécules **[37]**. Ainsi, les biocapteurs à base de NTCs développés jusque-là permettent de détecter des protéines **[38]**, du glucose **[39]**, de l'ADN **[40-41]**, de l'urée **[42]**.

D'autre part, étant composés de carbone et leur structure étant relativement inerte, les NTCs sont donc biocompatibles et constituent d'excellents candidats pour de multiples applications biomédicales.

Les NTCs peuvent également être utilisés pour la régénération tissulaire pour les mêmes raisons évoquées précédemment. En effet, il a été montré que les cellules neuronales avaient une forte affinité pour les NTCs, celles-ci préférant s'accrocher à un substrat recouvert de NTCs en milieu de culture, une grande partie des éléments du milieu de culture s'adsorbant sur les NTCs. Il a été également observé une croissance des axones dans ces conditions et un guidage de ces axones par le substrat de NTCs (**Figure 1.4**) **[43-44]**.

Les substrats de MWNTs **[45]** et de SWNTs **[46]** ont montré qu'ils permettaient d'amplifier le signal électrique des neurones.

Du fait de leur taille nanométrique, de leur structure que l'on peut considérer comme unidimensionnelle et de leur surface spécifique élevée, les NTCs ont rapidement été considérés comme des systèmes de vectorisation d'espèces biologiquement actives au sein de l'organisme **[47]**.

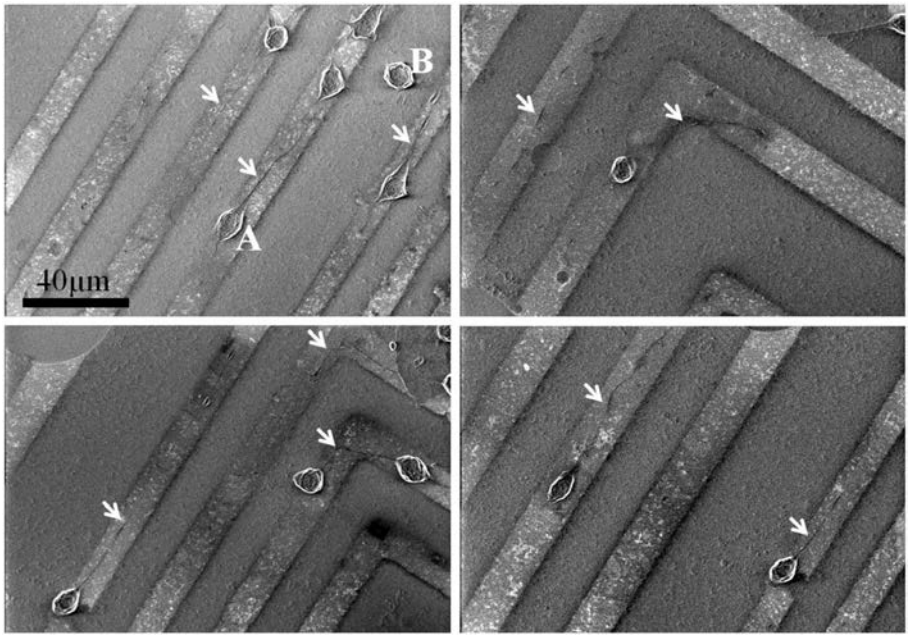



*Figure 1.4 : Images MEB de cultures cellulaires de neurones sur une surface SiO2 présentant des motifs de DWNTs. Les flèches blanches indiquent les neurites qui se sont développées sur le substrat de DWNTs.* ***[44]***

En effet, les NTCs permettraient de surmonter certaines limitations associées aux médicaments : solubilité limitée, désactivation rapide, biodistribution limitée. Les NTCs peuvent être remplis par des molécules ou nanoparticules, et leurs parois externes peuvent être fonctionnalisées de façon covalente ou non-covalente afin d'améliorer leur biocompatibilité, leur stabilité en solution, de faciliter leur biodégradation **[48]**, de les orienter vers des cibles prédéfinies **[49]**, et/ou de les détecter par imagerie (détaillé dans la partie C). De nombreuses recherches ont été réalisées sur les différentes façons d'utiliser les NTCs comme vecteurs (**Figure 1.5**).

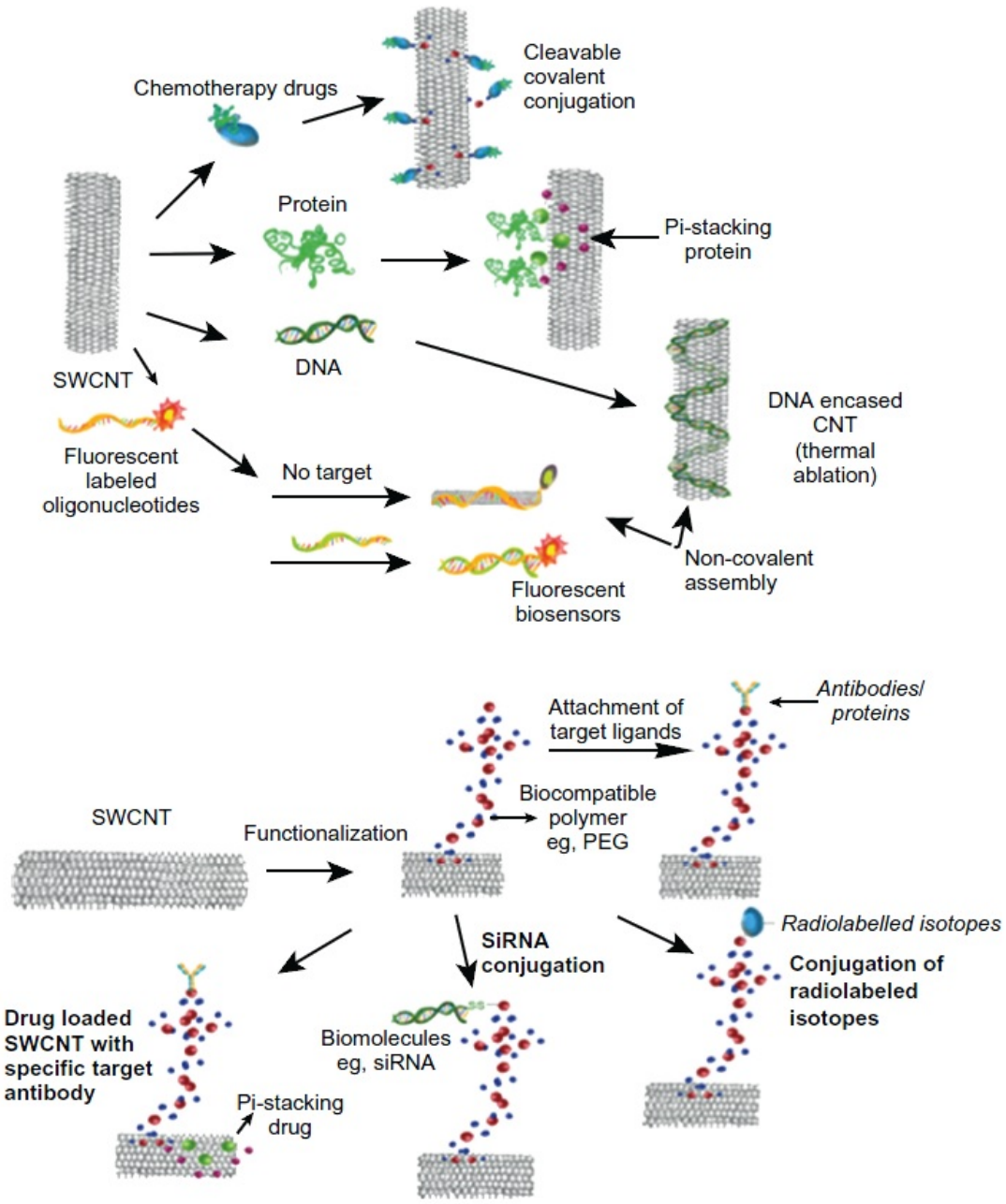



*Figure 1.5 : Schéma représentant les différentes fonctionnalisations des NTCs par diverses molécules pour des applications biomédicales.* ***[54]***

Un grand intérêt s'est développé pour utiliser les acides nucléiques afin de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer un gène cible bien particulier responsable de la manifestation d'une maladie. Est ainsi apparue une nouvelle classe d'acides nucléiques actifs pour la thérapie : petits ARN interférents (siRNA : small interfering RNA), plasmides, etc… **[50]**. Les principales difficultés rencontrées afin de délivrer le gène à la cible sont la

pénétration au travers des barrières extracellulaires, les mécanismes de clairance, le ciblage de cellules cibles et la protection des acides nucléiques contre la dégradation. Les vecteurs viraux ont montré leur efficacité dans cette tâche, cependant ils ont rapidement montré leurs limites en termes de capacité à transporter une quantité maximale de matériel génétique et à cibler des populations **[51]**. Les NTCs sont ainsi apparus comme un moyen de remédier à ces problèmes dans le cadre de la thérapie génique. Des SWNTs et des MWNTs ont été fonctionnalisés de sorte que les nanotubes portent des groupements cationiques, puis ont été complexés à des molécules d'ADN, permettant ainsi une transfection efficace du matériel génétique dans les cellules **[52-53]**.

A titre d'exemple, des DWNTs remplis de chloroquine, une molécule antipaludique bloquant l'acidification des endosomes, ont été recouverts d'un polymère cationique, la polyéthylèneimine (PEI), puis par des plasmides d'ADN codant pour la luciférase, une enzyme conduisant à l'émission de lumière lors de la catalyse de son substrat la luciférine **[55]**. Il a été montré que les DWNTs fonctionnalisés rentraient par endocytose dans les cellules, puis que la chloroquine était libérée dans le milieu acide du lysosome (pH = 4,8) conduisant ainsi à la rupture de sa membrane et à la libération des DWNTs fonctionnalisés dans le cytoplasme. Le plasmide est alors capable de diffuser dans le cytoplasme, de rentrer dans le noyau où il est ensuite transcrit en ARNm puis traduit (dans le cytoplame) pour former la luciférase, témoin que la transfection a été un succès (**Figure 1.6**).

De la même manière, des siRNA, permettant d'empêcher l'expression de gènes cibles en conduisant à la destruction des ARNm correspondants, ont pu être délivrés par les NTCs **[56-57]**.

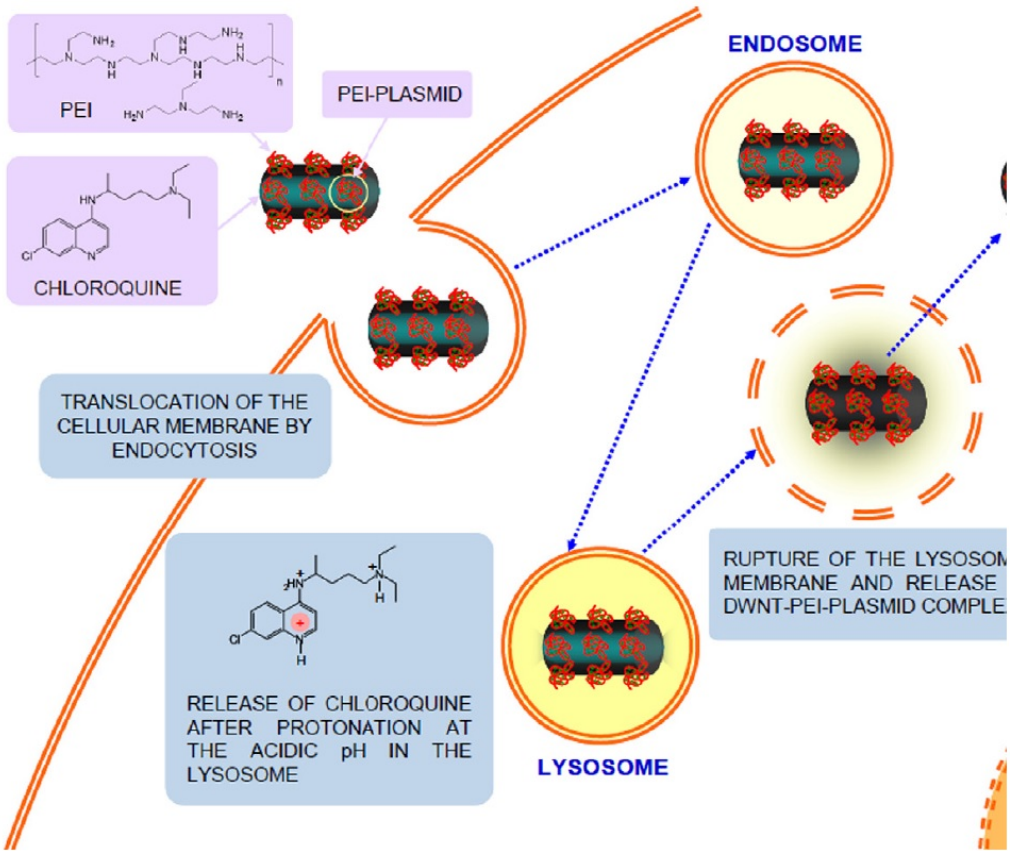



*Figure 1.6 : Schéma illustrant le mode d'action des DWNTs remplis de chloroquine et recouverts par un polymère cationique (PEI) et des plasmides codant pour la luciférase.* ***[55]***

Des médicaments peuvent également être vectorisés par le biais des NTCs, comme par exemple la doxorubicine qui est utilisée en chimiothérapie. L'un des problèmes avec les molécules anti-cancéreuses utilisées à ce jour est le manque de ciblage et donc des effets secondaires et indésirables sur les cellules saines de l'organisme. Il est donc devenu impératif de mettre au point des vecteurs, fonctionnalisés de sorte à éliminer uniquement les cellules cancéreuses. Des études ont été menées dans cette optique sur les NTCs. Des SWNTs ont été dans un premier temps fonctionnalisés par un polymère permettant une meilleure solubilité des NTCs en milieu aqueux, comme le polyéthylène glycol (PEG) **[58]** ou le chitosan **[59]**. Puis, une molécule de ciblage est greffée de façon covalente sur le polymère : par exemple, un peptide RGD, spécifique des intégrines qui sont des récepteurs cellulaires dont le rôle est connu dans la transformation des cancers localisés en cancers invasifs **[58]** ; ou de l'acide hyaluronique (polysaccharide), ligand des récepteurs cellulaires CD44 impliqués également dans la prolifération des cellules cancéreuses **[59]** ; ou encore

l'acide folique, précurseur des bases de l'ADN, nécessaire à la prolifération rapide des cellules cancéreuses **[60]**. Enfin, la molécule anti-cancéreuse est attachée aux NTCs fonctionnalisés. Pour la doxorubicine, la liaison est pH-dépendante et favorable au relargage de la molécule en milieu acide (endosome, lysosome).

Toutes ces applications biomédicales nécessitent par conséquent une fonctionnalisation des NTCs, à la fois pour le ciblage, la solubilité des NTCs en milieu aqueux et le greffage de molécules d'intérêt.

### A.III.5. Toxicité des nanotubes de carbone

L'une des préoccupations majeures liée à l'utilisation des NTCs concerne la toxicité de ces nanoparticules *in vivo*. Les risques potentiels sur l'environnement et la santé d'une production de NTCs à l'échelle industrielle n'ont pas encore été totalement déterminés, bien que de nombreux groupes de recherche s'attèlent toujours à répondre à ces questions **[47]**.

D'une part, les résidus catalytiques (nanoparticules métalliques) peuvent également s'avérer toxiques pour l'organisme. En effet, les résidus de fer peuvent entrainer la formation de radicaux libres ($OH^{\bullet}$) et ainsi endommager les protéines, les lipides et le matériel génétique contenus dans les cellules. Les résidus de cobalt également peuvent conduire à des défauts au niveau des chromosomes **[61]**.

D'autre part, la tendance des NTCs à s'agglomérer, du fait de leur composition et leur structure, dans les milieux aqueux, donc biologiques, pourrait rapidement devenir problématique, en rendant leur élimination difficile. La modification chimique des parois des NTCs (type et taux de fonctionnalisation) peut fortement influencer leur toxicité potentielle **[62]**, les parois étant ce qui est directement au contact avec le milieu. Ce sont elles qui vont conditionner l'intégration des NTCs dans les milieux biologiques et les interactions avec les cellules et les tissus. De manière générale, plus les NTCs ont un taux de fonctionnalisation élevé, plus ils sont dispersés et individualisés en solution et plus ils sont éliminés facilement à travers les reins **[63]**. A contrario, les NTCs non ou peu fonctionnalisés ont tendance à former des agrégats qui s'accumulent alors dans les organes (foie, rate, poumons) **[47]**.

En outre, il a également été montré que le diamètre et la longueur des NTCs avaient une influence sur leur toxicité. En effet, plus les NTCs sont longs et plus les réponses inflammatoires sont importantes **[47]**. Pour ce qui est du diamètre, les SWNTs provoquent plus d'effets toxiques que les DWNTs **[62]** et les MWNTs **[64]**.

La fonctionnalisation des NTCs joue par conséquent un rôle crucial sur la toxicité des NTCs : d'une part, elle est essentielle afin d'éliminer au mieux toutes les nanoparticules métalliques résiduelles pouvant entrainer une perte de l'intégrité de l'information génétique, et d'autre part, elle permet d'individualiser et de raccourcir les NTCs permettant ainsi de les éliminer plus facilement.

# B. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone

## B.I. Purification des nanotubes de carbone

### B.I.1. Purification par la voie humide

Les NTCs ne sont jamais synthétisés à l'état pur et les premières études sur leur purification ont commencé très rapidement après les premiers rapports parus sur leur synthèse. Les principales impuretés peuvent être classées en deux catégories : des produits secondaires du carbone (suie, carbone désorganisé, dépôts amorphes, fragments graphitiques – en fonction de la méthode de synthèse employée), et des résidus catalytiques. La plupart des techniques de purification implique des traitements par oxydation en solution. Les traitements adoptés par la plus grande partie des chercheurs sont le plus couramment à base de $HNO_3$ seul, ou en mélange concentré avec $H_2SO_4$ selon un rapport volumétrique $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3).

Les traitements utilisant des solutions de $HNO_3$ sur des SWNTs éliminent les nanoparticules métalliques provenant du catalyseur **[65-66]**. Haddon **[67]** a rapporté une évaluation sur l'utilisation de $HNO_3$ en tant que méthode de purifications sur les SWNTs : en augmentant la concentration en $HNO_3$ à 16M et le temps de réaction à 12h, la quantité de métal avait diminué de 28,1 à 0,2 %m, aux dépens du rendement qui était alors de 14%. Les

mélanges en acides concentrés $HNO_3/H_2SO_4$ (1:3) ont montré leur efficacité pour éliminer les impuretés de carbone désorganisé et les particules métalliques du catalyseur sur des échantillons de MWNTs **[68]**. De nombreuses études ont été réalisée afin de purifier les NTCs, et ce en utilisant une variété de solutions oxydantes différentes, à savoir : des solutions de $KMnO_4/H_2SO_4$ **[69-71]**, de $K_2Cr_2O_7/H_2SO_4$ **[72]**, de $H_2O_2$ **[73]** et de solution piranha ($H_2O_2/H_2SO_4$) **[74]**.

En outre, il a été montré par plusieurs groupes de recherche que de petits fragments aromatiques oxydés polycycliques, aussi connu sous le nom de fragments carbonés carboxylés ou CCFs (Carboxylated Carbon(aceous) Fragments), sont produits au cours des traitements d'oxydation et recouvrent les parois des NTCs **[75-76]**. Une autre conséquence liée à ces traitements est le greffage de groupements fonctionnels oxygénés sur les parois des NTCs (modification de la structure) : il s'agit principalement de groupements carboxyliques **[77-79]**, hydroxyles **[80]** ou même sulfoniques ($SO_3H$) sur des SWNTs oxydés par un mélange $HNO_3/H_2SO_4$ **[81]**. Ces fonctions ont été caractérisées par spectroscopie FT-IR **[75,79,81,82]** ou par XPS **[78,83]**. Les techniques de MET et de MEB peuvent également être utilisées afin de visualiser les changements structuraux après les traitements oxydants, cependant, une estimation quantitative de la fonctionnalisation n'est possible que par le biais de l'analyse thermogravimétrique (ATG) **[79, 81]**, du dosage potentiométrique **[84]** ou du dosage acido-basique **[85-86]**. Etant donné que ces groupements fonctionnels sont localisés à la fois sur les extrémités des NTCs (au niveau des structures pentagonales), au niveau des défauts des parois mais également sur les CCFs **[75-78]**, il est important de prendre en compte cette information lorsque le traitement oxydant n'est qu'une étape préliminaire à la fonctionnalisation des NTCs. En effet, le nombre de groupements fonctionnels –COOH uniquement greffés sur les parois des NTCs doit être bien inférieur à ce qui peut être attendu.

Une élimination efficace des CCFs par des lavages à la soude (NaOH) a été proposée sur des SWNTs et des MWNTs oxydés **[75, 87-90]**, la déprotonation des groupements fonctionnels greffés sur les CCFs rendant alors ces impuretés plus solubles en solution

aqueuse. La question de savoir où se situe exactement la fonctionnalisation après l'étape de purification par oxydation (sur les parois des NTCs ? sur les CCFs ? sur les deux ?) est très pertinente. Green et ses collègues ont montré par spectroscopie IR que le filtrat, récupéré après le lavage à la soude de SWNTs oxydés, contenait des groupements carboxylates $–COO^-$ **[75]**. Cependant, Haddon et ses collègues **[79]** ont montré de leur côté que des échantillons oxydés par $HNO_3$ puis lavés abondamment par une solution basique contenaient suffisamment de groupements carboxyliques pour préparer des échantillons de haute qualité de NTCs fonctionnalisés de façon covalente.

### B.I.2. Purification par la voie sèche

D'autres techniques de purification des NTCs ont été explorées, mais en travaillant sur des échantillons secs et non des suspensions. Green et ses collègues **[91]** ont proposé une méthode permettant d'ouvrir les extrémités de SWNTs à l'aide de NaOH et KOH : les SWNTs étaient broyés et mélangés avec du NaOH ou du KOH, puis le tout était versé dans une ampoule qui ensuite était scellée sous vide. Le mélange était alors chauffé entre 300 et 508°C, en fonction du point de fusion de l'hydroxyde sélectionné. Ils obtenaient alors des SWNTs ouverts qu'ils pouvaient alors remplir avec des sels métalliques. Les mêmes expériences ont été réalisées sur les DWNTs **[92]**, permettant d'obtenir des DWNTs avec des parois propres, et des extrémités qui semblaient ouvertes mais recouvertes de carbone amorphe. L'ouverture des NTCs peut être expliquée par la réaction se produisant entre les carbones les plus réactifs, situés aux extrémités des NTCs, et les molécules d'eau présentes à l'état de traces dans les sels d'hydroxyde fondus : $H_2O + C = CO + H_2$, l'équilibre $2\ NaOH = Na_2O + H_2O$ étant la principale source de molécules d'eau.

Les NTCs peuvent également être purifiés via un traitement thermique sous air. Les molécules oxydantes présentes dans l'air ($O_2$) vont attaquer plus facilement sous l'effet de la chaleur les sites portant les carbones les plus réactifs (C $sp^3$) situés au niveau du carbone désorganisé, des extrémités des NTCs, mais également au niveau des défauts des parois. La purification démarre à 370°C devient de plus en plus efficace en augmentant la température

**[93]**. Cette méthode de purification permet d'éliminer tout le carbone désorganisé présent dans les NTCs bruts, ainsi que les métaux lorsqu'elle est suivie d'un lavage à l'HCl. Cependant, les rendements sont très faibles étant donné que tous les NTCs comportant des défauts sont également dégradés.

## B.II. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone

On distingue de grandes voies de fonctionnalisation des NTCs permettant de fixer des molécules d'intérêt : les fonctionnalisations covalente et non-covalente. D'un côté, la fonctionnalisation covalente permet de greffer des molécules aux parois externes et aux extrémités des NTCs via la création de liaisons fortes (covalentes). La formation de ces liaisons a pour conséquence une modification de la structure des NTC et donc de leurs propriétés intrinsèques. D'un autre côté, il existe la fonctionnalisation non-covalente qui elle est basée sur des interactions faibles ($\pi$-$\pi$ stacking, interactions hydrophobes, ioniques, etc…) qui n'ont aucun impact sur la structure et le réseau électronique des NTCs **[94]**. Nous verrons dans un premier temps quelles sont les différentes réactions possibles conduisant à une fonctionnalisation covalente des NTCs, puis dans un deuxième temps quelles molécules peuvent être fixées par des interactions faibles à la surface des NTCs. Enfin, le remplissage des NTCs par différents types de composés sera abordé, ainsi que la « décoration » des NTCs par des nanoparticules.

### B.II.1. Fonctionnalisation covalente

#### *B.II.1.a. Estérification-Amidation*

La fonctionnalisation par estérification ou amidation nécessite que les NTCs comportent des fonctions carboxyliques à leur surface, donc qu'ils aient été oxydés au préalable. Les réactions directes entre des acides carboxyliques et des alcools/amines pour former des esters/amides sont difficiles et réversibles, d'où des rendements faibles. En revanche, lorsque les fonctions carboxyliques sont activées en fonctions chlorures d'acyle, les réactions sont rapides et irréversibles. Pour cette raison, les fonctions carboxyliques

présentes sur les NTCs oxydés sont converties en chlorure d'acyles dans une première étape par du chlorure de thionyle ou du chlorure d'oxalyle, puis est ajouté l'alcool ou l'amine à greffer. De nombreuses molécules organiques, biomolécules et polymères ont été greffés selon ce procédé.

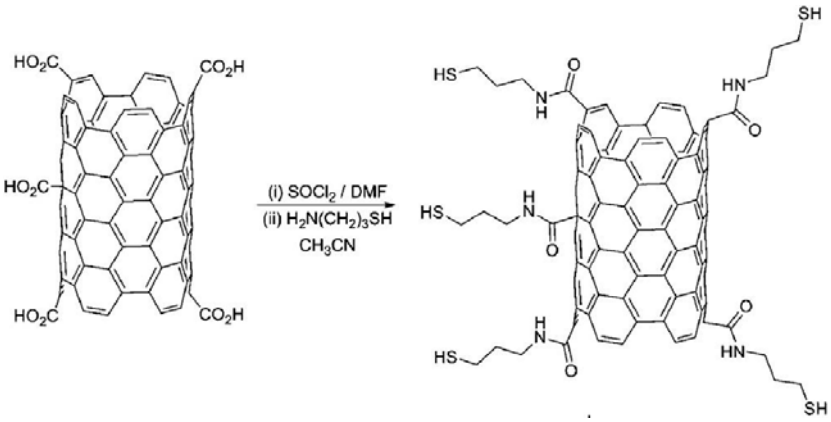



*Figure 1.7 : Exemple de fonctionnalisation des SWNTs par amidation.* ***[95]***

Tao *et al.* **[96]** ont fonctionnalisé des MWNTs par une molécule dendritique poly(amidoamine) (PANAM), ce qui a ensuite permis la déposition de nanoparticules d'argent, visualisables par MET. Plus tard, des structures en forme de V ont été réalisées par estérification des extrémités de SWNTs portant des groupements carboxyliques et des SWNTs avec des groupements hydroxyles **[97]**. Les angles observés par MET faisaient environ 119°, soit l'angle obtenu au niveau de la liaison de molécule classique d'ester.

Gul *et al.* **[98]** ont pu de cette façon fonctionnaliser des NTCs par une diamine, la 2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)éthanamine, afin d'y greffer par la suite un fluorophore, via l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), et suivre les NTCs fonctionnalisés *in vitro*. Singh *et al.* **[99]**, quant à eux, ont greffé différentes polyamines (putrescine, spermidine, spermine) par amidation sur des SWNTs et MWNTs dans le but d'y fixer par la suite des siRNA. Dans le même but, Battigelli *et al.* **[57]** ont greffé des dendrimères chargés positivement sur des MWNTs. Delgado *et al.* **[100]** ont réussi à greffer des fullerènes comportant des fonctions amines aux extrémités de SWNTs oxydés.

Des molécules biologiques peuvent également être greffées de façon covalente aux NTCs par amidation à température ambiante, en utilisation le couplage par un carbodiimide tel que le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou le 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). Les NTCs oxydés sont activés généralement par le 1-hydroxy benzotriazole (HOBt), puis couplés à l'amine en présence du DCC ou EDC. Des MWNTs ont ainsi été couplés à des protéines provenant d'un lysat de tumeur afin de tester le potentiel des NTCs comme traitement contre le cancer **[101]**. Ces MWNTs fonctionnalisés ont eu pour effet d'amplifier la réponse immunitaire contre les cellules cancéreuses chez la souris. La fixation sur les NTCs d'anticorps spécifiques de récepteurs membranaires surexprimés au niveau des cellules cancéreuses a permis la détection et l'ablation de ces cellules **[102-103]**. Des enzymes **[104]** ou des molécules d'ADN **[105]** ont également été fixés par amidation sur des NTCs pour créer des biocapteurs.

#### *B.II.1.b. Halogénation*

Les NTCs ont pu être fluorés afin d'augmenter la réactivité de leurs parois et permettre ainsi la fixation d'amines **[106]**, ou d'alkyls via des organolithiums par exemple. Des SWNTs fluorés ont été obtenus par Margrave *et al.* par exposition des SWNTs à un flux de $F_2$ entre 150°C et 325°C **[107]** mais également par Liu *et al.* par sonication des SWNTs dans de l'acide peroxytrifluoroacétique (PTFAA) **[108]**. Les DWNTs ont eux aussi été fluorés selon différentes méthodes : par un flux de $F_2$ à 200°C **[109]** ; par du $BrF_3$ gazeux (formé à partir d'un mélange liquide de $BrF_3$ et $Br_2$) à température ambiante **[109-110]** ; et par un plasma de $CF_4$ **[109]**. Ces DWNTs peuvent par la suite être défluorés entre 150°C et 396°C selon la méthode de fluoration utilisée. En partant, les atomes de fluor emportent avec eux des atomes de carbone provenant de la paroi externe des DWNTs, créant ainsi des défauts dans la structure des DWNTs.

### *B.II.1.c. Cycloaddition*

La cycloaddition la plus couramment utilisée afin de fonctionnaliser les NTCs est la cycloaddition 1,3-dipolaire d'ylures d'azomethines. Elle permet la création de cycles pyrrolidines sur les parois des NTCs. Les ylures d'azométhine sont générés in situ par réaction d'un aldéhyde avec un acide $\alpha$ aminé, accompagnée d'une décarboxylation **[111]**. Des MWNTs ont été fonctionnalisés par cyclo-addition 1,3-dipolaire par une chaine diamino triéthylène glycol protégée par un groupement Boc (tert-butyloxycarbonyl) (**Figure 1.8**) par Bianco *et al.* **[112]**. Les NTCs fonctionnalisés obtenus étaient plus solubles en milieu aqueux. Le groupement Boc a ensuite été déprotégé pour permettre la fixation d'un peptide impliqué dans l'adhésion cellulaire.

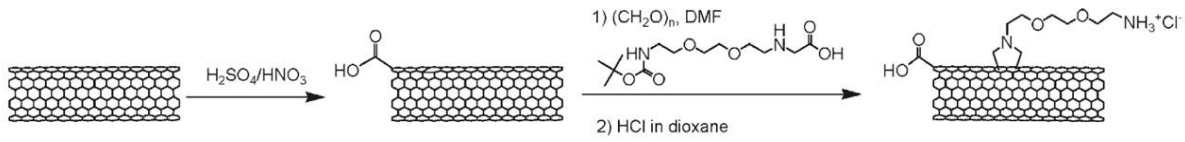



*Figure 1.8 : Fonctionnalisation de NTCs par une chaine diamino triéthylène glycol par cycloaddition 1,3-dipolaire. **[112]***

La même équipe a également réussi, par cette réaction, à greffer des molécules anti-cancéreuse comme le méthotrexate **[113]** et antifongique telle que l'amphotéricine B **[114]**.

Il existe d'autres types de cycloadditions qui ont été réalisées sur les NTCs, tels que la cycloaddition de Diels-Alder **[115]**, ou l'addition de carbènes **[116]** et de nitrènes **[117-118]**.

### *B.II.1.d. Addition radicalaire*

La fonctionnalisation des NTCs par des sels d'aryldiazonium, conduisant au greffage covalent de dérivés d'aryle sur les parois des NTCs, est une des méthodes les plus utilisées du fait de sa simplicité et son efficacité. En présence des NTCs, les sels de diazonium sont instables et se transforment en espèces très réactives, probablement des intermédiaires radicalaires. Tour *et al.* **[119]** sont les premiers à avoir décrit une fonctionnalisation de NTCs

par formation de sels d'aryldiazonium *in situ*, permettant d'obtenir des NTCs très faciles à disperser dans des solvants organiques et dans l'eau (**Figure 1.9**). Plus tard, la même équipe a amélioré le protocole de synthèse en utilisant des conditions plus douces : les SWNTs sont mélangés à température ambiante pendant 15 min dans un mortier avec les sels d'aryldiazonium, des liquides ioniques et du carbonate de potassium ($K_2CO_3$) **[120]**. Ménard-Moyon *et al*. ont développé une triple fonctionnalisation des SWNTs et des MWNTs utilisant la génération des sels d'aryldiazonium *in situ* **[121]**. Cette triple fonctionnalisation permet, en déprotégeant sélectivement les fonctions amines, de greffer par la suite trois molécules d'intérêt différentes (**Figure 1.10**), à savoir, une pour le ciblage des cellules particulières (anticorps par exemple), la deuxième pour le traitement de la maladie ciblée (médicament) et la troisième pour le marquage des NTCs (imagerie).

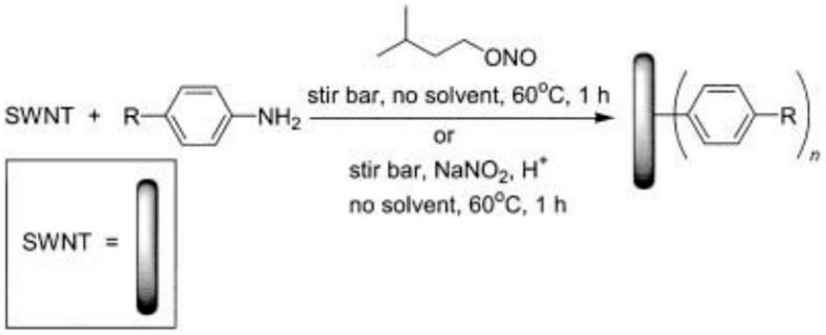



*Figure 1.9 : Fonctionnalisation de NTCs par des sels d'aryldiazonium. R correspond à des groupements Cl, Br, $NO_2$, $CO_2CH_3$, alkyl, OH, alkylhydroxy, etc…* ***[119]***

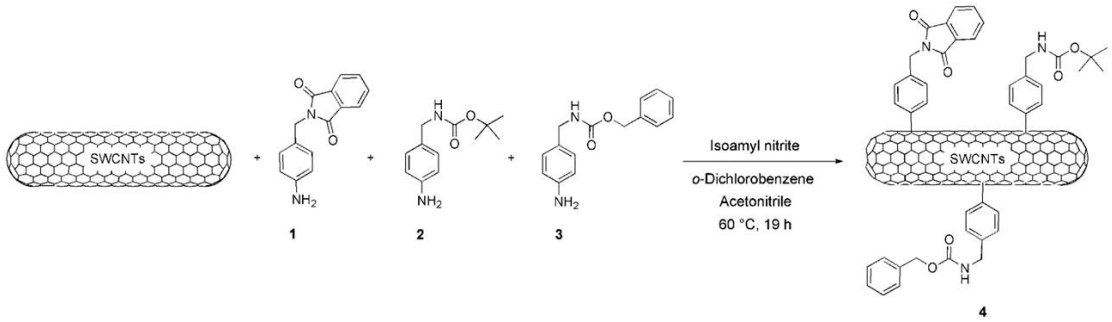



*Figure 1.10 : Fonctionnalisation simultanée de NTCs par trois différents sels d'aryldiazonium.* ***[121]***

### *B.II.1.e. Addition nucléophile*

Hirsch *et al.* **[122]** ont utilisé l'addition nucléophile de composés organométalliques (organolithien ou organomagnésien) sur les parois de SWNTs permettant ainsi de créer des intermédiaires chargés négativement capables de se séparer les uns des autres. Après une réoxydation à l'air, les SWNTs obtenus fonctionnalisés par un grand nombre de fonctions alkyls sont neutres et individualisés (**Figure 1.11**). Ils ont également montré que les additions nucléophiles se produisaient préférentiellement sur les SWNTs de plus petits diamètres : en effet, plus le diamètre des NTCs est faible et plus l'énergie de tension des liaisons C–C des carbones $sp^2$ est élevée et donc plus les carbones sont réactifs **[123]**.

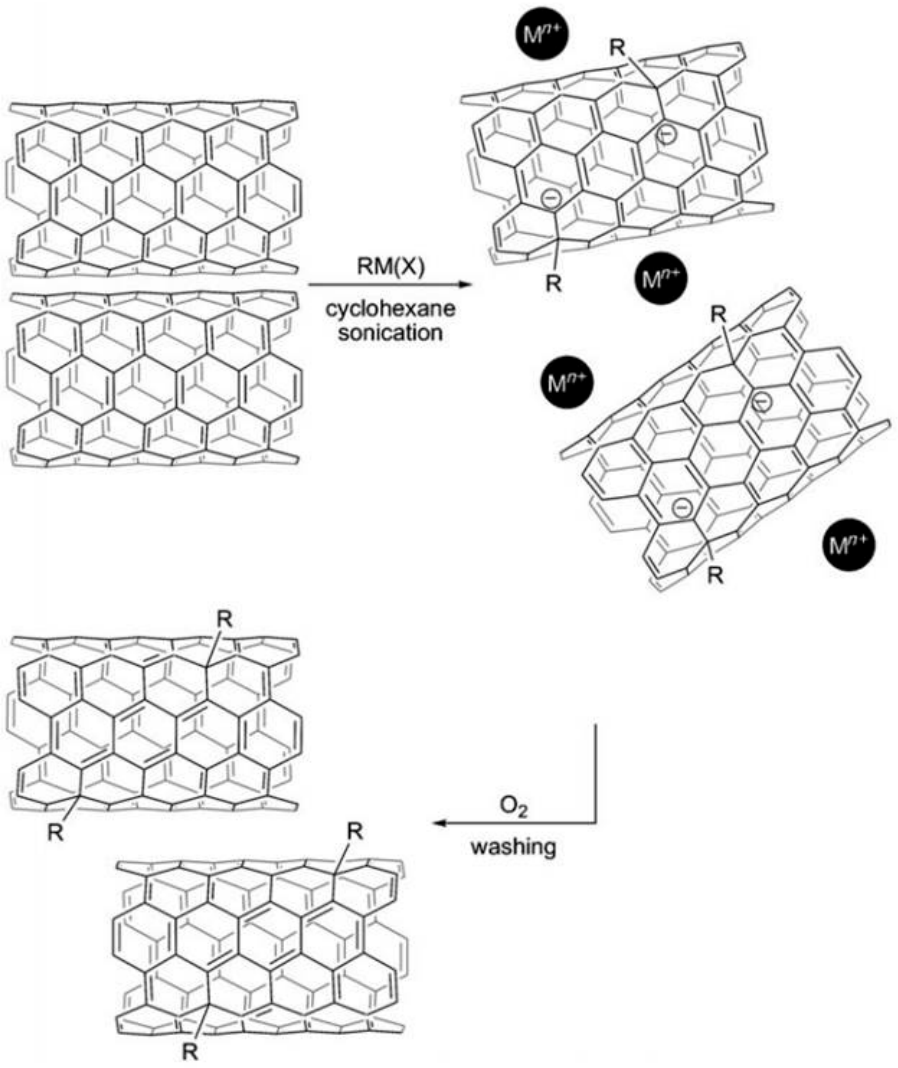



*Figure 1.11 : Alkylation de SWNTs par addition nucléophile de composé organométallique RM(X), suivie d'une réoxydation. R = nBu, tBu, Et ou nHex ; M = Li ou Mg ; X = Cl (pour M = Mg).* ***[123]***

### B.II.2. Fonctionnalisation non-covalente

La deuxième voie de fonctionnalisation consiste à fixer des molécules de façon non-covalente sur les NTCs, donc par le biais d'interactions faibles. Différents types de molécules peuvent être greffées sur les NTCs en fonction de la nature de ces molécules, des interactions mises en jeu et de l'objectif lié à cette fonctionnalisation.

#### *B.II.2.a. Interactions avec des tensio-actifs et des polymères*

L'un des enjeux majeurs, conditionnant l'utilisation des NTCs dans de multiples applications, est l'obtention de suspensions homogènes et stables de NTCs dans des solvants organiques ou aqueux. C'est pourquoi de nombreuses études ont été menées sur les interactions non-covalentes entre les NTCs et différents tensio-actifs. Les tensio-actifs sont des molécules amphiphiles, c'est-à-dire que leur partie hydrophile va interagir avec le solvant, alors que leur partie hydrophobe va s'adsorber sur la paroi des NTCs, permettant ainsi la solubilisation des NTCs et empêchant leur ré-agglomération en faisceaux. Ces tensio-actifs peuvent être chargés comme le dodécyl sulfate de sodium (SDS), le bromure de cetyltrimethyl ammonium (CTAB), ou bien neutres comme le Triton.

Des suspensions stables de NTCs ont ainsi été obtenues avec le SDS **[124-127]**, permettant notamment une séparation des NTCs métalliques des semi-conducteurs par ultracentrifugation. Les NTCs ont été dispersés également à l'aide de cholate de sodium (SC) **[127-129]**, de désoxycholate de sodium (DOC) **[127,130]**, ou encore de SDBS **[131]**. D'autres types de tensio-actifs ont été utilisés plus récemment, ceux-ci comportant une partie hydrophile dendritique, améliorant ainsi la solubilité des NTCs **[132-133]**.

Cependant, bien que ces tensio-actifs puissent être efficaces pour disperser les NTCs, certains sont connus pour détériorer les membranes plasmiques des cellules et ne peuvent donc pas être utilisés dans le cadre d'applications biomédicales.

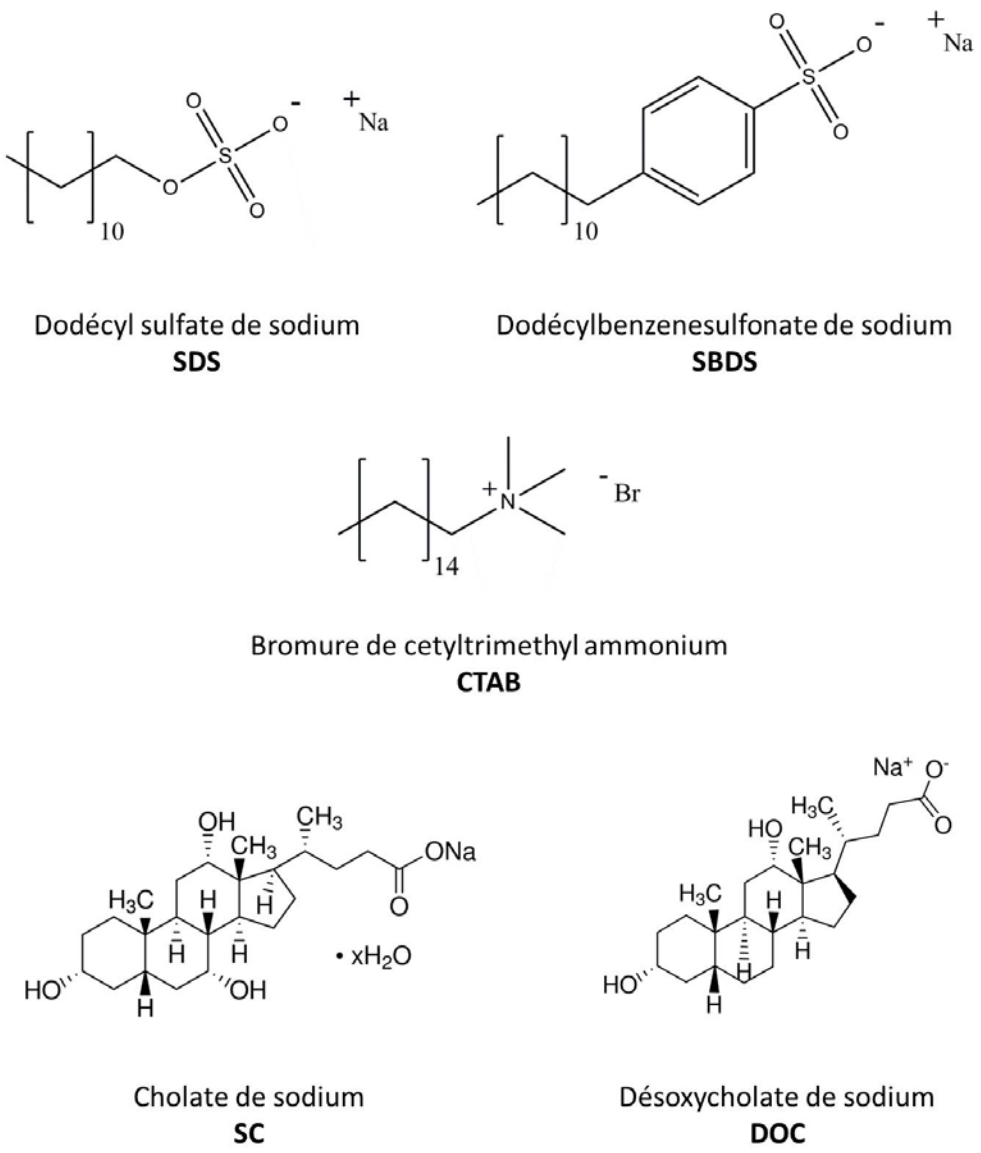



*Figure 1.12 : Structures moléculaires de plusieurs tensio-actifs utilisés pour la dispersion des NTCs.*

Les NTCs ont également été incorporés dans de nombreuses matrices à base de polymères afin d'améliorer les propriétés mécaniques, électriques ou thermiques de celles-ci. Il faut que le squelette du polymère permette son enroulement autour des NTCs, qu'il comporte des conjugaisons de type $\pi$ afin de favoriser les interactions de type $\pi$-$\pi$ stacking avec les parois des NTCs, ainsi que des groupements fonctionnels pour stabiliser les dispersions de NTCs. Cela a été étudié et vérifié pour des composites à base de NTCs et de polystyrène (PS) **[134]**, polypropylène (PP) **[135]**, epoxy **[136]**, alcool polyvinylique (PVA) **[137]**, polyéthylène à haute densité (HDPE) **[138]**.

Dans le cadre d'applications biomédicales, les NTCs ont pu être fonctionnalisés par du polyéthylène glycol (PEG) ou ses dérivés, ce qui a pour effet de prolonger le temps de circulation des NTCs *in vivo* **[139]**.

#### *B.II.2.b. Composés aromatiques polycycliques*

Les composés aromatiques comportant une fonction hydrophile ou hydrophobe peuvent aider à disperser les NTCs respectivement en solution aqueuse ou dans un solvant organique. L'une de ces molécules les plus couramment utilisées pour solubiliser les NTCs est le pyrène et ses dérivés. En effet, cette molécule est capable de s'adsorber sur les parois des NTCs par le biais de $\pi$-stacking. Il a été montré que plus le degré de graphitisation et le diamètre des NTCs étaient élevés et plus l'adsorption du pyrène était facile **[140]**.

Baek *et al.* **[41]** ont utilisé des dérivés de pyrène, comportant des groupements acide carboxylique, aldéhyde et amine, comme intermédiaires afin de fixer des molécules d'ADN sur des SWNTs et ainsi réaliser des biodétecteurs (**Figure 1.13**). Parra *et al.* **[141]**, quant à eux, ont adsorbé sur des MWNTs des molécules de pyrène, elles-mêmes fonctionnalisées par un éther couronne dans le but de détecter les ions potassium. Salice *et al.* **[142]** ont pu fixer des nanoparticules d'or sur des SWNTs via des molécules de pyrène comportant une longue chaine carbonée portant une fonction thiol (−SH).

Les molécules fluorescentes constituent également de bons candidats pour la fonctionnalisation non-covalente des NTCs, étant la plupart du temps des composés fortement conjugués. L'un des fluorophores le plus souvent utilisé est l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), composé peu coûteux dont le coefficient d'extinction molaire est assez élevé ($\approx 65000\ L.mol^{-1}.cm^{-1}$). Des SWNTs oxydés ont ainsi été fonctionnalisés par des molécules de FITC par simple adsorption **[143-144]**, non dans le but d'améliorer la solubilité des NTCs mais de les marquer pour pouvoir les suivre par la suite *in vivo*.

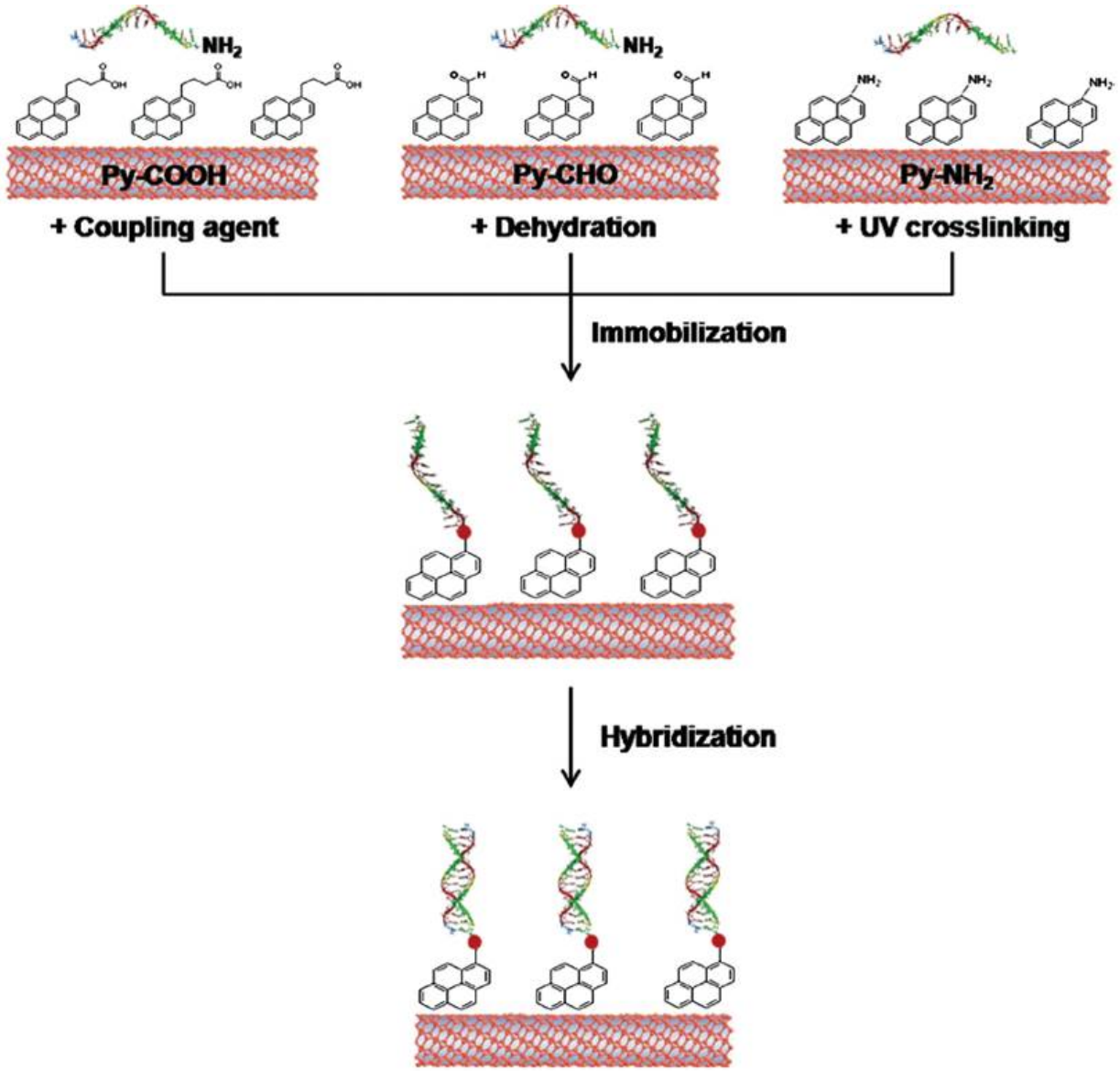



*Figure 1.13 : Illustration de l'utilisation de dérivés de pyrène adsorbés sur des SWNTs afin d'y fixer des molécules d'ADN.* ***[41]***

Cependant, des études comparatives ont également été menées sur la capacité de certains fluorophores et colorants à disperser des SWNTs **[145]**. Il est apparu que le FITC était le fluorophore qui permettait le mieux la dispersion des SWNTs, comparé à l'isothiocyanate de rhodamine B (RITC), le sel de sodium de fluorescéine (FSS) ou la fluorescéine (**Figure 1.14**), ce qui signifie que la capacité à disperser est directement reliée au squelette des molécules et à leurs groupements hydrophiles.

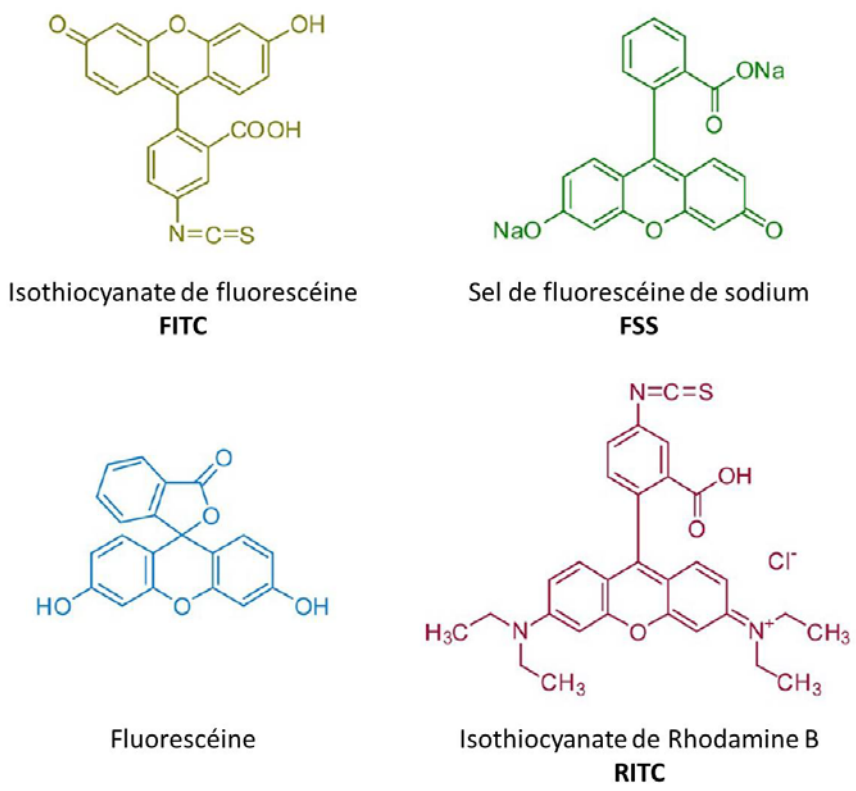



*Figure 1.14 : Structures moléculaires de fluorophores utilisés pour la dispersion de SWNTs.* ***[145]***

Des médicaments peuvent aussi être adsorbés sur les NTCs, tels que la doxorubicine. Dai *et al.* **[58]** ont travaillé sur des SWNTs fonctionnalisés (PL-SWNT-DOX) de façon non-covalente par un phospholipide-PEG (PL-PEG) pour favoriser la dispersion des SWNTs en milieu aqueux et par la doxorubicine comme médicament anti-cancéreux à délivrer aux cellules cibles (**Figure 1.15**). L'administration des PL-SWNTs-DOX à des souris portant un lymphome xénogreffé a montré que les PL-SWNTs-DOX s'accumulaient davantage au niveau de la tumeur que les molécules de DOX seules. De plus, la taille de la tumeur diminuait significativement, et ce, avec des effets secondaires moindres par rapport aux contrôles réalisés avec les molécules de DOX seules ou avec le DOXIL (liposome à base de PEG encapsulant la DOX) **[146]**.

D'autres médicaments contre le cancer ont pu être adsorbés sur les parois de NTCs par π-π stacking et leurs efficacités ont ainsi été augmentées grâce à la capacité des NTCs à entrer dans les cellules. Cela a été démontré pour la camptothécine **[147]** et le Paclitaxel (PTX) **[148]**.

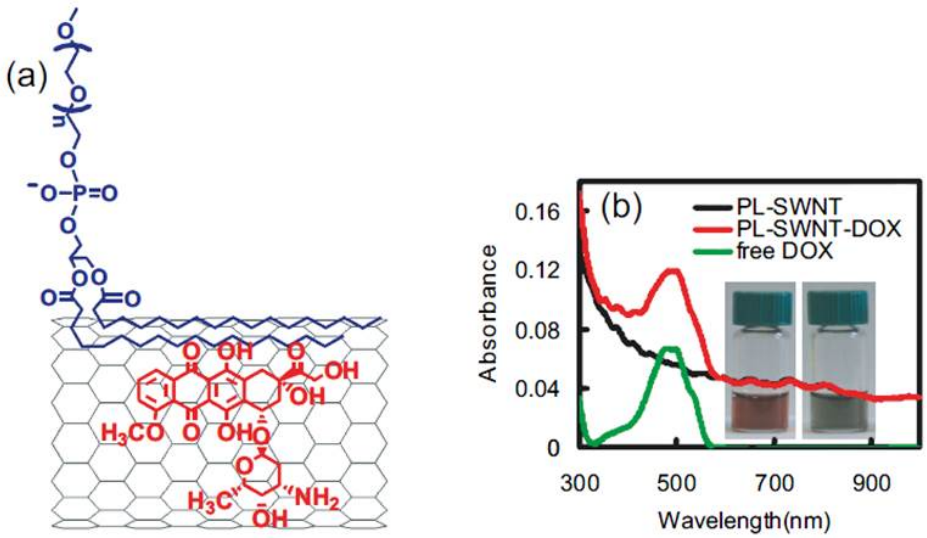



*Figure 1.15 : (a) Représentation de l'assemblage supramoléculaire des SWNTs fonctionnalisés de façon non-covalente par le PL-PEG et la doxorubicine (DOX) ; (b) Spectres d'absorbance UV-Vis-IR de solutions de DOX seule (vert), de PL-SWNT (noir) et de PL-SWNT-DOX (rouge).* ***[58,146]***

### *B.II.2.c. Interactions avec des biomolécules*

Afin d'utiliser les NTCs dans le cadre d'applications biologiques, les interactions des NTCs vis-à-vis de différentes sortes de biomolécules, telles que les protéines, les acides nucléiques, les glucides, et les lipides, ont été étudiées depuis plusieurs années.

Les protéines peuvent être utilisées pour disperser les NTCs en milieu aqueux. Cela a été montré pour des MWNTs oxydés sur lesquels a été adsorbée de l'albumine de sérum humain (HSA) marquée par du FITC, afin de cibler des cellules cancéreuses au niveau du foie (HepG2) **[149]**. L'internalisation de ces MWNTs-HSA par les cellules HepG2 a permis de détruire ces cellules avec une grande sélectivité par ablation thermique. Des biodétecteurs de glucose ont pu être réalisés par l'immobilisation sur les NTCs d'enzymes, la glucose oxydase (GO) **[150-151]** et la peroxydase de raifort (HRP) **[150]**, par l'intermédiaire d'un polymère adsorbé.

Les NTCs ont également été fonctionnalisés par des acides nucléiques. Alors que les bases azotées de l'ADN interagissent directement avec les parois des NTCs, le squelette osidique phosphaté, plus hydrophile, est quant à lui orienté vers le solvant. L'ADN double-

brin (dsDNA : double-stranded DNA) est plus rigide et s'enroule moins bien autour des NTCs que l'ADN simple brin (ssDNA : single-stranded DNA), et c'est pourquoi ce dernier est davantage utilisé pour disperser les NTCs **[152-153]**. Cependant, il existe des exemples de SWNTs fonctionnalisés par de l'ADN double-brin, permettant une meilleure dispersion des SWNTs dans les fluides biologiques et une utilisation prometteuse des NTCs-ADN comme source de chaleur photo-induite **[154]**.

Les polysaccharides ont beaucoup intéressé les chercheurs soit pour créer des dispersions de NTCs stables en milieu aqueux, soit pour réaliser des composites avec les NTCs pour des applications biologiques du fait de l'augmentation de la biocompatibilité que pourrait engendrer l'ajout de ces polymères osidiques. Neimark *et al.* **[155]** ont travaillé sur des SWNTs fonctionnalisés de façon non-covalente par de l'agarose pour former un support pour la croissance de neurones. Dans le cadre d'une étude sur l'ingénierie tissulaire osseuse, la dispersion de NTCs dans du poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) a permis d'obtenir une surface rugueuse, favorisant l'adhérence des cellules et la prolifération d'ostéoblastes **[156]**. Des suspensions stables de MWNTs ont également été obtenues en utilisant de la carboxyméthylcellulose (CMC), dérivé éthérifié de la cellulose, et de la gomme arabique (GA) d'origine naturelle **[157]**.

L'adsorption de biomolécules sur les NTCs nous amène à discuter de l'effet « corona ». En effet, en milieu biologique, les protéines présentes dans le milieu ambiant ont plus ou moins d'affinité avec la surface des NTCs, et peuvent interagir avec les NTCs par le biais d'interactions hydrophobes, électrostatiques, de $\pi$-stacking ou même de liaison covalente entre les fonctions carboxyliques des NTCs oxydés et les fonctions amines des protéines **[158]**. Par conséquent, ces protéines peuvent camoufler des fonctions présentes sur la surface des NTCs, et ainsi modifier leur distribution et leur interaction avec les cellules **[159]**.

### B.II.3. Remplissage

En plus de voir leurs parois fonctionnalisées de façon covalente ou non-covalente, les NTCs peuvent également être remplis par des composés de natures différentes. Khlobystov *et al.* **[160]** ont réussi à remplir des SWNTs de fullerènes $C_{60}$. Des médicaments ont également été introduits à l'intérieur des NTCs tels que le carboplatine **[161]**, le cisplatine **[162]**, l'oxaliplatine **[163]**, l'hexaméthylmélamine **[164]**, qui sont toutes des molécules anti-cancéreuses. Ces NTCs remplis de composés anti-cancéreux ont montré leur efficacité sur les cellules cancéreuses, grâce à l'internalisation des NTCs et un relargage lent des molécules actives.

D'autre part, les NTCs ont pu être remplis par des sels métalliques, ce qui généralement est réalisé par un procédé en phase fondue. Des DWNTs ont ainsi été remplis par de nanoparticules d'oxyde de fer **[165]**, de sélénium (Se), de tellure (Te), de tellurure de mercure (HgTe) ou encore de iodure de plomb ($PbI_2$) **[166]**. Le remplissage de DWNTs par du nitrate d'uranyle a notamment permis de montrer que les DWNTs avaient bien été ouverts suite à différentes oxydations **[167]**. Des MWNTs remplis de fer ont montré qu'ils pouvaient être utilisés, d'une part, comme vecteurs de médicaments en se regroupant sur une zone précise grâce à un aimant **[168]**, et d'autre part, comme traitement du cancer, ces MWNTs permettant ainsi l'utilisation de la technique d'hyperthermie magnétique **[169]**.

## C. Détection *in vitro* et *in vivo* des nanotubes de carbone

Les NTCs fonctionnalisés peuvent être internalisés par les cellules sans être toxiques pour celles-ci **[170]**. Deux voies de pénétration ont été considérées pour les NTCs en fonction de leur taux de fonctionnalisation et de leur taille : soit par endocytose **[170-171]**, soit par diffusion passive, c'est-à-dire que les NTCs sont assimilés à des aiguilles capable de passer à travers la membrane cellulaire **[172]**. En outre, Jin *et al.* **[173]** ont montré que des SWNTs, ayant pénétré par endocytose dans les cellules, pouvaient en ressortir par exocytose.

La première technique la plus utilisée pour visualiser l'internalisation des NTCs consiste à fixer une molécule fluorescente, comme le FITC, sur les NTCs via une liaison covalente ou non-covalente. La fluorescence émise est alors directement visualisable par microscopie de fluorescence à champs large ou confocale (**Figure 1.16**) **[143,170,174]**.

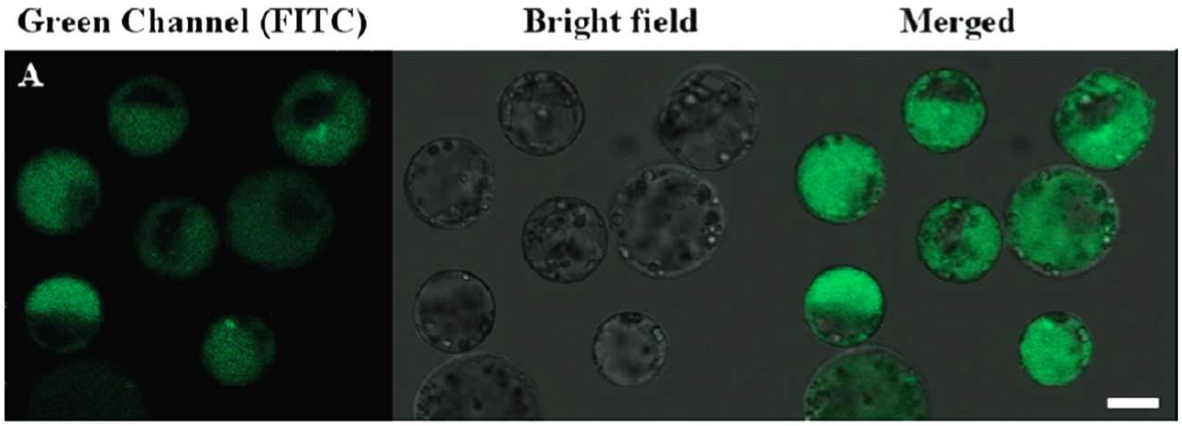



*Figure 1.16 : Images de microscopie confocale de fluorescence de protoplastes incubés avec des MWNTs fonctionnalisés de façon covalente par le FITC.* ***[174]***

Cependant, lorsque cette méthode est choisie, plusieurs points importants sont à considérer : les liaisons chimiques entre les NTCs et les molécules fluorescentes doivent résister aux coupures enzymatiques éventuelles (milieu intracellulaire) ; les interactions d'adsorption entre les fluorophores et les parois des NTCs doivent être suffisamment fortes pour éviter un relargage des molécules fluorescentes *in vitro* ou *in vivo* ; le fluorophore doit être détectable même s'il existe une auto-fluorescence provenant des cellules ; la fonctionnalisation réalisée sur les NTCs pour fixer ces molécules fluorescentes a très probablement modifié le comportement des NTCs dans le milieu biologique. De ce fait, des techniques permettant de détecter un signal propre aux NTCs est devenu impératif.

Weisman *et al.* **[175]** ont montré qu'il était possible de visualiser les SWNTs par microscopie de fluorescence infrarouge, sans que ceux-ci aient été fonctionnalisés par des molécules fluorescentes. En effet, cette technique est basée sur la fluorescence intrinsèque dans le proche IR des SWNTs.

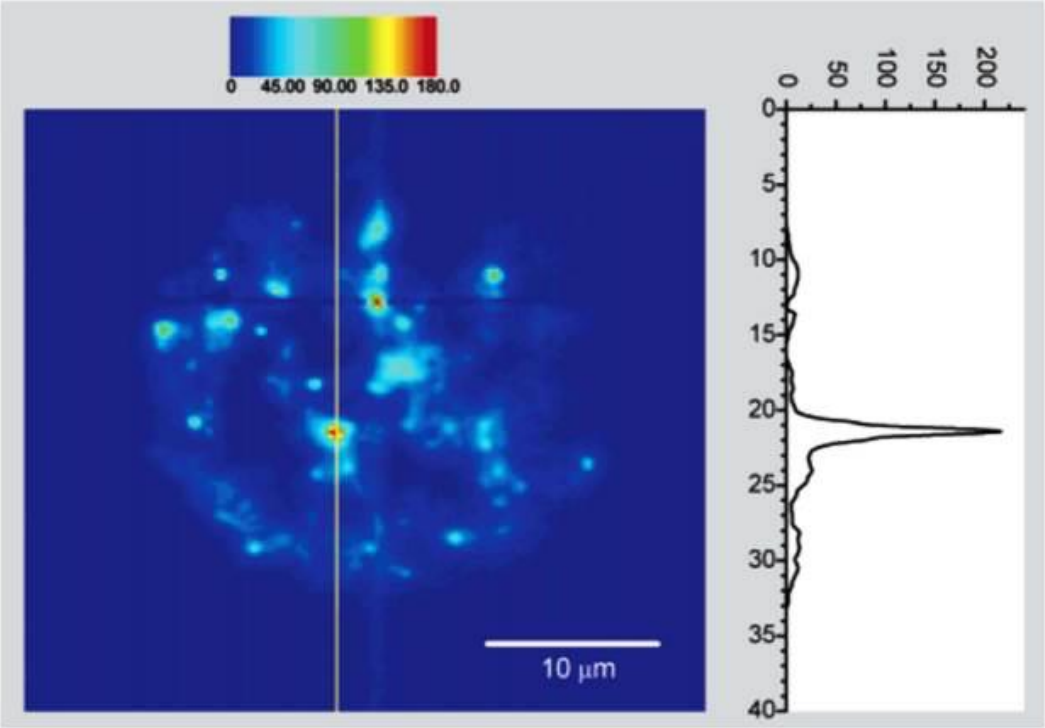



*Figure 1.17 : Image en fluorescence d'un macrophage incubés avec des SWNTs.* ***[175]***

Ils ont ainsi mis en contact des macrophages avec des SWNTs et observé une émission de fluorescence comprise entre 1125 et 1600 nm pour une longueur d'onde d'excitation de 660 nm (**Figure 1.17**). Ils ont ainsi pu en déduire que les SWNTs étaient contenus dans de petits phagosomes et qu'ils avaient donc été internalisés par phagocytose. Cette méthode de détection est d'autant plus intéressante que les tissus biologiques ne fluorescent pas dans cette gamme de longueurs d'ondes (au-delà de 1125 nm) utilisée pour les SWNTs, et aucun photoblanchiment n'a été observé. Plus tard, la même équipe s'est penchée sur la détection des SWNTs, grâce à leur fluorescence intrinsèque, in vivo sur une larve de drosophile **[176]**. Ces travaux ont montré que des SWNTs individuels pouvaient être détectés dans les tissus, sans endommagement des tissus.

Par la suite, Dai *et al.* **[177]** ont mené des études sur des SWNTs fonctionnalisés par des dérivés de PEG, et injectés à des souris présentant des tumeurs. Ils ont pu observer une forte photoluminescence provenant des SWNTs au niveau des tumeurs (**Figure 1.18**).

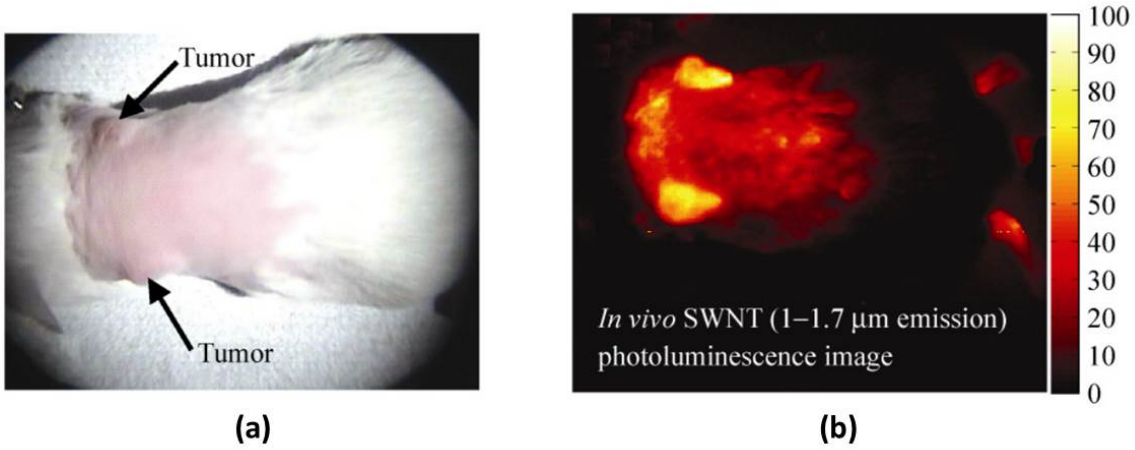



*Figure 1.18 : Images montrant en (a) une souris comportant deux tumeurs signalées par les flèches noires et (b) en photoluminescence IR la même zone 48h après injection de la suspension de SWNTs.* ***[177]***

Ils se sont servis de la propriété des SWNTs à absorber dans le proche infrarouge, pour réaliser un traitement photo-thermique des tumeurs, ce qui a conduit à une diminution des tumeurs sans endommagement des tissus externes.

D'un autre côté, s'est également développée la détection *in vitro* et *in vivo* des NTCs pas spectroscopie Raman, qui elle est applicable aux SWNTs, DWNTs et MWNTs. En effet, les NTCs présentent un spectre caractéristique en Raman avec des bandes de fortes intensités : les RBM (Radial Breathing Mode) entre 100 et 300 $cm^{-1}$ ; la bande D vers 1350 $cm^{-1}$ ; la bande G vers 1580 $cm^{-1}$ ; la bande G' vers 2630 $cm^{-1}$. Neves *et al.* **[178]** ont ainsi suivi des DWNTs fonctionnalisés de façon non-covalente par de l'ARN au niveau de cellules cancéreuses humaines. Les RBM, donnant une indication sur les diamètres présents dans un échantillon de NTCs (à une longueur d'onde donnée), a permis de montrer qu'il n'y avait pas de sélectivité par rapport au diamètre des DWNTs lorsque ceux-ci étaient internalisés par les cellules. Le suivi des DWNTs pendant 24h sur des cellules HeLa a été réalisé par microscopie Raman, en relevant le signal d'une bande RBM autour de 260 $cm^{-1}$ (**Figure 1.19**). Ainsi il s'est

avéré que les DWNTs rentraient bien dans les cellules puis en ressortaient complètement au bout de 24h.

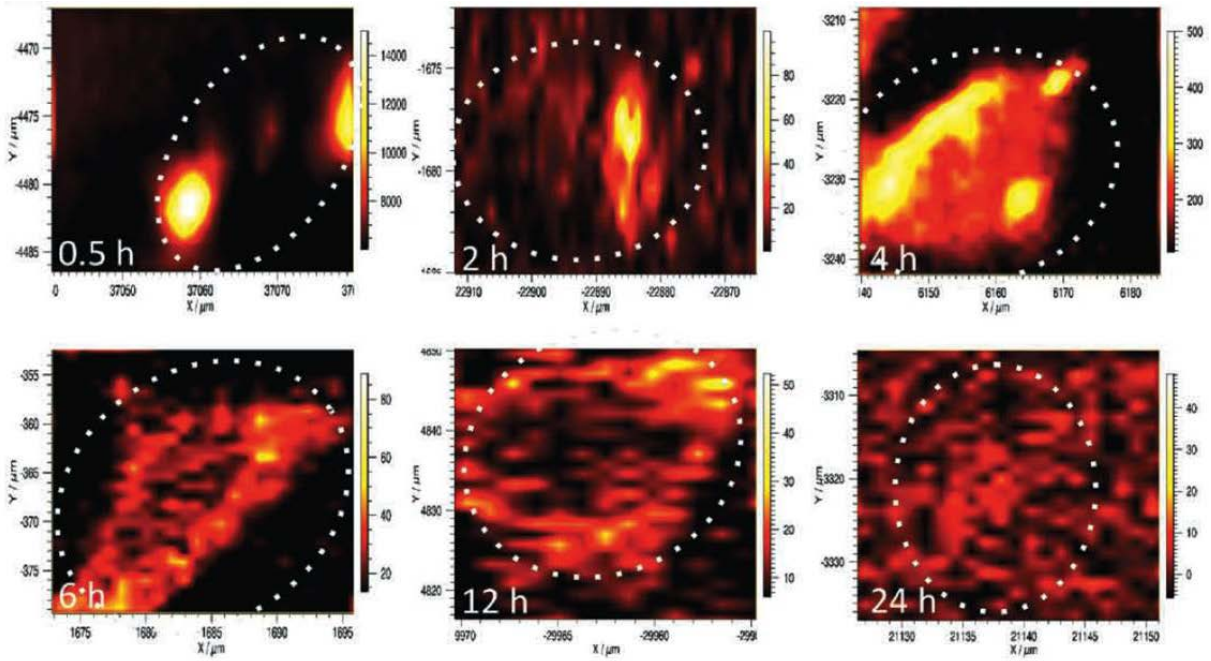



*Figure 1.19 : Cartographie par microscopie Raman d'une seule cellule HeLa pendant 24h à $\lambda$ = 785 nm. Le signal Raman des DWNTs sélectionné pour réaliser la cartographie est une bande RBM autour de 260 $cm^{-1}$. La ligne en pointillé correspond quant à elle au contour de la cellule.* ***[178]***

Des études sur l'internalisation de SWNTs ont également été réalisées par le biais de la microscopie confocale Raman, révélant ainsi que les SWNTs s'accumulent dans des lysosomes de cellules rénales de souris **[179]**.

Il existe également d'autres types d'imagerie in vivo, comme la microscopie de fluorescence bi-photon. La microscopie de fluorescence bi-photonique, basée sur l'absorption simultanée de deux photons de même énergie par une molécule, a permis de visualiser des MWNTs grâce à leur fluorescence intrinsèque au niveau de racine de blé (**Figure 1.20**) **[180]**. En excitant les MWNTs à 710 nm, leur émission a été enregistrée entre 360 et 530 nm. L'avantage de cette technique réside dans le fait qu'elle est non intrusive et permet la détection et la visualisation des NTCs en profondeur sans détérioration des tissus.

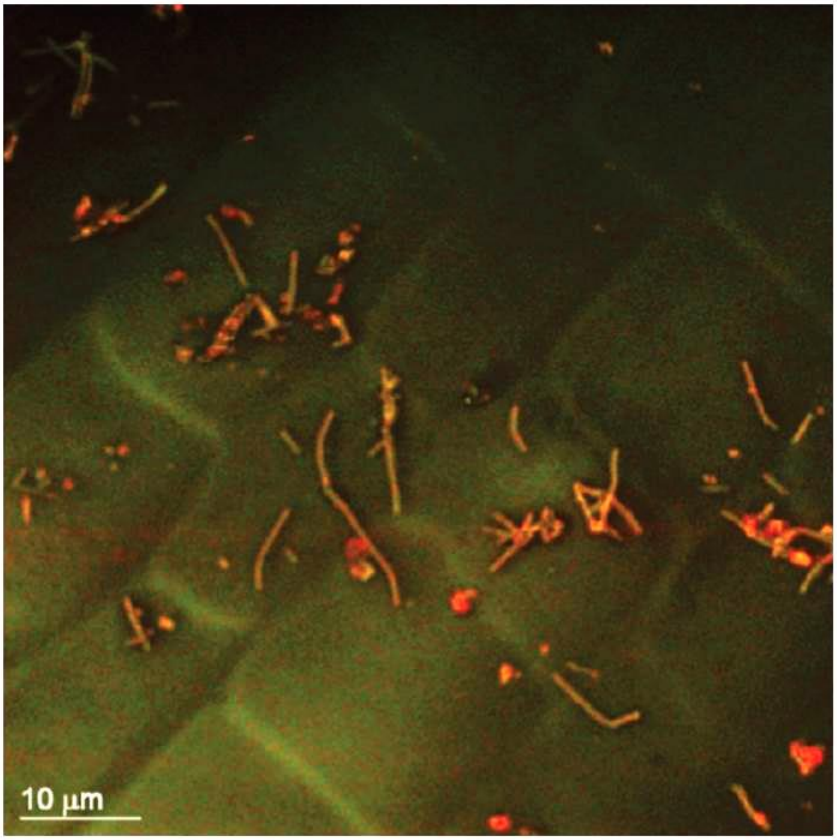



*Figure 1.20 : Image de microscopie de fluorescence biphotonique montrant des MWNTs (orange) à la surface de cellules de racine de blé.* ***[180]***

# D. Bibliographie du Chapitre 1

[1] Monthioux M, Serp P, Flahaut E, Razafinimanana M, Laurent C, Peigney A, Bacsa W and Broto JM, *Introduction to carbon nanotubes.* Springer Handbook of Nanotechnology, Ed Bhushan B, **2007**, 43-112.

[2] Hernandez Y, Nicolosi V, Lotya M, Blighe FM, Sun Z, De S, McGovern IT, Holland B, Byrne M, Gun'Ko YK, Boland JJ, Niraj P, Duesberg G, Krishnamurthy S, Goodhue R, Hutchison J, Scardaci V, Ferrari AC and Coleman JN, *High-yield production of graphene by liquid-phase exfoliation of graphite.* Nature Nanotech, **2008**, 3, 563-568.

[3] Kroto HW, Heath JR, O'Brien SC, Curl RF and Smalley RE, *$C_{60}$ Buckminsterfullerene.* Nature, **1985**, 318, 162-163.

[4] Iijima S, Helical microtubules of graphitic carbon. Nature, **1991**, 354, 56-58.

[5] Bethune DS, Klang CH, de Vries MS, Gorman G, Savoy R, Vazquez J and Beyers R, *Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls.* Nature, **1993**, 363, 605-607.

[6] Iijima S and Ichihashi T, *Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter.* Nature, **1993**, 603-605.

[7] Charlier JC and Michenaud JP, *Energetics of multilayered carbon tubules.* Phys Rev Lett, **1993**, 70, 1858-1861.

[8] Saito R, Matsuo R, Kimura T, Dresselhaus G and Dresselhaus M, *Anomalous potential barrier of double-wall carbon nanotube.* Chem Phys Lett, **2001**, 348, 187-193.

[9] Howard JB, Chowdhury KD and Sande JBV, *Carbon shells in flames.* Nature, **1994**, 370, 603.

[10] Hsin YL, Hwang KC, Chen FR and Kai JJ, *Production and in-situ metal filling of carbon nanotubes in water.* Adv Mater, **2001**, 13, 830-833.

[11] Laplaze D, Bernier P, Maser W, Flamant G, Guillard T and Loiseau A, *Carbon nanotubes : the solar approach.* Carbon, **1998**, 36, 685-688.

[12] Seo JW, Magrez A, Milas M, Lee K, Lukovac V and Forró L, *Catalytically grown carbon nanotubes : from synthesis to toxicity.* J Phys D : Appl Phys, **2007**, 40 (6), 109-120.

[13] Rodriguez NM, *A review of catalytically grown carbon nanofibers.* J Mater Res, **1993**, 8, 3233-3250.

[14] Dai H, Rinzler AG, Nikolaev P, Thess A, Colbert DT and Smalley RE, *Single-wall nanotubes produced by metal-catalyzed disproportionation of carbon monoxide.* Chem Phys Lett, **1996**, 260, 471-475.

[15] Grüneis A, Rümmeli MH, Kramberger C, Barreiro A, Pichler T, Pfeiffer R, Kuzmany H, Gemming T and Büchner B, *High quality double wall carbon nanotubes with a defined diameter distribution by chemical vapor deposition from alcohol.* Carbon, **2006**, 44 (15), 3177-3182.

[16] Baker RTK, *Catalytic growth of carbon filaments.* Carbon, **1989**, 27 (3), 315-323.

[17] Flahaut E, Govindaraj A, Peigney A, Laurent C, Rousset A and Rao CNR, *Synthesis of single-walled carbon nanotubes using binary (Fe, Co, Ni) alloy nanoparticles prepared in situ by the reduction of oxide solid solutions.* Chem Phys Lett, **1999**, 300, 236-242.

[18] Couteau M, Hernadi K, Seo JW, Thiên-Nga L, Mikó C, Gaál R and Forró L, *CVD synthesis of high-purity multiwalled carbon nanotubes using $CaCO_3$ catalyst support for large-scale production.* Chem Phys Lett, **2003**, 378, 9-17.

[19] Hernadi K, Fonseca A, Nagy JB, Bemaerts D, Fudala A, Lucas AA, *Catalytic synthesis of carbon nanotubes using zeolite support.* Zeolites, **1996**, 17, 416.423.

[20] Díaz G, Benaissa M, Santiesteban JG and José-Yacamán M, *Carbon nanotubes prepared by catalytic decomposition of benzene over silica supported cobalt catalysts.* Fullerene Sci Tech, **1998**, 6 (5), 853-866.

[21] Maruyama S, Kojima R, Miyauchi Y, Chiashi S and Kohno M, *Low-temperature synthesis of high-purity single-walled carbon nanotubes from alcohol.* Chem Phys Lett, **2002**, 360, 229-234.

[22] Flahaut E, Bacsa R, Peigney A and Laurent C, *Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes.* Chem Commun, **2003**, 12, 1442-1443.

[23] Nagaraju N, Fonseca A, Konya Z and Nagy J, *Alumina and silica supported metal catalysts for the production of carbon nanotubes.* J Mol Catal A, **2002**, 181, 57-62.

[24] Marangoni R, Serp P, Feurer R, Kihn Y, Kalck P and Vahlas C, *Carbon nanotubes produced by substrate free metalorganic chemical vapor deposition of iron catalysts and ethylene.* Carbon, **2001**, 39, 443-449.

[25] Rao CNR and Sen R, *Large aligned-nanotube bundles from ferrocene pyrolysis.* Chem Commun, 1998, 15, 1525-1526.

[26] Flahaut E, Peigney A, Bacsa WS, Bacsa RR and Laurent C, *CCVD synthesis of carbon nanotubes from (Mg,Co,Mo)O catalysts : influence of the proportions of cobalt and molybdenum.* J Mater Chem, **2004**, 14 (4), 646-653.

[27] Delmas M, Pinault M, Patel S, Porterat D, Reynaud C and Mayne-L'Hermite M, *Growth of long and aligned multi-walled carbon nanotubes on carbon and metal substrates.* Nanotechnology, **2012**, 23 (10), 105604.

[28] Ren ZF, Huang ZP, Xu JW, Wang JH, Bush P, Siegal MP and Provencio PN, *Synthesis of large arrays of well-aligned carbon nanotubes on glass.* Science, **1998**, 282, 1105-1107.

[29] Fan S, Chapline MG, Franklin NR, Tombler TW, Cassell AM and Dai H, *Self-oriented regular arrays of carbon nanotubes and their field emission properties.* Science, **1999**, 283, 512-514.

[30] Kratschmer W, Lamb LD, Fostiropoulos K and Huffman DR, *Solid C60 : a new form of carbon.* Nature, **1990**, 347, 354-358.

[31] Guo T, Nikolaev P, Rinzler AG, Tomanek D, Colbert DT and Smalley RE, *Self-assembly of tubular fullerenes.* J Phys Chem, **1995**, 99, 10694-10697.

[32] Aitken RJ, Chaudhry MQ, Boxall ABA and Hull M, *Manufacture and use of nanomaterials : current status in the UK and global trends.* Occup Med, **2006**, 56 (5), 300-306.

[33] Iijima S, Brabec C, Maiti A and Bernholc J, *Structural flexibility of carbon nanotubes.* J Chem Phys, **1996**, 104 (5), 2089-2092.

[34] Ricaud M, Lafon D and Roos F, *Les nanotubes de carbones : quels risques, quelle prévention ?* INRS, **2008**, Référence ND 2286.

[35] Seichepine F, *Réalisation d'interconnexions de faible résistivité à base de nanotubes de carbone biparois pour la microélectronique.* Thèse de doctorat, Université de Toulouse, **2011**.

[36] Wei BQ, Vajtai R and Ajayan PM, Reliability and current carrying capacity of carbon nanotubes. Appl Phys Lett, **2001**, 79 (8), 1172-1174.

[37] Lu F, Gu L, Meziani MJ, Wang X, Luo PG, Veca LM, Cao L and Sun YP, *Advances in bioapplications of carbon nanotubes*. Adv Mater, **2009**, 21, 139-152.

[38] Arkan E, Saber R, Karimi Z, Mostafaie A and Shamsipur M, *Multiwall carbon nanotube-ionic liquid electrode modified with gold nanoparticles as a base for preparation of a novel impedimetric immunosensors for low level detction of human serum albumin in biological fluids.* J Pharm Biomed Anal, **2014**, 92, 74-81.

[39] Masoomi-Godarzi S, Khodadadi AA, Vesali-Naseh M and Mortazavi Y, *Highly stable and selective non-enzymatic glucose biosensor using carbon nanotubes decorated by $Fe_3O_4$ nanoparticules.* J Electrochem Soc, **2014**, 161 (1), B19-B25.

[40] Zhang QD, Piro B, Noël V, Reisberg S and Pham MC, *Functionalization of single-walled carbon nanotubes for direct and selective electrochemical detection of DNA.* **2011**, 136, 1023-1028.

[41] Baek YK, Jung DH, Yoo SM, Shin S, Kim JH, Jeon HJ, Choi YK, Lee SY and Jung HT, *Label-free detection of DNA hybridization using pyrene-functionalized single-walled carbon nanotubes : effect of chemical structures of pyrene molecules on DNA sensing performance.* J Nanosci Nanotechnol, **2011**, 11, 4210-4216.

[42] Reza KK, Srivastava S, Yadav S and Biradar AM, *Biofunctionalized carbon nanotubes platform for biomedical applications.* Mater Lett, **2014**, 126, 126-130.

[43] Norman LL, Stroka K and Aranda-Espinoza H, *Guiding axons in the central nervous system : a tissue engineering approach.* Tissue Engineering Part B : Reviews, **2009**, 15, 291-305.

[44] Beduer A, Seichepine F, Flahaut E, Loubinoux I, Vaysse L and Vieu C*, Elucidation of the role of carbon nanotube patterns on the development of the cultured neuronal cells.* Langmuir, **2012**, 28 (50), 17363-17371.

[45] Lovat V, Pantarotto D, Lagostena L, Cacciari B, Grandolfo M, Righi M, Spalluto G, Prato M and Ballerini L, *Carbon nanotube substrates boost neuronal electrical signaling.* Nano Lett, **2005**, 5, 1107-1110.

[46] Mazzatenta A, Giugliano S, Campidelli S, Gambazzi L, Businaro L, Markram H, Prato M and Ballerini L, *Interfacing neurons with carbon nanotubes : electrical signal transfer and synaptic stimulation in cultured brain circuits.* J Neurosci, **2007**, 27, 6931-6936.

[47] Ménard-Moyon C and Bianco A, *Atténuation de la toxicité des nanotubes de carbone grâce à la fonctionnalisation chimique.* Techniques de l'ingénieur, **2014**, in167.

[48] Bianco A, Kostarelos K and Prato M, *Making carbon nanotubes biocompatible and biodegradable.* Chem Commun, **2011**, 47, 10182-10188.

[49] Fabbro C, Ali-Boucetta H, Da Ros T, Kostarelos K, Bianco A and Prato M, *Targeting carbon nanotubes against cancer.* Chem Commun, **2012**, 48, 39-11-3926.

[50] Bates K and Kostarelos K, *Carbon nanotubes as vectors for gene therapy : past achievements, present challenges and future goals.* Adv Drug Deliv Rev, **2013**, 65, 2023-2033.

[51] Atkinson H and Chalmers R, *Delivering the goods : viral and non-viral gene therapy systems and the inherent limits on cargo DNA and internal sequences.* Genetica, **2010**, 138 (5), 485-498.

[52] Pantarotto D, Singh R, McCarthy D, Erhardt M, Briand JP, Prato M, Kostarelos K and Bianco A, *Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery.* Angew Chem Int Ed, **2004**, 43, 5242-5246.

[53] Qin W, Yang K, Tang H, Tan L, Xie Q, Ma M, Zhang Y and Yao S, *Improved GFP gene transfection mediated by polyamidoamine dendrimer-functionalized multi-walled carbon nanotubes with high biocompatibility.* Colloids Surf B : Biointerfaces, **2011**, 84, 206-213.

[54] Vardharajula S, Ali SZ, Tiwari PM, Eroğlu E, Vig K, Dennis VA and Singh SR, *Functionalized carbon nanotubes : biomedical applications.* Int J Nanomedicine, **2012**, 7, 5361-574.

[55] Sanz V, Tilmacîu C, Soula B, Flahaut E, Coley HM, Silva SRP and McFadden J, *Chloroquine-enhanced gene delivery madiated by carbon nanotubes.* Carbon, **2011**, 49, 5348-5358.

[56] Huang YP, Lin IJ, Chen CC, Hsu YC, Chang CC and Lee MJ, *Delivery of small interfering RNAs in human cervical cancer cells by polyethyeneimine-functionalized carbon nanotubes.* Nanoscale Res Lett, **2013**, 8 (1), 267.

[57] Battigelli A, Wang JTW, Russier J, Da Ros T, Kostarelos K, Al-Jamal KT, Prato M and Bianco A, *Ammonium and guanidinium dendron-carbon nanotubes by amidation and click chemistry and their use for siRNA delivery.* Small, **2013**, 9 (21), 3610-3619.

[58] Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N and Dai H, *Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery.* ACS Nano, **2007**, 1 (1), 50-56.

[59] Mo Y, Wang H, Liu J, Lan Y, Guo R, Zhang Y, Xue W and Zhang Y, *Controlled release and targeted delivery to cancer cells of doxorubicin from polysaccharide-functionalised single-walled carbon nanotubes.* J Mater Chem B, **2015**, doi: 10.1039/C4TB02123A.

[60] Mehra NK and Jain NK, *One platform comparison of estrone and folic acid anchored surface engineered MWNTs for doxorubicin delivery.* Mol Pharm, **2015**, doi : 10.1021/mp500720a.

[61] Firme III CP and Bandaru PR, *Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems.* Nanomedicine, **2010**, 6 (2) 245-256.

[62] Yan L, Zhao F, Li S, Hu Z and Zhao Y, *Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes.* Nanoscale, **2011**, 3, 362-382.

[63] Lacerda L, Soundararajan A, Singh R, Pastorin G, Al-Jamal KT, Turton J, Frederik P, Herrero MA, Li S, Bao A, Emfietzoglou D, Mather S, Phillips WT, Prato M, Bianco A, Goins B et Kostarelos K, *Dynamic imaging of functionalised multi-walled carbon nanotube systemic circulation and urinary excretion.* Adv Mater, **2008**, 20, 225-230.

[64] Jia G, Wang H, Yan L, Wang X, Pei R, Yan T, Zhao Y and Guo X, *Cytotoxicity of carbon nanomaterials : single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene.* Environ Sci Technol, **2005**, 39, 1378-1383.

[65] Dillon AC, Gennett T, Jones KM, Alleman JL, Parilla PA and Heben MJ, *A simple and complete purification of single-walled carbon nanotube materials.* Adv Mater, **1999**, 11, 1354-1358.

[66] Monthioux M, Smith BW, Burteaux B, Claye A, Fischer JE and Luzzi DE, *Sensitivity of single-wall carbon nanotubes to chemical processing: an electron microscopy investigation.* Carbon, **2001**,39, 1251-1272.

[67] Hu H, Zhao B, Itkis ME and Haddon RC, *Nitric acid purification of single-walled carbon nanotubes.* J Phys Chem B, **2003**, 107, 13838-13842.

[68] Zhang XX, Deng CF, Xu R and Wang DZ, *Oxidation resistance of multi-walled carbon nanotubes purified with sulphuric and nitric acids.* J Mater Sci, **2007**, 42, 8377-8380.

[69] Hernadi K, Siska A, Thiên-Nga L, Forró L and Kiricsi I, *Reactivity of different kinds of carbon during oxidative purification of catalytically prepared carbon nanotubes.* Solid State Ionics, **2001**, 141, 203-209.

[70] Aitchison TJ, Ginic-Markovic M, Matisons JG, Simon GP and Fredericks PM, *Purification, cutting, and sidewall functionalization of multiwalled carbon nanotubes using potassium permanganate solutions.* J Phys Chem C, **2007**, 111, 2440-2446.

[71] Biro LP, Khanh NQ, Vertesy Z, Horvath ZE, Osvath Z, Koos A, Gyulai J, Kocsonya A, Kónya Z, Zhang XB, Van Tendeloo G, Fonseca A and Nagy JB, *Catalyst traces and other impurities in chemically purified carbon nanotubes grown by CCVD.* Mater Sci Eng C, **2002**, 19, 9-13.

[72] Zhou H, Gu T, Yang D, Jiang Z and Zeng J, *Study on the chemical modification of the walls of carbon nanotubes by $K_2Cr_2O_7$ and $HNO_3$.* Adv Mater Res, **2011**, 197, 571-574.

[73] Feng Y, Zhang H, Hou Y, McNicholas TP, Yuan D, Yang S, Ding L, Feng W and Liu J, *Room temperature purification of few-walled carbon nanotubes with high yield.* ACS Nano, **2008**, 2 (8), 1634-1638.

[74] Datsyuk V, Kalyva M, Papagelis K, Parthenios J, Tasis D, Siokou A, Kallitsis I and Galiotis C, *Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes.* Carbon, **2008**, 833-840.

[75] Salzmann CG, Llewellyn SA, Tobias G, Ward MAH, Huh Y and Green MLH, *The role of carboxylated carbonaceous fragments in the functionalization and spectroscopy of a single-walled carbon-nanotube material.* Adv Mater, **2007**, 19, 883-887.

[76] Hou PX, Liu C and Cheng HM, *Purification of carbon nanotubes.* Carbon, **2008**, 46, 2003-2025.

[77] Kuzmany H, Kukovecz A, Simon F, Holzweber M, Kramberger C and Pichler T, *Functionalization of carbon nanotubes.* Synth Met, **2004**, 141, 113-122.

[78] Yu H, Jin Y, Peng F,Wang H and Yang J, *Kinetically controlled sidewall functionalization of carbon nanotubes by nitric acid oxidation.* J Phys Chem C, **2008**, 112, 6758-6763.

[79] Worsley KA, Kalinina I, Bekyarova E and Haddon RC, *Functionalization and dissolution of nitric acid treated single-walled carbon nanotubes.* J Am Chem Soc, **2009**, 131, 18153-18158.

[80] Wang J, Liang G, Yan H and He S, *Mechanical and thermal properties of functionalized multiwalled carbon nanotubes/ cyanate ester composite.* Polym Eng Sci, **2009**, 680-684.

[81] Wang Y, Iqbal Z and Mitra S, *Rapidly functionalized, waterdispersed carbon nanotubes at high concentration.* J Am Chem Soc, **2006**, 128, 95-99.

[82] Zhang J, Zou H, Qing Q, Yang Y, Li Q, Liu Z, Guo X and Du Z, *Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes.* J Phys Chem B, **2003**, 107, 3712-3718.

[83] Musso S, Porro S, Vinante M, Vanzetti L, Ploeger R, Giorcelli M, Possetti B, Trotta F, Pederzolli C and Tagliaferro A, *Modification of MWNTs obtained by thermal-CVD.* Diamond Relat Mater, **2007**, 16, 1183-1187.

[84] Samori C, Sainz R, Menard-Moyon C, Toma FM, Venturelli E, Singh P, Ballestri M, Prato M and Bianco A, *Potentiometric titration as a straightforward method to assess the number of functional groups on shortened carbon nanotubes.* Carbon, **2010**, 48, 2447-2455.

[85] Goertzen SL, Thériault KD, Oickle AM, Tarasuk AC and Andreas HA, *Standardization of the Boehm titration. PartI. CO2 expulsion and endpoint determination.* Carbon, **2010**, 48, 1252-1261.

[86] Kim YS, Yang SJ, Lim HJ, Kim T, Lee K and Park CR, *Effects of carbon dioxide and acidic carbon compounds on the analysis of Boehm titration curves.* Carbon, **2012**, 50, 1510-1516.

[87] Shao L, Tobias G, Salzmann CG, Ballesteros B, Hong SY, Crossley A, Davis BG and Green MLH, *Removal of amorphous carbon for the efficient sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes.* Chem Commun, **2007**, 5090-5092.

[88] Verdejo R, Lamoriniere S, Cottam B, Bismarck A and Shaffer M, *Removal of oxidation debris from multi-walled carbon nanotubes.* Chem Commun, **2007**, 513-515.

[89] Price BK, Lomeda JR and Tour JM, *Aggressively oxidized ultrashort single-walled carbon nanotubes having oxidized sidewalls.* Chem Mater, **2009**, 21, 3917-3923.

[90] Flavin K, Kopf I, Del Canto E, Navio C, Bittencourt C and Giordani S, *Controlled carboxylic acid introduction: a route to highly purified oxidised single-walled carbon nanotubes.* J Mater Chem, **2011**, 21, 17881-17887.

[91] Shao L, Tobias G, Huh Y and Green MLH, *Reversible filling of single walled carbon nanotubes opened by alkali hydroxides.* Carbon, **2006**, 44 (13), 2855-2858

[92] Lukanov P, *Synthèse de nanotubes de carbone remplis et de nanoparticules encapsulées dans des coques de carbone pour applications biomédicales.* Thèse de doctorat, Université de Toulouse, **2010**.

[93] Osswald S, Flahaut E and Gogotsi Y, *In situ Raman spectroscopy study of oxidation of double- and single-wall carbon nanotubes.* Chem Mater, **2006**, 18, 1525-1533.

[94] Karousis N and Tagmatarchis N, *Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes.* Chem Rev, **2010**, 110, 5366-5397.

[95] Aprile C, Martín R, Alvaro M, Garcia H and Scaiano JC, *Covalent funcitonalization of short, single-wall carbon nanotubes : photophysics of 2,4,6-triphenylpyrylium attached to the nanotube walls.* Chem Mater, **2009**, 21, 884-890.

[96] Tao L, Chen G, Mantovani G, York S and Haddleton M, *Modification of multi-wall carbon nanotube surfaces with poly(amidoamine) dendrons : synthesis and metal templating.* Chem Commun, **2006**, 4949-4951.

[97] Xie X, Gao L and Sun J, *Esterification of chemical functional single-wall carbon nanotubes.* Mater Sci Forum, **2011**, 695, 373-376.

[98] Gul H, Lu W, Xu P, Xing J and Chen J, *Magnetic carbon nanotube labelling for haematopoietic stem/progenitor cell tracking*. Nanotechnology, **2010**, 21 (15), 155101.

[99] Singh P, Samori C, Toma FM, Bussy C, Nunes A, Al-Jamal KT, Ménard-Moyon C, Prato M, Kostarelos K and Bianco A, *Polyamine functionalized carbon nanotubes: synthesis, characterization, cytotoxicity and siRNA binding*. J Mater Chem, **2011**, 21, 4850-4860.

[100] Delgado JL, De la Cruz P, Urbina A, López Navarrete JT, Casado J and Langa F, *The first synthesis of a conjugated hybrid of $C_{60}$-fullerene and a single-wall carbon nanotube.* Carbon, **2007**, 45, 2250-2252.

[101] Meng J, Meng J, Duan J, Kong H, Li L, Wang C, Xie S, Chen S, Gu N, Xu H and Yang XD, *Carbon nanotubes conjugated to tumor lysate protein enhance the efficacy of an antitumor immunotherapy.* Small, **2008**, 4, 1364-1370.

[102] Xiao Y, Gao X, Taratula O, Treado S, Urbas A, Holbrook RD, Cavicchi RE, Avedisian CT, Mitra S, Savia R, Wagner PD, Srivastava S and He H, *Anti-HER2 IgY antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes for detection and selective destruction of breast cancer cells.* BMC Cancer, **2009**, 9, 351-362.

[103] Marches R, Chakravarty P, Musselman IH, Bajaj P, Azad RN, Pantano P, Draper RK and Vitetta ES, *Specific thermal ablation of tumor cells using single-walled carbon nanotubes targeted by covalently-coupled monoclonal antibodies.* Int J Cancer, **2009**, 125, 2970-2977.

[104] Lin Y, Lu F, Tu Y and Ren Z, *Glucose biosensors based on carbon nanotube nanoelectrose ensembles.* Nano Lett, **2004**, 4, 191-195.

[105] Sánchez-Pomales G, Santiago-Rodríguez L and Cabrera CR, *DNA-functionalized carbon nanotubes for biosensing applications.* J Nanosci Nanotechnol, **2009**, 9, 2175-2188.

[106] Pulikkathara MX, Kuznetsov OV and Khabashesku VN, *Sidewall covalent functionalization of single wall carbon nanotubes through reactions of fluoronanotubes with urea, guanidine, and thiourea.* Chem Mater, **2008**, 20, 2685-2695.

[107] Mickelson ET, Huffman CB, Rinzler AG, Smalley RE, Hauge RH and Margrave JL, *Fluorination of single-wall carbon nanotubes.* Chem Phys Lett, **1998**, 296, 188-194.

[108] Liu M, Yang Y, Zhu T and Liu Z, *Chemical modification of single-walled carbon nanotubes with peroxytrifluoroacetic acid.* Carbon, **2005**, 43, 1470-1478.

[109] Bulusheva LG, Fedoseeva YV, Okotrub AV, Flahaut E, Asanov IP, Koroteev VO, Yaya A, Ewels CP, Chuvilin AL, Felten A, Van Lier G and Vyalikh DV, *Stability of fluroinated double-walled carbon nanotubes produced by different fluorination techniques.* Chem Mater, **2010**, 22, 4197-4203.

[110] Bulusheva LG, Gevko PN, Okotrub AV, Lavskaya V, Yudanov NF, Yudanova LI, Abrosimov OG, Pazhetnov EM, Boronin AI and Flahaut E, *Thermal behavior of fluorinated double-walled carbon nanotubes.* Chem Mater, **2006**, 18, 4967-4971.

[111] Battigelli A, Ménard-Moyon C, Da Ros T, Prato M and Bianco A, *Endowing carbon nanotubes with biological and biomedical properties by chemical modifications.* Adv Drug Deliv Rev, **2013**, 65 (15), 1899-1920.

[112] Gaillard C, Cellot G, Li S, Toma FM, Dumortier H, Spalluto G, Cacciari B, Prato M, Ballerini L and Bianco A, *Carbon nanotubes carrying cell-adhesion peptides do not interfere with neuronal functionality.* Adv Mater, **2009**, 21, 2903-2908.

[113] Samorí C, Ali-Boucetta H, Sainz R, Guo C, Toma FM, Fabbro C, da Ros T, Prato M, Kostarelos K and Bianco A, *Enhanced anticancer activity of multi-walled carbon nanotube-methotrexate conjugates using cleavable linkers.* Chem Commun, **2010**, 46, 1494-1496.

[114] Benincasa M, Pacor S, Wu W, Prato M, Bianco A and Gennaro R, *Antifungal activity of amphotericin B conjugated to carbon nanotubes.* ACS Nano, **2011**, 5 (1), 199-208.

[115] Zydziak N, Yameen B and Barner-Kowollik C, *Diels-Alder reactions of carbon materials synthesis and surface functionalization.* Polym Chem, **2013**, 4, 4072-4086.

[116] Luksirikul P, Ballesteros B, Tobias G, Moloney MG and Green MLH, *Sidewall functionalisation of carbon nanotubes by addition of diarylcarbene derivatives.* J Mater Chem, **2011**, 21, 19080-19085.

[117] Gao C, He H, Zhou L, Zheng X and Zhang Y, *Scalable functional group engineering of carbon nanotubes by improved one-step nitrene chemistry.* Chem Mater, **2009**, 21, 360-370.

[118] Yadav SK, Kim IJ, Kim HJ, Kim J, Hong SM and Koo CM, *PDMS/MWCNT nanotcomposite actuators using silicone functionalized multiwalled carbon nanotubes via nitrene chemistry.* J Mater Chem C, **2013**, 1, 5463-5470.

[119] Dyke CA and Tour JM, *Overcoming the insolubility of carbon nanotubes through high degrees of sidewall functionalization.* Chem Eur J, **2004**, 10, 812-817.

[120] Price BK, Hudson JL and Tour JM, *Green chemical functionalization of single-walled carbon nanotubes in ionic liquids.* J Am Chem Soc, **2005**, 127, 14867-14870.

[121] Ménard-Moyon C, Fabbro C, Prato M and Bianco A, *One-pot triple functionalization of carbon nanotubes.* Chem Eur J, **2011**, 17, 3222-3227.

[122] Graupner R, Abraham J, Wunderlich D, Vencelová A, Lauffer P, Röhrl J, Hundhausen M, Ley Lothar and Hirsch A, *Nucleophilic-alkylation-reoxidation : a functionalization sequence for single-wall carbon nanotubes.* J Am Cham Soc, **2006**, 128, 6683-6689.

[123] Wunderlich D, Hauke F and Hirsch A, *Preferred functionnalization of metallic and small-diameter single-walled carbon anotubes by nucleophilic addition of organolithium and –magnesium compounds followed by reoxidation.* Chem Eur J, **2008**, 1607-1614.

[124] Alves da Cunha JR, Fantini C, Andrade NF, Alcantara P, Saraiva GD, Souza Filho AG, Terrones M and dos Santos MC, *Enhanced solubilization of carbon nanotubes in aqueous suspensions of anionic-nonionic surfactant mixtures.* J Phys Chem C, **2013**, 117, 25138-25145.

[125] Forrest SR and Zimmerman JD, *Purification of carbon nanotubes using agarose column and density gradient ultracentrifugation.* **2013**, US20120177560 A1.

[126] Blanch AJ, Quinton JS and Shapter JG, *The role of sodium dodecyl sulfate concentration in the separation of carbon nanotubes using gel chromatography.* Carbon, **2013**, 60, 471-480.

[127] Datsyuk V, Landois P, Fitremann J, Peigney A, Galibert AM, Soula B and Flahaut E, *Double-walled carbon nanotube dispersion via surfactant substitution.* J Mater Chem, **2009**, 19, 2729-2736.

[128] Heller DA, Mayrhofer RM, Baik S, Grinkova YV, Usrey ML and Strano MS, *Concomitant length and diameter separation of single-walled carbon nanotubes.* J Am Chem Soc, **2004**, 126, 14567-14573.

[129] Boghossian AA, Choi JH, Ham MH and Strano MS, *Dynamic and reversible self-assembly of photoelectrochemical complexes based on lipid bilayer disks, photosynthetic reaction centers, and single-walled carbon nanotubes.* Langmuir, **2011**, 27 (5), 1599-1609.

[130] Hobbie EK, Fagan JA, Becker ML, Hudson SD, Fakhri N and Pasquali M, *Self-assembly of ordered nanowires in biological suspensions of singl-wall carbon nanotubes.* ACS Nano, **2009**, 3 (1), 189-196.

[131] Utsumi S, Kanamaru M, Honda H, Kanoh H, Tanaka H, Ohkubo T, Sakai H, Abe M, Kaneko K, *RBM abnd shift-evidenced dispersion mechanism of single-wall carbon nanotube bundles with NaDDBS.* J Colloid Interface Sci, **2007**, 308, 276-284.

[132] Ernst F, Heek T, Setaro A, Haag R and Reich S, *Functional surfactants for carbon nanotubes : effects of design.* J Phys Chem C, **2013**, 117, 1157-1162.

[133] Kördel C, Setaro A, Bluemmel P, Popeney CS, Reich S and Haag R, *Controlled reversible debundling of single-walled carbon nanotubes by photo-switchable dendritic surfactants.* Nanoscale, **2012**, 4, 3029-3031.

[134] Wang K, Li N, Ren K, Zhang Q and Fu Q, *Exploring interfacial enhancement in polystyrene/multiwalled carbon nanotube monofilament induced by stretching.* Composites : Part A, **2014**, 61, 84-90.

[135] Stan E, Sandu LI and Fetecau C, *Effect of processing parameters and strain rate on mechanical properties of carbon nanotube-filled polypropylene nanocomposites.* Composites : Part B, **2014**, 59, 109-122.

[136] He Y, Zhang L, Chen G, Li X, Yao D, Lee JH and Zhang Y, *Surface functionalized carbon nanotubes and its effects on the mechanical properties of epoxy based composites at cryogenic temperature.* Polym Bull, **2014**, 71, 2465-2485.

[137] Dadfar SMM, Kavoosi G and Dadfar SMA, *Investigation of mechanical properties, antibacterial features, and water vapor permeability of polyvinyl alcohol thin films reinforced by glutaraldehyde and multiwalled carbon nanotube.* Polym Compos, **2014**, 35 (9), 1736-1743.

[138] Mehta H, Wangshul H and Kanagaraj S, *Studies on mechanical properties of carbon nanotubes/high-density polyethylene nanocomposites by small punch technique.* Int J Nanosci, **2011**, 10, 247-251.

[139] Robinon JT, Hong G, Liang Y, Zhang B, Yaghi OK and Dai H, *In vivo fluorescence imaging in the second near-infrared window with long circulating carbon nanotubes capable of ultrahigh tumor uptake.* J Am Chem Soc, **2012**, 134, 10664-10669.

[140] Detriche S, Devilers S, Seffer JF, Nagy JB, Mekhalif Z and Delhalle J, *The use of water-soluble pyrene derivatives to probe the surface of carbon nanotubes.* Carbon, **2011**, 49, 2935-2943.

[141] Parra EJ, Rius FX and Blondeau P, *A potassium sensor based on non-covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes.* Analyst, **2013**, 138, 2698-2703.

[142] Salice P, Gambarin A, Daldosso N, Mancin F and Menna E, *Noncovalent interaction between single-walled carbon nanotubes and pyrene-functionalized gold nanoparticles in water-soluble nanohybrids.* J Phys Chem C, **2014**, 118, 27028-27038.

[143] Liu Q, Chen B, Wang Q, Shi X, Xiao Z, Lin J and Fang X, *Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells.* Nano Lett, **2009**, 9 (3), 1007-1010.

[144] Serag MF, Kaji N, Venturelli E, Okamoto Y, Terasaka K, Tokeshi M, Mizu kami H, Braeckmans K, Bianco A and Baba Y, *Functional platform for controlled subcellular distribution of carbon nanotubes.* ACS Nano, **2011**, 5 (11), 9264-9270.

[145] Koh B, Kim G, Yoon HK, Park JB, Kopelman R and Cheng W, *Fluorophore and dye-assisted dispersion of carbon nanotubes in aqueous solution.* Langmuir, **2012**, 28, 11676-11686.

[146] Liu Z, Fan AC, Rakhra K, Sherlock S, Goodwin A, Chen X, Yang Q, Felsher DW and Dai H, *Supramolecular stacking of doxorubicin on carbon nanotubes for in vivo cancer therapy.* Angew Chem Int Ed Engl, **2009**, 48, 7668-7672.

[147] Tian Z, Yin H, Ma H, Zhu L, Shen H and Jia N, *Supramolecular assembly and antitumor activity of multiwalled carbon nanotube-camptothecin complexes.* J Nanosci Nanotechnol, **2011**, 11, 953-958.

[148] Guo Y, Shi D, Cho H, Dong Z, Kulkami A, Pauletti GM, Wang W, Lian J, Liu W, Ren L, Zhang Q Liu G, Huth C, Wang L and Ewing RC, *In vivo imaging and drug storage by quantum-dot-conjugated carbon nanotubes.* Adv Funct Mater, **2008**, 18, 2489-2497.

[149] Iancu C, Mocan L, Bele C, Orza AI, Tabaran FA, Catoi C, Stiufiuc R, Stir A, Matea C, Iancu D, Agoston-Coldea L, Zaharie F and Mocan T, *Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalized with human serum albumine.* Int J Nanomed, **2011**, 6, 129-141.

[150] Chen H, Xi F, Gao X, Chen Z and Lin X, *Bioenzyme bionanomultilayer electrode for glucose biosensing based on functional carbon nanotubes and sugar-lectin biospecific interaction.* Anal Biochem, **2010**, 403, 36-42.

[151] Pang X, Imin P, Zhitomirsky I and Adronov A, *Amperometric detection of glucose using a conjugated polyelectrolyte complex with single-walled carbon nanotubes.* Macromolecules, **2010**, 43 (24), 10376-10381.

[152] Zheng M, Jagota A, Semke ED, Diner BA, Mclean RS, Lustig SR, Richardson RE and Tassi NG, *DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes.* Nature Materials, **2003**, 2, 338-342.

[153] Cheung W, Pontoriero F, Taratula O, Chen AM and He H, *DNA and carbon nanotubes as medicine.* Adv Drug Deliv Rev, **2010**, 62, 633-649.

[154] Kawaguchi M, Ohno J, Irie A, Fukushima T, Yamazaki J and Nakashima N, *Dispersion stability and exothermic properties of DNA-functionalized single-walled carbon nanotubes*. Int J Nanomed, **2011**, 6, 729-736.

[155] Lewitus DY, Landers J, Branch J, Smith KL, Callegari G, Kohn J, Neimark AV, *Biohybrid carbon nanotube/agarose fibers for neural tissue engineering.* Adv Funct Mater, **2011**, 21 (14), 2624-2632.

[156] Cheng Q, Rutledge K and Jabbarzadeh Ehsan, *Carbon nanotube-poly(lactide-co-glycolide) composite scaffolds for bone tissue engineering applications.* Ann Biomed Eng, **2013**, 41 (5), 904-916.

[157] Bourdiol F, Mouchet F, Perrault A, Fourquaux I, Datas L, Gancet C, Boutonnet JC, Pinelli E, Gauthier L and Flahaut E, *Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi-walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae.* Carbon, **2013**, 54, 175-191.

[158] Shannahan JH, Brown JM, Chen R, Ke PC, Lai X, Mitra S and Witzmann FA, *Comparison of nanotube-protein corona composition cell culture media.* Small, **2013**, 9 (12), 2171-2181.

[159] Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, Klaessig F, Castranova V and Thompson M, *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface.* Nature Materials, **2009**, 8, 543-557.

[160] Britz DA and Khlobystov AN, *Noncovalent interactions of molecules with single walled carbon nanotubes.* Chem Soc Rev, **2006**, 35, 637-659.

[161] Arlt M, Haase D, Hampel S, Oswald S, Bachmatiuk A, Klingeler R, Schulze R, Ritschel M, Leonhardt A, Fuessel S, Büchner B, Kraemer K and Wirth MP, *Delivry of carboplatin by*

*carbon-based nanocontainers mediates increased cancer cell death.* Nanotechnol, **2010**, 21, 335101.

[162] Feazell RP, Nakayama-Ratchford N, Dai H and Lippard SJ, *Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum (IV) anticancer drug design.* J Am Chem Soc, **2007**, 129 (27), 8438-8439.

[163] Wu L, Man C, Wang H, Lu X, Ma Q, Cai Y and Ma W, *PEGylated multi-walled carbon nanotubes for encapsulation and sustained release of oxaliplatin.* Pharm Res, **2013**, 30, 412-423.

[164] Ren Y and Pastorin G, *Incorporation of hexamethylmalamine inside capped carbon nanotubes.* Adv Mater, **2008**, 20, 2031-2036.

[165] Tîlmaciu CM, Soula B, Galibert AM, Lukanov P, Datas L, González J, Barquín LF, Fernández JR, González-Jiménez F, Jorge J and Flahaut E, *Synthesis of superparamagnetic iron (III) oxide nanowires in double-walled carbon nanotubes.* Chem Commun, **2009**, 6664-6666.

[166] Sendova M, Flahaut E and Hartsfield T, *Temperature dependance of Raman scattering in filled double-walled carbon nanotubes.* J Appl Phys, **2010**, 108, 044309.

[167] Bortolamiol T, Lukanov P, Galibert AM, Soula B, Lonchambon P, Datas L and Flahaut E, *Double-walled carbon nanotubes : quantitative purification assessment, balance between purificatin and degradation and solution filling as an evidence of opening.* Carbon, **2014**, 78, 79-90.

[168] Li R, Wu R, Zhao L, Hu Z, Guo S, Pan X and Zou H, *Folate and iron difunctionalized multiwall carbon nanotubes as dual-targeted drug nanocarrier to cancer cells.* Carbon, **2011**, 49, 1797-1805.

[169] Marega R, De Leo F, Pineux F, Sgrignani J, Magistrato A, Naik AD, Garcia Y, Flamant L, Michiels C and Bonifazi D, *Functionalized Fe-filled multiwalled carbon nanotubes as multifunctional scaffolds for magnetization of cancer cells.* Adv Funct Mater, **2013**, 23, 3173-3184.

[170] Pantarotto D, Briand JP, Prato M and Bianco A, Translocation of bioactive peptide across cell membranes by carbon nanotubes. Chem Commun, **2004**, 16-17.

[171] Heller DA, Baik S, Eurell TE and Strano M, *Single-walled carbon nanotube spectroscopy in live cells : towards long-term labels and optical sensors.* Adv Mater, **2005**, 17, 2793-2799.

[172] Kostarelos K, Lacerda L, Pastorin G, Wu W, Wieckowski S, Luangsivilay J, Godefroy S, Pantarotto D, Briand JP, Muller S, Prato M and Bianco A, *Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is dependant of functional group and cell type.* Nature Nanotechnol, **2007**, 2 (2), 108-113.

[173] Jin H, Heller DA and Strano MS, *Single-particle tracking of endocytosis and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in NIH-3T3 cells.* Nano Lett, **2008**, 8 (6), 1577-1585.

[174] Serag MF, Kaji N, Gaillard C, Okamoto Y, Terasaka K, Jabasini M, Tokeshi M, Mizukami H, Bianco A and Baba Y, *Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells.* ACS Nano, **2011**, 5 (1), 493-499.

[175] Cherukuri P, Bachilo SM, Litovsky SH and Weisman RB, *Near-infrared fluorescence microscopy of single-walled carbon nanotubes in phagocytic cells.* J Am Chem Soc, **2004**, 126, 15638-15639.

[176] Leeuw TK, Reith RM, Simonette RA, Harden ME, Cherukuri P, Tsyboulski DA, Beckingham KM and Weisman RB, *Single-walled carbon nanotubes in the intact organism : near-IR imaging and biocompatibility studies in drosophila.* Nano Lett, **2007**, 7 (9), 2650-2654.

[177] Robinson JT, Welsher K, Tabakman SM, Sherlock SP, Wang H, Luong R and Dai H, *High performance in vivo near-IR (>1 µm) imaging and photothermal cancer therapy with carbon nanotubes.* Nano Res, **2010**, 3, 779-793.

[178] Neves V, Hister E, Costa S, Tîlmaciu C, Borowiak-Palen E, Giusca CE, Flahaut E, Soula B, Coley HM, McFadden J and Silva SRP, *Uptake and release of double-walled carbon nanotubes by mammalian cells.* Adv Funct Mater, **2010**, 20, 3272-3279.

[179] Wang R, Mikoryak C, Li S, Bushdiecker D, Musselman IH, Pantano P and Draper RK, *Cytotoxicity screening of single-walled carbon nanotubes : detection and removal of cytotoxic contaminants from carboxylated carbon nanotubes.* Mol Pharmaceutics, **2011**, 8, 1351-1361.

[180] Wild E and Jones KC, *Novel Method for the direct visualization of in vivo nanomaterials and chemical interaction in plants.* Environ Sci Technol, **2009**, 43, 5290-5294.

# CHAPITRE 2

# MATERIEL ET METHODES

# A. Synthèse des DWNTs par CCVD

Les DWNTs qui ont été utilisés dans le cadre de cette thèse ont été synthétisés par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD) selon un procédé développé au CIRIMAT **[1-2]**. Cette synthèse se déroule en trois étapes principales : la préparation de la poudre de catalyseur, la synthèse des DWNTs à partir de cette même poudre et l'extraction de la poudre nanocomposite.

## A.I. Synthèse de la poudre de catalyseur $Mg_{0,99}Co_{0,0075}Mo_{0,0025}O$

### A.I.1. Préparation de la poudre de catalyseur par combustion à l'acide citrique

La poudre de catalyseur de formule $Mg_{0,99}Co_{0,0075}Mo_{0,0025}O$ a été obtenue par combustion d'une solution d'acide citrique contenant les composés suivants dans les proportions stœchiométriques correspondantes : l'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté ($(NH_4)_6Mo_7O_{24},4H_2O$), le nitrate de cobalt (II) hexahydraté ($Co(NO_3)_2,6H_2O$) et le nitrate de magnésium hexahydraté ($Mg(NO_3)_2,6H_2O$).

Dans un bécher, sont introduits dans un premier temps l'eau et l'acide citrique. Le mélange est agité et chauffé afin de dissoudre l'acide citrique. Une solution limpide jaune clair est alors obtenue. Est ensuite ajouté en premier le sel de molybdène dont la dissolution est la plus difficile. Une fois que ce composé a été dissous entièrement, les sels de cobalt et de magnésium sont ajoutés simultanément à la solution. Après environ 30 minutes d'agitation, une solution limpide, sirupeuse et de couleur rose bonbon est obtenue (**Figure 2.1. a**). Cette solution doit rester sous agitation et chauffée afin d'éviter sa cristallisation au cours de la prochaine étape.

Une fois cette solution prête, une petite fraction est versée dans un cristallisoir en verre qui sera ensuite placé dans un four à moufle pendant 15 minutes à une température de 550°C. La solution se met rapidement à bouillir (**Figure 2.1. b**), les nitrates sont réduits en $NO_{(g)}$ qui réagit rapidement avec le dioxygène de l'air pour former du $NO_{2(g)}$, d'où une émission de

vapeurs rousses. Par la réaction oxydo-réductrice qui s'y déroule et l'évaporation, la solution se transforme en un solide de couleur hétérogène (du beige au noir) léger, friable et volumineux (**Figure 2.1. c**). Celui-ci est par la suite broyé à la spatule afin d'en obtenir une poudre, forme plus adaptée à l'étape suivante de calcination.

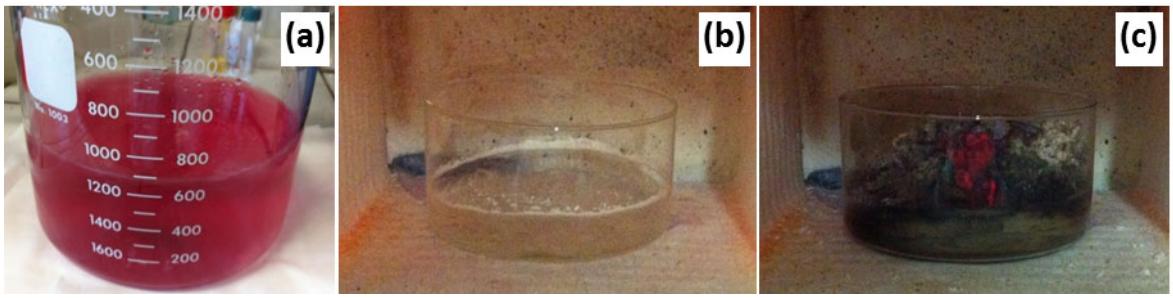



*Figure 2.1 : Photos de la solution préparée à partir de l'acide citrique et de sels métalliques à (a) t = 0, (b) t = 2 min et (c) à t = 10 min de combustion dans un four à moufle à 550°C.*

### A.I.2. Calcination de la poudre de catalyseur

L'étape de calcination permet l'élimination des dernières traces de carbone résiduel, formé au cours de la dégradation de l'acide citrique. La poudre est placée dans une grande nacelle en alumine et traitée de nouveau dans un four à moufle mais cette fois à une température de 450°C pendant 1h et sous flux d'air. La poudre de catalyseur obtenue dans cette dernière étape est homogène et de couleur écrue. C'est cette solution solide, résultant des étapes de combustion et de calcination, qui servira par la suite de catalyseur pour la synthèse des DWNTs.

## A.II. Synthèse des DWNTs par CCVD à partir de la poudre de catalyseur $Mg_{0,99}Co_{0,0075}Mo_{0,0025}O$

Entre 4 et 5 g de poudre de catalyseur $Mg_{0,99}Co_{0,0075}Mo_{0,0025}O$ sont introduits dans une nacelle en alumine, cette dernière étant ensuite positionnée au centre d'un réacteur en quartz. C'est dans ce réacteur, placé à l'intérieur d'un four tubulaire, que va se dérouler la synthèse des DWNTs par CCVD (**Figure 2.2**).

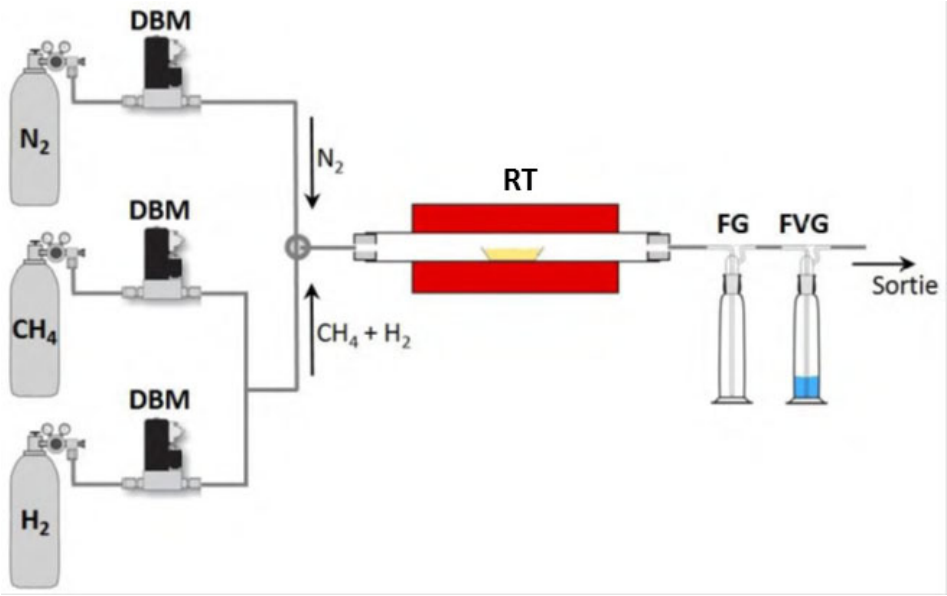



*Figure 2.2 : Schéma du montage utilisé pour effectuer la synthèse par CCVD des DWNT à partir de $CH_4$. Un réacteur tubulaire (RT), où est introduite la nacelle contenant la poudre de catalyseur, est alimenté en azote ($N_2$) ou en méthane et hydrogène ($CH_4 + H_2$). Les débits de gaz sont réglés grâce à des débitmètres massiques (DBM). Un flacon laveur permet de vérifier la circulation de gaz (FVG) et un autre d'éviter le retour d'eau dans le réacteur (FG).* ***[3]***

La procédure se déroule en trois étapes successives :

1) Montée en température jusqu'à 1000°C, à une vitesse de 5°C.min$^{-1}$, sous atmosphère de dihydrogène et de méthane (18% $CH_4$) à un débit de 15 L.h$^{-1}$. Sous le flux de $H_2$, le cobalt (II) présent dans le catalyseur va être réduit sélectivement et former des nanoparticules de cobalt (0). Le méthane, qui est la source de carbone de cette synthèse, va alors pouvoir se déposer et être décomposé au niveau de ces nanoparticules de cobalt : c'est la naissance et la croissance des DWNTs. Le Mo, probablement présent initialement sous forme d'oxyde, participe à la décomposition de la source de carbone.

2) Refroidissement jusqu'à 120°C, à une vitesse de 5°C.min$^{-1}$, sous la même atmosphère de $H_2$ et $CH_4$ à un débit de 15 L.h$^{-1}$. Au cours de cette phase va se poursuivre la croissance des DWNTs.

3) Purge sous atmosphère d'azote ($N_2$) jusqu'à température ambiante pendant 20 min. Cette dernière étape permet d'éliminer toute trace de $H_2$ et de $CH_4$, assurant ainsi une manipulation sans risque du réacteur.

L'échantillon obtenu est de couleur noire et sous forme d'un bloc de poudre compact : c'est la poudre nanocomposite (**Figure 2.3**) qui contient environ 12%m de NTCs (dont 80% de DWNTs), les 88%m restants étant constitués de la magnésie, des nanoparticules métalliques, et de carbone désorganisé. L'échantillon est par la suite cassé et broyé manuellement à l'aide d'une spatule. Plusieurs blocs de synthèse sont ainsi broyés et mélangés ensemble afin de constituer un lot de départ qui servira pour toutes les manipulations ultérieures.

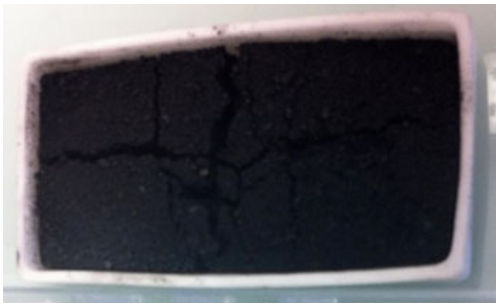


*Figure 2.3 : Photos de la poudre nanocomposite obtenue à la fin de la CCVD.*

## A.III. Extraction des DWNTs à partir de la poudre composite

La poudre nanocomposite obtenue est par la suite traitée à l'acide chlorhydrique concentré afin de dissoudre la magnésie et les nanoparticules de cobalt et molybdène facilement accessibles. À cet effet, 1 g de poudre nanocomposite est placé dans un erlenmeyer, puis mouillé avec 3-4 g d'eau désionisée puis complètement immergé dans 15 mL d'HCl à 37%. L'ouverture de l'erlenmeyer est fermée par un morceau de parafilm et le mélange est soniqué 10 min dans un bain à ultrasons. Il est alors possible d'observer une coloration bleu-vert de la solution, liée à la dissolution du Co et du Mo. Après une attente d'une nuit, le mélange est filtré sur une membrane en nitrate de cellulose (Merk Millipore, 0,45 µm), le 1$^{er}$ filtrat étant de couleur bleu-vert. Puis les DWNTs sont lavés avec de l'eau désionisée jusqu'à ce que le filtrat soit neutre. Les DWNTs extraits peuvent alors être directement oxydés (humides) ou séchés par lyophilisation en fonction de leur utilisation. Pour la lyophilisation, les DWNTs sont récupérés dans un pilulier en verre et immergés dans de l'eau désionisée. Avant la congélation, ils sont bien dispersés au bain à ultrasons pendant quelques minutes afin d'éviter la formation d'agglomérats très compacts difficiles à broyer par la suite. Rendement = 12%.

# B. Purification des DWNTs

## B.I. Oxydation

### B.I.1. Oxydation à l'acide nitrique (Méthode 1)

100 mg de DWNTs bruts humides ou secs (lyophilisés) sont introduits dans un ballon de 250 mL. Puis sont ajoutés 100 mL d'une solution d'acide nitrique $HNO_3$ 3M et un barreau aimanté. La suspension est soniquée au bain à ultrasons pendant 10 min afin de casser les agglomérats et de disperser au mieux les DWNTs bruts. La suspension est ensuite portée à reflux à 130°C pendant 24h, puis refroidie à température ambiante et l'agitation est arrêtée afin de permettre la décantation des DWNTs. La suspension est par la suite filtrée sur une membrane en polypropylène (Merk Millipore, 0,45 µm). Le filtrat sortant est de couleur jaune pâle. Les DWNTs oxydés retenus sur la membrane sont lavés avec de l'eau désionisée jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore et neutre. Les DWNTs oxydés sont récupérés dans un pilulier en verre taré dans un volume d'eau conséquent permettant leur dispersion avant congélation. Une fois l'échantillon congelé, celui-ci est lyophilisé. Rendement = 82%, obtenu pour 100 mg de DWNTs bruts secs traités.

### B.I.2. Oxydation par un mélange d'acides nitrique et sulfurique

#### *B.I.2.a. Oxydation par un mélange $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) à 70°C (Méthode 2)*

100 mg de DWNTs bruts humides ou secs (lyophilisés) sont introduits dans un ballon de 250 mL. Puis sont ajoutés 100 mL d'un mélange d'acides nitrique et sulfurique concentrés $HNO_3$ 65% /$H_2SO_4$ 95% (1 : 3) et un barreau aimanté. La suspension est soniquée au bain à ultrasons pendant 10 min afin de casser les agglomérats et de disperser au mieux les DWNTs bruts. La suspension est ensuite portée à reflux à 70°C pendant différents temps de réaction (3h, 4h, 5h ou 6h30). Une fois la réaction terminée, la suspension est refroidie à température ambiante. Le contenu du ballon est dilué lentement dans 400 mL d'eau désionisée (réaction exothermique et dégagement de vapeurs nitreuses) puis la suspension est abandonnée pour la nuit afin de favoriser la décantation des DWNTS oxydés. La suspension est par la suite filtrée sur une membrane en polypropylène (Merk Millipore, 0,45 µm). Il faut noter que le filtrat sortant est de couleur marron-orange et que la filtration est très lente. Les DWNTs

oxydés retenus sur la membrane sont lavés à l'eau désionisée jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore et neutre. Les DWNTs oxydés sont récupérés dans un pilulier en verre taré, immergés dans de l'eau désionisée et dispersés avant congélation. Une fois l'échantillon congelé, celui-ci est lyophilisé. Rendement = 18% pour 6h30.

### *B.I.2.b. Oxydation par un mélange $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) à 130°C (Méthode 3)*

Cette oxydation est basée sur le même protocole que précédemment à l'exception de la température de reflux qui est portée à 130°C pendant 5h. Beaucoup de vapeurs nitreuses se dégagent à cette température. Il est donc nécessaire d'ajouter un piège afin de neutraliser ces vapeurs (**Figure 2.4**). Une prise de vide placée en haut du réfrigérant est reliée par un tuyau à une fiole de garde contenant 80 mL d'une solution d'urée à 32,5% en masse. Du papier aluminium est enroulé tout autour du tuyau pour éviter la condensation des vapeurs nitreuses dans le tuyau. Les oxydes d'azote sont décomposés dans l'urée en $N_2$, $H_2O$ et $CO_2$ **[4]**.

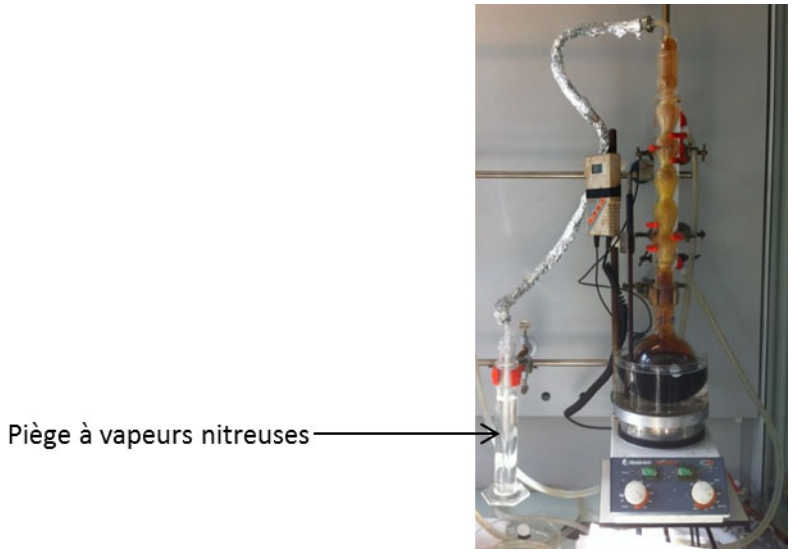



*Figure 2.4 : Photo du montage à reflux monté d'un piège à vapeurs nitreuses pour l'oxydation des DWNTs par la Méthode 3.*

Il faut attendre l'apparition des vapeurs nitreuses pour mettre le piège en place afin d'éviter la remontée de la solution d'urée dans le tuyau. Le pH de la solution d'urée est mesuré à la fin de la réaction (pH = 3) montrant ainsi l'efficacité du piège mis en place. La filtration dans ce cas est très rapide et le premier filtrat de couleur orange. Rendement = 2%.

### *B.I.2.c. Oxydation par un mélange $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) à 130°C utilisant les micro-ondes (Méthode 4)*

70 mg de DWNTs bruts humides ou secs (lyophilisés) sont introduits dans un ballon de 100 mL à col long. Puis sont ajoutés 30 mL du même mélange d'acides concentrés $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) et un barreau aimanté. La suspension est soniquée au bain à ultrasons pendant 10 min afin de casser les agglomérats et de disperser au mieux les DWNTs bruts. 10 mL de mélange d'acide sont ajoutés afin de rincer la paroi du ballon. Le ballon est placé dans un four à micro-ondes (**Figure 2.5**) à une puissance de 100W maximum et une température de 130°C pendant différents temps de réaction (15 et 30 min).



*Figure 2.5 : Photo du montage à reflux utilisant un four à micro-ondes pour l'oxydation des DWNTs par la Méthode 4.*

Il faut attendre que la puissance fixée soit atteinte (1 min) pour que le compte à rebours du temps de réaction se déclenche. Il faut 9 min pour atteindre les 130°C, température maintenue ensuite 15 ou 30 min. Une fois la réaction terminée, la suspension est refroidie à température ambiante. La suspension de DWNTs oxydés obtenue semble très stable. Le contenu du ballon est dilué lentement dans 100 mL d'eau désionisée (réaction exothermique et dégagement de vapeurs nitreuses) puis la suspension est abandonnée pour la nuit afin de favoriser la décantation des DWNTS oxydés. La suspension est par la suite filtrée sur une membrane en polypropylène (Merk Millipore, 0,45 µm). Il faut noter que le filtrat sortant est de couleur orange foncé et que la filtration est très lente. Les DWNTs oxydés retenus sur la membrane sont lavés à l'eau désionisée jusqu'à l'obtention d'un filtrat incolore et neutre.

Les DWNTs oxydés sont récupérés dans un pilulier en verre taré dans un volume d'eau conséquent permettant leur dispersion avant congélation. Une fois l'échantillon congelé, celui-ci est lyophilisé. Rendement = 22% et 12% pour 15 et 30 min respectivement.

### B.I.3. Double oxydation : combinaison de l'acide nitrique puis du mélange d'acides nitrique et sulfurique (Méthode 5)

Cette double oxydation se déroule en deux étapes successives :

1) Reflux à 130°C pendant 24h de 100 mg de DWNTs bruts dans 200 mL d'une solution de $HNO_3$ 3M (voir B.I.)
2) Reflux à 70°C pendant 5h des DWNTs obtenus dans 200 mL d'un mélange $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) (voir B.II.1.)

Il faut noter qu'aux $2^{ème}$ et $3^{ème}$ lavages de la deuxième étape, les filtrats sont noirs : des particules noires passent à travers la membrane et se déposent au fond de la fiole à vide. Ces particules correspondent à des fragments de nanotubes de carbones oxydés.

Les DWNTs doublement oxydés sont récupérés dans un pilulier en verre taré. Ils seront soit stockés à l'état humide pour des traitements ultérieurs soit lyophilisés. Rendement = 16%.

### B.I.4. Traitement thermique à sec (Méthode 6)

Les DWNTs bruts peuvent être purifiés à sec par une méthode d'oxydation sous air. Quelques mg de DWNTs bruts et secs sont placés dans une nacelle en alumine de sorte à juste recouvrir le fond. La nacelle est par la suite placée au milieu d'un four tubulaire (500°C) qui reste ouvert à l'air libre pendant 30 min. Une fois le temps écoulé, la nacelle est retirée du four. Lorsque celle-ci n'est plus chaude, les DWNTs sont récupérés à l'aide d'une solution de HCl (19%) dans un flacon en verre et laissés au repos toute une nuit. Les DWNTs sont par la suite filtrés sur une membrane en nitrate de cellulose (Merck, 0,45 µm) puis lavés à l'eau désionisée jusqu'à ce que le filtrat soit incolore et de pH neutre. Ils sont récupérés dans un pilulier en verre taré puis lyophilisés. Rendement = 8 %.

## B.II. Elimination des fragments carbonés carboxylés (CCFs) par un lavage à la soude

### *B.II.1. Reflux dans une solution de soude (Méthode A)*

100 mg de DWNTs oxydés par la Méthode 1 sont introduits dans un ballon avec 100 mL d'une solution de soude 4M. Le mélange est soniqué 10 min au bain à ultrasons afin d'obtenir une suspension homogène. La suspension est par la suite portée à reflux à 130°C pendant 24h. Une fois le temps écoulé, le mélange doit revenir à température ambiante avant filtration sur une membrane en polypropylène (Merck, 0,45 µm). Le filtrat est de couleur rose-orangé. Les DWNTs sont lavés à l'eau désionisée jusqu'à ce que le filtrat soit incolore et de pH neutre. Il faut noter qu'à chaque lavage supplémentaire la filtration est de plus en plus difficile et lente. Les DWNTs sont récupérés dans un pilulier taré et lyophilisés.
Rendement = 82 %

### *B.II.2. Incubation et ultra-sonication dans une solution de soude (Méthodes B et C)*

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour ce lavage à la soude utilisant les ultrasons.

La Méthode B consiste à introduire 100 mg de DWNTs oxydés par la Méthode 1 ainsi que 200 mL d'une solution de soude à différentes concentrations (0,01 M ; 4M ; 10M). Le mélange est par la suite soniqué au bain à ultrasons pendant différentes durées (30 min ; 3h). Les DWNTs sont filtrés sur une membrane en polypropylène (Merck, 0,45µm) puis lavés avec une solution de NaOH à 0,01 M jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Ils sont ensuite lavés à l'eau désionisée jusqu'à ce que le pH soit neutre. Les DWNTs sont récupérés dans un pilulier taré puis lyophilisés. Rendements respectifs = 15% ; 16% ; 16%.

La Méthode C, quant à elle, consiste à introduire 100 mg de DWNTs oxydés par la Méthode 2 ou 5 avec 200 mL de solution de NaOH à 4M dans un ballon. Le mélange est par la suite soniqué au bain à ultrasons pendant 1h. Une fois le temps écoulé, la suspension est filtrée sur une membrane polypropylène (Merck, 0,45 µm). Le filtrat est de couleur marron-rose. Les DWNTs sont ensuite lavés à l'eau désionisée jusqu'à ce que le filtrat soit incolore et

de pH neutre. Les DWNTs sont ensuite récupérés dans un pilulier taré puis lyophilisés. Rendements respectifs = 68% ; 63%.

# C. Fonctionnalisation des DWNTs

## C.I. Fonctionnalisation covalente

### C.I.1. Création des fonctions acides par une double oxydation suivie d'un lavage à la soude

La fonctionnalisation covalente utilisée dans cette thèse est basée sur des DWNTs oxydés par une double oxydation (Méthode 5) puis lavés par sonication dans une solution de soude (Méthode C). Les DWNTs sont ensuite lyophilisés, ceux-ci devant impérativement être secs pour les étapes ultérieures de fonctionnalisation.

### C.I.2. Activation des fonctions acides

100 mg de DWNTs oxydés (Méthode 5 C) secs sont introduits dans un ballon à col rodé de 250 mL ainsi que 40 mL de chlorure d'oxalyle. Le cholrure d'oxalyle étant très sensible à l'humidité de l'air, le ballon est immédiatement fermé à l'aide d'un bouchon à jupe. Le mélange est par la suite soniqué 10 min au bain à ultrasons. Puis le mélange est porté à reflux à 62°C sous atmosphère d'argon pendant 24h (**Figure 2.6. a**). Le chlorure d'oxalyle est ensuite distillé à 90°C afin d'en éliminer la plus grande partie (**Figure 2.6. b**). Les DWNTs activés sont ensuite séchés sous vide puis stockés sous argon. Il faut noter que le chlorure d'oxalyle doit être neutralisé (avec une solution saturée d'hydrogénocarbonate de sodium par exemple) avant d'être jeté car il pourrait réagir très violemment avec les déchets acides **[5]**.

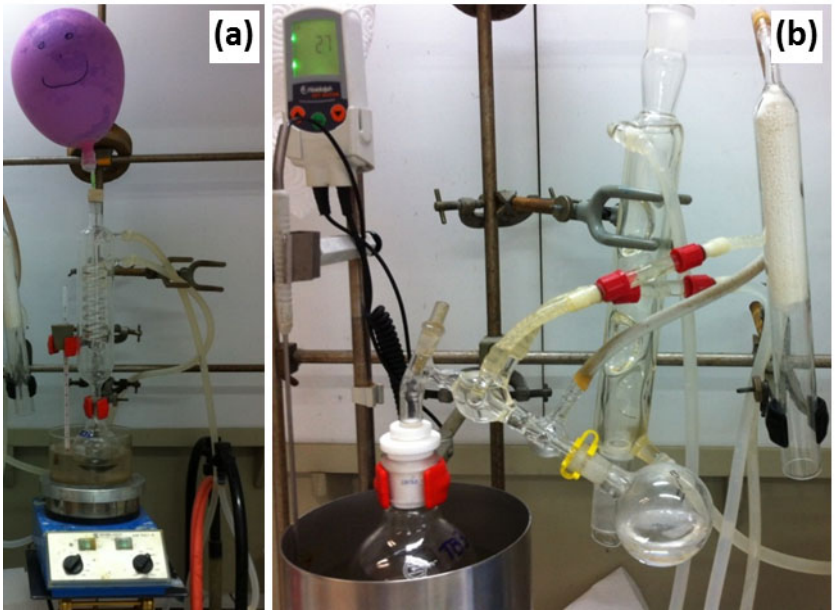



*Figure 2.6 : Photo du (a) montage à reflux pour l'activation des DWNTs oxydés par le chlorure d'oxalyle sous atmosphère d'argon et (b) montage de distillation du chlorure d'oxalyle.*

### C.I.3. Greffage d'une diamine

Toute cette étape doit impérativement être réalisée sous atmosphère inerte afin de conserver les fonctions acides activées à la surface des DWNTs.

Dans un ballon sont pesés 2 g (22,7 mmol) de 1,4-diaminobutane, puis le ballon est refermé avec un bouchon à jupe. La diamine est alors placée sous atmosphère inerte. 100 mL de tétrahydrofurane (THF) anhydre sont ajoutés à la diamine à l'aide d'une aiguille de transfert ainsi que 3,95 mL (22,7 mmol) de diisopropyléthylamine (DIEA). Cette solution de diamine/DIEA est transférée dans le ballon contenant les DWNTs activés, toujours sous atmosphère d'argon. Le mélange est soniqué 10 min au bain à ultrasons puis agité magnétiquement à 30°C pendant 96h **[5-6]**.

Le THF est ensuite distillé à 90°C. Un précipité blanc de chlorhydrate de DIEA (insoluble à froid dans le THF) se forme dans le distillat. Les DWNTs aminés sont repris dans de l'éthanol puis filtrés sur une membrane en polypropylène (Merck, 0,45 µm). Une fois que tout l'éthanol a été aspiré, les DWNTs aminés sont récupérés dans un pilulier et immergés dans de l'éthanol propre. La suspension est soniquée 10 min au bain à ultrasons puis re-filtrée. Cette série de filtration / lavage / sonication est répétée autant de fois qu'il le faut jusqu'à neutralité du filtrat. Enfin, les DWNTs sont récupérés dans un pilulier taré et lyophilisés.

### C.I.4. Greffage du fluorophore

10 mg de DWNTs aminés sont introduits dans un pilulier en verre. Une solution tampon d'hydrogénocarbonate de sodium à 0,1 M est préparée afin que le pH du milieu réactionnel se situe autour de 8,3-8,5. 9 mL de cette solution tampon sont ajoutés aux DWNTs aminés. La suspension est soniquée 15 min au bain à ultrasons puis 15 min à la sonde à ultrasons (5s ON, 3s OFF, 20% d'amplitude). Puis 1,2 mL d'une solution de fluorophore (FITC, hémicarboxonium ou Cy5 NHS Ester) sont préparés dans le DMSO à $1{,}11.10^{-2}$ M. 1,0 mL de cette solution de fluorophore est ajouté à la suspension de DWNTs aminés : la quantité de fluorophore ainsi introduite est égale à 2 fois la quantité de fonctions amines présentes à la surface des DWNTs. Les 0,2 mL restants sont conservés pour des analyses ultérieures. La suspension est soniquée 15 min à la sonotrode (5s ON, 3s OFF, 20% d'amplitude) puis 45 min au bain à ultrasons. Le pilulier est fermé hermétiquement et recouvert d'un film plastique opaque noir afin de protéger le fluorophore de la lumière. La suspension est ainsi agitée magnétiquement à température ambiante pendant 72h. La suspension est ensuite filtrée sur une membrane en polypropylène (Merck, 0,45 µm). Le filtrat est récupéré et stocké pour analyse. Les DWNTs sont repris dans le pilulier avec exactement 5 mL du solvant dans lequel le fluorophore est le plus soluble (EtOH pour le FITC, $CH_2Cl_2$ pour l'hémicarboxonium et le Cy5) puis la suspension est soniquée 10 min au bain à ultrasons. Ce cycle de filtration / récupération du filtrat / lavage / sonication est répété autant de fois qu'il le faut jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Les DWNTs sont finalement lavés à l'eau désionisée pour éliminer les traces de DMSO, puis récupérés dans un pilulier en verre taré et finalement lyophilisés.

## C.II. Fonctionnalisation non-covalente

Cette étude a pour but d'analyser l'influence des différents états de surface des DWNTs sur leur capacité à adsorber deux types de molécules : le FITC ou isocyanate de fluorescéine et la 1-pyrène-méthylamine ($PyMeNH_2$). Les différents états de surface des DWNTs correspondent à différents types de DWNTs qui sont des :

- DWNTs bruts
- DWNTs purifiés à l'air à 500°C
- DWNTs oxydés par la Méthode 1 et lavés par la Méthode A
- DWNTs oxydés par la Méthode 2 et lavés par la Méthode C

Pour les études comparatives d'adsorption du FITC et de la $PyMeNH_2$, les quantités utilisées de molécules à fixer ont été calculées de sorte que les DWNTs soient recouverts au maximum à 50%, pour éviter une saturation des solutions. Cette couverture a été évaluée à partir de la surface spécifique des DWNTs (≈ 900 $m^2/g$) et de la surface des molécules concernées.

### C.II.1. Adsorption de l'isothiocyanate de fluorescéine

5,0 mg de DWNTs de chaque type sont pesés dans des piluliers en verre. 20,27 mL d'EtOH absolu sont ajoutés. Le mélange est soniqué 10 min au bain à ultrasons. Pour avoir 50% maximum de couverture, 4,72 mL d'une solution de FITC dans l'EtOH absolu à $2{,}57.10^{-3}$M sont ajoutés à la suspension de DWNTs. Celle-ci est alors soniquée au bain à ultrasons pendant 1h puis à la sonde à ultrasons (5s ON, 5s OFF, 20% d'amplitude) pendant 15 min. Un barreau aimanté est introduit dans le pilulier qui est par la suite fermé hermétiquement et recouvert d'un film plastique opaque noir. La suspension est agitée à température ambiante pendant 48h. Les suspensions subissent ensuite 6 cycles de centrifugation (15500 g, 15 min) / lavage à l'EtOH absolu. Les surnageants sont récupérés à chaque lavage et analysés par spectroscopie UV-visible. A la fin de tous les lavages, les culots sont récupérés et lyophilisés pour les analyses ultérieures.

### C.II.2. Adsorption de la 1-pyrène-méthylamine

5,0 mg de DWNTs de chaque type sont pesés dans des piluliers en verre. 9,00 mL de THF sont ajoutés. Le mélange est soniqué 10 min au bain à ultrasons. Pour avoir 50% maximum de couverture, 1,00 mL d'une solution de 1-pyrène-méthylamine dans le THF à $1{,}87.10^{-2}$M sont ajoutés à la suspension de DWNTs. Celle-ci est alors soniquée au bain à ultrasons pendant 1h puis à la sonde à ultrasons (5s ON, 5s OFF, 20% d'amplitude) pendant 15 min. Un barreau aimanté est introduit dans le pilulier qui est par la suite fermé hermétiquement et recouvert d'un film plastique opaque noir. La suspension est agitée à température ambiante pendant 48h. Les suspensions subissent ensuite 6 cycles de centrifugation (15500 g, 15 min/ lavage au THF. Les surnageants sont récupérés à chaque lavage et analysés par

spectroscopie UV-visible. A la fin de tous les lavages, les culots sont récupérés et lyophilisés pour les analyses ultérieures.

### C.II.3. Comparaison des fonctionnalisations covalente et non-covalente : le cas du FITC

Pour cette comparaison, le protocole commun utilisé est celui qui a été décrit précédemment en C.I.4. Pour le greffage covalent du FITC, ce sont bien les DWNTs aminés qui sont utilisés (cf. C.I.4) alors que pour le greffage non-covalent ce sont les DWNTs doublement oxydés puis lavés à la soude (cf. C.I.1) qui servent de contrôle.

### C.II.4. Adsorption d'un dérivé du cholestérol : le 25-hydroxycholestérol

Pour une couverture maximum de 50%, 1,382 mL une solution mère de 25-hydroxycholestérol (25-HC) « froid » (non-radioactif) dans l'EtOH absolu à 18 mM est préparée. Trois incubations sont réalisées en parallèle avec des DWNTs bruts, des DWNTs doublement oxydés (cf. partie C.I.1) et un témoin sans DWNTs. 5,0 mg de DWNTs sont introduits dans un pilulier ainsi que 4,50 mL d'EtOH absolu. Les suspensions sont soniquées 5 min au bain à ultrasons puis 4 min à la sonde à ultrasons (5s ON, 5s OFF, 20% d'amplitude). 500 µL de la solution de 25-HC « froid » et 1,5 µL d'une solution de 25-HC-$^{3}$H « chaud » sont ensuite ajoutées. La solution témoin est constituée de 4,50 mL d'EtOH absolu, de 500 µL de la solution de 25-HC « froid » et 1,5 µL d'une solution de 25-HC-$^{3}$H « chaud » (1,5 µCi). Les trois milieux réactionnels sont agités magnétiquement à température ambiante pendant 96h. Les suspensions subissent par la suite 6 cycles de centrifugation (4000 tr.min-1, 2 min) / lavage à l'EtOH absolu / agitation au vortex (1 min). Tous les surnageants ainsi que le culot à la fin des lavages sont récupérés pour analyse.

La même expérience est réalisée uniquement avec une solution de 25-HC « froid » pour analyse par HPLC.

# D. Tests sur cellules

## D.I. Incubation en présence de macrophages de souris

150 000 macrophages murins primaires sont mis à adhérer sur lamelles pendant 2h à 37°C sous atmosphère à 5% $CO_2$. 1,0 mg de DWNTs sont dispersés dans 1,0 mL de Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) à 20% de sérum de veau fœtal (SVF). 20 µL de suspension de DWNTs sont injectés dans chaque puits pour un volume total par puits de 200 µL (concentration en DWNTs de 0,1 $mg.mL^{-1}$). Les macrophages sont incubés avec les DWNTs pendant 1h-1h30. Le milieu est ensuite retiré et les lamelles sont lavées deux fois au tampon phosphate salin (PBS, pH = 7,2). Les cellules sont fixées au paraformaldéhyde (PFA) à 3,7% pendant 30 min à température ambiante. Les lamelles sont de nouveau lavées au PBS puis fixées sur des lames en verre avec du mowiol. Les lames sont mises à sécher toute la nuit à température ambiante dans l'obscurité.

## D.II. Incubation en présence de cellules B16

30 000 cellules B16 (mélanome de souris) sont mises à adhérer dans du DMEM à 10% de SVF dans des puits séparés sur lame de verre (**Figure 2.7**) à 37°C, 5% $CO_2$.

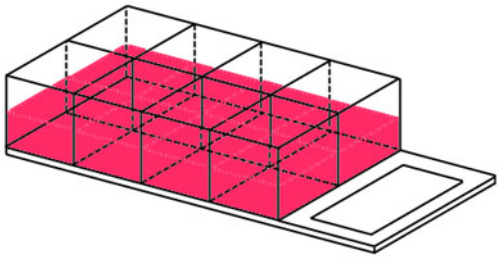


*Figure 2.7 : Schéma du montage d'incubation utilisé : système de 8 puits de culture séparés, collé sur une lame en verre permettant une incubation simultanée sur une même lame de 8 milieux de culture différents.*

Les suspensions de DWNTs sont préparées à la concentration de 1 $mg.mL^{-1}$ : dans un eppendorf de 2 mL est pesé 1,0 mg de DWNTs auquel on va ajouter 1 mL de DMEM 10% SVF. Les suspensions sont soniquées 15 min au bain à ultrasons puis 2 min à la sonde à ultrasons (5s ON, 5s OFF, 20% d'amplitude). Des solutions de fluorophores libres sont également préparées pour servir de contrôle. 0,4 mg / 0,5 mg / 0,4 mg respectivement de FITC / Cyanine / Fluorescéine sont pesés puis dilués dans 2 mL de DMEM à 10% SVF. Pour le

Cy5 NHS Ester, une solution mère à $1.10^{-4}$ M dans du tampon hydrogénocarbonate de sodium est utilisée. 100 µL de suspensions de DWNTs ou 50 µL de solutions témoins de fluorophores sont introduits dans les puits pour un volume total de 550 µL (concentration en DWNTs de 0,18 $mg.mL^{-1}$). Les lames sont ensuite mises à incuber à 37°C pendant 24h sous atmosphère à 5% $CO_2$. Une fois l'incubation terminée, le milieu de culture est aspiré, les puits sont rincés deux fois au PBS enrichi en ions $Mg^{2+}$ et $Ca^{2+}$. Les cellules sont ensuite fixées au PFA à 4% pendant 15 min à température ambiante, puis lavées au PBS. 100 µL d'une solution de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dans le PBS (5 $mg.L^{-1}$) sont ajoutées dans chaque puits et le milieu est mis à incuber 10 min à 37°C. Le colorant est ensuite retiré par aspiration et les puits rincés une fois au PBS enrichi en $Mg^{2+}$ et $Ca^{2+}$. Enfin, du mowiol est injecté dans chaque puits pour le montage et une grande lamelle en verre est placée au-dessus des puits.

### D.III. Incubation en présence de cellules MCF7

100 000 cellules MCF7 sont ensemencées sur lamelles dans du milieu RPMI à 5% SVF à 37°C et une atmosphère de 5% $CO_2$. Les suspensions de DWNTs sont préparées à 1 $mg.mL^{-1}$ dans du Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) à 5% SVF puis soniquées 15 min au bain à ultrasons et 2 min à la sonde à ultrasons (5s ON, 3s OFF, 20% d'amplitude). Pour les solutions témoins de fluorophores, le même protocole (décrit en D.I.2) est utilisé excepté que le milieu utilisé est le RPMI à 5% SVF au lieu du DMEM à 10% SVF. 50 ou 100 µL de suspensions ou de solutions témoins sont injectées dans chaque puits pour des volumes totaux respectivement de 1100 µL et de 1050 µL (concentrations en DWNTs respectivement de 0,09 $mg.mL^{-1}$ et de 0,05 $mg.mL^{-1}$). Les puits sont ensuite mis à incuber pendant 24h, 48h ou 72h à 37°C sous atmosphère à 5% $CO_2$. Le milieu est ensuite aspiré et les lamelles sont lavées trois fois au PBS enrichi en $Mg^{2+}$ et $Ca^{2+}$ (quatre fois pour 72h). Les cellules sont fixées au PFA à 3,7% pendant 15 min à température ambiante. Les lamelles sont de nouveau lavées trois fois au PBS. Les lamelles sont montées sur lame en verre avec du mowiol contenant du DAPI (0,1%). Les lames sont enfin mises à sécher 24h au réfrigérateur. Chacune des conditions testées est réalisée en duplicat.

# E. Caractérisation

## E.I. Caractérisations spectroscopiques et microscopie électronique

### E.I.1. Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman constitue avec la spectroscopie infrarouge l'une des techniques de spectroscopie de vibration. Pour observer l'effet Raman, un échantillon est éclairé par un faisceau de lumière monochromatique, ou radiation excitatrice, qui n'est autre qu'une source laser. Une fraction des photons de cette radiation est réfléchie ou absorbée par l'échantillon alors qu'une fraction bien plus faible est diffusée dans toutes les directions de l'espace. Parmi les photons diffusés, la plupart ont la même fréquence $\nu_0$ que le rayonnement excitateur : c'est la diffusion Rayleigh. Pour seulement un photon diffusé sur un million, un changement de fréquence est observé : c'est l'effet Raman. Celui-ci est le résultat de l'excitation d'une molécule de son état fondamental vers un état électronique virtuel induit par la lumière monochromatique. Lorsque la molécule revient à son état fondamental, celle-ci émet un photon d'énergie différente qui est détecté et comparé au signal de départ. La diffusion Raman n'est possible que s'il y a un changement de polarisabilité de la molécule. Si l'on considère $\nu_d$ la fréquence de ce type de photon, deux cas sont possibles :

$\nu_d < \nu_0$ $\quad \nu_d = \nu_0 - \nu_v$ C'est le cas de la diffusion Raman Stokes

$\nu_d > \nu_0$ $\quad \nu_d = \nu_0 + \nu_v$ C'est le cas de la diffusion Raman anti-Stokes.

Dans les deux cas, les écarts de fréquence $\nu_v$ sont égaux aux fréquences de vibration, actives en Raman, de la molécule considérée.

Les unités couramment utilisées pour la caractérisation des spectres Raman sont : en abscisse, le nombre d'onde $\nu$ exprimé en $cm^{-1}$ (l'inverse de la longueur d'onde), et en ordonnée, l'intensité en nombre de coups **[7]**.

Dans le cas des NTCs, quatre modes de vibrations sont caractéristiques.

- Les RBM (Radial Breathing Mode) ou modes de respiration ou modes de vibration radiale. Ils se situent toujours aux faibles nombres d'onde entre 100 et 300 $cm^{-1}$. La position de chacune de ces bandes est directement reliée au diamètre ainsi qu'à une chiralité (n,m) spécifique des NTCs correspondants **[8]**.

- La bande D ou bande de Désordre se situe entre 1320 et 1340 $cm^{-1}$. Comme son nom l'indique, cette bande est proportionnelle tant en largeur qu'en intensité aux défauts présents dans la structure de carbone $sp^2$. Elle est donc directement reliée à la quantité de C $sp^3$ présent dans ce réseau de carbone.

- La bande G ou bande Graphite se situe entre 1575 et 1590 $cm^{-1}$. Elle est spécifique au réseau hexagonal de carbone $sp^2$ donc caractéristique du graphite et des NTCs.

- La bande G' ou 2D se situe entre 2620 et 2640 $cm^{-1}$. Elle correspond à la deuxième harmonique de la bande D. Alors que l'intensité de la bande D est proportionnelle à la quantité de défauts présents dans la structure du matériau, celle de la bande G' n'est quant à elle pas affectée par ce facteur.

Dans le cadre de cette thèse, la spectroscopie Raman a été effectuée sur un microscope confocal Raman Labram HR800 Horiba Yvon Jobin.
La préparation de l'échantillon dépend du type de matériau analysé. S'il s'agit d'un produit chimique organique sous forme de poudre, celui-ci est directement placé et écrasé entre deux lames en verre. La lame sur laquelle est resté collé le plus d'échantillon est conservée pour l'analyse. S'il s'agit de NTCs, une suspension peu concentrée est préparée dans de l'éthanol. Quelques gouttes de suspension sont déposées sur une lame en verre, puis l'éthanol est évaporé sous une lampe infrarouge pour qu'il ne reste plus qu'un dépôt fin collé à la lame de verre.

Les paramètres expérimentaux utilisés pour toutes les caractérisations de routine des DWNTs synthétisés et fonctionnalisés sont les suivants :

- Laser λ = 633 nm,
- Filtre de 10% (D1),
- Diamètre de trou de 100 µm,
- Réseau de 600 traits,
- 5 acquisitions (à des positions différentes sur l'échantillon analysé),
- 5 s d'exposition,
- 5 accumulations,
- Mode multifenêtre de 10 à 3000 $cm^{-1}$.

Les analyses Raman des DWNTs fonctionnalisés, effectuées au Laboratoire Charles Coulomb à Montpellier, ont été réalisées sur un spectromètre Horiba Scientific iH550 dans les conditions suivantes :

- Laser λ = 457 nm pour la fluorescéine (ou FITC), et λ = 725 nm pour la cyanine Cy*,
- Diamètre de trou de 200 µm,
- Réseau de 1800 traits pour la fluorescéine (ou FITC), et de 1200 traits pour la streptocyanine Cy*,
- 1 acquisition,
- 300 s d'exposition,
- 2 accumulations.

La microscopie confocale Raman est traitée ultérieurement dans la partie E.IV.3.

### E.I.2. Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie infrarouge (IR) est basée sur l'absorption résultant de phénomènes de vibration et de rotation des molécules. Une molécule ne peut absorber un rayonnement infrarouge et entrer en résonance vibrationnelle que si son moment dipolaire peut varier.
Les spectres d'absorption IR permettent ainsi de déterminer à la fois la nature des liaisons chimiques composant une molécule et sa structure moléculaire **[9]**.

Les échantillons de DWNTs à analyser ont été préparés sous forme de pastilles à base de KBr. Pour cela, environ 0,5 mg de DWNTs secs est mélangé à 100 mg de KBr préalablement séché à l'étuve, et le mélange est broyé au mortier et pilon afin d'obtenir le mélange le plus homogène possible. S'il y a trop de DWNTs dans la pastille, la lumière ne peut plus passer et aucun signal ne peut être enregistré. S'il y a trop peu de DWNTs, le signal enregistré est très faible et les bandes caractéristiques ne sont pas discernables. Une fois le mélange effectué, celui-ci est déposé dans un moule à pastiller puis soumis à une forte pression dans une presse hydraulique. La pastille est ensuite extraite du moule (elle doit avoir une couleur gris-clair) et fixée dans un porte-échantillon. Celui-ci est alors placé dans le compartiment de mesure d'un spectromètre FT-IR Spectrum Two de Parkin Elmer. Le blanc est réalisé sur l'air. Quatre scans entre 600 et 4000 $cm^{-1}$ sont effectués pour chacun des échantillons. Les résultats sont enregistrés sous la forme de spectres (transmittance en fonction du nombre d'onde) via le logiciel Spectrum et analysés de façon qualitative uniquement.

### E.I.3. Spectroscopie UV-visible-IR

Le principe de la spectroscopie UV-visible repose sur l'absorption de la lumière par des espèces chimiques (essentiellement des formes ioniques de métaux de transition, des composés organiques fortement conjugués et des complexes) dans le domaine allant de 190 à 800 nm. Soumis à un rayonnement de cette gamme de longueurs d'onde, les différentes espèces chimiques peuvent subir une ou plusieurs transitions électroniques. Les analyses peuvent être réalisées à l'état liquide (le plus courant), solide ou gazeux.

Si une partie des photons est absorbée, l'intensité du rayonnement UV-visible transmis par le milieu va diminuer. Cette diminution sera d'autant plus importante que le nombre de molécules interagissant avec le rayonnement sera grand. La spectroscopie UV-Visible est ainsi basée sur la loi de Beer-Lambert :

$$A_\lambda = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = l\varepsilon_\lambda c$$

Avec $A_\lambda$ l'absorbance du milieu à la longueur d'onde λ (en nm)

$I_0$ l'intensité lumineuse incidente

$I$ l'intensité lumineuse transmise

$\varepsilon_\lambda$ le coefficient d'extinction molaire spécifique à la longueur d'onde λ (en $L.mol^{-1}.cm^{-1}$)

$l$ la longueur de la cuve (en cm)

$c$ la concentration en molécules absorbantes à la longueur d'onde λ (en $mol.L^{-1}$)

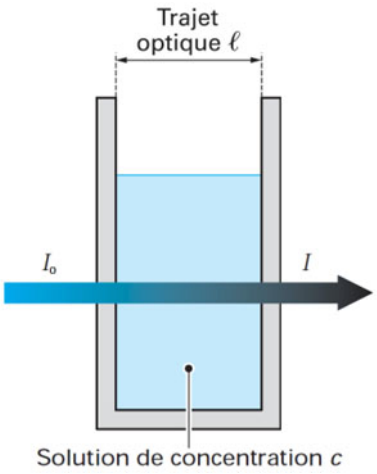



*Figure 2.8 : Schéma d'une cellule d'absorption d'un spectrophotomètre UV-visible.*

D'après cette loi, l'absorbance $A_\lambda$ est ainsi proportionnelle à la concentration de l'espèce qui absorbe à la longueur d'onde λ. Une droite d'étalonnage peut alors être construite pour cette espèce à la longueur d'onde λ : plusieurs solutions de l'espèce sont préparées à différentes concentrations connues et leurs absorbances sont mesurées. Les points expérimentaux sont placés sur un graphe $A_\lambda = f(c)$ et permettent le tracé d'une droite de pente $\varepsilon_\lambda$. Une fois le coefficient d'extinction molaire connu pour une longueur d'onde, la mesure de l'absorbance à cette même longueur d'onde d'une solution de concentration inconnue permet de calculer très simplement à partir de la loi de Beer-Lambert la concentration de cette solution **[10]**.

Toutes les mesures UV-visibles ont été effectuées sur un spectrophotomètre à double faisceau Varian CARY-300 Bio équipé d'un module à effet Peltier et les spectres ont été traités sur le logiciel CARY Win.

Les caractérisations réalisées au laboratoire Charles Coulomb à Montpellier sur les échantillons de DWNTs fonctionnalisés ont quant à elles été effectuées sur un

spectrophotomètre Cary 5000-UV-Vis (175-3300 nm). Les suspensions de DWNTs fonctionnalisés à analyser ont été préparées selon le protocole suivant : 5 mg de DWNTs sont immergés dans 10 mL de $D_2O$ à 1% de désoxycholate de sodium (DOC), puis dispersés par sonication 30 min au bain à l'ultrasons (45 kHz, 100W) et 10 min à la sonde à ultrasons (pulse de 2s, amplitude de 40 W). Les suspensions sont par la suite centrifugées pendant 10h à 1450 rpm (≈ 20000 g) et les surnageants sont alors analysés.

### E.I.4. Spectroscopie de photoluminescence

La spectroscopie de photoluminescence est très utilisée dans l'étude des transitions optiques des semi-conducteurs du fait que cette technique est très sensible, non-destructive et ne nécessite pas de contacts électriques. Elle ne fournit des informations que sur les niveaux d'énergies les plus bas du matériau étudié **[11]**.

Le comportement des solides est régi par la théorie des bandes dont le principe est le suivant : quelques électrons dans les solides sont mobiles et se positionnent soit au niveau de la bande de valence (basse énergie) lorsqu'ils sont dans leur état fondamental, soit au niveau de la bande de conduction (haute énergie) lorsqu'ils sont excités. Concernant les solides de type conducteurs (comme les métaux), ces deux bandes se chevauchent, permettant ainsi aux électrons de circuler librement dans le solide. Pour ce qui est des semi-conducteurs et des isolants, les bandes de valence et de conduction sont séparées par une bande d'énergie interdite, aussi connue sous le nom de « bande gap ». Cette bande est beaucoup plus large dans le cas des isolants ($E_g$ > 3,5 eV) que dans celui des semi-conducteurs (0 < $E_g$ ≤ 3,5 eV) **[12]**.

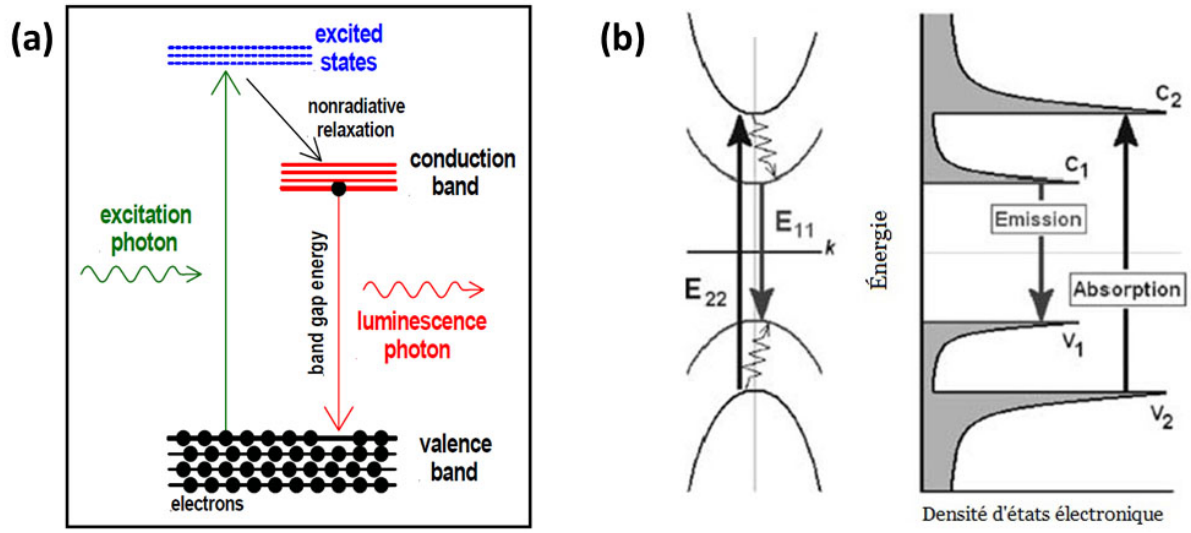



*Figure 2.9 : Schémas du processus de photoluminescence dans (a) un solide semi-conducteur **[13]** et (b) un nanotube de carbone **[14]**.*

Lors d'une expérience de photoluminescence, l'échantillon est soumis à une excitation lumineuse par un faisceau laser. Si le photon a une énergie plus grande que celle de la bande gap, il peut être absorbé et faire passer un électron de la bande de valence vers la bande de conduction (**Figure 2.9. a**). L'électron possède alors généralement un surplus d'énergie qu'il libère de façon non-radiative pour retomber au niveau d'énergie le plus bas de la bande de conduction (LUMO = Lowest Unoccupied Molecular Orbital). L'électron redescend ensuite au niveau de plus haute énergie de la bande de valence (HOMO = Highest Occupied Molecular Orbital) en émettant un photon de longueur d'onde caractéristique de la différence d'énergie entre les deux états mis en jeu, à savoir l'énergie de la bande gap $E_g$ : ce phénomène correspond à la recombinaison radiative des excitons **[13]**.

Lorsqu'une molécule est excitée, la répartition énergétique de ses électrons est modifiée, donc la longueur de ses liaisons également, ce qui conduit à une différence entre les longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission, aussi appelée « déplacement de Stokes » **[12]**. Les transitions de plus hautes énergies peuvent être étudiées par spectroscopie d'excitation de la photoluminescence (PLE). Selon ce mode, l'énergie excitation du laser est modifiée de façon continue et l'énergie de détection est fixée dans la raie d'émission du semi-conducteur. Si l'énergie d'excitation du laser correspond à une transition optique du spectre d'absorption du semi-conducteur, le signal de

photoluminescence augmente alors. La PLE et la spectroscopie d'absorption sont donc analogues, dans la mesure où les processus non-radiatifs de relaxation sont négligeables.

Pour être actifs en photoluminescence, les NTCs doivent être semi-conducteurs mais il faut également qu'ils soient individualisés ou sous forme de petits faisceaux ne comportant pas de NTCs métalliques. En effet, même si un NTC semi-conducteur contenu dans un faisceau absorbe un photon, la présence d'un NTC métallique dans ce même faisceau va conduire à une recombinaison non-radiative des excitons par transfert de charge. Il est donc préférable de travailler sur des suspensions bien dispersées de NTCs. Si l'excitation est réalisée avec une énergie égale à celle de la bande gap ($E_{11}$ pour les NTCs) (**Figure 2.9. b**), alors le déplacement de Stokes est très faible (de l'ordre de quelques meV) et l'énergie de la radiation légèrement différente. La résonance d'une bande supérieure avec l'énergie du photon émis permet de tirer des conclusions très spécifiques quant à la chiralité des NTCs semi-conducteurs grâce au diagramme de Kataura **[14]**.

Les analyses de spectroscopie de photoluminescence ont été effectuées au laboratoire Charles Coulomb à Montpellier sur un montage comprenant un spectromètre Horiba Scientific Symphony II Linear InGaAs Array, un filtre passe-bande pour raie laser (LLTF) Contrast VIS-2 et un laser à spectre supercontinu SC-4x0 (**Figure 2.10**). Les longueurs d'onde d'excitation sont comprises entre 400 et 1000 nm avec un pas de 3 nm. Ce sont les mêmes suspensions de DWNTs qui avaient été préparées pour la caractérisation par spectroscopie UV-Vis-NIR qui ont été utilisées (voir partie E.I.3).

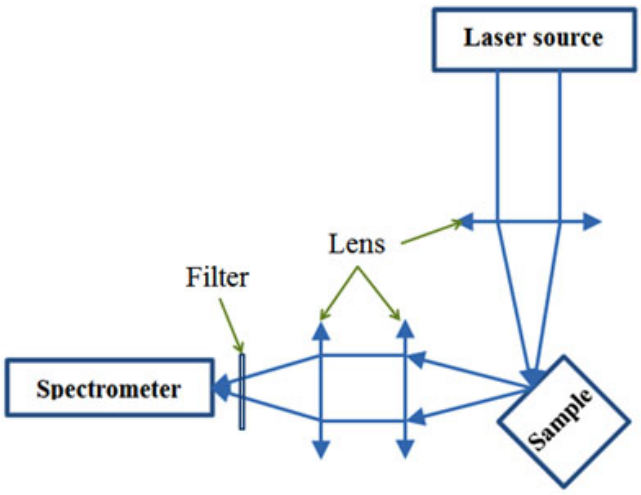



*Figure 2.10 : Schéma du montage utilisé pour les mesures de photoluminescence.*

### E.I.5. Microscopie électronique à transmission

La microscopie électronique à transmission (MET) est basée sur la diffraction des électrons. Un faisceau électronique est produit au niveau d'une source ou canon à électrons (dans notre cas un filament de tungstène) (**Figure 2.11**) puis repris par un système de lentilles magnétiques, dites condenseur, destiné à transférer et concentrer le faisceau sur l'échantillon. L'épaisseur, la densité et la nature chimique de l'échantillon sont trois paramètres influençant l'interaction entre le faisceau électronique et l'échantillon : il en résulte une image plus ou moins contrastée. Les électrons ainsi transmis à travers l'échantillon sont repris par une lentille « objectif » magnétique qui forme une première image intermédiaire. Cette image est par la suite reprise par des lentilles dites « intermédiaire » et « de projection » qui donnent l'image finale agrandie observable sur l'écran fluorescent se situant au bas de la colonne. La modification des courants traversant les lentilles « objectif » et « de projection » permet respectivement la mise au point et le choix du grandissement **[15]**.

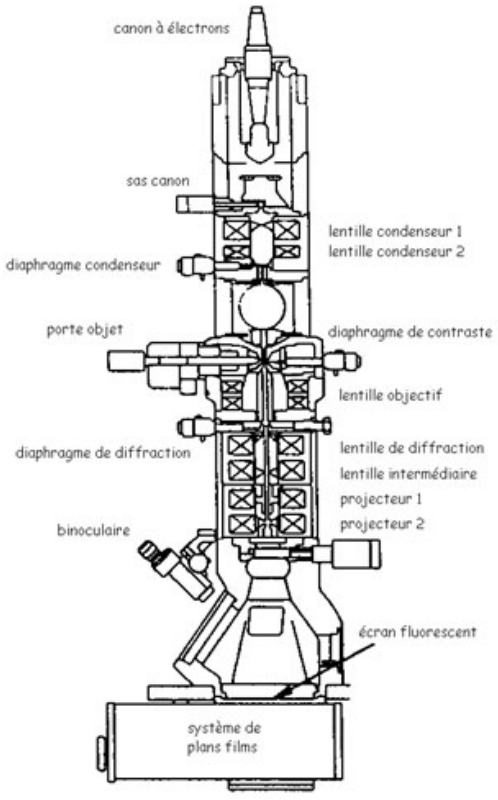



*Figure 2.11 : Coupe d'une colonne de microscopie électronique à transmission **[16]**.*

Dans le cadre de cette thèse, toutes les images de microscopie électronique à transmission ont été prises sur les microscopes JEOL TEM 1400 pour le MET de routine et sur le JEOL TEM 2100 pour les images en haute résolution, à une tension de 120 kV. Pour la préparation des échantillons de NTCs à observer, une suspension très peu concentrée (très légère teinte grise) est préparée dans de l'éthanol. 1 ou 2 gouttes de cette suspension sont déposées à l'aide d'une pipette pasteur sur une grille de MET à trous (Lacey Carbon 400 Mesh Cu), cette dernière étant ensuite mise à sécher quelques minutes à température ambiante sur un papier absorbant.

## E.II. Analyses chimiques

### E.II.1. Microanalyse élémentaire

La détermination des teneurs massiques en carbone, oxygène, azote et soufre sur des échantillons de DWNTs et de poudre composite a été réalisée sur des microanalyseurs organiques conçus par le Service Central d'Analyse du CNRS de Lyon **[17]**.

Pour le dosage de C et N, l'échantillon subit une combustion totale à 1050°C sous un flux d'hélium/oxygène et sous pression. Le carbone, l'hydrogène et l'azote sont respectivement transformés en dioxyde de carbone, eau et divers oxydes d'azote. Les oxydes d'azote sont réduits en azote moléculaire qui peut alors être séparé sur une colonne chromatographique du $CO_2$ et de l'eau issus de la combustion. Les quantités de $CO_2$ et d'azote sont enfin déterminées grâce à détecteur à conductibilité thermique. Les incertitudes absolues de mesure pour la teneur en C dans la poudre nanocomposite et les DWNTs sont respectivement de 0,30 et 0,50%. En ce qui concerne l'azote, l'incertitude absolue de mesure au niveau des DWNTs fonctionnalisés est de 0,30%.

Pour le dosage de l'oxygène, l'échantillon subit une pyrolyse totale à 1080°C sous flux d'azote. L'oxygène des composés issus de la pyrolyse est alors transformé en monoxyde de carbone par passage sur du charbon actif à 1120°C, qui peut alors être quantifié par un détecteur infrarouge spécifique du CO. L'incertitude absolue de mesure pour les échantillons de DWNTs est de 0,30%.

Pour le dosage du S, l'échantillon est soumis à une combustion totale à 1350°C sous flux d'oxygène. Le soufre est alors transformé en dioxyde de soufre qui est quantifié à l'aide d'un détecteur infrarouge spécifique avec une incertitude absolue de mesure de 0,30%.

Pour la détermination des teneurs en métaux (% en Co, Mo), les échantillons de poudre nanocomposite et de DWNTs ont été minéralisés par voie humide puis analysés par spectrométrie d'émission atomique à source plasma (ICP-AES, SCA - Lyon) avec une incertitude relative de 2%.

### E.II.2. Dosage indirect des fonctions acides

Afin de quantifier le nombre de fonctions acides présentes sur les parois des DWNTs de départ (bruts) puis fonctionnalisés, deux préparations sont nécessaires : celle des DWNTs à analyser et celle de témoins ou références.

Pour cela, 1 L d'eau désionisée est mis à bouillir sur une plaque chauffante afin d'en éliminer les gaz dissous, puis mis à refroidir à température ambiante dans un récipient clos pour éviter la redissolution des gaz. Une fois l'eau à température ambiante, 1 L de solution de NaOH à $10^{-2}$ mol.L$^{-1}$ est préparée dans une fiole jaugée de 1 L à partir d'un titrisol et de l'eau désionisée précédemment dégazée.

10,0 mg de chaque échantillon de DWNTs à analyser sont pesés dans des piluliers en verre de 15 mL. 10,00 mL de solution de NaOH à $10^{-2}$ mol.L$^{-1}$ (excès connu) sont introduits dans chacun des piluliers puis chacune des suspensions est soniquée au bain à ultrasons pendant 10 min pour disperser les DWNTs. Le contenu de chaque pilulier est ensuite transvasé dans des tubes Schlenk, dans lesquels est rajouté un petit barreau aimanté. Les DWNTs secs ne sont pas introduits directement dans les tubes Schlenk, car les DWNTs s'envolent et recouvrent entièrement la paroi du tube en verre même sous la protection de la barre antistatique. Les suspensions sont ensuite saturées de $N_2$, puis les tubes Schlenk sont fermés hermétiquement et les suspensions mises à agiter pendant 72h à température ambiante.

Deux solutions références identiques sont préparées en parallèle : 10,00 mL de solution NaOH à $10^{-2}$ mol.L$^{-1}$ et un petit barreau aimanté sont introduits dans un tube Schlenk (sans DWNTs). La solution est saturée et en $N_2$, le tube est fermé et la solution est agitée pendant 72h. Ces solutions de référence sont essentielles à cause de la carbonatation naturelle de la

solution de soude au cours du temps ($2\ OH^- + CO_2 \rightarrow CO_3^{2-} + H_2O$). En effet, les sauts de pH correspondant aux réactions des ions $OH^-$ et $CO_3^{2-}$ avec $H_3O^+$ ont lieu quasiment dans la même zone donc il est nécessaire de soustraire la participation des ions $CO_3^{2-}$ au résultat final du dosage.

Tous les dosages de fonctions acides ont été réalisés sur un titrimètre Metrohm 808 Titrando. Au bout des 72h d'agitation, le contenu de chacun des tubes Schlenk est transféré dans un flacon en verre de 30 mL. Les tubes Schlenk sont rincés avec un minimum d'eau désionisée (2-3 mL). Les suspensions sont alors dosées par une solution d'acide chlorhydrique à $10^{-2}$ mol.$L^{-1}$.

La quantité de fonctions acides présentes sur la paroi des DWNTs peut alors être déterminée de façon indirecte par la relation suivante :

Qté de fonctions acides (mmol/g NTC) = $\frac{10^{-2}(mol.L^{-1}) \times (V_{éq,ref} - V_{éq,échantillon})(mL)}{m_{NTC}\,(g)}$

### E.II.3. Chromatographie liquide à haute performance et à haute pression

La chromatographie liquide à haute performance ou HPLC (High Performance Liquid Chromatography) est un outil analytique de séparation performant pour l'étude de solutés peu volatils ou thermodégradables, donc complémentaire à la chromatographie en phase gazeuse (CPG). La chromatographie en phase liquide (CPL) est basée sur les mécanismes d'interaction qui ont lieu entre deux phases non miscibles :

- La phase stationnaire, le plus souvent solide : silice vierge ou greffée, polymère moléculaire ou échangeur d'ions,
- La phase mobile, ici à l'état liquide : solvant pur ou mélange de solvants.

Le soluté injecté est soumis à plusieurs forces au cours de l'analyse (**Figure 2.12**). D'une part, il est entrainé par la phase mobile dans laquelle il a été solubilisé, et d'autre part, il interagit plus ou moins avec la phase stationnaire en fonction de son affinité avec elle (caractère hydrophile/hydrophobe, chargé/neutre) **[18-19]** : c'est une chromatographie de partage.

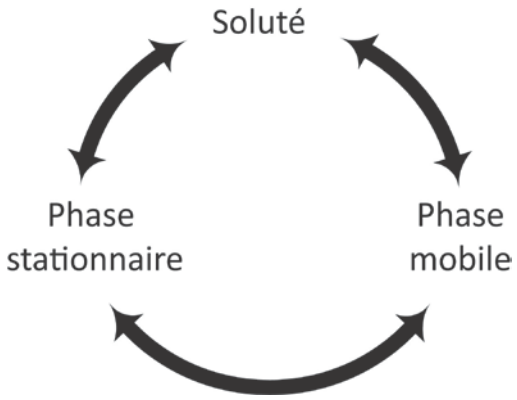



*Figure 2.12 : Schéma des interactions existant en chromatographie en phase liquide.*

Pour que la séparation d'un mélange de solutés soit correcte en CPL, il faut que les solutés aient une affinité suffisante avec la phase stationnaire pour sortir de la colonne après le volume mort, qu'ils soient repérés par les différents détecteurs possibles (absorption UV-Visible, UV à barrette de diodes, fluorescence, indice de réfraction, spectrométrie de masse), que les pics correspondant à chacun de ces composés soient bien séparés (bonne sélectivité), bien symétriques et peu étalés (efficacité).

Afin d'améliorer la détectabilité de faibles quantités injectées et la capacité de séparer un grand nombre de composés dans une fenêtre de temps donnée, il est nécessaire d'obtenir les pics les plus fins possible. Ainsi pour obtenir une colonne de chromatographie plus efficace, le diamètre des particules de la phase stationnaire a été diminué, réduisant ainsi la distance que doit parcourir une molécule de soluté entre deux sites d'interaction de la phase stationnaire : c'est la chromatographie liquide à haute performance ou à haute résolution (HPLC).

Cependant, l'utilisation de particules de diamètre plus petit conduit à une augmentation de la perte de charge, donc une diffusion plus lente des solutés à séparer dans la phase stationnaire. Un système de chromatographie liquide à haute pression (UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography) a alors été mis au point par Waters afin d'accélérer les analyses sans en altérer l'efficacité ni la perte de charge.

Dans le cadre de cette thèse, les analyses par HPLC ont été effectuées sur une chaîne HPLC Waters Alliance 2695 équipé d'un détecteur UV Waters 2487, avec une colonne Waters XBridge Shield RP18, de granulométrie de 3,5 µm et de dimensions 2,1 x 100 mm. Les

conditions de séparation déterminées sont les suivantes : une élution isocratique acétonitrile (ACN) / eau à 0,1% d'acide formique (55/45), un débit de 300 µL.min$^{-1}$, un volume d'injection de 10 µL et une durée d'analyse de 4,5 min.

Pour les analyses par UPLC, l'appareil utilisé est un Acquity UPLC H-Class équipé d'un détecteur à barrettes de diode. Plusieurs types de colonnes ont été utilisés en fonction des mélanges de solvants les plus adaptés aux composés analysés.

- *Pour le FITC :* colonne Acquity BEH C18, granulométrie 1,7 µm, dimensions 2,1 x 50 mm. Elution isocratique ACN/$H_2O$ (55/45), débit 0,6 mL.min$^{-1}$, un volume d'injection de 2,0 µL, durée d'analyse = 0,6 min, Température de colonne = 40°C, λ = 280 nm.
- *Pour la cyanine (produit de l'hémicarboxonium) :* colonne Acquity BEH C18, granulométrie 1,7 µm, dimensions 2,1 x 50 mm. Elution isocratique ACN/$H_2O$ (4g.L$^{-1}$ d'acétate d'ammonium) (60/40), débit 0,6 mL.min$^{-1}$, un volume d'injection de 2,0 µL, durée d'analyse = 0,7 min, Température de colonne = 40°C, λ = 398 nm.
- *Pour le Cy5 NHS Ester :* colonne Acquity BEH HILIC, granulométrie 1,7 µm, dimensions 2,1 x 50 mm. Elution isocratique ACN/$H_2O$ (4g.L$^{-1}$ d'acétate d'ammonium) (80/20), débit 0,6 µL.min$^{-1}$, un volume d'injection de 2,0 µL, durée d'analyse = 0,6 min, Température de colonne = 40°C, λ = 287 nm.
- *Pour le 25-HC :* colonne Acquity BEH C18, granulométrie 1,7 µm, dimensions 2,1 x 50 mm. Elution isocratique ACN/$H_2O$ (80/20), débit 0,6 mL.min$^{-1}$, un volume d'injection de 2,0 µL, durée d'analyse = 0,8 min, Température de colonne = 40°C, λ = 202 nm.

### E.II.4. Tests de Kaiser

Le test de Kaiser permet de quantifier le nombre de fonctions amines primaires présentes dans un échantillon, et plus particulièrement dans notre cas, le nombre de fonctions amines greffées sur la surface des DWNTs fonctionnalisés **[20]**. Il s'agit d'un test colorimétrique basé sur la formation d'un complexe (pourpre de Ruhemann) en présence de fonctions amines.

Quatre solutions sont préparées :

Solution ① = 10 g de phénol dans 20 mL EtOH absolu

Solution ② = 2 mL d'une solution aqueuse de cyanure de potassium (1 mM) dissous dans

98 mL de pyridine. KCN 1 mM = 6,5 mg KCN + 100 mL $H_2O$

Solution ③ = 1 g de ninhydrine dans 20 mL EtOH absolu

Solution ④ = EtOH à 60% en volume dans $H_2O$

Dans un tube eppendorf à vis, sont introduits successivement :

- ⇨ entre 500 µg et 1 mg de DWNTs fonctionnalisés
- ⇨ 75 µL de solution ①
- ⇨ 100 µL de solution ②
- ⇨ 75 µL de solution ③

Les suspensions sont soniquées au bain à ultrasons pendant 10 min puis chauffées dans un bain sec à 100°C pdt 7 min. Les suspensions sont ensuite transvasées dans des piluliers et diluées dans 4,750 µL de solution ④. Elles sont finalement mises à décanter afin de récupérer le surnageant pour analyse en spectroscopie UV-visible.

Si des fonctions amines sont présentes, on doit observer une bande d'absorption à λ = 570 nm, bande correspondant au pourpre de Ruhemann (**Figure 2.13**). Le test est répété deux fois pour un même échantillon.

La valeur de l'absorbance de la bande à λ = 570 nm est proportionnelle à la quantité de fonctions $NH_2$ présentes à la surface des DWNTs.
Pour la mesure du blanc, une solution témoin est préparée en reprenant toutes les étapes suivies précédemment mais sans les DWNTs.

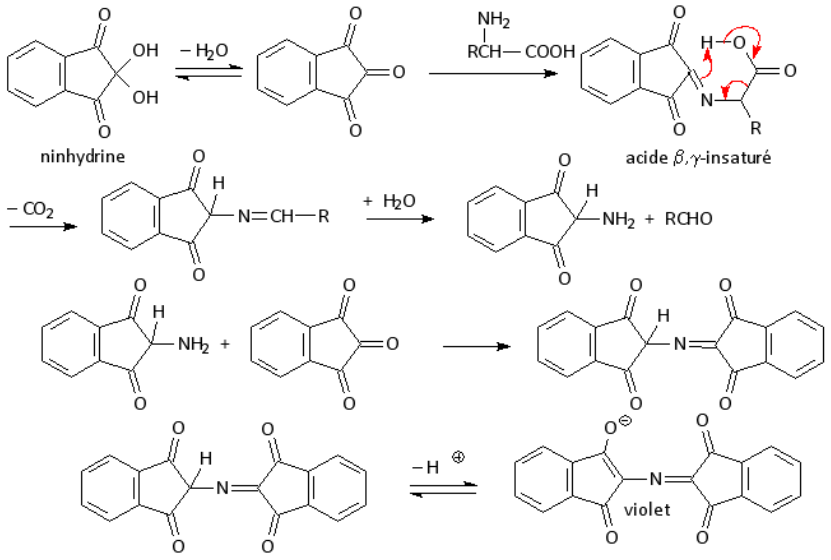



*Figure 2.13 : Mécanisme de la formation du pourpre de Ruhemann **[21]**.*

Sachant que le coefficient d'extinction molaire du pourpre de Ruhemann est égal à ε = 15000 L.mol$^{-1}$.cm$^{-1}$ et que la cuve de mesure est de 1 cm, pour une dilution à 5 mL, la quantité de fonctions amines est calculée selon la relation suivante :

$$\text{Quantité de fonctions amines (µmol/g DWNTs)} = \frac{Abs_{mesurée} \times dilution(mL) \times 10^6}{\varepsilon \times l \times \text{masse d'échantillon(mg)}}$$

Il faut tout de même noter la possibilité d'interférences avec la présence des DWNTs. En effet, une partie du complexe formé pourrait être piégé par les DWNTs du fait de l'aromaticité de la molécule, et le test de Kaiser minimiserait alors la quantité de fonctions amines présentes. Pour une étude comparative de DWNTs fonctionnalisés, nous pouvons considérer que cet effet sera le même dans tous les cas et donc moins problématique que ce qui a été envisagé.

## E.III. Autres analyses

### E.III.1. ATG

L'analyse thermogravimétrique (ATG) permet la caractérisation de matériaux par mesure de la variation de leur masse en fonction de la température et/ou du temps **[22]**. Les mesures sont effectuées dans notre cas sur un SETARAM TAG 16. L'appareil est constitué :

- d'une balance de haute précision de type symétrique suspendu, dont le fléau à compensation magnétique se situe dans la partie supérieure de l'appareil,
- de deux enceintes étanches en alumine autour de chacune des suspentes de la balance permettant d'exposer l'échantillon à une atmosphère donnée,
- de deux fours autour de chacune des enceintes afin d'en contrôler la température.

A l'extrémité de chacune des suspentes de la balance est accroché un creuset en platine, l'un étant destiné à recevoir l'échantillon et l'autre la référence.
Les caractéristiques de cette thermobalance, avec sa symétrie et ses deux fours séparés, permettent de compenser en partie plusieurs facteurs perturbant les mesures de variations de masse tels que la poussée d'Archimède et les turbulences ou phénomènes de convection dus au flux et au chauffage du gaz **[23]**.

Pour l'analyse des DWNTs par thermogravimétrie, environ 3-4 mg de DWNTs sont pesés avec précision dans un creuset en platine. Pour limiter la dérive due à la poussée d'Archimède, moitié moins (en masse) d'alumine $\alpha$ est introduit dans l'autre creuset en platine (référence), la densité de l'alumine $\alpha$ étant deux fois plus grande que celle des DWNTs. Les creusets sont ensuite accrochés aux suspentes de la thermobalance et introduits dans les enceintes. Les différentes étapes de l'analyse peuvent alors être programmées sur le logiciel SETSOFT-Acquisition.

Si l'analyse est réalisée sous un flux d'air, une seule phase correspondant à la montée et à la descente en température est programmée (réglage de la température maximale, de la vitesse de montée et de descente en température, de l'atmosphère).
En revanche si l'analyse est réalisée sous atmosphère inerte, deux phases successives doivent être programmées. La première phase permet la stabilisation de l'atmosphère en gaz inerte. Il faut compter 2h (7200 sec) pour que les enceintes du four soient remplies de façon homogène par le gaz inerte. Une fois cette phase de stabilisation terminée, une nouvelle tare est effectuée avant le début de la deuxième phase. Celle-ci correspond à la phase de montée et descente en température en atmosphère inerte (précédemment décrite dans le premier cas). Une fois l'analyse terminée, les résultats sont récupérés et traités sur le logiciel SETSOFT-Traitements.

Les conditions d'analyse utilisées pour la caractérisation des différents produits sont les suivantes :

- Masse de produit analysé : entre 1 et 3 mg pour les DWNTs ; environ 5 mg pour le FITC et la $PyMeNH_2$.
- Atmosphère : Argon 4.5
- Rampe de température : 5°C/min en montée et descente

### E.III.2. Diffusion de neutrons

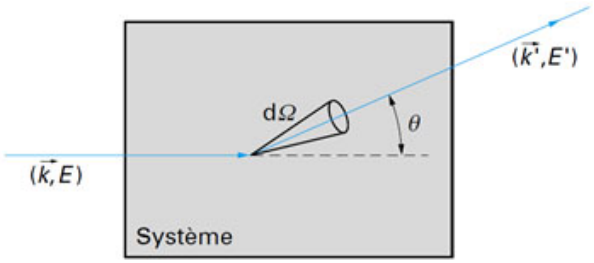
La diffusion de neutrons est une technique très puissante pour étudier les vibrations atomiques et moléculaires qui ne peuvent être observées avec d'autres types de radiations. Les neutrons sont électriquement neutres et peuvent pénétrer en profondeur dans la matière sans pour autant détruire l'échantillon. Ils interagissent ainsi avec les noyaux des atomes et leur moment magnétique. D'autre part, la longueur d'onde des neutrons est comprise entre 0,1 Å et 1000 Å ce qui rend ces particules idéales pour sonder les structures atomiques et moléculaires. Leurs énergies sont du même ordre de grandeur que les mouvements diffusifs dans les solides et les liquides et que les modes vibrationnels des molécules. De plus, le neutron est particulièrement sensible aux atomes d'hydrogène ce qui lui confère un caractère très attrayant dans l'étude des matériaux consacrés au stockage de l'hydrogène, mais aussi des matériaux de natures organique et polymérique **[24]**.

Afin d'explorer les propriétés des noyaux, un faisceau de neutrons, dont la direction et la longueur d'onde $\lambda$ sont bien définies (**Figure 2.14**) est envoyé sur l'échantillon ; puis est mesuré, en fonction de l'angle de diffusion $\theta$, le nombre de neutrons de longueur d'onde $\lambda'$ diffusés dans un angle solide $d\Omega$ autour de l'angle $\theta$. Ces paramètres permettent de définir le vecteur d'onde $\vec{k}$ et l'énergie E du faisceau incident ainsi que le vecteur d'onde $\vec{k}'$ et l'énergie E' du faisceau diffusé. Le transfert de moment $\vec{K}$ et le transfert d'énergie $\hbar\omega$, définis par les relations :

$$\vec{K} = \vec{k} - \vec{k}' \quad ; \quad \hbar\omega = E - E'$$

traduisent les interactions entre les neutrons et les atomes de l'échantillon **[25]**. La diffusion élastique des neutrons par les atomes de l'échantillon est caractérisée par une énergie inchangée, et un vecteur d'onde $\vec{k}'$ dont la direction est modifiée mais pas sa norme. La

diffusion inélastique des neutrons quant à elle est définie par une modification à la fois de la direction et de la norme du vecteur d'onde. La probabilité qu'un neutron diffusé ait perdu l'énergie ħω et le moment $\vec{K}$ est appelée section efficace de diffusion $\tilde{S}(\vec{K},\omega)$. Les expériences dites quasi-élastiques ou inélastiques donnent une mesure de cette section efficace en fonction de $\vec{K}$ et ω, de laquelle est déduite l'organisation spatiotemporelle des atomes de l'échantillon.




| | |
|---|---|
| $(\vec{k},E)$ | vecteur d'onde et énergie du faisceau incident |
| $(\vec{k}',E')$ | vecteur d'onde et énergie du faisceau diffusé |
| $\theta$ | angle de diffusion |
| $d\Omega$ | angle solide élémentaire |

*Figure 2.14 : Représentation schématique de l'interaction d'un rayonnement de neutrons sur un échantillon* ***[24]****.*

Dans le cas des NTCs, la diffusion de neutrons particulièrement sensible aux fonctions hydrogénées parait tout à fait appropriée afin de caractériser les NTCs fonctionnalisés (identification des différentes vibrations associées).

Les expériences de diffusion de neutrons ont été réalisées à l'Institut Laue-Langevin à Grenoble (avec la collaboration de Monica Jimenez-Ruiz et Stéphane Rols) sur le spectromètre à trois axes IN1-LAGRANGE (Large Graphite Analyser for Genuine Excitations) à neutrons chauds (Graphite 2000 K, E = 100 meV) **[26]**. 100 mg de différents types de DWNTs ont été analysés selon les conditions suivantes : température = 10 K, énergie incidente sélectionnée avec un monochromateur Cu220 et énergie diffusée avec un analyseur PG002 et fixée à 4 meV.

### E.III.3. Mesure de la radioactivité par scintillation liquide

Alors que le rayonnement gamma est directement mesurable par des appareils spécifiques (spectromètre gamma), la mesure par scintillation liquide est une des seules méthodes permettant de mesurer les rayonnements bêta purs.

Le cas étudié dans cette thèse est celui du 25-hydroxycholestérol tritié ou 25-HC-$^{3}$H (**Figure 2.15**). Le tritium, isotope radioactif de l'hydrogène, a une activité spécifique de 9650 Ci.g$^{-1}$ et une demi-vie de 12,3 ans **[27]**.

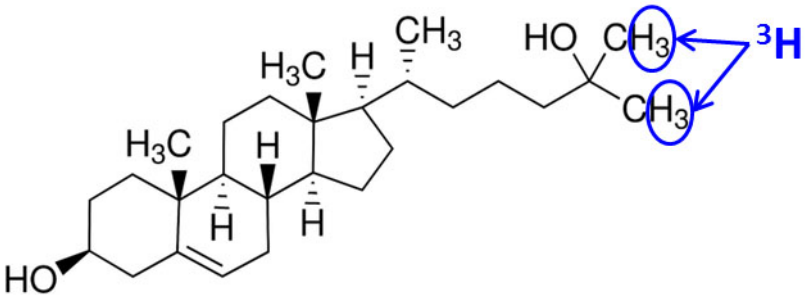



*Figure 2.15 : Représentation de la molécule de 25-hydroxycholestérol tritié.*

Lors de la désintégration du tritium (**Figure 2.16**), celui-ci émet un atome d'hélium 3 ainsi qu'une particule $\beta^-$ qui n'est autre qu'un électron **[28]**.

$$^{3}_{1}H \longrightarrow {}^{3}_{2}He + {}^{0}_{-1}\beta$$

*Figure 2.16 : Réaction de désintégration du tritium.*

La technique de mesure de radioactivité par scintillation liquide consiste à mélanger la solution radioactive à analyser à un liquide scintillant, ce dernier étant composé d'un solvant organique, généralement aromatique, et de molécules fluorescentes ou aussi appelées « scintillants ». Les particules $\beta$ vont entrer en collision avec les molécules du solvant et les exciter (**Figure 2.17**). Les molécules de solvant vont alors transférer leur énergie sous forme de photons aux molécules fluorescentes du liquide scintillant. L'énergie lumineuse émise par

les molécules fluorescentes pourra alors être détectée et mesurée par une cellule photomultiplicatrice **[29-30]**.

Dans le cadre de cette thèse, dans chacun des pots à scintillation prévus pour les mesures ont été introduits 5 mL de liquide scintillant provenant de Perkin Elmer (n°6013389, « Highflash-point economy LSC-cocktail for aqueous sample ») ainsi qu'un volume précis de surnageant à analyser ou la totalité du culot récupéré (DWNTs). Les pots à scintillations ont ensuite été placés dans un compteur (ou détecteur) à scintillation WALLAC 1409 afin de procéder aux mesures et enregistrements de radioactivité. Les expériences et mesures ont été réalisées au Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse avec la collaboration de l'équipe de Marc Poirot et Sandrine Silvente-Poirot.

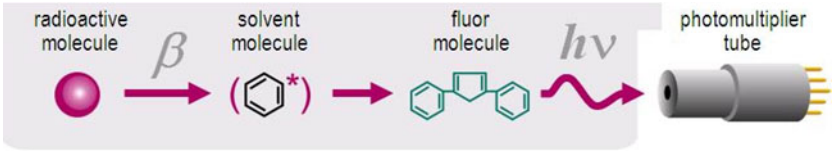



*Figure 2.17 : Schéma résumant le principe de la mesure de la radioactivité par scintillation liquide.*

## E.IV. Détection des DWNTs in vitro

### E.IV.1. Microscopie de fluorescence à champ large

La microscopie de fluorescence, ou microscopie à épifluorescence, est devenue un outil essentiel dans les domaines de la biologie, des sciences biomédicales et de la science des biomatériaux. La fonction du microscope optique à fluorescence est dans un premier temps d'irradier un échantillon par une lumière dont la bande passante spécifique a été préalablement choisie en fonction du fluorochrome observé, puis dans un second temps de séparer le faible signal de fluorescence émis de la lumière d'excitation de plus grande intensité.

Un rayon de lumière blanche est généré par une lampe au mercure (HBO) et doit passer au travers d'un bloc optique aussi appelé « cube ». Ce cube est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'arrêt (ou filtre d'émission). Lorsque la lumière atteint

le cube, elle passe par un premier filtre (d'excitation) qui permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation spécifique au fluorochrome à observer (**Figure 2.18**). La lumière ainsi filtrée est alors réfléchie sur un miroir dichroïque et envoyée en direction de l'échantillon. Lorsque le fluorochrome contenu dans l'échantillon analysé est excité, celui-ci émet alors une lumière de faible intensité (comparée à l'intensité du faisceau d'excitation) à sa longueur d'onde d'émission ($\lambda_{émission} > \lambda_{excitation}$). La fluorescence émise passe alors au travers du miroir dichroïque pour arriver au filtre d'émission. Ce filtre a pour rôle d'éliminer tous les rayons lumineux résiduels provenant de la lumière d'excitation. Le faisceau lumineux de fluorescence transmis par le filtre d'émission peut alors être observé directement aux oculaires du microscope par l'observateur ou bien enregistré au niveau d'une caméra **[31]**.

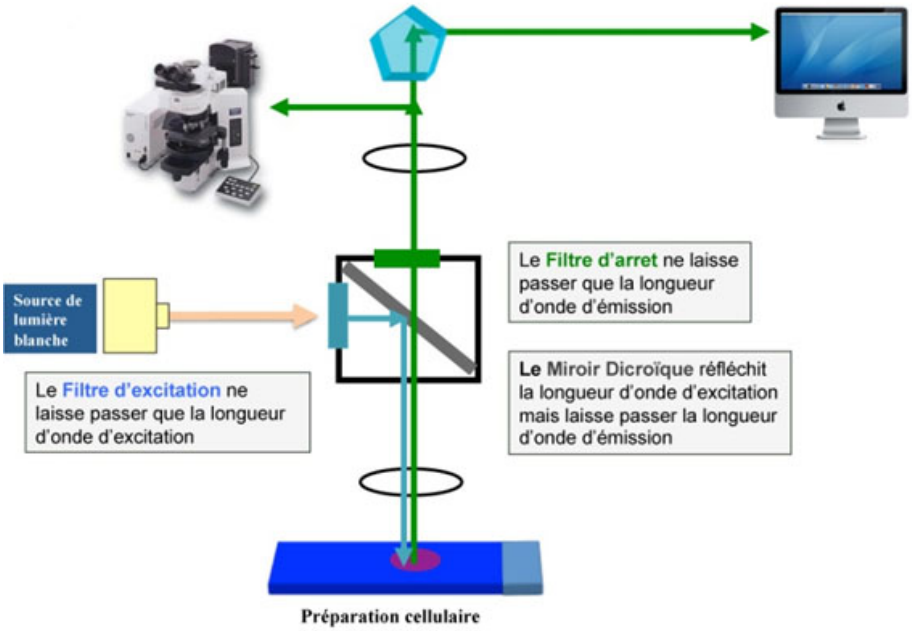



*Figure 2.18 : Schéma du principe de la microscopie à épifluorescence **[32]**.*

La microscopie de fluorescence à champ large utilise un éclairage homogène de l'ensemble du champ d'observation, c'est-à-dire que l'on visualise la fluorescence globale de la zone observée. De ce fait, il existe une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée, ce qui peut être considéré comme une limite à la technique **[33]**.

Les observations sur les macrophages ont été réalisées à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS, Toulouse) avec la collaboration de Muriel Golzio de l'équipe de Biophysique Cellulaire, sur un microscope Leica DMIRB équipé d'un filtre L4 (FITC)

(excitation BP 450-490, miroir dichroïque RKP 510, émission BP 515-560) et d'une caméra Coolsnap HQ2, Roper. Les images ont été enregistrées via le logiciel Metavue de Roper Scientific.

Pour les échantillons incubés avec les cellules MCF7, les observations ont été réalisées sur un microscope confocal à fluorescence Nikon Eclipse 90i équipé d'un objectif x40 à immersion dans l'huile, au Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse avec la collaboration de l'équipe de Marc Poirot et Sandrine Silvente-Poirot. Les longueurs d'onde d'excitation utilisées correspondent à celles des molécules fluorescentes utilisées :

- FITC : $\lambda_{exc}$ = 488 nm, temps d'exposition 400 ms
- Cy* : $\lambda_{exc}$ = 440 nm, temps d'exposition 600 ms
- Cy5 : $\lambda_{exc}$ = 635 nm, temps d'exposition 700 ms
- DAPI : $\lambda_{exc}$ = 405 nm, temps d'exposition 30 ms.

### E.IV.2. Microscopie confocale à fluorescence

La microscopie confocale à fluorescence ou à balayage laser se différencie de la microscopie de fluorescence à champs large sur plusieurs points.

Tout d'abord, la zone observée en microscopie confocale se limite à ce qui se situe au niveau du plan de l'image (**Figure 2.19**). En effet, en microscopie à champ large, l'échantillon est illuminé sur une très large épaisseur : la fluorescence émise au niveau du plan focal est nette alors que celle provenant de la zone hors du plan focal va rendre l'image floue. En microscopie confocale, la présence d'un diaphragme confocal juste avant le détecteur permet de ne laisser passer que la fluorescence émise au niveau du plan focal et de stopper toute autre fluorescence parasite. L'image obtenue est donc nette et correspond à une section optique **[34]**.

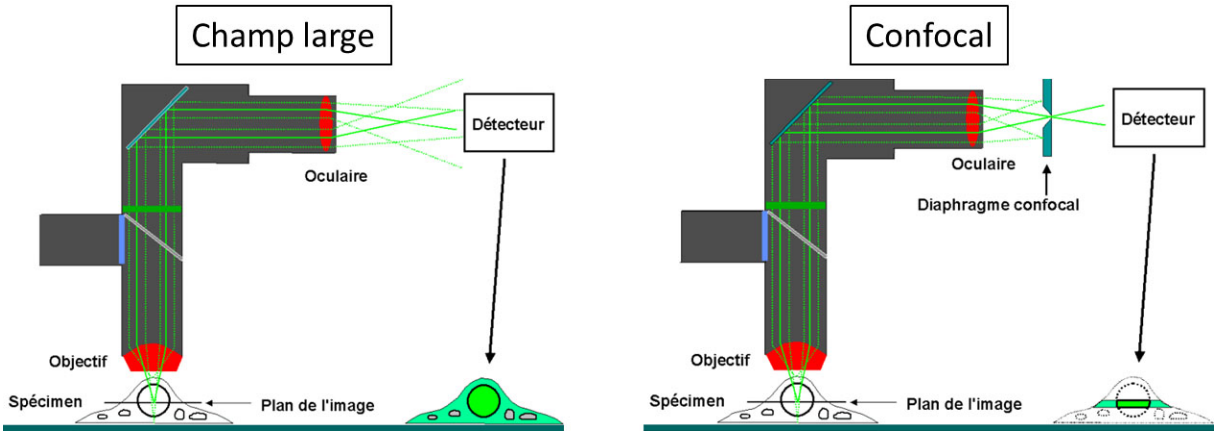



*Figure 2.19 : Schéma montrant la différence d'observation entre les microscopies à champ large et confocale* ***[33]***.

En outre, en se déplaçant sur l'axe z, il est possible de réaliser une série de sections optiques permettant une reconstitution en trois dimensions de la structure observée.

D'autre part, la source d'excitation se trouve être différente de celle en microscopie de fluorescence à champ large. En effet, en microscopie confocale, un laser continu est utilisé afin d'amplifier le signal de fluorescence. Le laser est basé sur le phénomène d'émission stimulée. Lorsqu'un atome est excité par une onde électromagnétique, il passe à un niveau d'énergie supérieur. L'atome peut se désexciter de façon spontanée et aléatoire en absence de rayonnement en libérant de l'énergie sous forme d'un photon : c'est l'émission spontanée. Dans le cas de l'émission stimulée, l'atome peut se désexciter sous l'effet d'une onde électromagnétique amplifiée : un photon incident, d'énergie égale à la différence d'énergie entre les deux états de l'atome, passant à proximité de l'électron excité, peut faciliter la transition de cet électron vers le niveau d'énergie de départ. Il y a alors émission d'un photon de même énergie et de même longueur d'onde. Le laser permet ainsi d'obtenir deux photons identiques à partir d'un seul photon incident : la fluorescence émise est ainsi plus intense.

Les échantillons incubés avec les cellules B16 ont été observés sur un microscope confocal à fluorescence Olympus TIRF-FV1000 équipé d'un objectif x60 à immersion dans l'huile (TRI, IPBS, Toulouse). L'excitation du Hoechst ou DAPI a été effectuée grâce à un laser diode à

405 nm, les FITC / fluorescéine / cyanine par un laser Argon à 488 nm, et la Cy5 NHS Ester par un laser diode à 635 nm. Les images ont été enregistrées via le logiciel Leica FV10.

### E.IV.3. Microscopie confocale Raman

La microscopie confocale Raman est basée sur le même phénomène décrit en E.I.1. A partir des spectres de diffusion, il est possible de d'établir des cartes en deux ou trois dimensions, caractéristiques des espèces chimiques présentes dans l'échantillon, avec un pouvoir séparateur de l'ordre du micron. Au niveau des spectres Raman enregistrés, en isolant les bandes liées à un mode de vibration caractéristique d'un composant particulier, il est possible de visualiser la distribution spatiale de ce composant dans l'échantillon analysé **[7]**.

Dans le cadre de cette thèse, la reconstruction d'images point par point a été choisie. Ce mode d'analyse (cartographie point par point) présente l'avantage d'être parfaitement confocal, mais constitue une technique lente qui reste plutôt réservée à l'analyse de petites régions.

Les premiers essais ont été réalisés, avec la collaboration de Pascal Puech de l'équipe Nanomatériaux au Centre d'Elaboration de Matériaux et d'Etudes Structurales (CEMES, Toulouse), sur un microscope confocal Olympus BX51, équipé d'un laser Horiba Scientific Jobin Yvon Xplora et d'un objectif x100. L'échantillon analysé était celui de cellules MCF7 incubées avec des DWNTs doublement oxydés DWNTs−COOH (100 µL, 24h). Seuls des profils en z sur des points uniques ont été enregistrés avec un pas de 5 µm, les lasers vert (λ = 532 nm) et rouge (λ = 633 nm), une fente de 100 µm, un trou de 100 µm, un filtre de 10%, un réseau de 600 traits, 5 s d'exposition, 1 accumulation, 1 acquisition et sur une fenêtre de 0 à 5000 $cm^{-1}$.

Par la suite, les analyses ont été effectuées sur un microscope confocal Raman Labram HR800 Horiba Yvon Jobin à une longueur d'onde de λ = 532 nm (CIRIMAT, Labège). Des profils en z et cartographies (en x, y et z) ont été réalisées sur les échantillons suivants : cellules B16 incubées avec des DWNT−NH−FITC et des cellules B16 incubées avec des DWNT−NH−Cy5. Les conditions expérimentales utilisées sont les suivantes : pas de 5 µm,

laser vert (λ = 532 nm), trou de 100 µm, filtre de 10%, réseau de 600 traits, 5 s d'exposition, 1 accumulation, 1 acquisition et sur une fenêtre de 10 à 5000 $cm^{-1}$ ou de 1500 à 3100 $cm^{-1}$.

### E.IV.4. Microscopie bi-photonique de fluorescence

La microscopie bi-photonique est un outil puissant dérivé de la microscopie confocale. Cette technique est basée sur le principe qu'un atome ou molécule est capable d'absorber simultanément deux photons (**Figure 2.20**), ce qui a été établi par Maria Göppert-Mayer en 1931 (Prix Nobel de 1963) **[35]**.

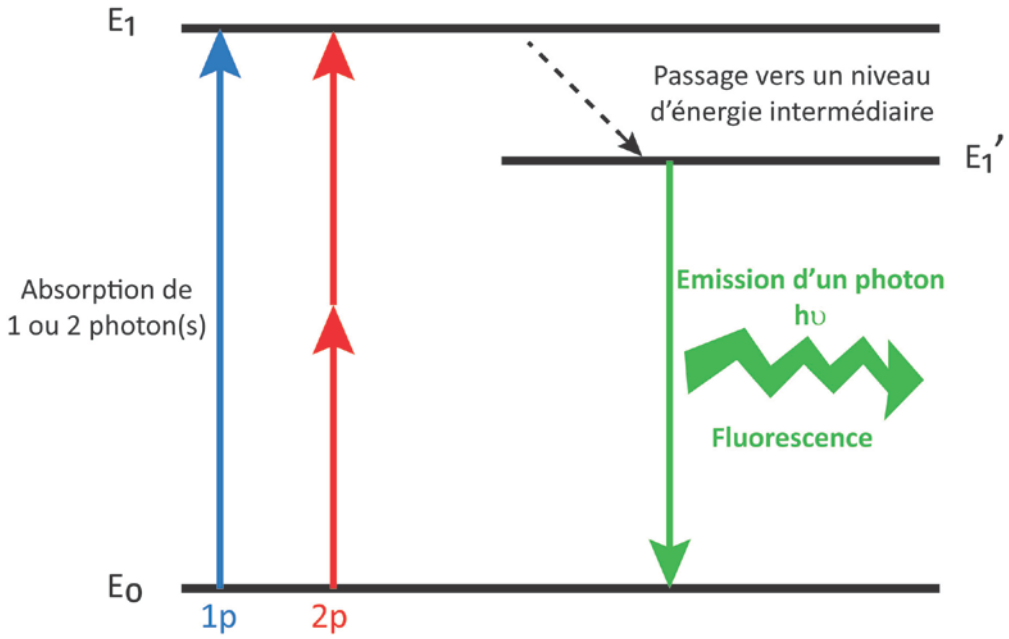



*Figure 2.20 : Illustration du principe de la microscopie bi-photonique de fluorescence **[36]**.*

Pour cela, la microscopie bi-photonique nécessite l'utilisation d'un laser pulsé envoyant des rayons lasers très brefs et très puissants. L'intensité lumineuse doit être très grande pour que deux photons passant près de l'atome à exciter dans un laps de temps très court ($10^{-16}$ sec) soient absorbés. Afin d'exciter une molécule fluorescente à une longueur d'onde $\lambda_{excitation}$, il faut que les deux photons absorbés aient chacun la moitié de l'énergie nécessaire à cette excitation, c'est-à-dire qu'ils aient une longueur d'onde d'environ $\lambda_{photon} = 2 \times \lambda_{excitation}$. De ce fait, la source d'excitation utilisée émet des photons situés dans le proche IR, ce qui permet une meilleure pénétration dans les tissus

biologiques (coefficient d'absorption des tissus 10 fois moins important à 800 nm qu'à 450 nm) **[34, 36]**.

En outre, en utilisant un laser pulsé, l'excitation est confinée au niveau du volume focal, ce qui implique qu'aucune fluorescence n'est émise hors du point focal. Cela est un très grand avantage par rapport à la microscopie à un photon : rapport signal/bruit amélioré, pas de phototoxicité au niveau des tissus hors du point focal, meilleures résolutions axiale et radiale.
Enfin, il est possible de reconstituer l'objet observé en 3 dimensions en accumulant une série d'images (déplacement selon l'axe z), comme en microscopie confocale classique.

Dans le cadre de cette thèse, les observations ont été réalisées sur un microscope Zeiss FLIM 7MP équipé d'un objectif x40 à immersion et sur un microscope Zeiss FLIM 710 NLO inversé équipé d'un objectif x40 à immersion dans l'huile (TRI, IPBS, Toulouse). Le même laser pulsé femtoseconde avec pré-compensation Coherent Chaméléon Vision II (690-1080 nm) a été utilisé sur les deux microscopes. Les images en lumière du jour ont été obtenues par contraste interférentiel différentiel (CID) (image obtenue à partir des interférences de deux faisceaux d'une onde lumineuse traversant l'objet observé).

# F. Bibliographie du chapitre 2

[1] Flahaut E, Peigney A, Bacsa R and Laurent Ch, *Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes.* Chem Commun, **2003**, 1442-1443.

[2] Flahaut E, Peigney A, Bacsa WS, Bacsa RR and Laurent Ch, *CCVD synthesis of carbon nanotubes from (Mg Co, Mo)O catalysts: influence of the proportions of cobalt and molybdenum.* J Mater Chem, **2004**, 14, 646-653.

[3] Bourdiol F, *Evaluation de l'écotoxicité de nanotubes de carbone en milieu aquatique à l'aide du modèle amphibien Xenopus laevis : synthèse, protocoles d'exposition, détection et dosage.* Thèse de doctorat, Université de Toulouse, **2013**.

[4] Frivik B, *Quality sensor apparatus*, **2011**, WO2011078692A1.

[5] Singh P, Samori C, Toma FM, Bussy C, Nunes A, Al-Jamal KT, Ménard-Moyon C, Prato M, Kostarelos K and Bianco A, *Polyamine functionalized carbon nanotubes : synthesis, characterization, cytotoxicity and siRNA binding*, J Mater Chem., **2011**, 21, 4850-4860.

[6] Gul H, Lu W, Xu P, Xing J and Chen J, *Magnetic carbon nanotube labelling for haematopoietic stem/progenitor cell tracking*. Nanotechnology, **2010**, 21 (15), 155101.

[7] Barbillat J, Bougeard D, Buntinx G, Delhaye M, Dhamelincourt P and Fillaux F, *Spectrométrie Raman.* Techniques de l'Ingénieur, **1999**, p2865.

[8] Dresselhaus MS, Dresselhaus G, Saito R and Jorio A, *Raman spectroscopy of carbon nanotubes.* Physics Reports, **2005**, 409, 47-99.

[9] Humbert B, Mevellec JY, Grausem J, Dossot M and Carteret C, *Spectrométrie d'absorption dans l'infrarouge.* Techniques de l'Ingénieur, **2012**, p2850.

[10] Di Benedetto D and Breuil P, *Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible*. Techniques de l'Ingénieur, **2007**, p2795.

[11] Laboratoire Pierre Aigrain (ENS), Photoluminescence, Techniques expérimentales, http://www.lpa.ens.fr/spip.php?article266.

[12] Le Barny P, *Electroluminescence des matériaux organiques. Principes de base.* Techniques de l'Ingénieur, **2006**, e3106.

[13] Heiman D, *Photoluminescence spectroscopy.* Northeastern University, Physics of Waves and Optics, **2004**, http://tns.ndhu.edu.tw/~clcheng/class-94/bio-phy94/Class-2-PL.pdf.

[14] Desjardins-Carrière M, *Identification des parois des nanotubes de carbone à double-parois par spectroscopie raman.* Mémoire de Maîtrise Ès Sciences appliquées, Université de Montréal, **2011**.

[15] Thibault-Desseaux J, Guyot P, Louchet F et Verger-Gaugry JL, *Microscopie électronique en transmission. Transmission conventionnelle et balayage en transmission.* Techniques de l'Ingénieur, **1988**, p875.

[16] COLLIEX C, *La Microscopie Electronique*. Ed. Presses universitaires de France, Collection Que sais-je ?, **1998**.

[17] Fiche de renseignements du SCA-CNRS, Référence RC-E2-130, *Détermination du carbone, de l'hydrogène, de l'azote, de l'oxygène et du soufre en microanalyses.*

[18] Caude M and Jardy A, *Méthodes chromatographiques – Introduction.* Techniques de l'Ingénieur, **1996**, p1445.

[19] Caude M and Jardy A, *Chromatographie en phase liquide – Théorie et méthodes de séparation.* Techniques de l'Ingénieur, **1994**, p1455.

[20] Ménard-Moyon C, Fabbro C, Prato M and Bianco A, *One-pot triple functionalization of carbon nanotubes.* Chem Eur J, **2011**, 17, 3222-3227.

[21] Garett RH and Grisham CM, *Biochimie.* Ed. De Boeck Supérieur, **2000**.

[22] Daudon JL, *Thermogravimétrie.* Techniques de l'Ingénieur, **2001**, p1260.

[23] Rochon L, *Etude cinétique expérimentale et modélisation de la réaction de carbonatation de l'oxyde de calcium.* Thèse de Doctorat, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, **2012**.

[24] Institut Laue-Langevin, *The Neutron – Why use neutrons*, **2013**, http://www.ill.eu/fr/science-technology/the-neutron.

[25] Cotton JP, *Diffraction et spectrométrie des neutrons.* Techniques de l'Ingénieur, **1996**, p1095.

[26] Ivanov A, Jiménez-Ruiz M and Kulda J, *IN1-LAGRANGE – the new ILL instrument to explore vibration dynamics of complex materials.* J Phys : Conference series, **2014**, 554, 012001.

[27] Health Physics Society - North Carolina Chapter, *Nuclide Safety Data Sheet on Tritium.* Nuclide Information Library.

[28] Northern Arizona University, *Nuclear processes, Nuclear Fusion, Radioactivity.* Environmental Education Courses, Environmental Chemistry ENV440, Lecture 3.

[29] Cassette P, *Mesures de radioactivité par scintillation liquide.* Techniques de l'Ingénieur, **2004**, p2552.

[30] Perkin Elmer, *Liquid Scintillation Counting.* Technical resources, Radiometric assays and detection, **2014**.

[31] Spring KR and Davidson MW, *Introduction to Fluorescence Microscopy*. Nikon MicroscopyU, **2003**.

[32] Romana S and Malan V, *Cytogénétique moléculaire*, Université Médicale Virtuelle Francophone de Nantes, Enseignement Génétique 19, **2012**.

[33] Toulouse Réseau Imagerie (TRI), *La microscopie à champ large*. Cours en ligne, CNRS Entreprise, **2009**.

[34] Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan - INSERM, *Présentation de la microscopie confocale pour l'imagerie cellulaire*. **2013**.

[35] Göppert-Mayer M, *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen.* Ann Phys, **1931**, 401 (3), 273-294.

[36] Dufour P, Dufour S, Castonguay A, McCarthy N and De Koninck Y, *Microscopie à deux photons pour l'imagerie cellulaire fonctionnelle : avantages et enjeux*. Médecine Sciences, **2006**, 22, 837-844.

# CHAPITRE 3

# PURIFICATION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS

# A. Introduction

Les échantillons obtenus à la fin du processus de synthèse par CCVD ne contiennent pas uniquement des NTCs. En effet, des nanoparticules métalliques provenant du catalyseur ainsi que des produits secondaires du carbone (carbone désorganisé) sont également présents. En fonction des applications potentielles des NTCs, le niveau de pureté de ces échantillons peut devenir un paramètre non négligeable, notamment pour ce qui est de leur utilisation dans le domaine de la biologie.

Dans ce troisième chapitre, différents traitements d'oxydation en solution ont été testés sur des échantillons de DWNTs, produits selon un procédé mis au point au CIRIMAT **[1-2]**. Les modifications apparues sur ces échantillons, consécutives à ces traitements (purification, fonctionnalisation, ouverture), ont été évaluées de la façon la plus exhaustive possible, qualitativement et quantitativement. Le but étant de fonctionnaliser ces DWNTs, de façons covalente et non-covalente, afin de pouvoir les utiliser dans le cadre d'applications biomédicales (suivi dans les cellules, ingénierie tissulaire, délivrance de médicaments, nanomatériaux, etc…), il est devenu impératif de travailler sur des NTCs purifiés, sans nanoparticules métalliques et sans carbone désorganisé. En effet, nous voulions être certains que la fonctionnalisation opérée sur ces DWNTs oxydés serait uniquement présente sur les parois des DWNTs et non sur le carbone désorganisé ou les impuretés carbonées (habituellement présentes après un traitement oxydant classique), d'où la nécessité d'un niveau de pureté aussi élevé.

Les DWNTs bruts ainsi que leur caractérisation seront présentés dans une première partie afin de rendre compte de l'état de l'échantillon de départ utilisé tout au long de cette thèse. Différentes méthodes d'oxydation et de lavage seront par la suite décrites. Les résultats obtenus par différentes techniques d'analyse seront alors comparés afin de déterminer les méthodes les plus efficaces en fonction des besoins d'un utilisateur lambda, et bien évidemment en fonction des besoins de cette thèse.

# B. Présentation des DWNTs bruts et des méthodes de purification

## B.I. Les DWNTs bruts

Les échantillons de DWNTs bruts, obtenus après extraction de la poudre nanocomposite de synthèse par une solution de HCl, contiennent du carbone désorganisé, aussi appelé voile de carbone (cf. flèches blanches sur la **Figure 3.1. a**), mais également des particules de Co et de Mo résiduelles encapsulées dans des coques de carbone (cf. flèches noires sur la **Figure 3.1. b**). Le diamètre moyen des nanoparticules métalliques encapsulées dans des coques de carbone est compris entre 2 et 5 nm. Le carbone désorganisé, qui peut être comparé à du graphène froissé, est toujours présent dans les échantillons de DWNTs bruts sous la forme d'agglomérats assez imposants (de l'ordre de plusieurs microns) dans lesquels les DWNTs sont entremêlés. Il est formé au cours de la synthèse par CCVD des DWNTs par une décomposition catalytique secondaire (et non voulue) du $CH_4$ sur le support catalytique MgO.

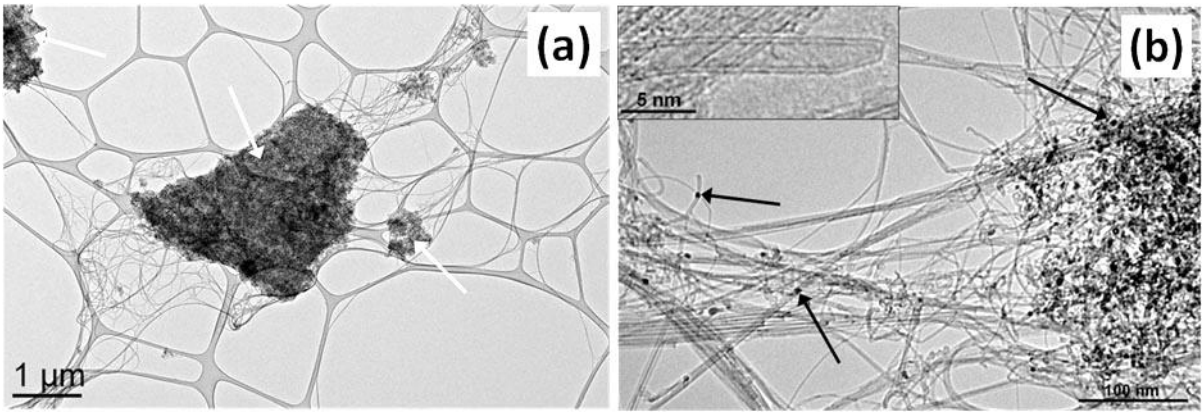



*Figure 3.1 : Images MET de DWNTs bruts montrant (a) le carbone désorganisé (flèches blanches) et (b) les nanoparticules métalliques (flèches noires).*

Concernant le spectre Raman des DWNTs bruts obtenu pour λ = 633 nm (**Figure 3.2**), toutes les bandes caractéristiques des NTCs sont clairement visibles (RBM, bandes D, G et G'). Le rapport moyen de l'intensité de la bande D sur celle de la bande G ($I_D/I_G$) est égal à 0,20 ± 0,05. La valeur de ce rapport signifie que les DWNTs bruts présentent assez peu de défauts. Toutes les analyses ultérieures en Raman (purification, fonctionnalisation) seront basées sur la comparaison des rapports $I_D/I_G$ mesurés au rapport $I_D/I_G$ des DWNTs bruts.

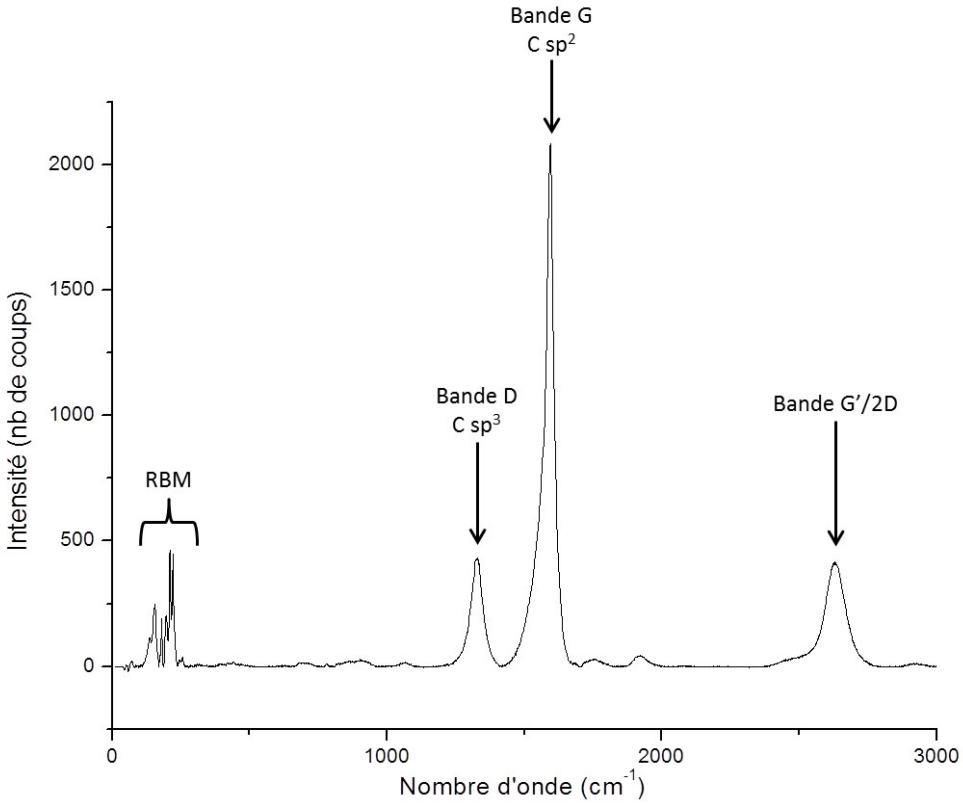



*Figure 3.2 : Spectre Raman caractéristique des DWNTs bruts (λ = 633 nm).*

La détermination des teneurs en métaux (Co et Mo), en carbone et en oxygène dans les échantillons de DWNTs a été réalisée par microanalyse élémentaire au Service Central d'Analyse du CNRS de Lyon. Ces valeurs serviront de référence pour les comparaisons des différentes techniques de purification des DWNTs. Les résultats ont été rassemblés dans le **Tableau 3.1**.

*Tableau 3.1 : Résultats de microanalyse élémentaire sur les DWNTs bruts.*

| Elément analysé | Teneur massique (%) |
|---|---|
| **C** | 91,87 ± 0,50 |
| **O** | 2,16 ± 0,30 |
| **Co** | 3,5 ± 0,1 |
| **Mo** | 1,0 ± 0,1 |

En effectuant la somme de de ces teneurs massiques, un total de 98,53 % est obtenu. Les 0,47 % manquants, en tenant compte des incertitudes, correspondent très certainement aux impuretés contenues dans les produits de départ utilisés pour la synthèse des DWNTs.

D'après les fiches des fabricants (Acros, VWR, Sigma-Aldrich), il peut s'agir de traces de Cl, $SO_4$, $PO_4$, Pb, Cu, Fe, Ni, Ca.

L'analyse par spectroscopie IR des DWNTs bruts sous la forme de pastille dans KBr montre plusieurs bandes caractéristiques de l'échantillon (**Figure 3.3**) telles que les élongations de type :

- C=C : bandes comprises entre 1449 et 1544 $cm^{-1}$,
- C=O conjugée : bande à 1633 $cm^{-1}$,
- C–H des carbones $sp^3$ : bandes autour 2900 $cm^{-1}$,
- =C–H des carbones $sp^2$ aromatiques : bandes comprises entre 3050 et 3100 $cm^{-1}$.

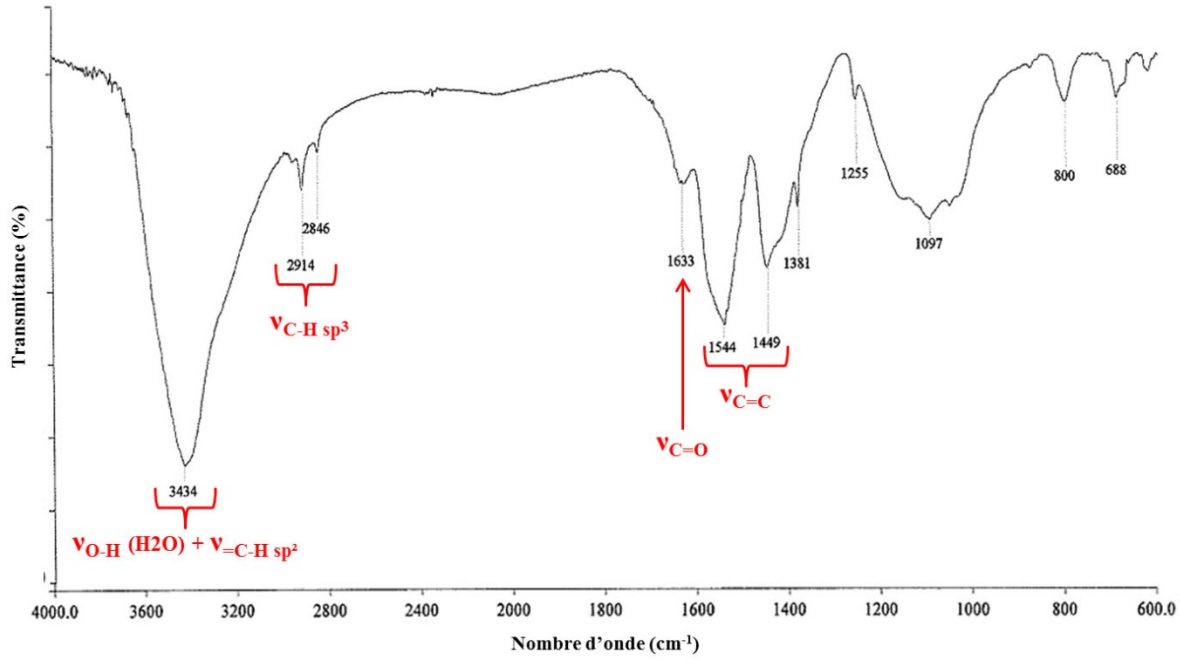



*Figure 3.3 : Spectre IR caractéristique des DWNTs bruts.*

La bande correspondant à l'élongation de la liaison C=O, habituellement fine et très intense, est présente mais de très faible intensité, donc il existe des fonctions oxygénées sur les parois des DWNTs bruts mais en très faible quantité.

La bande correspondant à l'élongation de la liaison =C–H n'est cependant pas clairement visible sur le spectre enregistré à cause de la très large et intense bande liée à l'élongation

de la liaison O–H, provenant de l'eau probablement présente soit dans le KBr (très hygroscopique) soit dans les échantillons de DWNTs (mauvais séchage, eau contenue dans les tubes internes des DWNTs).

Pour ce qui est du nombre de groupements fonctionnels carboxyliques, celui-ci a été déterminé par titration acido-basique indirecte et évalué à une valeur comprise entre 0 et 0,5 mmol de fonctions par gramme de DWNTs bruts, compte tenu de l'incertitude de la mesure. Il existe ainsi un nombre très réduit, voire inexistant, de fonctions carboxyliques dans cet échantillon de DWNTs bruts.

En conclusion, les DWNTs bruts sont des échantillons contenant deux types d'impuretés majoritaires, à savoir environ 4,5 % en masse de nanoparticules métalliques résiduelles (Co, Mo) et d'importants agglomérats de carbone désorganisé ; peu de défauts de structure au niveau des parois des DWNTs ($I_D/I_G$ = 0,20 ± 0,05) ; des bandes caractéristiques en IR des carbones de type aromatiques ; et quasiment aucun groupement fonctionnel carboxylique potentiellement utilisable à des fins de fonctionnalisation covalente.

## B.II. Méthodes de purification

Afin de déterminer la ou les meilleures méthodes de purification des DWNTs, cinq différents traitements d'oxydation en solution (détaillés au Chapitre 2, B), certains étant des traitements classiques et couramment utilisés (Méthodes 1 et 2), ont ainsi été évalués :

- **Méthode 1** = Reflux à 130°C dans $HNO_3$ (3M),
- **Méthode 2** = Reflux à 70°C dans $HNO_3$ conc./$H_2SO_4$ conc. (1 : 3),
- **Méthode 3** = Reflux à 130°C dans $HNO_3$ conc./$H_2SO_4$ conc. (1 : 3),
- **Méthode 4** = Reflux à 130°C dans $HNO_3$ conc./$H_2SO_4$ conc. (1 : 3) utilisant les micro-ondes,
- **Méthode 5** = Reflux à 130°C dans $HNO_3$ (3M) puis à 70°C dans $HNO_3$ conc./$H_2SO_4$ conc. (1 : 3) = aussi appelée « Double oxydation ».

Ces méthodes ont également été comparées à une méthode de purification réalisée à sec consistant à traiter les DWNTs bruts sous air à 500°C pendant 30 min (**Méthode 6**). Cette technique, retenue dans notre cas comme référence quant à la pureté de l'échantillon obtenu, est connue pour éliminer efficacement à la fois les nanoparticules métalliques résiduelles et le carbone désorganisé, mais ayant l'inconvénient de détruire 90 % de l'échantillon et de ne pas créer de groupements fonctionnels sur les parois des DWNTs.

Sur la **Figure 3.4**, quelques exemples d'images MET obtenues après différents traitements, montrent que, selon le protocole utilisé :

- soit les particules métalliques sont éliminées sélectivement avec une destruction limitée du carbone désorganisé (Méthode 1, **Figure 3.4. a**),
- soit le carbone désorganisé disparait, mais les particules métalliques sont partiellement éliminées (Méthode 2, **Figure 3.4. b**),
- soit les particules métalliques et le carbone désorganisé sont tous les deux éliminés (Méthode 5, **Figure 3.4. c**).

Ces résultats seront discutés plus loin beaucoup plus en détail et permettront d'établir quelles méthodes sont les plus efficaces et les plus adaptées selon les besoins propres de l'utilisateur. Toute cette discussion reposera sur la comparaison des données obtenues par spectroscopie Raman, microscopie électronique à transmission, microanalyse élémentaire, dosage acido-basique des groupements fonctionnels créés et par spectroscopie IR.

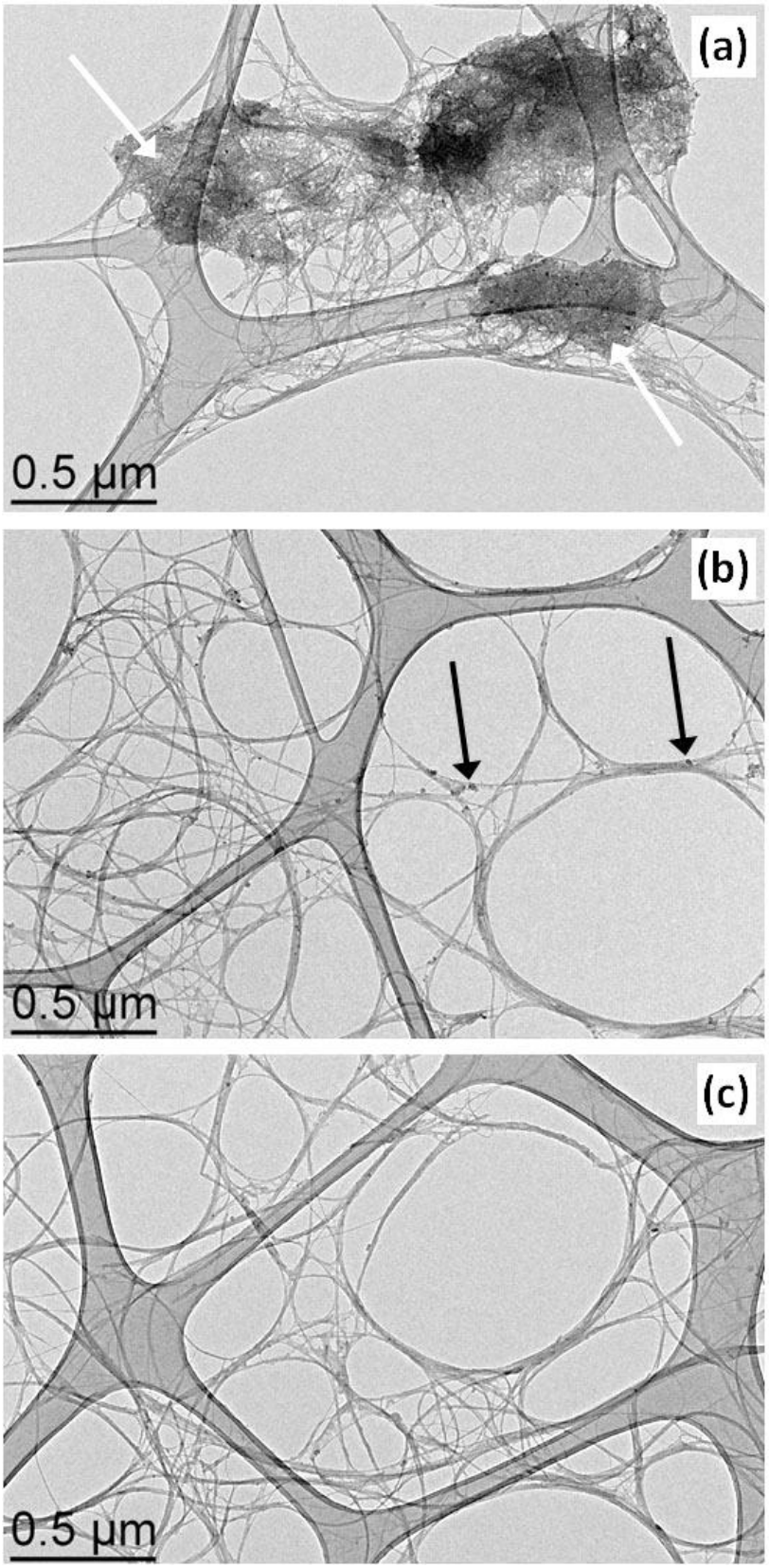



*Figure 3.4 : Images MET de DWNTs traités par (a) la Méthode 1 ; (b) la Méthode 2 pendant 24h et (c) la Méthode 5. Sur ces images sont indiqués le carbone désorganisé (flèches blanches) et les nanoparticules métalliques (flèches noires).*

# C. Effets des différentes méthodes d'oxydation sur les DWNTs

## C.I. Elimination des métaux

Les échantillons de DWNTs bruts obtenus après extraction de la poudre nanocomposite contiennent toujours du cobalt (3,5 %) et du molybdène (1,0 %) résiduels principalement sous la forme de nanoparticules encapsulées des coques de carbone. Lorsque les DWNTs subissent des traitements oxydants, ces coques de carbone sont également attaquées, permettant ainsi aux acides de s'y infiltrer et de dissoudre les métaux qui y sont piégés. Les taux d'élimination des métaux, déterminés par analyse élémentaire, dépendent de la méthode d'oxydation utilisée et ont été listés dans le **Tableau 3.2**.

*Tableau 3.2 : Comparaison des taux d'élimination de métal et des rendements pour les différentes méthodes de purification. Les durées de traitement sont précisées entre parenthèses.*

| Méthode d'oxydation | 1 (24h) | 2 (24) | 3 (5h) | 4 (30 min) | 5 (24h + 5h) | 6 (30 min) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Elimination du métal (%) | 91 | 78 | 98 | 98 | 96 | 99 |
| Rendement (%) | 80 | 18 | 2 | 12 | 16 | 10 |

Compte tenu des résultats obtenus, il apparait que toutes les méthodes utilisées sont relativement efficaces pour éliminer les nanoparticules métalliques résiduelles présentes dans les échantillons de DWNTs bruts avec un taux d'élimination variant entre 78 et 99 % (**Figure 3.5**).

En revanche, l'élimination des résidus catalytiques s'accompagne de la destruction d'une partie des NTCs et donc d'une perte de masse, représentée ici par le rendement massique sur l'ensemble de l'échantillon, qui fluctue entre 2 et 80 % en fonction du traitement employé. Avec la Méthode 1 ($HNO_3$ 3M à 130°C pendant 24h), très fréquemment utilisée en termes de purification et d'oxydation de NTCs **[3]**, le métal est éliminé efficacement à 91 % sans perte importante d'échantillon, puisque le meilleur rendement est obtenu avec ce traitement (80 %). En utilisant la Méthode 2 ($HNO_3$ conc/$H_2SO_4$ conc (1 : 3) à

70°C), traitement également très répandu, seulement 78 % du métal a pu être éliminé après 24h, avec une destruction de 82 % de l'échantillon.

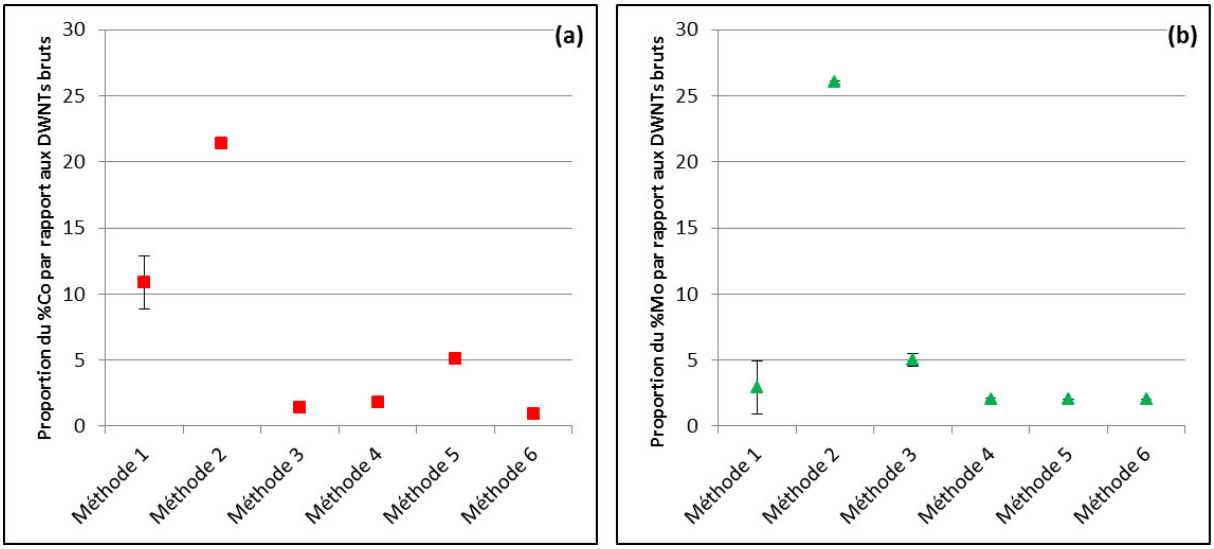



*Figure 3.5 : Graphiques représentant les pourcentages par rapport à la valeur initiale en (a) Cobalt et (b) Molybdène dans les échantillons traités par les six différentes méthodes.*

Sur la **Figure 3.6**, les images de MET montrent des échantillons de DWNTs traités par la Méthode 2 pendant différentes durées de traitement (3h, 4h, 5h et 6h30) : il est possible d'observer que plus la durée du traitement oxydant est longue et plus le nombre de particules métalliques visibles dans l'échantillon diminue. Cette constatation est en accord avec le fait que plus les échantillons de DWNTs incubent dans l'acide, plus celui-ci a la possibilité d'attaquer les coques de carbone protégeant les nanoparticules métalliques, et donc plus le métal est éliminé.

Cette purification a pu être améliorée en chauffant davantage le mélange d'acides concentrés $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) à 130°C (Méthode 3) et en ajoutant de surcroit l'utilisation de micro-ondes (Méthode 4). Différentes durées de traitement ont été testées avec la Méthode 4 (15 min et 30 min), suivies par des analyses élémentaires et observations MET. Les mêmes résultats que pour la Méthode 2 ont été obtenus : plus la durée de traitement est longue, moins il reste de nanoparticules métalliques résiduelles (**Figure 3.7**) avec une élimination du métal évaluée à 96 et 98 % pour 15 min et 30 min de réaction, et plus le rendement final est faible avec 22 et 12 % respectivement.

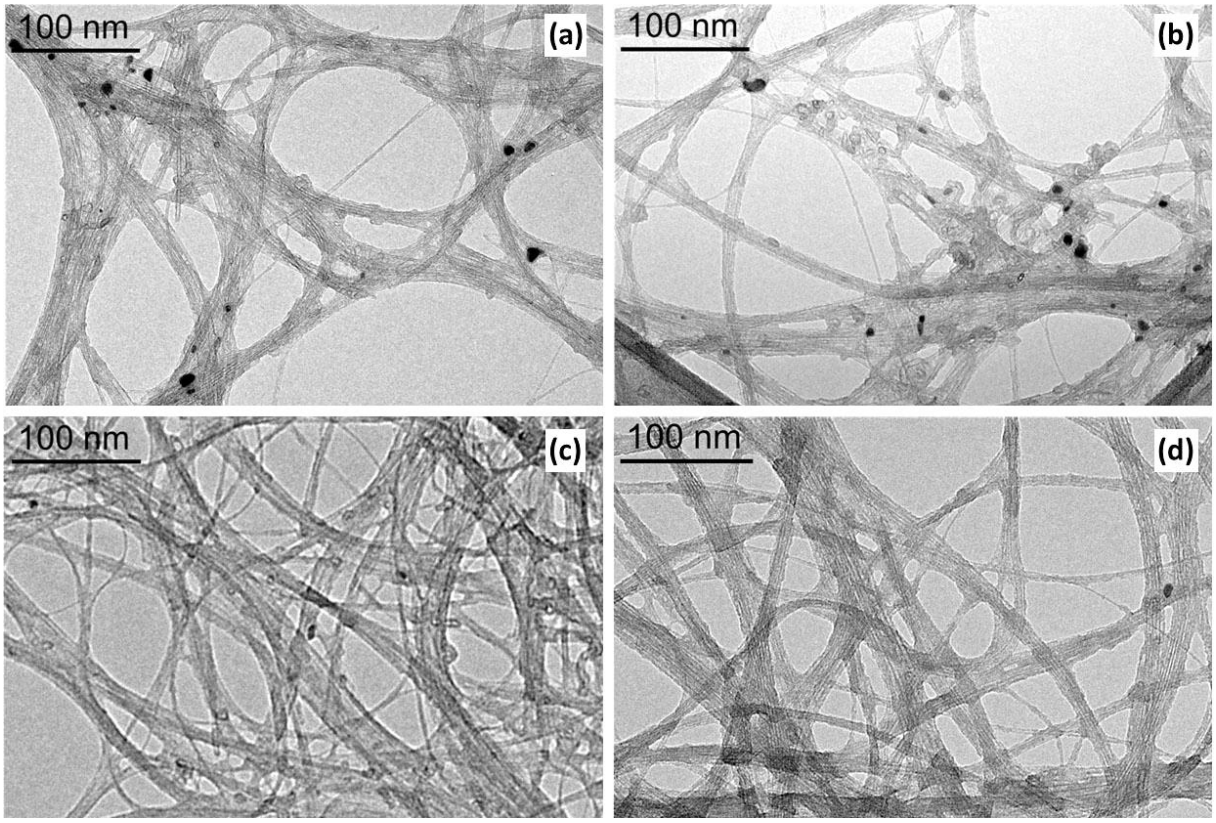



*Figure 3.6 : Images MET de DWNTs traités par la Méthode 2 pendant (a) 3h ; (b) 4h ; (c) 5h et (d) 6h30.*

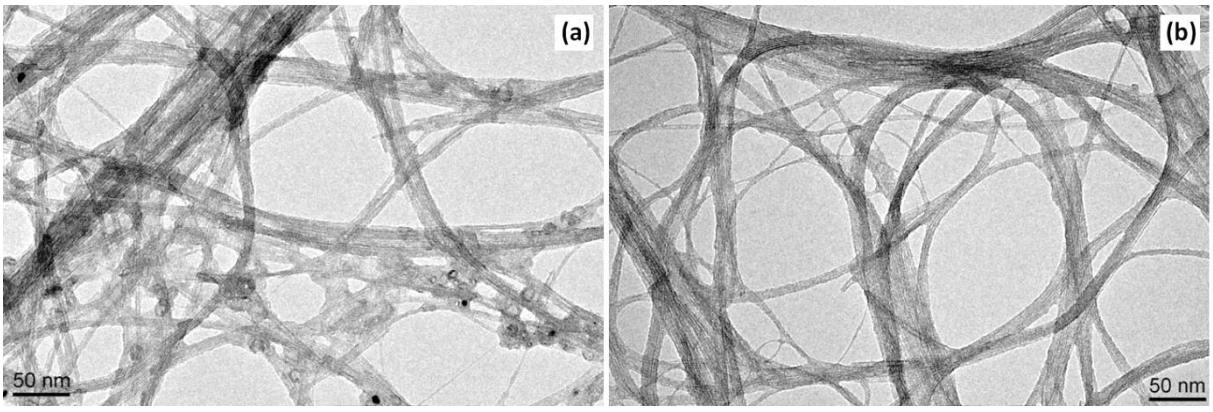



*Figure 3.7 : Images MET de DWNTs traités par la Méthode 4 pendant (a) 15 min et (b) 30 min.*

Avec les Méthodes 3 et 4, la durée de traitement a pu être réduite, par rapport aux Méthodes 1 et 2 respectivement à 5h et à 30 min, le taux d'élimination en métal augmenté à 98 % dans les deux cas, mais les rendements finaux se voient quant à eux rabaissés à 2 et à 12 %. Ces deux dernières méthodes se rapprochent ainsi le plus de la Méthode 6

(purification sous air à 500°C), permettant une suppression quasi-totale des métaux aux détriments du rendement final.

D'après ces résultats, il apparait que la Méthode 1 est très performante pour éliminer presque l'intégralité des nanoparticules métalliques résiduelles tout en ayant un faible impact sur le rendement massique final de l'échantillon. Des échantillons de plus grande pureté peuvent être obtenus par la Méthode 4, cependant il faut tenir compte de deux paramètres pour ce traitement : le rendement final est environ 7 fois plus faible ; et les ballons à col long utilisés, spécialement dédiés au four à micro-ondes, ne permettent le traitement que de 70 mg de DWNTs bruts.

## C.II. Modification des parois des DWNTs et formation des fragments carbonés carboxylés (CFFs)

Au cours du traitement oxydant, si l'on essaie de se focaliser en MET-HR sur les parois des DWNTs, il est possible de voir que les extrémités des NTCs sont ouvertes **[4]**. En effet, au niveau des extrémités se situent les sites les plus réactifs, puisque la courbure de la structure rend les liaisons C=C très contraintes, donc plus instables. Ces liaisons sont ainsi plus faciles à attaquer par les acides oxydants. Ce phénomène a aussi lieu au niveau des parois des DWNTs où il existe des défauts de structure du type « défauts de Stone-Wales » constituant des réarrangements des atomes de carbone en pentagones et heptagones. Il en résulte la création de trous dans les parois des DWNTs, qui ne peuvent pas être observés en MET. Cependant, après traitement, les parois et/ou les extrémités sont recouvertes d'un matériau carboné collant (les fragments carbonés carboxylés ou CCFs) provenant probablement de la dégradation des agglomérats de carbone désorganisé présents initialement dans les DWNTs bruts mais aussi de la dégradation des extrémités des NTCs, comme ce qui avait été observé plus tôt pour les SWNTs **[5]** et les MWNTs **[6]**. Sur les **Figures 3.8 et 3.9** sont présentées les images de MET des échantillons de DWNTs traités par les six différentes méthodes.

Avec la Méthode 1 (**Figures 3.8-3.9. a**), il est possible d'observer qu'il existe toujours des agglomérats de matériau carboné d'une taille de l'ordre du micron dans l'ensemble de l'échantillon. Cependant ces agglomérats n'ont plus le même aspect que dans les DWNTs bruts mais semblent plus fins. Les DWNTs semblent « englués » dans cette matrice carbonée. A plus fort grossissement, un dépôt de carbone amorphe est plus facilement visible au niveau des parois des DWNTs. Cela confirme bien que le carbone désorganisé présent dans les échantillons de DWNTs bruts subit une détérioration au cours de l'oxydation, le transformant en CCFs, matériaux plus amorphe et désordonné.

Pour la Méthode 2, les **Figures 3.8-3.9 (b)** montrent que les agglomérats ont disparu pour ne laisser place qu'à des dépôts de CCFs sur les parois des DWNTs. Ce traitement semble ainsi plus efficace quant à la dégradation du carbone désorganisé.

Avec les Méthodes 3 et 4 (**Figures 3.8-3.9. c-d**), les échantillons ne présentent plus du tout d'agglomérats de carbone désorganisé, et les parois des DWNTs sont propres, sans CCFs apparents. La pureté des DWNTs obtenus par ces deux méthodes, en termes d'absence de métaux et de carbone désorganisé, tend vers celle des DWNTs traités par la Méthode 6. Les Méthodes 3 et 4 sont ainsi les traitements oxydants les plus performants pour éliminer le carbone désorganisé et limiter la formation de CCFs pouvant se déposer sur les parois des DWNTs. Cependant il est pertinent de rappeler que ces deux méthodes présentent tout de même des inconvénients (déjà notifiés dans la partie précédente C.I) :

- Avec la Méthode 3, le rendement total du traitement est seulement de 2 %, ce qui rend cette méthode non envisageable (coût trop élevé).
- Avec la Méthode 4, c'est la quantité de NTCs pouvant être traitée, liée au rendement assez faible, qui va conduire à privilégier une autre technique.

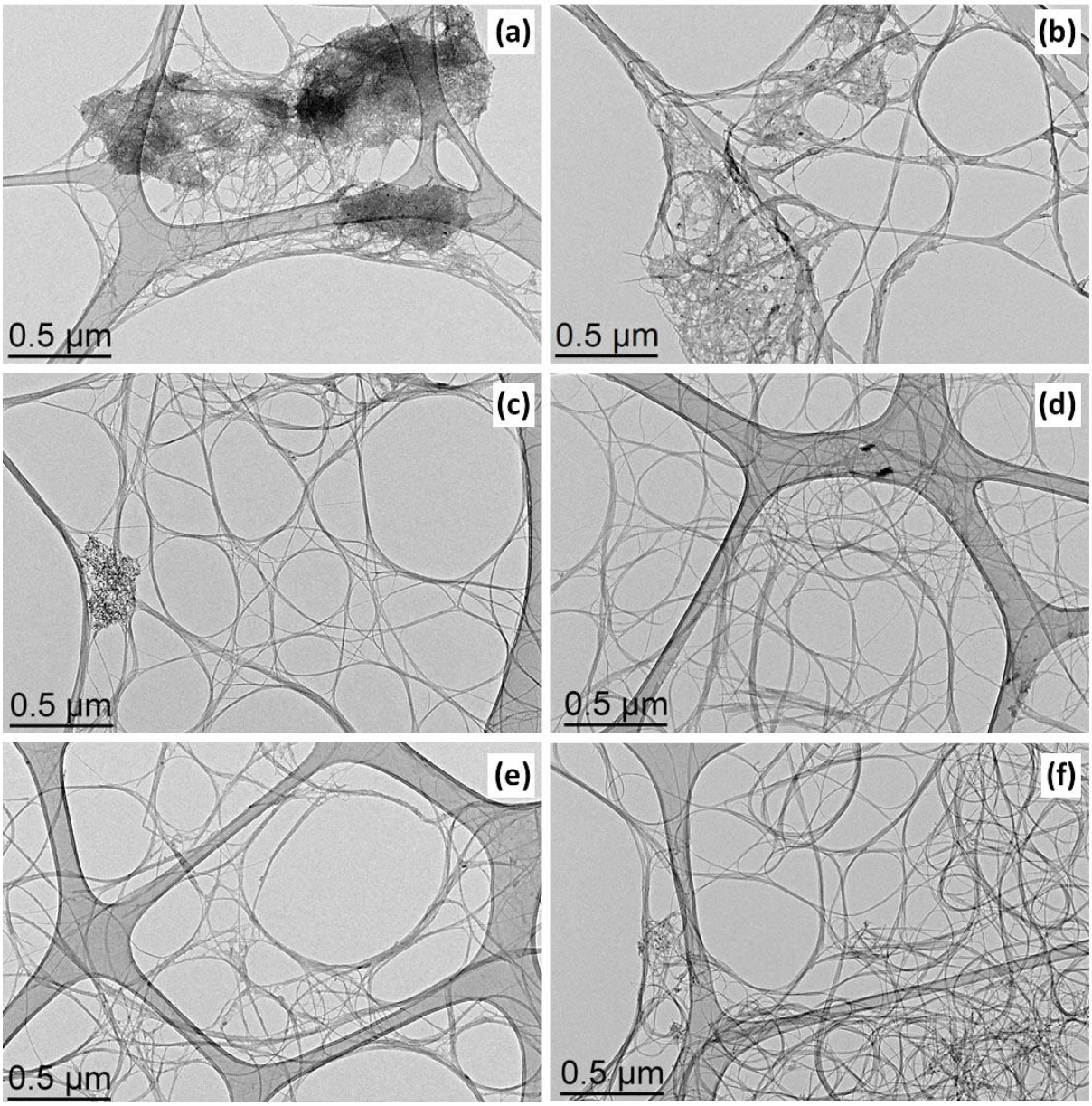



*Figure 3.8 : Images MET de DWNTs traités par (a) la Méthode 1 ; (b) la Méthode 2 pendant 6h30 ; (c) la Méthode 3 ; (d) la Méthode 4 pendant 30 min ; (e) la Méthode 5 et (f) la Méthode 6.*

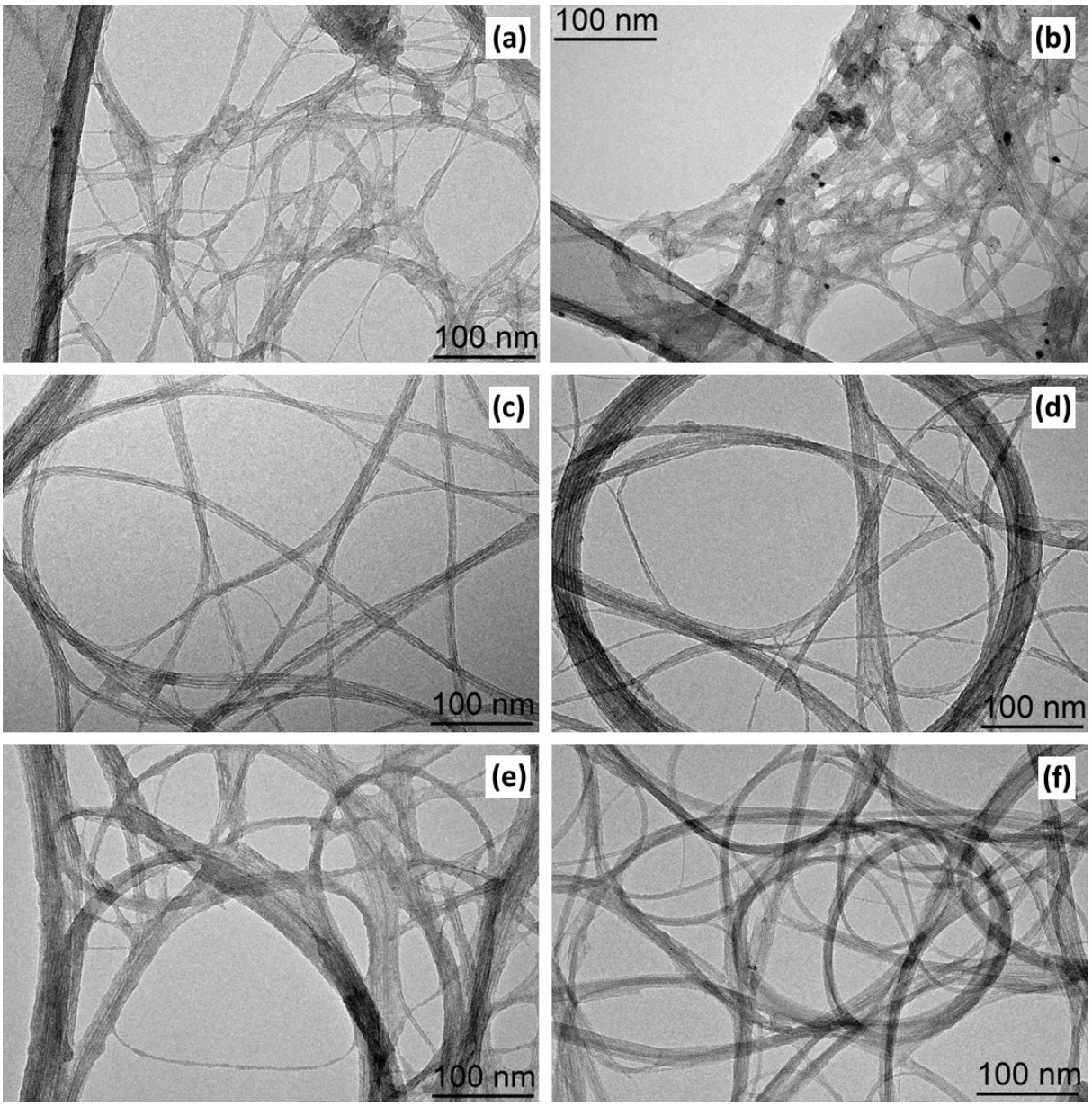



*Figure 3.9 : Images MET à un plus fort grossissement de DWNTs traités par (a) la Méthode 1 ; (b) la Méthode 2 pendant 6h30 ; (c) la Méthode 3 ; (d) la Méthode 4 pendant 30 min ; (e) la Méthode 5 et (f) la Méthode 6.*

La spectroscopie Raman est un outil précieux pour tout ce qui concerne la caractérisation des nanostructures à base de carbone, étant donné la présence de bandes bien caractéristiques : les bandes D et G, ainsi que les modes de respiration radiale (RBM) dans le cas particulier des NTCs. La bande D est en général attribuée aux défauts, plus précisément aux carbones $sp^3$, présents dans la structure des nanotubes de carbone alors que la bande G provient des élongations tangentielles au plan des liaisons carbone-carbone entre carbones $sp^2$ d'un feuillet de graphène. Les valeurs des rapports $I_D/I_G$ (rapport entre les intensités des bandes D et G) ont été calculées à partir des spectres Raman enregistrés sur

les différents échantillons de DWNTs bruts et traités par les différentes méthodes d'oxydation. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.3**. Les valeurs présentent toutes une valeur d'écart-type qui lui est propre, calculée à partir des valeurs de rapports $I_D/I_G$ obtenues au sein d'un même échantillon et entre plusieurs échantillons de même nature.

*Tableau 3.3 : Comparaison des rapports $I_D/I_G$ pour les différentes méthodes de purification.*

| Echantillon analysé | Rapport $I_D/I_G$ |
|---|---|
| **DWNTs bruts** | 0,20 ± 0,05 |
| **Méthode 1 - 24h** | 0,4 ± 0,1 |
| **Méthode 2 - 3h** | 0,08 ± 0,02 |
| **Méthode 2 - 4h** | 0,08 ± 0,02 |
| **Méthode 2 - 5h** | 0,07 ± 0,02 |
| **Méthode 2 - 6,5h** | 0,06 ± 0,02 |
| **Méthode 2 - 24h** | 0,050 ± 0,001 |
| **Méthode 3 - 5h** | 0,03 ± 0,01 |
| **Méthode 4 - 15 min** | 0,029 ± 0,001 |
| **Méthode 4 - 30 min** | 0,017 ± 0,002 |
| **Méthode 5 - 24+5h** | 0,08 ± 0,01 |
| **Méthode 6 - 30 min** | 0,020 ± 0,001 |

Comme cela a été décrit plus tôt **[7-8]**, dans la plupart des cas, la présence de défauts peut être reliée à la valeur du rapport $I_D/I_G$. Les DWNTs bruts ont un rapport $I_D/I_G$ plutôt bas (0,20 ± 0,05) du fait de leur faible quantité de défauts dans la structure en carbone. Après un traitement par la Méthode 1, le rapport $I_D/I_G$ voit sa valeur doubler et atteindre ainsi une valeur de 0,4 ± 0,1 en 24h d'oxydation. Avec la Méthode 2, le rapport $I_D/I_G$ diminue significativement par rapport aux échantillons bruts ($0,050 \leq I_D/I_G \leq 0,08$), à noter que plus la durée de traitement est longue et plus le rapport $I_D/I_G$ diminue. Les Méthodes 3 (5h) et 4 (15 min ; 30 min) conduisent aux rapports $I_D/I_G$ les plus faibles de tous les traitements d'oxydation en solution avec des valeurs atteignant respectivement 0,03 ; 0,029 et 0,017. Lorsque ces valeurs sont corrélées aux images MET présentées un peu plus haut, il est possible de constater que plus la valeur du rapport $I_D/I_G$ est faible, moins il reste de carbone désorganisé dans les échantillons et moins il y a de carbone amorphe sous forme de CCFs collé aux parois des DWNTs.

La question de la contribution du carbone désorganisé sur l'intensité de la bande D étant à ce jour toujours débattue, nous avons essayé de synthétiser ce carbone désorganisé, ou voiles de carbone, et de le mettre en présence de DWNTs purs (Méthode 6) pour enfin mesurer le rapport $I_D/I_G$ qui en résulte. Les voiles de carbone ont été synthétisés par CCVD à 900°C à partir d'une poudre de catalyseur MgO dénuée de toutes particules métalliques (Co ou Mo) et sous flux de $CH_4$ pur. Les voiles de carbone bruts sont alors extraits à l'aide d'une solution de HCl à 37 % (rendement = 17 %). Par la suite, des suspensions de voiles de carbone sont préparées :

- 1,0 mg de voiles de carbone bruts dans 20 mL d'EtOH absolu,
- 1,0 mg de voiles de carbone oxydés par la Méthode 1 dans 20 mL d'EtOH absolu,

Puis soniquées au bain à ultrasons pendant 10 min. Dans chacune des suspensions est ajouté 1,0 mg de DWNTs purifiés par la Méthode 6, et les suspensions sont de nouveau soniquées pendant 10 min au bain à ultrasons. Les deux échantillons de DWNTs Meth6@Voiles bruts et de DWNTs Meth6@Voiles Meth1 ont été analysés par MET (**Figure 3.10**) et par spectroscopie Raman (**Tableau 3.4**).

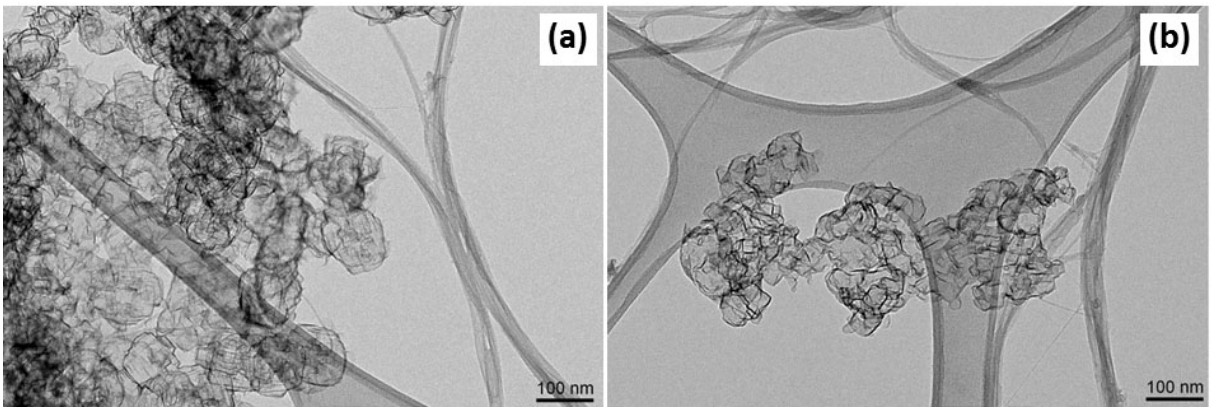



*Figure 3.10 : Images MET des (a) DWNTs Meth6@Voiles bruts et (b) DWNTs Meth6@Voiles Meth1.*

D'après les images de MET, les voiles de carbone synthétisés ne présentent pas de différence structurale avant (**Figure 3.10. a**) ou après oxydation (**Figure 3.10. b**). L'aspect des voiles de carbone synthétisés semble néanmoins légèrement différent de celui du carbone désorganisé présent dans les échantillons de DWNTs bruts.

*Tableau 3.4 : Comparaison des rapports $I_D/I_G$ obtenus pour les échantillons de voiles de carbone.*

| Echantillon analysé | Rapport $I_D/I_G$ |
|---|---|
| **DWNTs Meth6** | 0,020 ± 0,001 |
| **Voiles de carbone bruts** | 1,9 ± 0,1 |
| **Voiles de carbone Meth1** | 2,03 ± 0,08 |
| **DWNTs Meth6@Voiles bruts** | 0,024 ± 0,008 |
| **DWNTs Meth6@Voiles Meth1** | 0,03 ± 0,01 |

Las analyses par spectroscopie Raman ont révélé que le signal des voiles de carbone était nettement moins intense que celui des DWNTs, avec des intensités maximales respectivement de 200 et 15000 coups. D'autre part, comme nous pouvons le voir dans le **Tableau 3.4**, la bande D des voiles de carbone atteint une intensité deux fois supérieure à celle de la bande G donc le rapport $I_D/I_G$ des voiles de carbone est inversé par rapport à celui des DWNTs, révélant ainsi un nombre de défauts beaucoup plus élevé. Après que les voiles de carbone, bruts ou oxydés, aient été mélangés aux DWNTs Meth6, le rapport $I_D/I_G$ n'a pas varié et est toujours égal à celui des DWNTs Meth6. Donc l'ajout des voiles de carbone n'a eu aucune influence sur le rapport $I_D/I_G$, ce qui signifie que la contribution du carbone désorganisé en Raman est quasi-nulle.

De ce fait, la diminution du rapport $I_D/I_G$ observée avec les traitements oxydants serait surtout reliée à l'élimination des DWNTs comportant des défauts, et non à la dégradation du carbone désorganisé.

Avec les Méthodes 3 et 4, il est ainsi possible d'atteindre un niveau de pureté égal à celui des DWNTs purifiés à l'air (Méthode 6), cependant les rendements obtenus sont tout aussi faibles.

En outre, du point de vue de l'analyse Raman, il est important de noter que plus le rapport $I_D/I_G$ est faible plus l'échantillon est homogène, à la fois sur différents points d'un même échantillon et d'un échantillon à l'autre pour un même traitement). Ceci est directement observable au niveau des écarts-types du **Tableau 3.3**.

## C.III. Le cas particulier de la Méthode 5 ou Double-oxydation

Après avoir analysé tous les résultats obtenus par MET et par spectroscopie Raman sur l'élimination du métal, la modification des parois des DWNTs et la formation de CCFs, nous avons voulu tester une nouvelle approche.

En effet, avec la Méthode 1 (24h), il était possible d'éliminer 91 % du métal tout en conservant 80 % de la masse totale de l'échantillon de DWNTs. Cependant, cette méthode avait l'inconvénient de ne pas détruire entièrement les agglomérats de carbone désorganisé et de créer beaucoup de CCFs. Nous est donc venue l'idée de faire subir un deuxième traitement oxydant à l'échantillon afin d'attaquer au maximum le carbone désorganisé résiduel et de limiter la création des CCFs. Les Méthodes 3 (5h) et 4 (30 min) conduisaient aux DWNTs les plus propres, que ce soit visuellement au MET ou par leurs rapports $I_D/I_G$ les plus faibles. Cependant, la Méthode 3 présentait un trop mauvais rendement (2 %) pour être envisageable, et la Méthode 4 présentait l'inconvénient de ne pouvoir traiter que de faibles quantités de DWNTs. La Méthode 2 en revanche permettait de traiter de grandes quantités de DWNTs avec un rendement acceptable (≈ 18 %) et un rapport $I_D/I_G$ relativement faible (≈ 0,07). La Méthode 5, ou double oxydation, a ainsi été expérimentée : Méthode 1 pendant 24h suivie de la Méthode 2 pendant 5h.

Avec la Méthode 5, le métal a été éliminé efficacement à 96 % avec un rendement total convenable de 16 % (**Tableau 3.2**). Pour ce qui est de l'élimination du carbone désorganisé, le traitement semble avoir agi selon nos attentes puisque sur les images MET (**Figures 3.8-3.9. e**) plus aucun agglomérat n'est visible et le rapport $I_D/I_G$ obtenu est faible (0,08) (**Tableau 3.3**). Néanmoins, il est possible d'observer sur les images à fort grossissement que les parois des DWNTs sont recouvertes de CCFs. Cela expliquerait pourquoi le rapport ID/IG n'a pas atteint la valeur la plus basse possible (0,02), obtenue pour les DWNTs les plus propres avec les Méthodes 4 (30 min) et 6.

## C.IV. Création de groupements fonctionnels

Il a été établi de façon générale que les traitements par des acides oxydants créent des groupements fonctionnels oxygénés, surtout carboxyliques (–COOH), localisés au niveau des extrémités et des défauts des NTCs **[9, 10]**. La fonctionnalisation des DWNTs par ces fonctions a été mise en évidence par spectroscopie IR. Les analyses ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les DWNTs bruts, à savoir sous la forme de pastilles dans du KBr.

Sur la **Figure 3.11** sont présentés les spectres IR des DWNTs bruts à titre de rappel en **(a)**, et des DWNTs oxydés par la Méthode 5 en **(b)** à titre d'exemple. Les différents échantillons de DWNTs, ayant subi les traitements d'oxydants (Méthodes 1 à 5), donnent tous des spectres IR très similaires.

Les spectres IR des DWNTs bruts et oxydés sont assez proches l'un de l'autre par la présence des bandes correspondant aux élongations des liaisons C=C (entre 1430 et 1544 $cm^{-1}$), C–H des carbones $sp^3$ (entre 2846 et 2955 $cm^{-1}$), =C–H et O–H (vers 3440 $cm^{-1}$). Cependant, deux autres bandes ressortent du lot par leur intensité dans les échantillons de DWNTs oxydés par rapport aux intensités des autres bandes :

- C=O : bande à 1631 $cm^{-1}$,
- C–O : bande entre 1259 et 1384 $cm^{-1}$.

Ces deux bandes étant beaucoup plus accentuées après oxydation sont la preuve de la création de fonctions oxygénées, plus précisément de fonctions carboxyliques, sur les DWNTs.

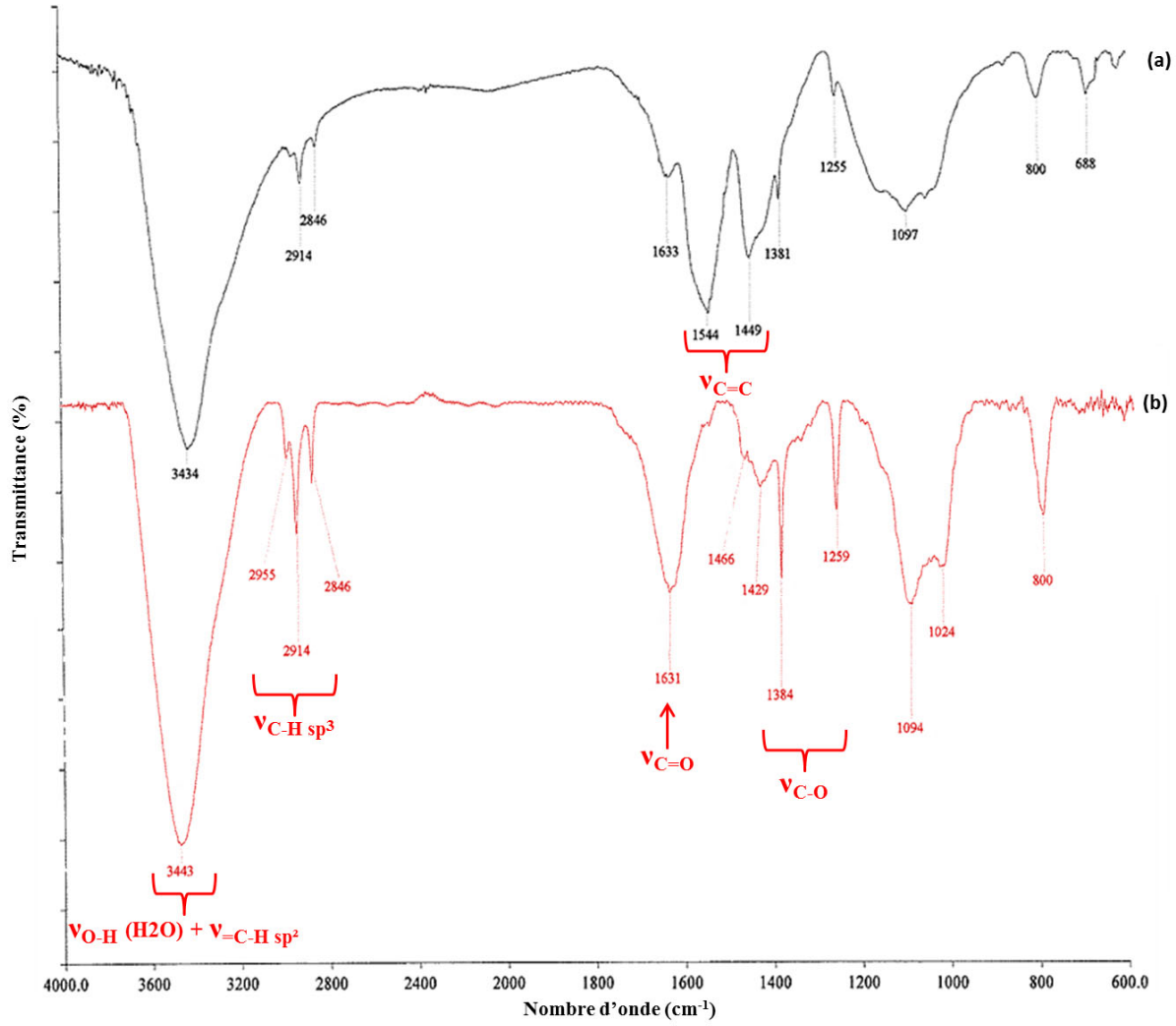



*Figure 3.11 : Spectres IR caractéristiques (a) des DWNTs bruts et (b) des DWNTs oxydés par la Méthode 5.*

Il est possible de quantifier le nombre de fonctions carboxyliques créées sur les échantillons de DWNTs par un dosage en retour acido-basique. Pour cela 10,0 mg de DWNTs sont agités pendant 72h dans un excès de soude (10 mL de solution à $10^{-2}$M) sous atmosphère d'azote. Puis la suspension est titrée par une solution de HCl à $10^{-2}$M. Un témoin est également préparé à partir du même volume de solution de NaOH mais sans DWNTs afin de compenser dans les résultats la possible carbonatation de la solution de soude. La méthode de préparation et d'analyse des échantillons est décrite plus en détails dans le Chapitre 2 (partie E.II.2). Les résultats sont présentés dans le **Tableau 3.5**. Certaines valeurs sont accompagnées de leur écart-type respectif, calculé à partir des valeurs obtenues après plusieurs dosages. Cependant, du fait que ces dosages de fonctions acides sont "gourmands" en quantité d'échantillon, les titrations n'ont pas toujours pu être répétées.

*Tableau 3.5 : Comparaison du nombre de fonctions carboxyliques créées par les différentes méthodes de d'oxydation.*

| Echantillon analysé | Nombre de fonctions COOH (mmol/g de DWNTs) |
|---|---|
| **DWNTs bruts** | 0,25 ± 0,25 |
| **Méthode 1 - 24h** | 2,1 ± 0,1 |
| **Méthode 2 - 6,5h** | 3,3 |
| **Méthode 2 - 24h** | 4,4 |
| **Méthode 3 - 5h** | 0,0 |
| **Méthode 4 - 15 min** | 2,8 |
| **Méthode 4 - 30 min** | 3,1 |
| **Méthode 5 - 24+5h** | 3,7 |
| **Méthode 6 - 30 min** | 0,4 ± 0,2 |

Les échantillons de DWNTs bruts contiennent une faible quantité de fonctions acides (moins de 0,5 mmol/g DWNTs). Après les traitements par les Méthodes 1, 2, 4 et 5, la quantité de groupements fonctionnels –COOH est comprise entre 2,0 et 4,4 mmol/g de DWNTs, ce qui est beaucoup plus que ce qui avait été observé pour les MWNTs traités par une solution de $HNO_3$ concentré (0,4 mmol/g) **[6]**. En outre, lorsque la durée de réaction pour la Méthode 2 passe de 6,5h à 24h, la quantité de groupements fonctionnels varie de 3,3 à 4,4 mmol/g. Il en est de même pour la Méthode 4 qui voit son nombre de fonctions –COOH augmenter de 2,8 à 3,1 mmol/g de DWNTs en passant d'un traitement de 15 à 30 min. Ainsi, plus la durée de traitement est longue et plus le nombre de fonctions acides créés augmente.

Ces fonctions sont sûrement localisées sur les parois des DWNTs mais également sur les CCFs. Dans le cas des DWNTs purifiés sous air (Méthode 6), pour lesquels le carbone désorganisé a été complétement détruit, le nombre de groupements fonctionnels est compris seulement entre 0,2 et 0,6 mmol/g, valeurs quasiment identiques à celles obtenues pour les DWNTs bruts. Quand cette purification sous air est suivie d'une oxydation par la Méthode 1, le nombre de fonctions –COOH atteint la valeur de 1,0 mmol/g de DWNTs, ce qui est bien inférieur au résultat obtenu lorsque la Méthode 1 est appliquée aux DWNTs bruts **[4]**. Par conséquent, la formation de groupements –COOH ne se produit pas uniquement sur les parois de DWNTs mais également sur le carbone désorganisé et d'autres espèces carbonées présentes dans les échantillons.

Quant à la Méthode 3, la quantification des fonctions acides n'a pu être réalisée qu'une seule fois du fait du très faible rendement du traitement (2 %) et de la quantité importante de DWNTs utilisée pour la titration. Afin d'expliquer la valeur égale à 0 plusieurs hypothèses sont possibles : étant donné le rendement de ce traitement, il est fort possible qu'il ne reste dans l'échantillon que les DWNTs les plus résistants, c'est-à-dire présentant très peu de défauts (confirmé par un rapport $I_D/I_G$ très faible), donc ceux sur lesquels la formation de fonctions carboxyliques aura été la plus difficile ; comme une partie des fonctions acides se forme sur le carbone désorganisé et les CCFs et que ces deux types de matériaux sont inexistants dans l'échantillon obtenu par la Méthode 3 (observations MET et rapport $I_D/I_G$), le nombre de groupements fonctionnels ne peut être que voisin de celui des DWNTs bruts ou traités sous air (Méthode 6).

En conclusion, ce sont les Méthodes 2 et 5 qui permettent l'obtention d'échantillons de DWNTs avec le plus grand nombre de fonctions –COOH. Néanmoins, il est nécessaire de rappeler que l'élimination du métal est égale à seulement 78 % par la Méthode 2 contre 96 % par la Méthode 5, à rendement final équivalent. La Méthode 5 semble ainsi la plus adéquate et la meilleure alternative afin de produire des DWNTs avec le moins de nanoparticules métalliques résiduelles, sans agglomérats de carbone désorganisé, un rapport $I_D/I_G$ faible et un nombre de fonctions carboxyliques important.

Cependant, les parois des DWNTs oxydés par la Méthode 5 ne sont pas propres, et il n'est pas possible de travailler directement sur un tel échantillon pour faire de la fonctionnalisation covalente, car les molécules d'intérêt seraient greffées à la fois sur les parois des DWNTs et sur les CCFs encore présents.

## C.V. Elimination des CCFs après l'étape d'oxydation

Après les traitements d'oxydation en solution, une procédure supplémentaire est nécessaire afin d'obtenir des DWNTs de grande pureté. Pour cela, il est impératif d'éliminer les CCFs restants dans les échantillons et recouvrant les parois des DWNTs.

Différents lavages par des solutions de NaOH ont été effectués sur plusieurs échantillons de DWNTs oxydés encore humides correspondant à 20 mg de DWNTs secs.

- **Lavage (A)** : 20 mg équivalents secs de DWNTs obtenus par la Méthode 1 sont transférés dans 40 mL de solution de NaOH (4M), puis soniqués au bain à ultrasons pendant 7 min à température ambiante et chauffés à reflux pendant 24h à 130°C ;
- **Lavage (B)** : 20 mg équivalents secs de DWNTs obtenus par la Méthode 1 sont transférés dans 50 mL de solutions de NaOH à différentes concentrations (0,01M, 4M, 10M), puis soniqués au bain à ultrasons de 30 min à 3h à température ambiante selon la concentration ;
- **Lavage (C)** : 20 mg équivalents secs de DWNTs obtenus par la Méthode 2 (5h ou 6h30) ou la Méthode 5 sont transférés dans 40 mL de solution de NaOH (4M), puis soniqués au bain à ultrasons pendant 1h à température ambiante.

L'utilisation de solutions basiques dans le but d'éliminer les CCFs a tout d'abord été proposée par Rinzler et son équipe **[11]** puis cette méthode s'est largement répandue au sein de la communauté scientifique **[8, 12, 13, 14]**. Ils ont démontré que le filtrat brun recueilli après un lavage basique contenait des groupes $–COO^-$, et ont conclu que la neutralisation des groupements carboxyliques situés sur les CCFs favorisait la solubilisation de ces espèces carbonées dans l'eau. Les **Figure 3.12 et 3.15** montrent les images MET des échantillons de DWNTs oxydés avant et après les différents lavages (**A**, **B**, **C**).

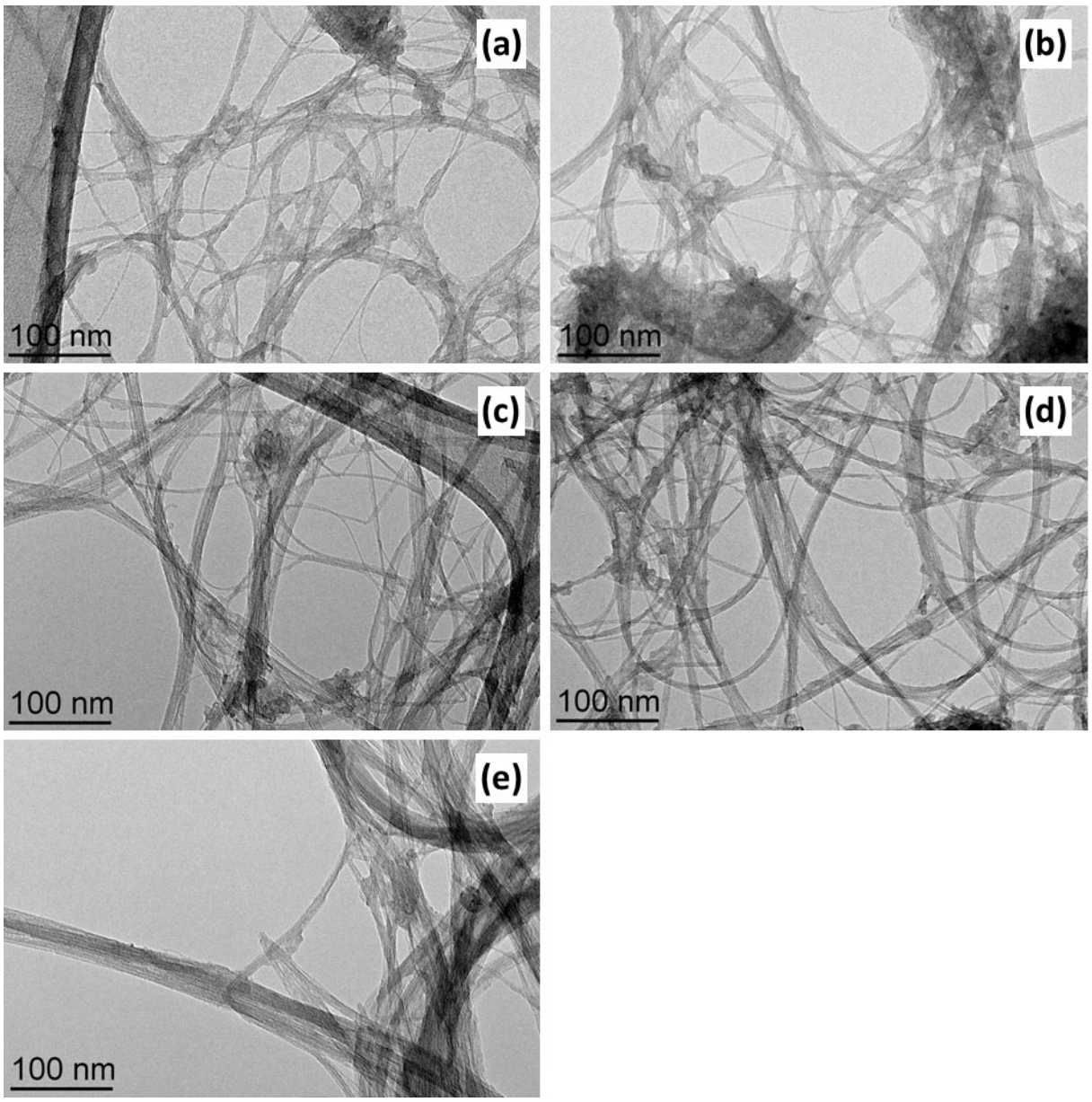



*Figure 3.12 : Images MET de (a) DWNTs oxydés par la Méthode 1 ; puis lavés par (b) une solution de NaOH (4M) à reflux (**Lavage A**) ; (c) une solution de NaOH à 0,01M (**Lavage B**) ; (d) une solution de NaOH à 4M (**Lavage B**) et (e) une solution de NaOH à 10M (**Lavage B**).*

Avec le traitement **(A)**, la purification semble incomplète (**Figure 3.12. b**) puisqu'il reste encore beaucoup d'impuretés carbonées collées aux parois DWNTS, mais plus aucun groupement fonctionnel ne peut être détecté ni par titration (2,1 mmol/g avant lavage contre 0,0 après lavage) ni par spectroscopie IR (disparition des bandes caractéristiques des fonctions oxygénées). Quant au rapport $I_D/I_G$, il est passé de 0,40 à 0,20 (**Figure 3.13**).

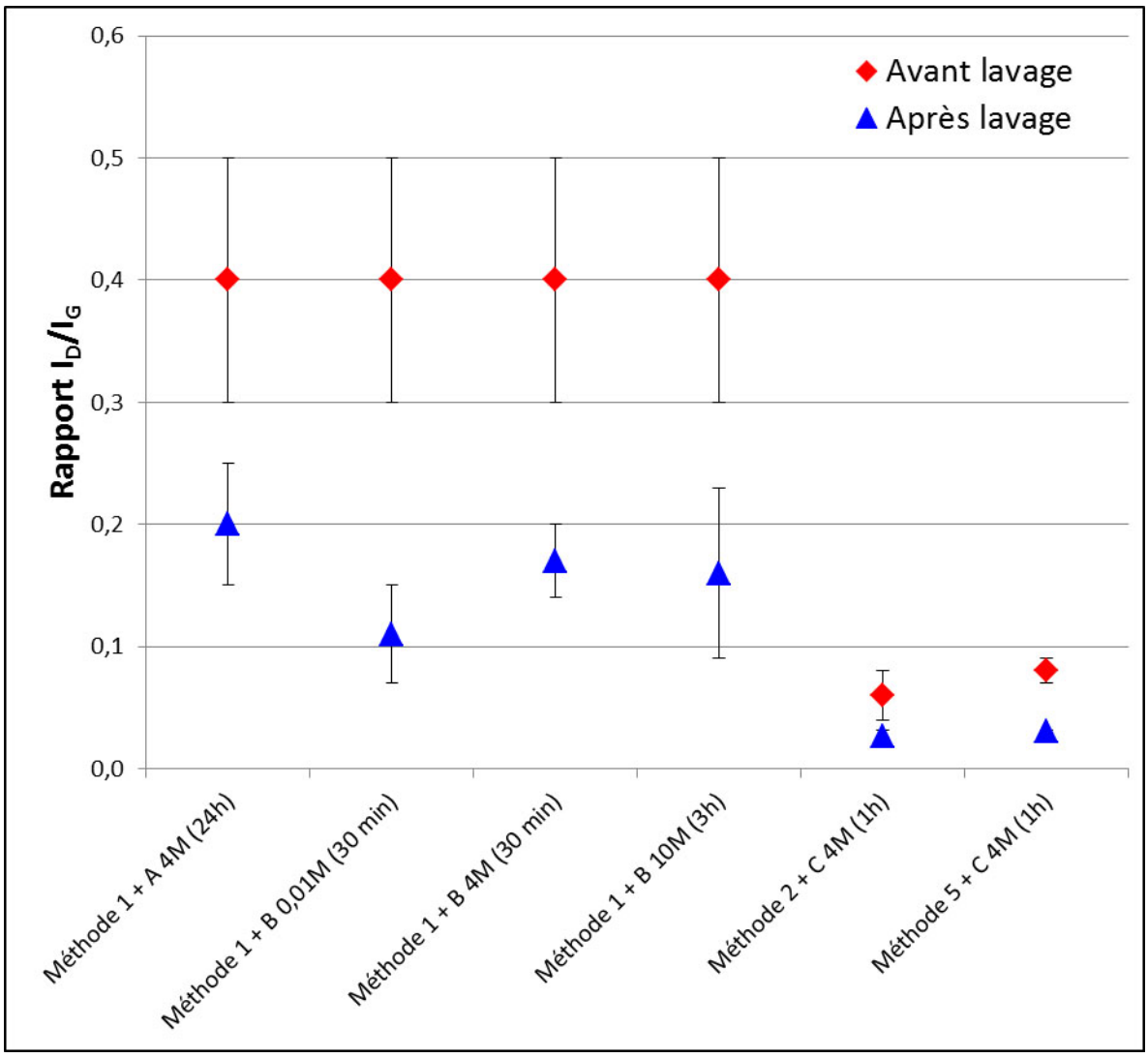



*Figure 3.13 : Graphique représentant les valeurs des rapports ID/IG calculées avant et après les différents lavages à la soude, .*

Avec le lavage **(B)**, trois concentrations de solutions de NaOH ont été utilisées pendant des durées de traitement différentes : les suspensions préparées avec les solutions de soude à 0,01M et à 4M ont été soniquées au bain pendant 30 min (**Figure 3.12. c d**) ; et celle avec la solution de soude à 10M pendant 3h (**Figure 3.12. e**). Les résultats obtenus par dosage acido-basique (**Figure 3.14**) montrent que le nombre de groupements fonctionnels a diminué de 62 % après le lavage avec la solution de NaOH à 0,01M (de 2,1 à 0,8 mmol/g) et de 100 % après les lavages avec les solutions de NaOH à 4M et à 10M. Les images de MET quant à elles révèlent une très légère amélioration après les lavages basiques, mais la différence entre les échantillons n'est pas significative. Les rapports $I_D/I_G$ calculés pour chacun des trois lavages **(B)** ont tous diminué et atteint une valeur proche de 0,15.

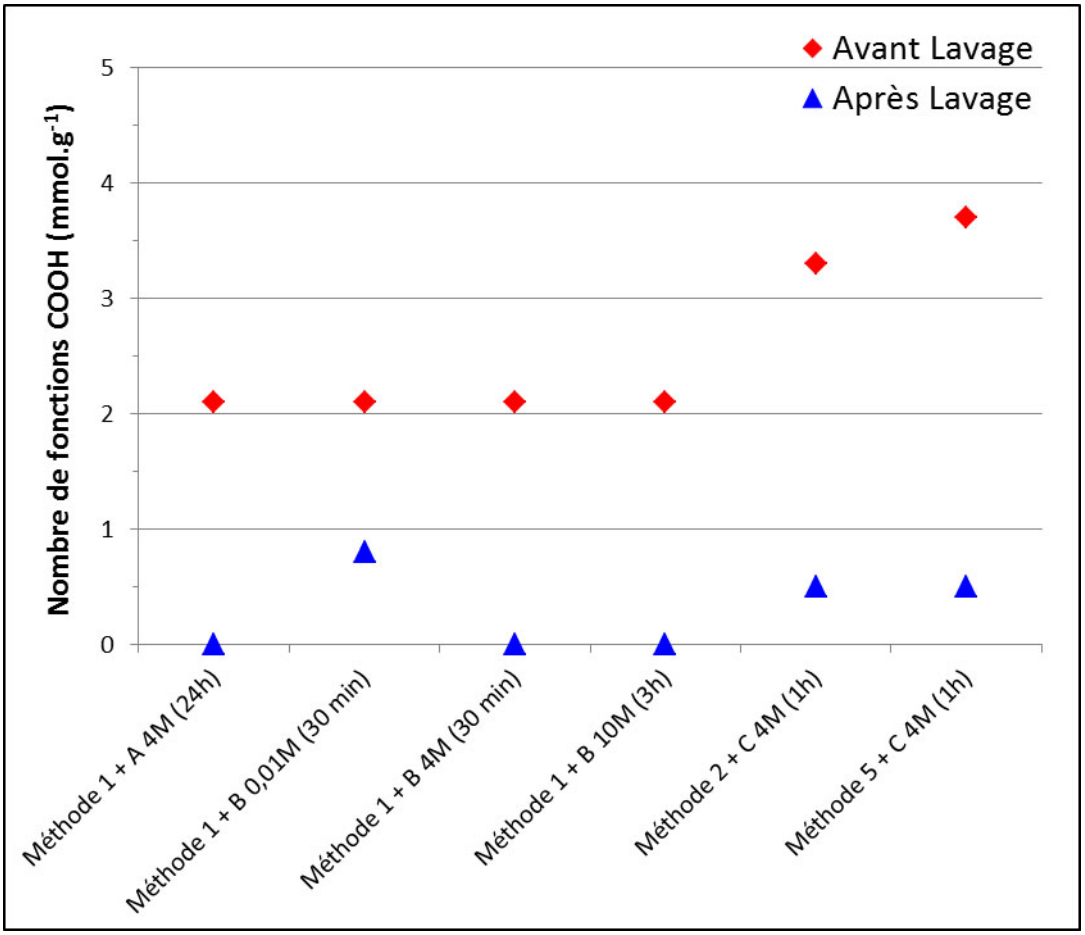



*Figure 3.14 : Graphique représentant le nombre de fonctions COOH par gramme de DWNTs avant et après lavages à la soude.*

Après le lavage **(C)**, les DWNTs oxydés par la Méthode 2 pendant 5h (**Figure 3.15. a-b**) et 6,5h (**Figure 3.15. c-d**) ont leur parois beaucoup plus propres, bien qu'il semble rester quelques débris de carbone amorphe au niveau des intersections inter-faisceaux et à certains points localisés sur les parois. L'analyse Raman des échantillons montre que le rapport $I_D/I_G$ a diminué en passant d'un rapport moyen de 0,07 à 0,023 (**Figure 3.13**), peu importe la durée de l'oxydation. Le nombre de fonctions acides diminue également de 3,3 à 0,5 mmol/g de DWNTs.

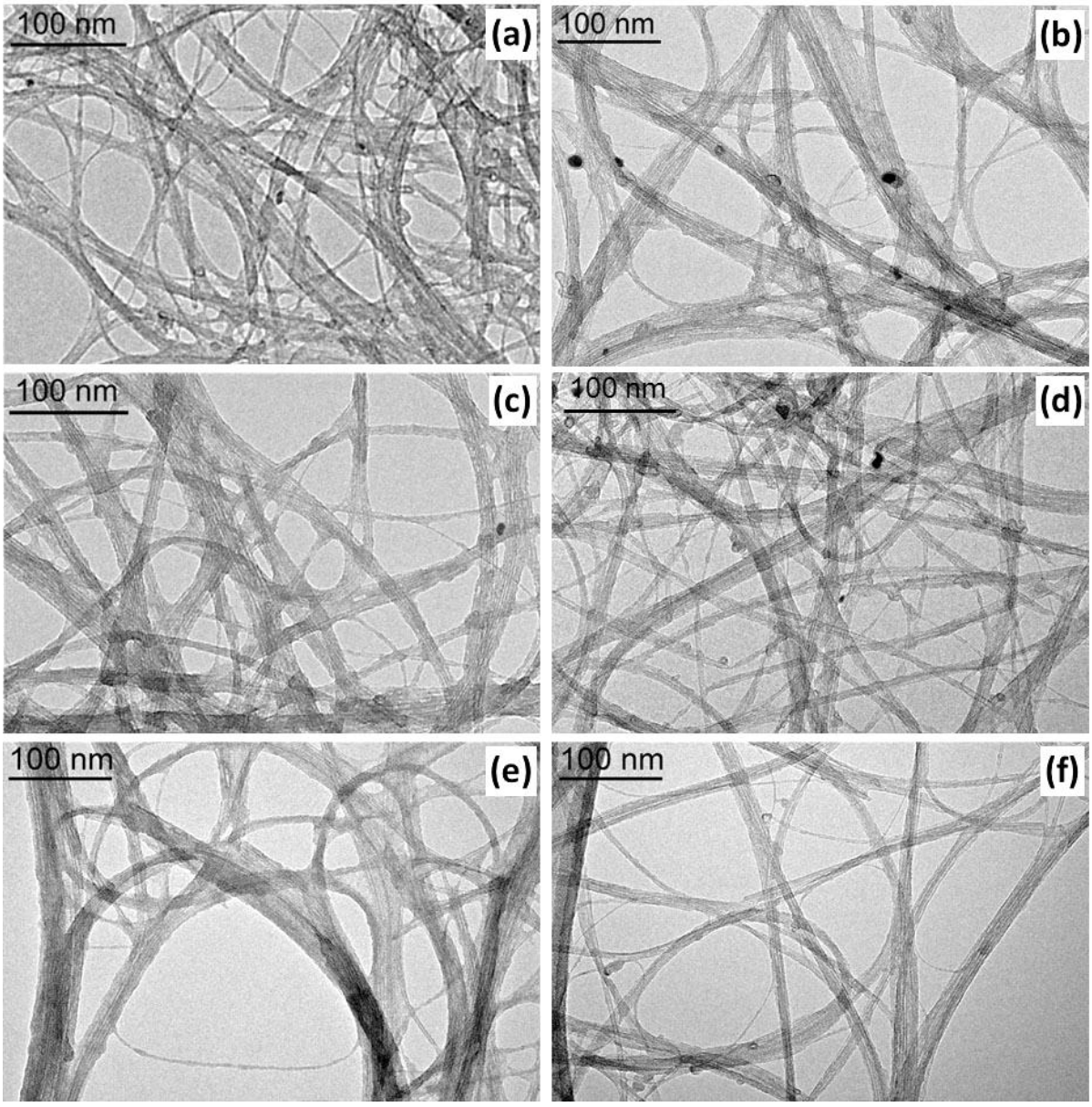



*Figure 3.15 : Images MET, à gauche, de DWNTs oxydés par (a) la Méthode 2 pendant 5h puis (b) lavés par une solution de NaOH à 4M (**Lavage C**) ; (c) la Méthode 2 pendant 6,5h puis (d) lavés par une solution de NaOH à 4M (**Lavage C**) ; et (e) la Méthode 5 puis (f) lavés par une solution de NaOH à 4M (**Lavage C**).*

Pour les DWNTs oxydés par la Méthode 5, les images de MET (**Figure 3.15. e-f**) montrent que leurs parois sont propres et qu'il ne reste plus de CCFs ou autres impuretés carbonées. Le rapport $I_D/I_G$ diminue légèrement de 0,08 avant lavage à 0,03 après lavage (avec une grande homogénéité au sein d'un même échantillon et entre les échantillons). Les résultats obtenus après titration indiquent que le nombre de fonctions acides diminue de 3,7 à 0,5 mmol/g.

Dans tous les cas (lavages **A**, **B**, **C**), les lavages à la soude causent une diminution à la fois du nombre de fonctions acides titrées et des valeurs des rapports $I_D/I_G$, et les images de MET montrent également dans la majorité des situations une quantité décroissante de CCFs recouvrant les parois des DWNTs. Avant les lavages avec les solutions de NaOH, les échantillons présentaient en moyenne 3,5 mmol/g de DWNTs de fonctions oxygénées, alors qu'après les lavages plus de 85 % des fonctions ont été éliminées (0,5 mmol/g). Par conséquent, tous ces résultats convergent vers la même conclusion : le filtrat marron-brun, éliminé après les lavages, doit contenir ces CCFs oxydés et très solubles (CCFs–$COO^-$) sur lesquels la majorité des fonctions acides, créées au cours de l'étape d'oxydation, est présente.

Tous les résultats obtenus après les différentes méthodes d'oxydation et de lavage ont été regroupés dans le **Tableau 3.6** et les spectres Raman présentés la **Figure 3.16**.

*Tableau 3.6 : Comparaison des résultats obtenus par dosage des fonctions acides et analyse des spectres Raman pour les différentes méthodes d'oxydation et de lavage.*

| Méthode d'oxydation | Durée du traitement (h) | Lavage par une solution de NaOH Lavages A, B ou C | Nombre de fonctions – COOH (mmol/g) | Rapport $I_D/I_G$ |
|---|---|---|---|---|
| **DWNTs bruts** | | | 0,25 ± 0,25 | 0,20 ± 0,05 |
| **1** | 24 | | 2,1 ± 0,1 | 0,4 ± 0,1 |
| **1** | 24 | A | 0 | 0,20 ± 0,05 |
| **1** | 24 | B – 0,01M | 0,8 | 0,11 ± 0,04 |
| | | B – 4M | 0 | 0,17 ± 0,03 |
| | | B – 10M | 0 | 0,16 ± 0,07 |
| **2** | 3 | | ND | 0,08 ± 0,02 |
| | 4 | | ND | 0,08 ± 0,02 |
| | 5 | | ND | 0,07 ± 0,02 |
| | 6,5 | | 3,3 | 0,06 ± 0,02 |
| | 24 | | 4,4 | 0,050 ± 0,001 |
| **2** | 3 | C | ND | 0,023 ± 0,002 |
| | 4 | C | ND | 0,021 ± 0,003 |
| | 5 | C | 0 | 0,021 ± 0,005 |
| | 6,5 | C | 0,5 | 0,026 ± 0,005 |
| **3** | 5 | | 0 | 0,03 ± 0,01 |
| **4** | 0,25 | | 2,8 | 0,029 ± 0,001 |
| | 0,5 | | 3,1 | 0,017 ± 0,002 |
| **5** | 24+5 | | 3,7 | 0,08 ± 0,01 |
| | 24+5 | C | 0,5 | 0,030 ± 0,001 |
| **6** | 0,5 | | 0,4 ± 0,2 | 0,020 ± 0,001 |

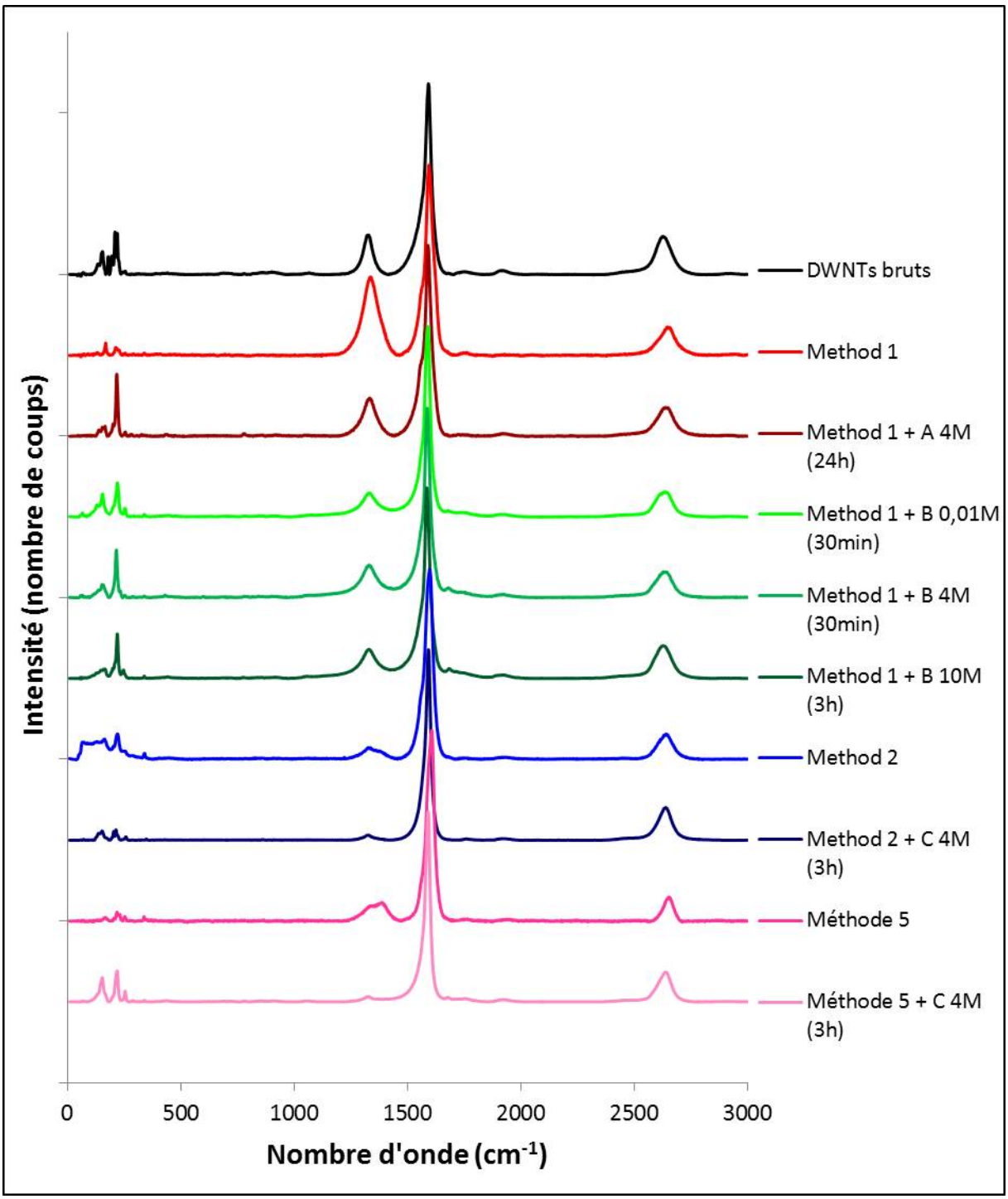



*Figure 3.16 : Spectres Raman enregistrés à $\lambda$ = 633 nm sur les échantillons traités par les différentes méthodes d'oxydation et de lavages.*

En conclusion, différents traitements de purification ont pu être mis en évidence, permettant d'éliminer soit les nanoparticules métalliques résiduelles provenant du catalyseur de départ (Méthodes 1 et 4), soit le carbone désorganisé (Méthodes 2, 3 et 4), soit les deux types d'impuretés (Méthode 5 **(C)**), selon les besoins de l'utilisateur. Chaque traitement possède ses avantages et ses inconvénients, notamment en termes de rendement final et de contraintes expérimentales. Ces résultats ont aussi montré que les CCFs déposés sur les DWNTs après les traitements d'oxydation provenaient probablement des impuretés carbonées et non des NTCs eux-mêmes. En outre, l'étape d'oxydation permet la création de fonctions carboxyliques sur les parois des DWNTs, potentiels points d'ancrage pour le greffage covalent de molécules d'intérêt.

Le but dans cette thèse étant d'étudier et de quantifier les fonctionnalisations covalente et non-covalente sur des DWNTs, il était impératif de travailler dans le cas d'un greffage covalent sur un matériau très propre, dénué de toutes impuretés sur lesquelles les molécules d'intérêt pourraient potentiellement se fixer. D'après toute l'étude réalisée dans ce chapitre, les DWNTs les plus propres possibles ont été obtenus avec un rendement acceptable par la Méthode 5 ou double-oxydation, suivie d'un lavage par une solution de NaOH (4M) selon la méthode **(C)**. Ce procédé de purification a donc été sélectionné pour toutes les études ultérieures de fonctionnalisation covalente des DWNTs.

## D. Bibliographie du chapitre 3

[1] Flahaut E, Peigney A, Bacsa R and Laurent Ch, *Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes.* Chem Commun, **2003**, 1442-1443.

[2] Flahaut E, Peigney A, Bacsa WS, Bacsa RR and Laurent Ch, *CCVD synthesis of carbon nanotubes from (Mg Co, Mo)O catalysts: influence of the proportions of cobalt and molybdenum.* J Mater Chem, **2004**, 14, 646-653.

[3] Hu H, Zhao B, Itkis ME and Haddon RC, *Nitric acid purification of single-walled carbon nanotubes.* J Phys Chem B, **2003**, 107, 13838-13842.

[4] Bortolamiol T, Lukanov P, Galibert AM, Soula B, Lonchambon P, Datas L and Flahaut E, *Double-walled carbon nanotubes: quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening.* Carbon, **2014**, 78, 79-90.

[5] Monthioux M, Smith BW, Burteaux B, Claye A, Fischer JE and Luzzi DE, *Sensitivity of single-wall carbon nanotubes to chemical processing: an electron microscopy investigation.* Carbon, **2001**, 39, 1251-1272.

[6] Satishkumar BC, Govindaraj A, Mofokeng J, Subbanna GN and Raoy CNR, *Novel experiments with carbon nanotubes: opening, filling, closing and functionalizing nanotubes.* J Phys B, **1996**, 29, 4925-4934.

[7] Osswald S, Flahaut E, Ye H and Gogotsi Y, *Elimination of D-band in Raman spectra of double-wall carbon nanotubes by oxidation.* Chem Phys Lett, **2005**, 402, 422-427.

[8] Del Canto E, Flavin K, Movia D, Navio C, Bittencourt C and Giordani S, *Critical investigation of defect site functionalization on single-walled carbon nanotubes.* Chem Mater, **2011**, 23, 67-74.

[9] Worsley KA, Kalinina I, Bekyarova E and Haddon RC, *Functionalization and dissolution of nitric acid treated single-walled carbon nanotubes.* J Am Chem Soc, **2009**, 131, 18153-18158.

[10] Zhang J, Zou H, Qing Q, Yang Y, Li Q, Liu Z, Guo X and Du Z, *Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes.* J Phys Chem B, **2003**, 107, 3712-3718.

[11] Rinzler AG, Liu J, Dai H, Nikolaev P, Huffman CB, Rodriguez-Macias FJ, Boul PJ, Lu AH, Heymann D, Colbert DT, Lee RS, Fischer JE, Rao AM, Eklund PC and Smalley RE, *Large-scale purification of single-wall carbon nanotubes: process, product, and characterization.* Appl Phys A, **1998**, 67, 29-37.

[12] Salzmann CG, Llewellyn SA, Tobias G, Ward MAH, Huh Y and Green MLH, *The role of carboxylated carbonaceous fragments in the functionalization and spectroscopy of a single-walled carbon-nanotube material.* Adv Mater, **2007**, 19, 883-887.

[13] Yu H, Jin Y, Peng F,Wang H and Yang J, *Kinetically controlled sidewall functionalization of carbon nanotubes by nitric acid oxidation.* J Phys Chem C, **2008**, 112, 6758-6763.

[14] Shao L, Tobias G, Salzmann CG, Ballesteros B, Hong SY, Crossley A, Davis BG and Green MLH, *Removal of amorphous carbon for the efficient sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes.* Chem Commun, **2007**, 5090-5092.

# CHAPITRE 4

# FONCTIONNALISATION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS

# A. Introduction

Les NTCs sont potentiellement utilisables à des fins biomédicales étant donné leur taille et leur biocompatibilité avec les milieux biologiques. Afin de les utiliser comme vecteurs de médicaments ou pour l'imagerie, une étape de modification de ces NTCs est nécessaire par le biais de fonctionnalisations chimiques. Les deux principales méthodes de fonctionnalisation sont dites « covalente » et « non-covalente » et reposent sur des interactions bien différentes. La fonctionnalisation covalente est basée sur la formation d'une liaison covalente, donc une liaison forte, entre la paroi des NTCs et la molécule greffée, ayant pour conséquence des modifications à la fois de la structure carbonée et des propriétés intrinsèques des NTCs. La deuxième stratégie, non-covalente, est basée quant à elle sur des liaisons faibles qui ne jouent pas sur les propriétés des NTCs.

Ce quatrième chapitre, consacré à la fonctionnalisation des DWNTs, est divisé en deux parties. La première partie traite de la fonctionnalisation covalente entreprise sur les DWNTs obtenus à la fin du chapitre précédent, c'est-à-dire des DWNTs purifiés et oxydés. Nous verrons quelles molécules fluorescentes ont été sélectionnées pour suivre les DWNTs *in vitro* et par quel processus celles-ci ont pu être greffées. Le greffage covalent sera alors analysé de manières qualitative et quantitative par le biais de plusieurs techniques complémentaires. Dans une seconde partie sera abordée la fonctionnalisation non-covalente. Une comparaison des différents états de surface des DWNTs vis-à-vis de deux molécules sera abordée en premier lieu afin de déterminer quelles combinaisons conduisent aux affinités les plus fortes. Cette évaluation reposera sur une quantification de l'adsorption de ces molécules par différentes techniques analytiques. Puis, ces deux méthodes de fonctionnalisation seront comparées afin de déterminer laquelle permet d'atteindre le meilleur taux de greffage et à quel pourcentage s'élève la contribution de l'adsorption dans le cas de la fonctionnalisation dite covalente. Enfin, l'adsorption d'un dérivé lipidique sur deux types de DWNTs sera également décrite afin d'évaluer le potentiel des DWNTs en tant que vecteurs.

# B. Fonctionnalisation covalente

Les NTCs peuvent être fonctionnalisés de façon covalente selon différents procédés : estérification et amidation sur des NTCs préalablement oxydés ; halogénation ; réaction de cyclo-addition ; additions radicalaire, nucléophile et électrophile ; activation par plasma. Dans le cadre de cette thèse, partant des DWNTs oxydés les plus purs possibles, nous nous sommes orientés vers une fonctionnalisation par amidation des fonctions carboxyliques présentes sur les parois des DWNTs utilisés. Pour cela, nous avons décidé de fixer en premier lieu une diamine, ayant le rôle de coupleur entre la paroi du DWNT et le fluorochrome à greffer en second lieu. Des études qualitatives et quantitatives de ces deux principales étapes ont été réalisées au moyen de plusieurs techniques telles que la microscopie électronique à transmission, les spectroscopies IR, Raman, UV-Vis et de photoluminescence, la diffusion de neutrons, la micro-analyse élémentaire, les tests chimiques (test de Kaiser) et la chromatographie liquide à haute pression.

## B.I. Etapes de fixation du fluorophore

### B.I.1. Activation des fonctions carboxyliques

Afin de réaliser une réaction d'amidation, deux groupements fonctionnels sont nécessaires : une fonction carboxylique et une fonction amine. Le groupement carboxylique provient dans notre situation des DWNTs qui ont été purifiés et oxydés par la Méthode 5 **(C)** décrite au chapitre précédent alors que la fonction amine provient du coupleur chimique sélectionné, ici la 1,4-diaminobutane.

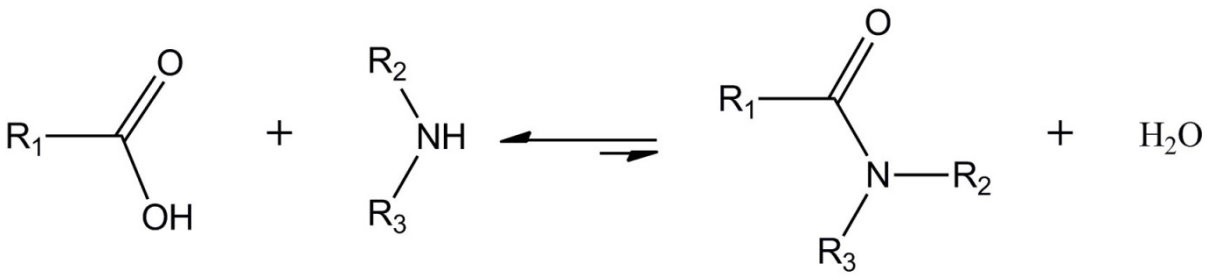



*Figure 4.1 : Equilibre d'amidation.*

Cette réaction est une réaction d'équilibre et plutôt déplacée dans le sens de la formation de l'acide carboxylique et de l'amine (**Figure 4.1**). Il existe plusieurs possibilités pour inverser la réaction et favoriser la génération de l'amide voulu : l'acide carboxylique peut être « activé » et ainsi transformé en chlorure d'acyle (–CO–Cl), composé beaucoup plus réactif ; ou activé à l'aide de dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et d'hydroxybenzotriazole (HOBt), deux molécules couramment utilisées dans le couplage peptidique **[1-2]**. Les **DWNTs–COOH** ont été activés en chlorure d'acyle, par le chlorure d'oxalyle, selon le mécanisme détaillé sur la **Figure 4.2**, méthode déjà utilisée sur des MWNTs **[3]**.

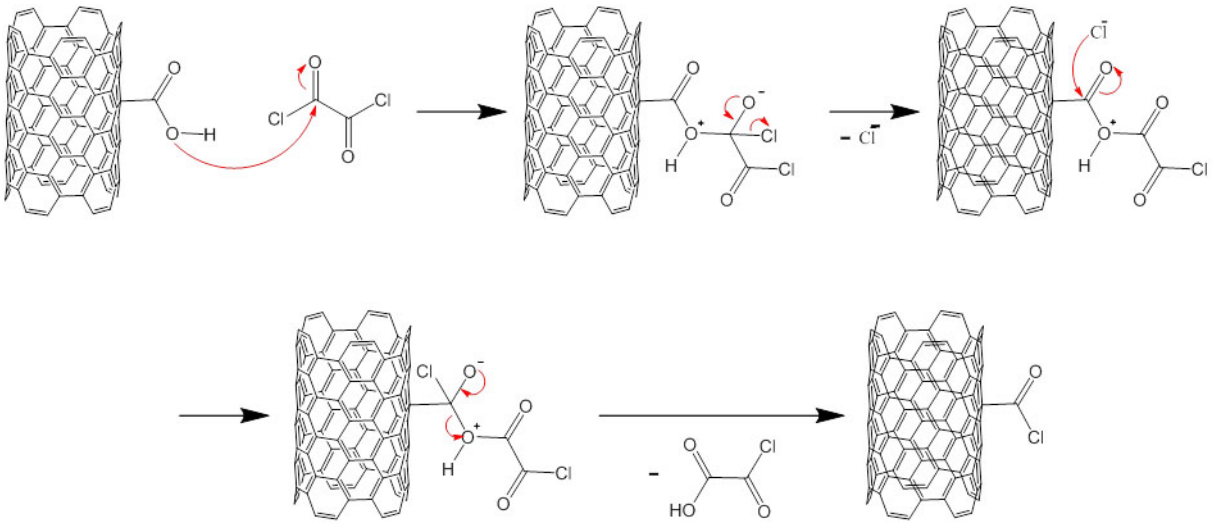


*Figure 4.2 : Mécanisme de l'activation de la fonction carboxylique par le chlorure d'oxalyle.*

Pour cela, les DWNTs secs sont directement mis en suspension dans le chlorure d'oxalyle puis le mélange est chauffé à reflux pendant 24h sous atmosphère d'argon (Chapitre 2, C.I.2). En réalisant directement la réaction dans le réactif sans le diluer, les chances d'activer toutes les fonctions acides carboxyliques présentes sur les parois des DWNTs sont accrues. De plus, le chlorure d'oxalyle étant très sensible à l'eau (potentiellement contenue à l'état de traces dans les DWNTs lyophilisés), le fait de l'introduire en très large excès permet de limiter les répercussions que pourraient entrainer sa dégradation sur l'activation attendue. Le chlorure d'oxalyle est par la suite éliminé par distillation et les DWNTs activés, référencés sous le nom **DWNTs–COCl**, sont séchés sous vide puis placés sous atmosphère d'argon en attendant l'étape suivante de greffage de la diamine.

### B.I.2. Fixation d'une diamine

La fonctionnalisation de NTCs oxydés par des réactions d'amidation a été assez rapidement envisagée par les chercheurs du fait de l'utilisation courante d'amines en présence de fonctions acides, notamment le greffage de molécules ou poly-peptides biologiques riches en fonctions aminées **[4-5]**.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes tout particulièrement focalisés sur la fixation d'une diamine, et ce, pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le marquage des cellules, ou plus précisément, de certaines structures internes et/ou externes cellulaires spécifiques, est possible grâce à la fixation de fluorochromes sur ces mêmes structures. Il est donc impératif que ces fluorochromes aient davantage d'affinité pour des sites bien particuliers, donc des groupements fonctionnels spécifiques. Ces fluorophores sont donc chimiquement modifiés et vendus sous forme de molécules dérivées réactives vis-à-vis des groupements fonctionnels déterminés. La grande majorité des molécules issue du milieu biologique présente des fonctions de type amine, et c'est pourquoi la plupart des fluorophores disponibles possèdent une fonction très réactive vis-à-vis de ces groupements fonctionnels. Le choix d'une diamine nous permet ainsi de fonctionnaliser assez facilement les DWNTs, par formation d'une liaison amide, de sorte qu'ils présentent des fonctions amines primaires sur lesquelles pourront être greffés ultérieurement différents fluorochromes. La seconde raison justifiant le choix du greffage d'une diamine provient du choix de greffer des molécules fluorescentes sur des structures carbonées telles que les NTCs. En effet, les fluorophores sont généralement des molécules comportant des noyaux aromatiques conjugués, donc avec un nuage d'électrons $\pi$ délocalisé, tout comme les NTCs dont la structure peut être assimilée à un polymère aromatique. De ce fait, l'interaction éventuelle entre les fluorophores et les NTCs, due à une trop grande proximité suite à un greffage direct sans l'utilisation d'un espaceur ou coupleur chimique, risquerait de désactiver le signal de fluorescence **[6]**. L'introduction d'une chaine alkyle saturée entre les chromophores et les parois des DWNTs limiterait les interactions entre les électrons $\pi$ de ces deux espèces et ainsi l'effet de désactivation de la fluorescence serait limité. Cependant, il faut que la chaine alkyle soit :

- ni trop courte : le problème ne serait pas résolu,
- ni trop longue : risque à la fois de pontage entre deux fonctions carboxyliques sur une même paroi ou entre deux NTCs différents **[7]**; et risque de repli de la chaine conduisant à une interaction entre le fluorophore et la paroi du NTC.

Dans l'optique de répondre à tous ces critères, la 1,4-diaminobutane, appelée également putrescine, a ainsi été sélectionnée et le mécanisme réactionnel de cette substitution nucléophile est détaillé sur la **Figure 4.3**.

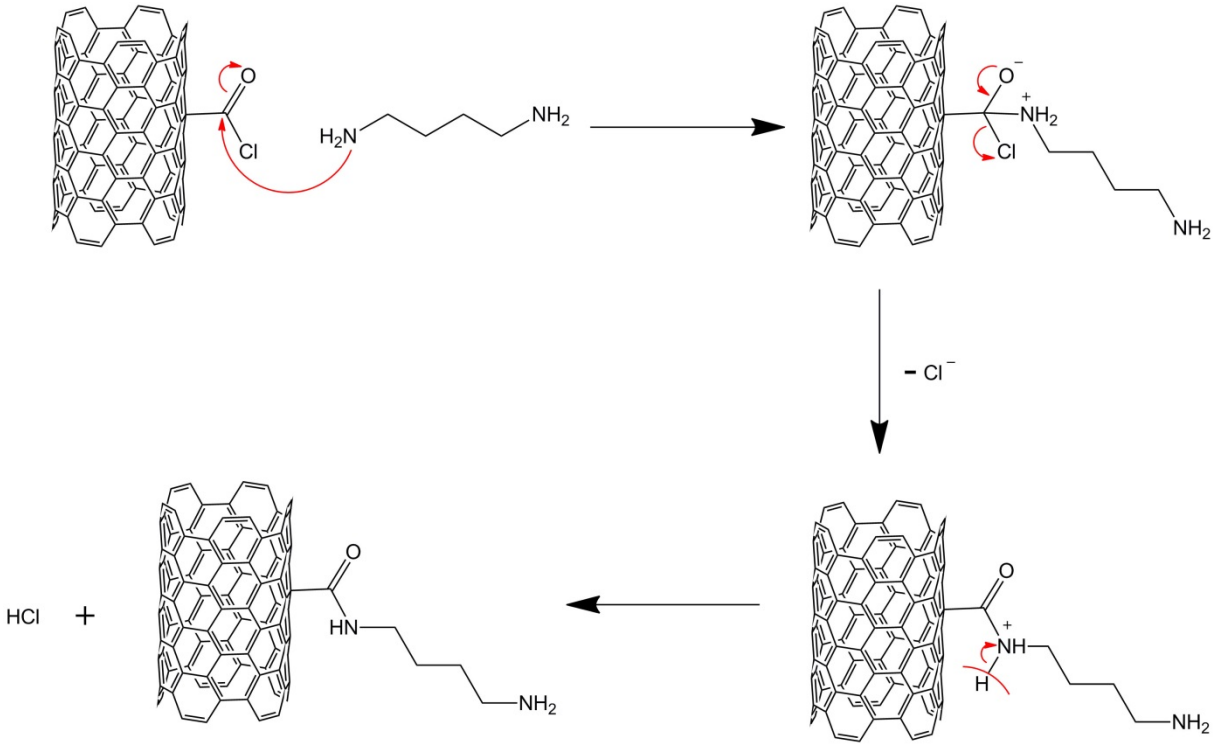



*Figure 4.3 : Mécanisme du greffage du 1,4-diaminobutane par formation d'une liaison amide.*

Le protocole de greffage de cette diamine a été mis au point à partir de plusieurs travaux déjà publiés. Gul *et al.* **[8]** proposaient de placer 100 mg de SWNTs activés en présence de 1,64 mol de 2-(2-(2-aminoethoxy)ethoxy)ethanamine anhydre puis de chauffer le mélange à 100°C pendant 100h. D'un autre côté, Singh *et al.* **[3]** préparaient un mélange de 100 mg de SWNTs ou MWNTs activés avec 150 mL de THF anhydre, de 2,4 mmol de putrescine modifiée (avec une seule fonction amine primaire disponible) et de 2,4 mmol de N,N-diisopropyléthylamine (DIEA), le tout porté ensuite à reflux pendant 48h. Le DIEA est

une base assez forte (pKa = 10,1) **[9]** et faiblement nucléophile, couramment utilisée en chimie organique. Son emploi permet à la fois d'augmenter le pH du milieu afin de favoriser la forme $–NH_2$ du groupement fonctionnel amine primaire (et non la forme $–NH_3^+$ qui n'est pas favorable à la substitution nucléophile) et de piéger l'acide chlorhydrique formé au cours de la réaction (**Figure 4.4**).

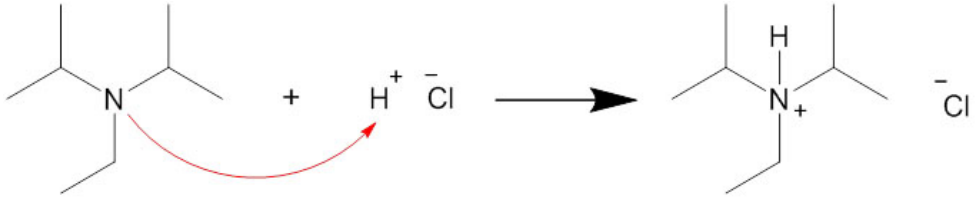


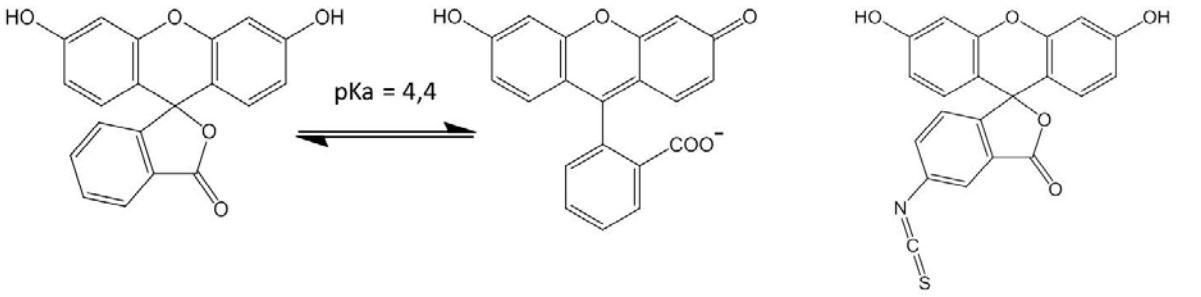

*Figure 4.4 : Rôle de la N,N-diisopropyléthylamine : piégeage l'acide chlorhydrique libéré au cours de la réaction.*

Afin de fonctionnaliser les DWNTs–COCl, un compromis a ainsi été adopté : 100 mg de DWNTs activés ont été dispersés dans une solution de 100 mL de THF anhydre, dans laquelle ont été dissous 22,7 mmol de 1,4-diaminobutane et 22,7 mmol de DIEA. Le mélange a été soniqué 10 min au bain à ultrasons puis agité magnétiquement à 30°C pendant 96h. Il est important de travailler avec un excès d'amine afin, dans un premier temps, d'être sûr de pouvoir fonctionnaliser toutes les fonctions acyles présentes sur les DWNTs, et dans un second temps, d'éviter les risques de pontage par fixation de la diamine sur deux fonctions carboxyliques proches, sur un même DWNT ou entre deux DWNTs différents. De plus, l'utilisation d'un solvant organique, tel que le THF, au lieu de réaliser la réaction directement dans le réactif que constitue la 1,4-diaminobutane, permet d'une part, de meilleures homogénéisation et agitation du milieu réactionnel, et d'autre part une expérimentation quasiment à température ambiante. Nous avons préféré employer le THF plutôt que le DMF (utilisé habituellement) afin d'éviter l'introduction d'azote, autre que celui présent dans la diamine, et de pouvoir ainsi effectuer une quantification du greffage par analyse élémentaire.

Une fois les 96h d'agitation écoulées, le THF est éliminé par distillation, entrainant une partie de la diamine qui n'a pas réagi. Les DWNTs sont ensuite repris dans de l'EtOH puis filtrés. Un série de lavage/sonication/filtration est répétée autant de fois qu'il le faut, jusqu'à neutralité du filtrat. Enfin, les DWNTs aminés, référencés sous le nom **DWNTs–$NH_2$**, sont lyophilisés.

### B.I.3. Greffage du fluorophore

Une fois les DWNTs pourvus de leurs fonctions amines, il est alors possible d'y greffer assez facilement différentes molécules fluorescentes qui permettront un potentiel traçage *in vitro*. En biologie, plusieurs marqueurs fluorescents sont couramment employés, notamment la fluorescéine (**Figure 4.5**) et le Cy5 (**Figure 4.6**) qui ont été sélectionnées dans le cadre de cette thèse.




**Flurorescéine** **Isothiocyanate de fluorescéine FITC**

*Figure 4.5 : Structures moléculaires de la fluorescéine et du FITC.*

La fluorescéine, afin d'être greffée sur une molécule ou un objet cible, doit être utilisée sous sa forme dérivée activée que constitue l'isothiocyanate de fluorescéine ou FITC (**Figure 4.5**). La fonction isothiocyanate présente une forte réactivité vis-à-vis des fonctions amines primaires, d'où son utilisation courante pour le marquage de protéines **[10]** et l'intérêt d'utiliser cette molécule dans notre cas. L'utilisation courante de la fluorescéine provient du fait qu'elle est peu coûteuse et possède un coefficient d'extinction molaire assez élevé ($\varepsilon$ = 70000 L.mol$^{-1}$.cm$^{-1}$). Le FITC est tout particulièrement soluble dans le DMSO et l'éthanol, mais un peu moins dans l'acétone et l'eau. Cependant, il présente certains inconvénients : d'une part, sous sa forme FITC, la molécule est peu stable en solution aqueuse (haute réactivité) ; d'autre part, elle interfère avec l'auto-fluorescence des cellules ($\lambda_{exc}$ = 485 nm ; $\lambda_{ém}$ = 525 nm).

Les cyanines, quant à elles, sont également très utilisées en imagerie médicale, notamment pour le marquage des acides nucléiques ou des protéines **[11-13]**. Elles appartiennent au groupe des polyméthines, molécules comportant une chaine conjuguée

dont le nombre de carbone $sp^2$ est impair. Lorsque les atomes situés aux extrémités de cette chaine sont des atomes d'azote alors il s'agit d'une cyanine. Un des avantages des cyanines provient du fait que leur longueur d'onde d'absorption peut être changée en modifiant la longueur de la chaine méthine et la nature des substituants terminaux **[13-14]**. Les cyanines peuvent ainsi couvrir un spectre allant de l'IR à l'UV selon les besoins.

Dans le cadre de cette thèse deux types de cyanines ont été utilisées : la Cy5, appartenant à la famille des cyanines à chaine fermée, avec des $\lambda_{exc}$ = 646 nm et $\lambda_{ém}$ = 662 nm et un $\varepsilon$ = 250000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ ; et une cyanine, appelée ici Cyanine*, synthétisée par l'équipe Acides Nucléiques Modifiés au sein du laboratoire de Synthèse et Physico-Chimie de Molécules d'Intérêt Biologique (SPCMIB), appartenant à la famille des streptocyanines ou cyanines à chaine ouverte, avec des $\lambda_{exc} \approx$ 440 nm et $\lambda_{ém} \approx$ 490 nm et un $\varepsilon$ = 60000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ **[14]**. La Cy5 (**Figure 4.6**) est très souvent employée en biologie, du fait qu'elle possède un coefficient d'extinction molaire très élevé et qu'elle fluoresce à une longueur d'onde d'émission qui n'interfère pas avec l'auto-fluorescence des cellules. Quelques essais (coût très élevé) ont ainsi réalisés pour le greffage covalent sur les DWNTs–$NH_2$ avec la Cy5 sous sa forme NHS Ester permettant une réaction avec des fonctions amines.

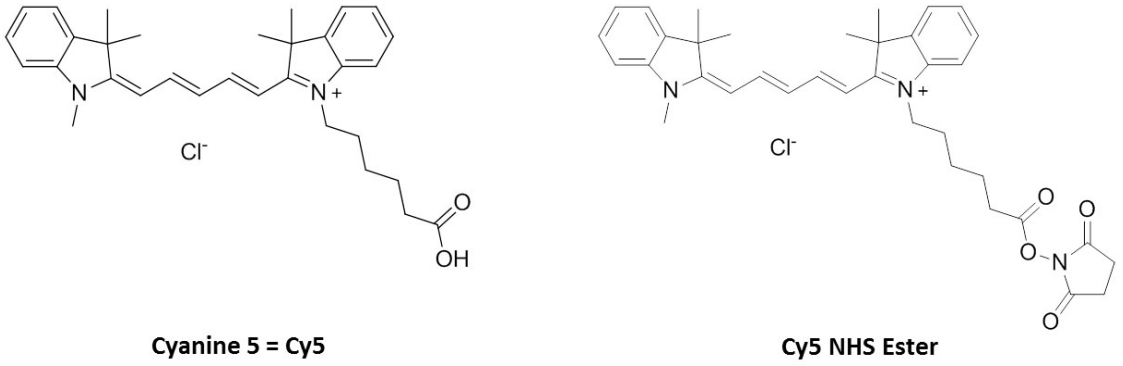



*Figure 4.6 : Structures moléculaires de la cyanine 5 ou Cy5 et de la Cy5 NHS Ester*

En ce qui concerne la Cyanine* ou Cy*, elle présente quant à elle un autre avantage. Sous sa forme de départ d'hémicarboxonium (**Figure 4.7**), la molécule n'est pas fluorescente ($\lambda_{abs}$ = 392 nm). Lorsque cet hémicarboxonium réagit avec une fonction amine en créant une liaison covalente, on obtient une cyanine qui elle est fluorescente (**Figure 4.7**) **[13]**.

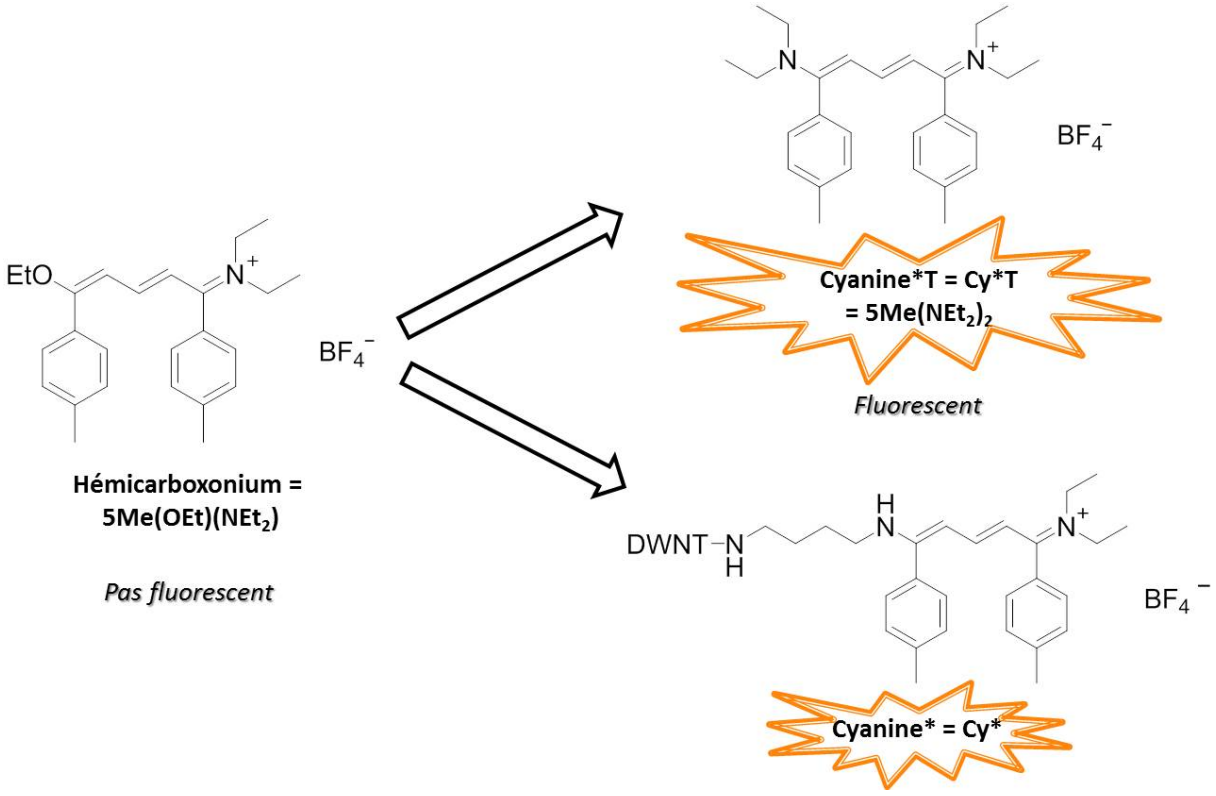



*Figure 4.7 : Structures moléculaires de l'hémicarboxonium, de la Cyanine*T (témoin) et de la Cyanine*.*

Elle se rapproche du FITC par ses caractéristiques avec des $\lambda_{exc}$ = 440 nm ; $\lambda_{ém}$ = 490 nm et un $\varepsilon$ = 60000 L.mol$^{-1}$.cm$^{-1}$. L'avantage d'utiliser cette Cyanine* est que, dans le cas d'une observation de fluorescence, nous pouvons être sûrs qu'une fraction des molécules s'est bien fixée de façon covalente. En outre, cette molécule possède un autre avantage dans notre cas : les deux cycles phényles ne sont pas alignés dans le même plan mais situés dans deux plans différents parallèles, et eux-mêmes perpendiculaires au plan de la chaine méthine **[15]**. De ce fait, la molécule devient un bien plus mauvais candidat à l'adsorption par $\pi$-$\pi$ stacking sur les DWNTs que la fluorescéine par exemple. Cependant, elle a le désavantage de ne pas être disponible dans le commerce et doit être synthétisée **[14]**, et comme pour le FITC, sa fluorescence risque d'interférer avec l'auto-fluorescence des cellules. La Cyanine* est la forme de la cyanine qui se trouvera fixée sur les DWNTs fonctionnalisés. Quant à la Cyanine*T ou Cy*T, il s'agit d'une cyanine dérivée et libre qui servira de témoin pour les expériences ultérieures *in vitro*.

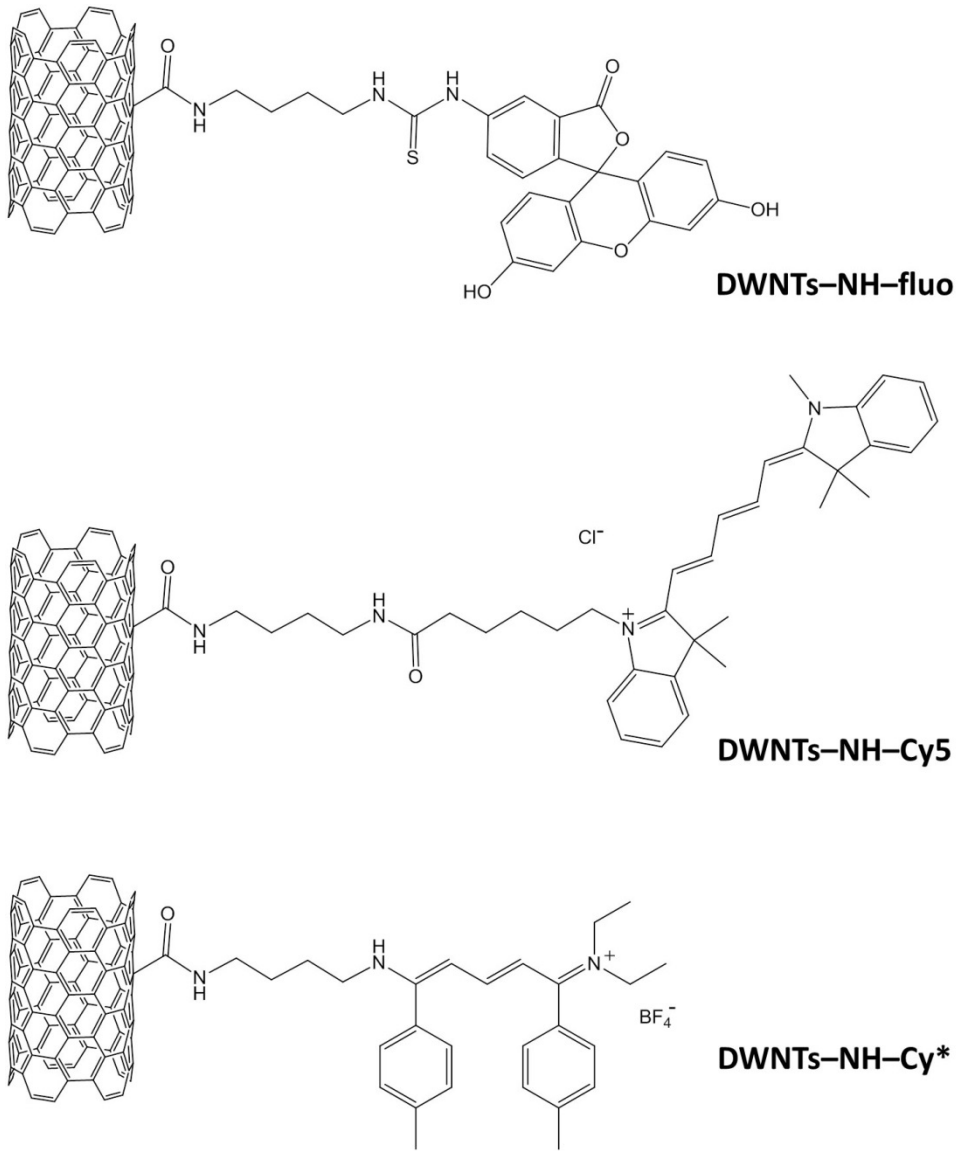



*Figure 4.8 : DWNTs fonctionnalisés par les différents fluorophores : DWNTs–NH–fluo, DWNTs–NH–Cy5 et DWNTs–NH–Cy*.*

Pour le greffage des fluorophores, 10 mg de DWNTs–$NH_2$ sont mis en suspension dans une solution tampon d'hydrogénocarbonate de sodium (0,1M ; pH = 8,4) dans un pilulier. Une solution de molécules fluorescentes (FITC, Cy5 NHS Ester ou hémicarboxonium) dans du DMSO à $1{,}11.10^{-2}$M est ajoutée de sorte que la quantité de matière en fluorophores soit deux fois supérieure au nombre de fonctions amines disponibles dans l'échantillon (déterminées par le test de Kaiser). La suspension est ensuite soniquée à la sonde à ultrasons (15min, 5s ON, 3s OFF, 20% d'amplitude) puis au bain à ultrasons (45min). Le pilulier est fermé hermétiquement, recouvert d'un film plastique noir pour isoler l'échantillon de la lumière et la suspension est agitée magnétiquement pendant 72h à température ambiante.

La suspension est par la suite filtrée, et les DWNTs fonctionnalisés subissent alors autant de fois qu'il le faut le cycle de lavage / sonication / filtration / récupération du filtrat, jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. Les lavages sont effectués avec les solvants dans lesquels les molécules d'intérêt sont les plus solubles, à savoir, l'EtOH pour le FITC et le $CH_2Cl_2$ pour l'hémicarboxonium et le Cy5 NHS Ester. Les DWNTs fonctionnalisés (**DWNTs–NH–fluo** ; **DWNTs–NH–Cy5** ; **DWNTs–NH–Cy***) (**Figure 4.8**) sont finalement lavés à l'eau désionisée puis lyophilisés.

## B.II. Analyses qualitatives

Nous nous sommes tout d'abord portés sur des observations directes des échantillons de DWNTs fonctionnalisés par MET et des analyses par spectroscopie IR.

D'autres formes d'analyses par spectroscopies Raman et de photoluminescence, et par spectrophotométrie UV-Vis-IR ont également été entreprises sur les échantillons fonctionnalisés par la fluorescéine et la Cy*. Ces études ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe Nanostructures, au Département Colloïdes, Verres et Nanomatériaux (CVN) du laboratoire Charles Coulomb à Montpellier.

Enfin, les DWNTs–COOH, DWNTs–$NH_2$ et DWNTs–NH–fluo ont été caractérisés par diffusion des neutrons avec la collaboration de la Division de Diffraction des Neutrons (Unités Triple-Axis Spectrometers et Time Of Flight and High Resolution spectrometers) à l'Institut Laue-Langevin (ILL) à Grenoble.

### B.II.1. Mise en évidence des greffages successifs par MET

Les différentes étapes de la fonctionnalisation covalente ont été observées par MET afin de vérifier les greffages successifs du 1,4-diaminobutane et des fluorophores sur les parois des DWNTs doublement oxydés. Les molécules d'intérêt étant petites et de nature organique non organisée, l'observateur peut s'attendre à voir un dépôt plus ou moins régulier sur les parois des DWNTs, ressemblant à des dépôts de CCFs.

La **Figure 4.9** présente les images MET en **(a)** des DWNTs–COOH avec leur parois nettes et propres sans traces de CCFs, et en **(b)** des DWNTs–$NH_2$ sur lesquels il est possible d'observer de la matière carbonée amorphe sur les parois des DWNTs ainsi qu'aux

intersections de faisceaux de DWNTs. Cette constatation montre bien que de la diamine a pu être greffées sur les DWNTs, mais elle ne permet pas de conclure quant à la nature de la liaison entre les DWNTs et la diamine : il est probable qu'une fraction de diamine soit également adsorbée. De plus, ces dépôts sont présents de manière irrégulière et par zones sur les parois ce qui signifie que le greffage de la diamine n'est apparemment ni homogène ni total.

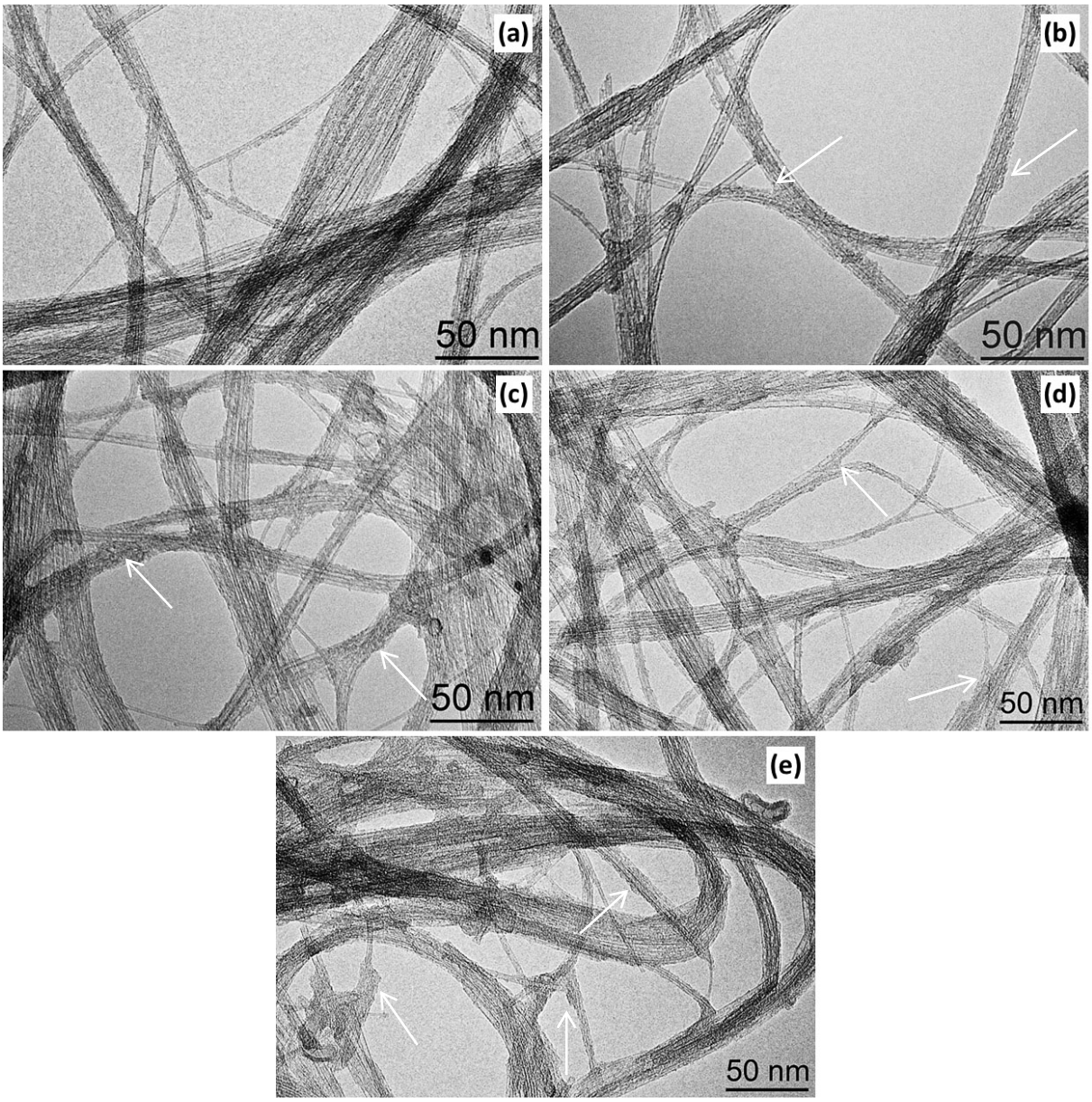



*Figure 4.9 : Images MET des (a) DWNTs–COOH, (b) DWNTs–$NH_2$, (c) DWNTs–NH–fluo, (d) DWNTs–NH–Cy5 et (e) DWNTs–NH–Cy* avec mise en évidence de dépôts amorphes (flèches).*

Sur les autres images de MET, correspondant à l'étape suivante de fonctionnalisation consistant à fixer soit la fluorescéine (**Figure 4.9. c**), soit le Cy5 (**Figure 4.9. d**), soit la Cy* (**Figure 4.9. e**), nous pouvons remarquer que les dépôts amorphes sont un peu plus importants sur les parois des DWNTs et au niveau des intersections de faisceaux de NTCs. Cela nous révèle que davantage de produits organiques carbonés se sont fixés aux DWNTs, ce qui pourrait indiquer que les fluorophores se sont bien fixés aux NTCs.
Cependant, il nous est encore impossible de savoir à partir de simples images de quelle nature est le greffage observé et quel est le taux de couverture atteint sur les DWNTs−NH−fluo, DWNTs–NH–Cy5 et DWNTs–NH–Cy*. Des analyses qualitatives plus poussées ont été réalisées sur ces mêmes échantillons afin de vérifier que les dépôts observés en MET correspondent bien aux fluorophores qui ont été greffés.

### B.II.2. Mise en évidence de la fonctionnalisation covalente par spectroscopie IR

Tous les échantillons ont été analysés par spectroscopie IR sous forme de pastilles de KBr afin d'inspecter la potentielle présence des bandes caractéristiques des molécules fluorescentes après greffage.

Sur la **Figure 4.10** sont représentés les spectres IR des DWNTs–COOH en **(a)** et des DWNTs–$NH_2$ en **(b)**. Il est possible de constater que les spectres obtenus sont tout à fait identiques et la présence de la 1,4-diaminobutane n'a donc pas pu être mise en évidence par cette technique. Cela est sûrement dû à la présence d'eau résiduelle emprisonnée dans les faisceaux (même après lyophilisation), qui est à l'origine de la bande à 3436 $cm^{-1}$ beaucoup trop large et intense pour que l'on puisse discerner les bandes correspondant aux élongations des liaisons N–H des amines primaires et amides (entre 3100 et 3500 $cm^{-1}$). Quant aux bandes correspondant aux liaisons C–H des $–CH_2–$ présents dans la molécule, elles doivent être englobées dans le signal provenant des DWNTs–COOH.

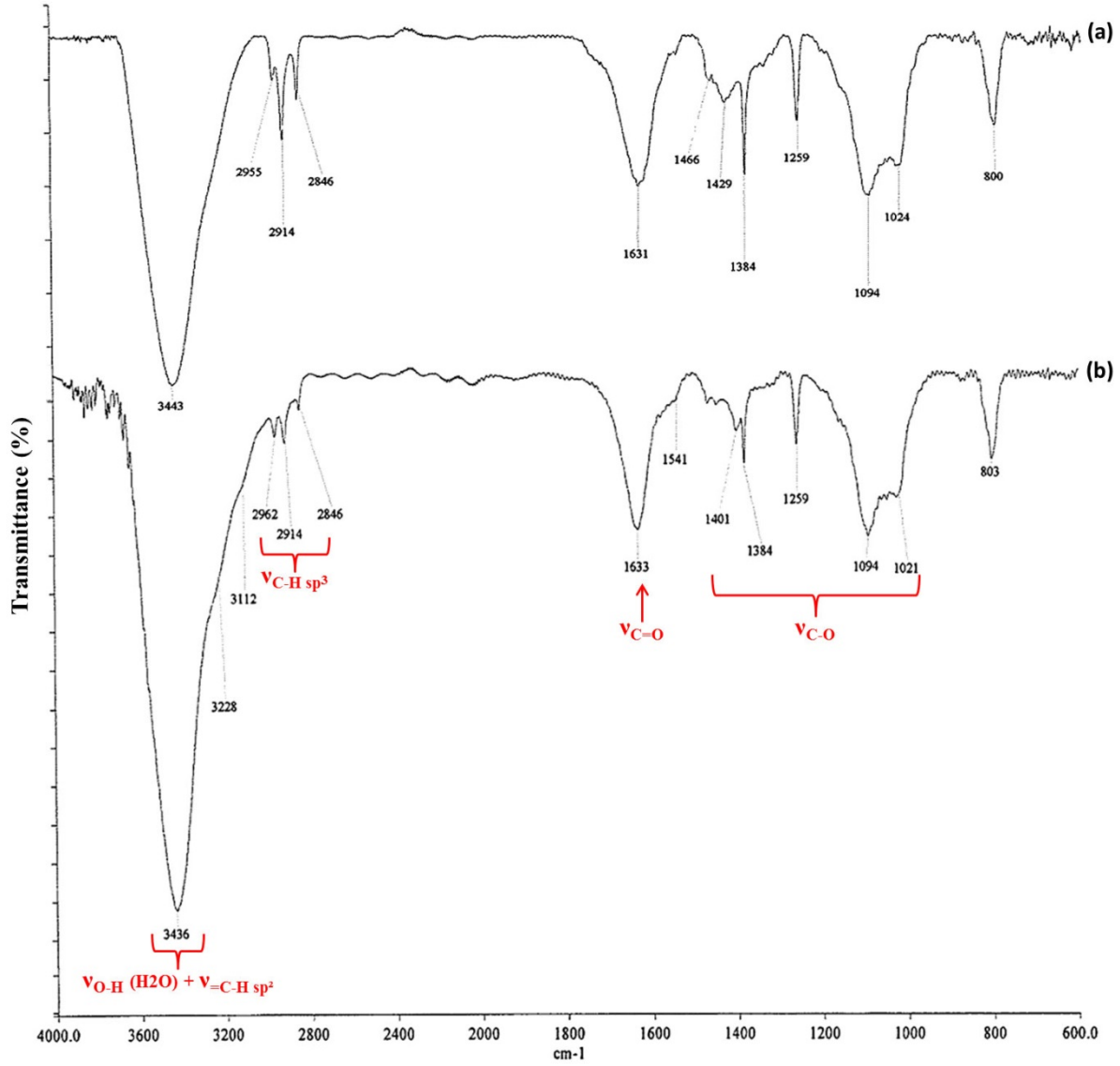



*Figure 4.10 : Spectres IR des (a) DWNTs–COOH et (b) DWNTs–$NH_2$.*

Concernant la fonctionnalisation covalente par le FITC, les molécules de FITC et de fluorescéine ont été analysées dans un premier temps afin repérer quelles sont les bandes spécifiques à ces molécules et quelles sont les différences spectrales notables entre ces deux différentes formes de la molécule fluorescente.

Sur la **Figure 4.11** sont représentés en **(a)** et **(b)** les spectres IR du FITC et de la fluorescéine. Les deux molécules ont en commun plusieurs bandes caractéristiques :

- Elongation O–H : bande autour de 3430 $cm^{-1}$,
- Elongation =C–H des carbones $sp^2$ aromatiques : bandes comprises entre 3050 et 3100 $cm^{-1}$,
- Elongation C=C aromatique : bandes comprises entre 1450 et 1595 $cm^{-1}$,
- Elongation C–O : bandes comprises entre 1110 et 1390 $cm^{-1}$,
- Déformation C–H aromatique : bande autour de 850 $cm^{-1}$.

Cependant, une bande bien particulière différencie ces deux molécules de structures très proches : il s'agit de la bande très intense à 2037 $cm^{-1}$ correspondant à l'élongation de la fonction –N=C=S qui est uniquement présente au niveau du FITC.

Le spectre IR des DWNTs–NH–Fluo (**Figure 4.11. c**) présente de nombreuses similitudes avec le spectre des DWNTs–$NH_2$ (**Figure 4.10. b**) avec des bandes provenant des DWNTs :

- Elongation O–H et =C–H de carbone $sp^2$ : bande large et intense autour de 3435 $cm^{-1}$,
- Elongation C–H de carbone $sp^3$ : bandes entre 2850 et 2975 $cm^{-1}$,
- Elongation C=C aromatique : bandes entre 1450 et 1550 $cm^{-1}$,
- Elongation C–O : bandes entre 1020 et 1380 $cm^{-1}$,
- Déformation C–H aromatique : bande entre de 800 et 880 $cm^{-1}$.

Néanmoins, une différence a pu être révélée au niveau de la bande correspondant à l'élongation de la liaison de type C=O. Que ce soit au niveau des DWNTs–COOH ou des DWNTs–$NH_2$, cette bande était unique et présente à 1630 $cm^{-1}$, ce qui est plutôt caractéristique de fonctions carboxylates. Dans l'échantillon de DWNTs–NH–Fluo, un massif a pu être mis en évidence, englobant les bandes comprises entre 1630 $cm^{-1}$ et 1750 $cm^{-1}$ correspondant à des élongations de liaisons C=O (amide) et HN–(C=S)–NH. La présence de ces élongations signifie donc que des liaisons de type amide et thio-urée ont été établies, preuves directes que le FITC s'est bien fixé de façon covalente.

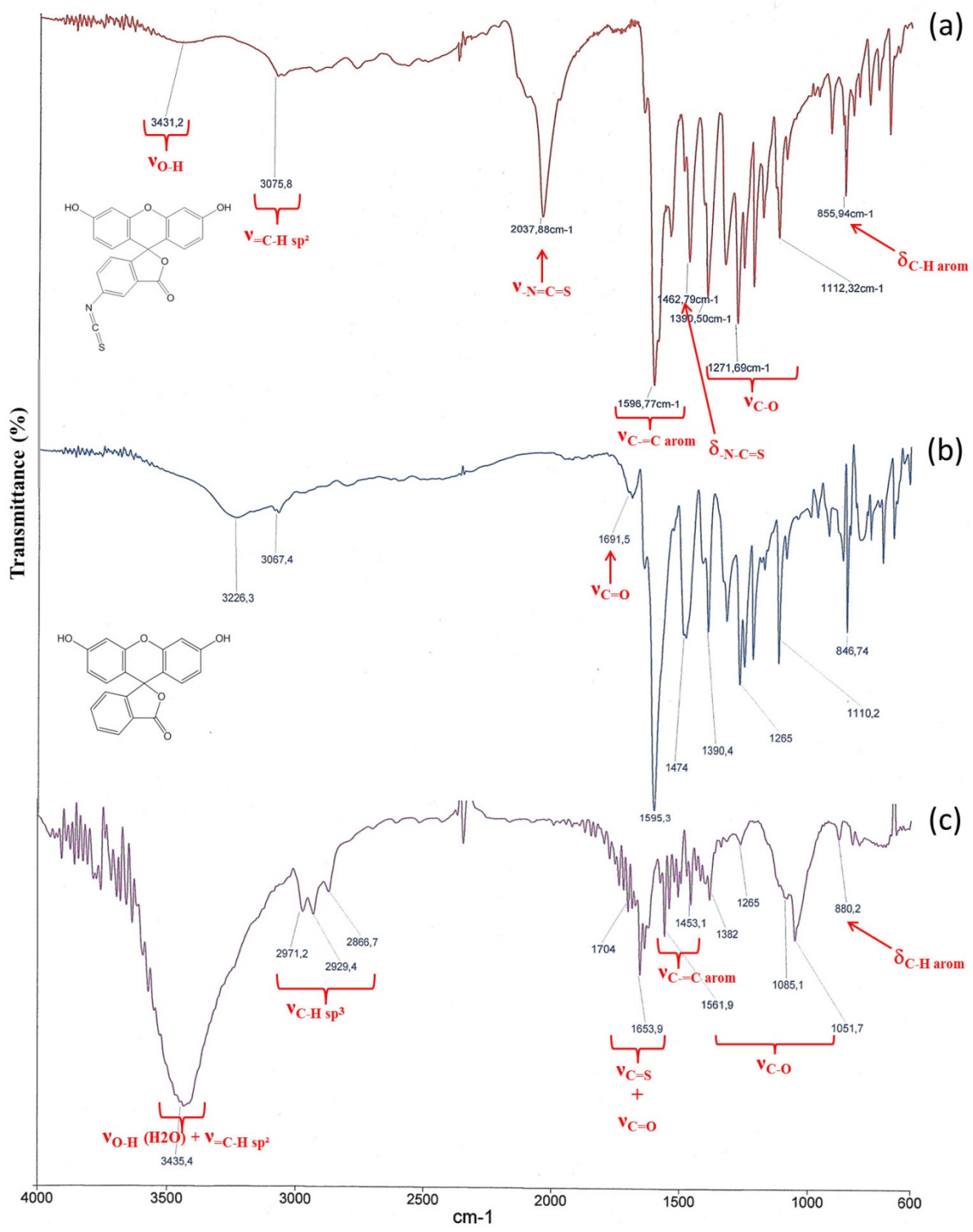



*Figure 4.11 : Spectres IR (a) du FITC, (b) de la fluorescéine et (c) des DWNTs–NH–fluo.*

D'autre part, aucune bande à 2038 $cm^{-1}$, caractéristique de la liaison isothiocyanate, n'est présente sur le spectre des DWNTs–NH–Fluo. Etant donné qu'il est certain que des liaisons amides et HN–(C=S)–NH ont été créées en présence du FITC, deux hypothèses sont alors possibles :

1) Soit toutes les molécules de FITC se sont fixées de façon covalente aux DWNTs, sans aucune adsorption, d'où une disparition totale de la bande isothiocyanate ;
2) Soit une partie du FITC s'est fixée de façon covalente aux DWNTs, et l'autre partie de façon non-covalente. Cependant, les molécules adsorbées ont été dégradées par le milieu réactionnel pour redevenir de la fluorescéine, du fait de l'instabilité du FITC dans certains solvants.

Etant donné l'aromaticité de la fluorescéine, donc sa potentielle affinité avec les parois des DWNTs, la seconde hypothèse semble la plus probable.

Pour ce qui est de la Cy*T et des DWNTs–NH–Cy*, quasiment les mêmes observations ont été faites notamment concernant tous les signaux relatifs aux DWNTs (**Figure 4.12. a et b**). La Cy*T présente une bande particulière sortant du champ des DWNTs correspondant à l'élongation de la liaison C=N (bande d'intensité moyenne entre 1500-1600). Quant aux DWNTs–NH–Cy*, la bande à 1630 $cm^{-1}$ caractéristique de l'élongation de la liaison C=O se voit remplacée par une bande assez large et mal définie autour de à 1654 $cm^{-1}$ correspondant à la liaison C=N. Il est donc possible d'en déduire qu'une modification au niveau des différentes fonctions et liaisons présentes dans l'échantillon de DWNTs a eu lieu après l'introduction du fluorophore, donc que celui-ci a bien été greffé sur les DWNTs–$NH_2$.

L'analyse par spectroscopie IR n'a pas été réalisée sur le Cy5 NHS Ester et sur les DWNTs–NH–Cy5 du fait du coup très élevé de la molécule fluorescente et donc de la faible quantité d'échantillon fonctionnalisé à disposition.

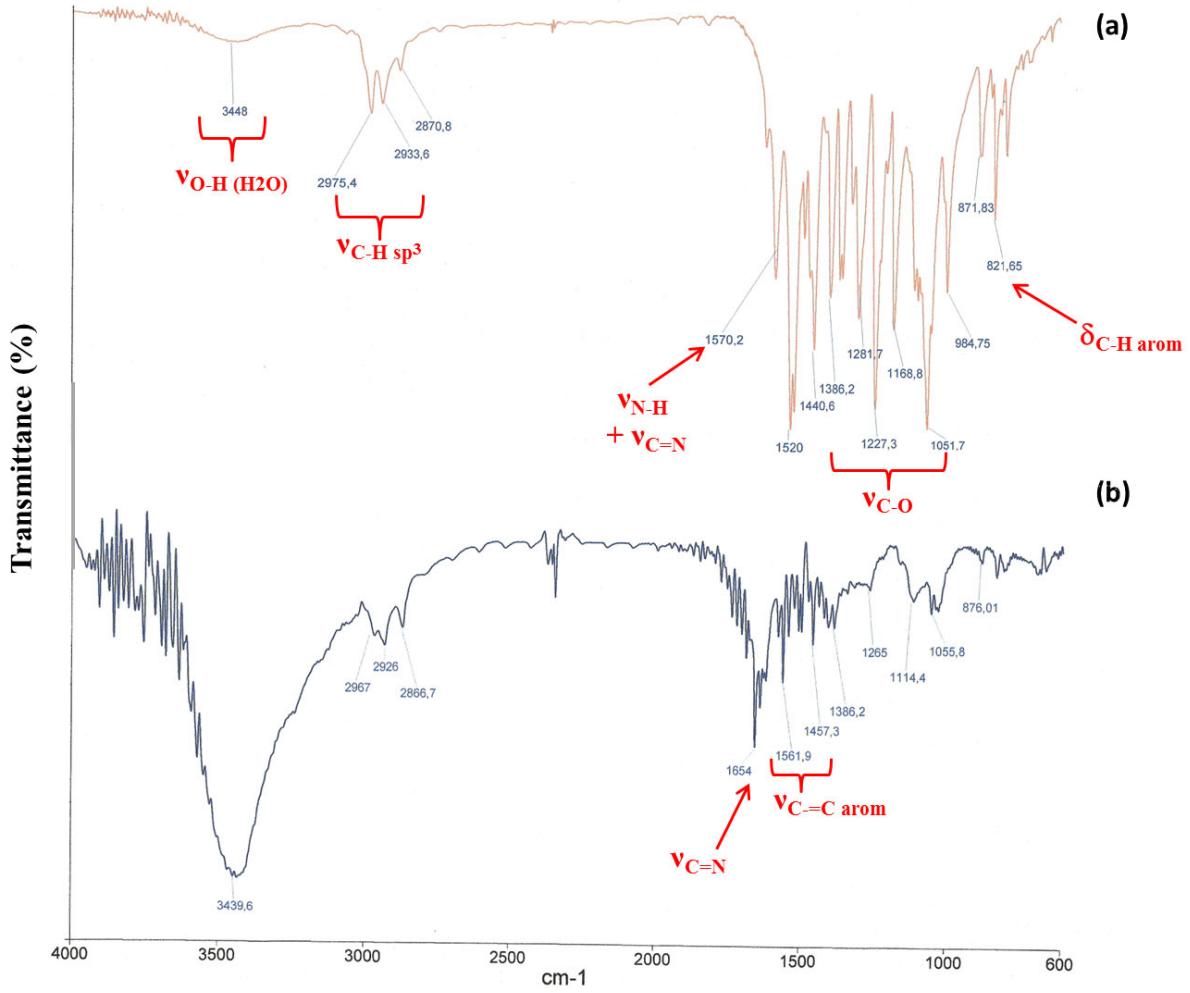



*Figure 4.12 : Spectres IR (a) de la cyanine Cy*T et (b) DWNTs–NH–Cy*.*

En conclusion, la spectroscopie IR a permis de mettre en évidence le greffage des molécules fluorescentes sur les DWNTs par la présence de bandes bien caractéristiques de ces fluorophores et par le décalage de certaines bandes propres aux DWNTs. Une quantification par spectroscopie IR ne serait possible qu'avec un étalonnage, cependant cela semble peu envisageable du fait de l'hétérogénéité des pastilles préparées.

### B.II.3. Mise en évidence de la fonctionnalisation covalente par spectroscopie Raman

Les échantillons de DWNTs fonctionnalisés par la fluorescéine et la Cy* ont également été analysés par spectroscopie Raman afin de regarder si ces molécules fluorescentes ont une signature particulière que l'on pourrait retrouver une fois le greffage réalisé sur les DWNTs. Les analyses ont été effectuées directement sur les DWNTs secs et purs au laboratoire Charles Coulomb à Montpellier à $\lambda$ = 457 nm pour tous les échantillons concernés par la fluorescéine, et à $\lambda$ = 725 nm pour ceux dont la Cy* est impliquée afin de se préserver de la fluorescence qui pourrait camoufler le signal Raman.

Sur la **Figure 4.13** sont représentées les acquisitions enregistrées pour les molécules de fluorescéine et de FITC, ainsi que pour les DWNTs–COOH et les DWNTs–NH–Fluo. Le premier graphe montre les spectres dans leur globalité : par rapport aux DWNT–COOH et aux DWNTs–NH–Fluo, les bandes D, G et G' sont tout à fait identifiables ; quant à la fluorescéine et au FITC, ceux-ci présentent de nombreux signaux compris dans une fourchette allant de 100 à 1700 $cm^{-1}$. Les trois autres graphes sont des zooms de cette même zone. De prime abord, les spectres de la fluorescéine et du FITC paraissent complètement superposables (nombre de bandes identique, celles-ci situées aux mêmes nombres d'onde) :

- Déformation de cycle d'un benzène hexasubstitué : Fluo à 352 $cm^{-1}$; FITC à 348 $cm^{-1}$,
- Déformation C–O : Fluo à 467 $cm^{-1}$; FITC à 451 $cm^{-1}$,
- Déformation dans le plan de cycle de benzène mono/di/tri-substitué : Fluo à 635 $cm^{-1}$; FITC à 623 $cm^{-1}$,
- Vibration de cycle d'un benzène substitué : Fluo à 766 $cm^{-1}$; FITC à 770 $cm^{-1}$,
- Elongation C–O–C (type formate) : Fluo à 1187 $cm^{-1}$; FITC à 1178 $cm^{-1}$,
- Déformation O–H de phénol : Fluo à 1339 $cm^{-1}$; FITC à 1347 $cm^{-1}$,
- Déformation C–O : Fluo à 1422 $cm^{-1}$; FITC à 1407 $cm^{-1}$.

Il existe cependant un décalage (entre 4 et 16 $cm^{-1}$) entre les bandes de la fluorescéine et du FITC, soit vers le rouge (faibles nombres d'onde) soit vers le bleu (nombres d'onde élevés).

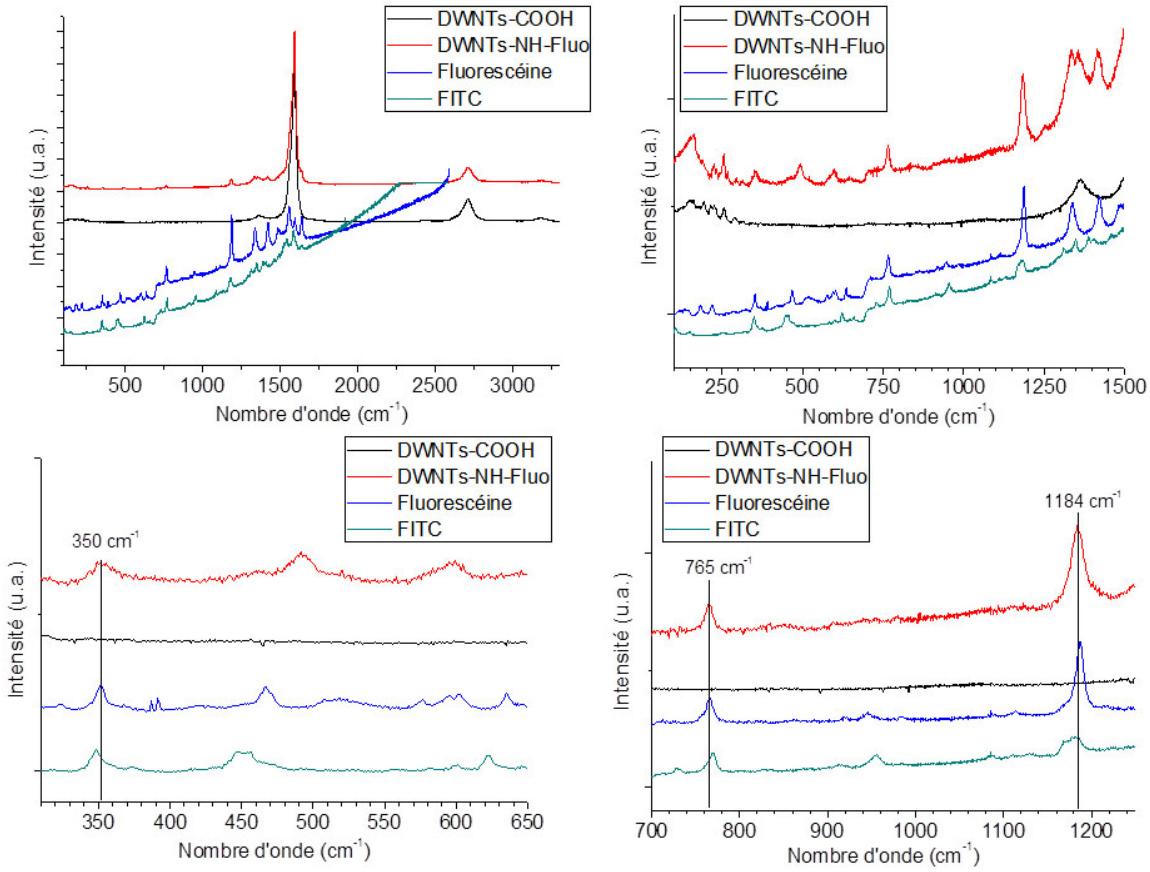



*Figure 4.13 : Spectres Raman des DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo, de la fluorescéine et du FITC.*

En s'intéressant au spectre des DWNTs–NH–Fluo, on se rend compte que plusieurs bandes caractéristiques de la molécule fluorescente sont également présentes, ce qui signifie que celle-ci a bien été fixée sur les DWNTs. D'autre part, il est possible de constater que les bandes des DWNTs fonctionnalisées sont alignées avec celles de la fluorescéine et non du FITC. Cela nous permet de conclure que la molécule fluorescente est présente sur les DWNTs en majorité sous sa forme de fluorescéine, ce qui est attendu dans le cas d'un greffage covalent.

Le même raisonnement a été suivi sur les spectres obtenus à partir de la Cy*T, des DWNTs–COOH et des DWNTs–NH–Cy* (**Figure 4.14**). Sur le premier graphe, les bandes D, G et G' sont clairement visibles pour les DWNTs–COOH alors que pour les DWNTs–NH–Cy* la bande D est englobée dans un massif de bandes. La Cy*T quant à elle laisse apparaitre des bandes de 100 à 1650 $cm^{-1}$. En zoomant sur cette zone, nous pouvons nous rendre compte que les signaux caractéristiques de la Cy*T sont également présents sur le spectre des

DWNTs–NH–Cy*, ce qui signifie que la molécule Cy*a bien été greffée sur les DWNTs (**Tableau 4.1**).

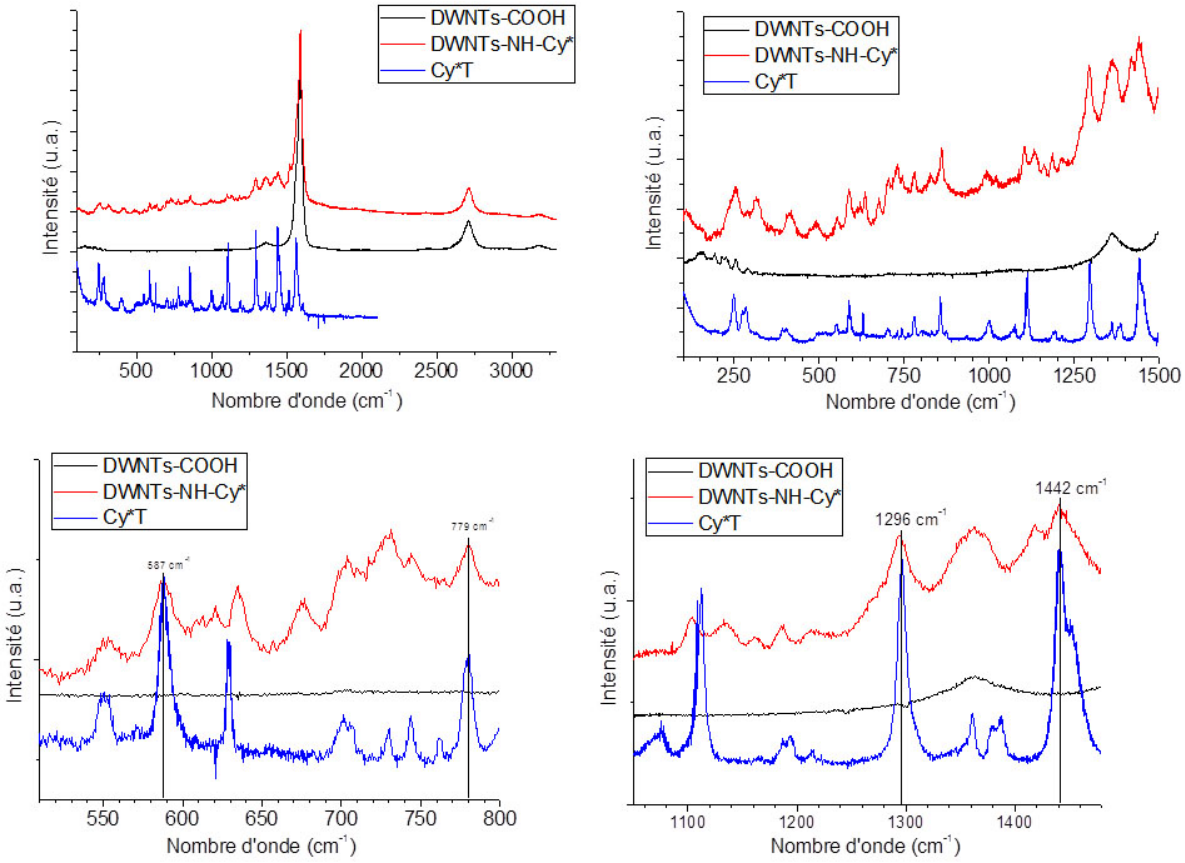



*Figure 4.14 : Spectres Raman des DWNTs–COOH, DWNTs-NH-Cy* et de la Cy*T.*

Cependant, il existe certaines différences entre les spectres de la Cy*T et des DWNTs−NH−Cy* au niveau de deux plages de nombres d'onde (entre 675 et 770 $cm^{-1}$ correspondant à des élongations C–C de carbone $sp^3$ ; entre 1045 et 1140 $cm^{-1}$ correspondant à des élongations C–N) qui peuvent être expliquées du fait que la Cy*T et la Cy* greffée sur les DWNTs ne sont pas les mêmes molécules.

*Tableau 4.1 : Comparaison des bandes relevées sur les spectres Raman de la Cy*T et des DWNTs–NH–Cy*.*

| Type de vibration | Cy*T (nombre d'onde en $cm^{-1}$) | DWNTs–NH–Cy* (nombre d'onde en $cm^{-1}$) |
|---|---|---|
| Déformation C–C de C $sp^3$ | 249 | 255 |
| | 280 | 316 |
| | 401 | 413 |
| Déformation dans le plan de cycle benzène di-substitué | 551 | 553 |
| Déformation de cycle benzène di-substitué | 589 | 589 |
| Déformation dans le plan de cycle benzène para di-substitué | 629 | 635 |
| Vibration de cycle benzène para di-substitué | 781 | 781 |
| Déformation C–H de C $sp^2$ | 859 | 860 |
| Elongation C–N | 1191 | 1186 |
| Déformation C–C de C $sp^2$ | 1296 | 1296 |
| Déformation C=C aromatique | 1442 | 1442 |

Nous nous sommes également penchés sur les bandes D, G et G' caractéristiques des DWNTs (**Figure 4.15**). Il est possible de constater qu'aucune des trois bandes n'est décalée soit vers le rouge soit vers le bleu après la fonctionnalisation par la fluorescéine ou par la Cy* : comme nous pouvions nous y attendre, cette fonctionnalisation n'a donc aucune influence sur la structure des DWNTs et donc sur leur réponse en Raman.

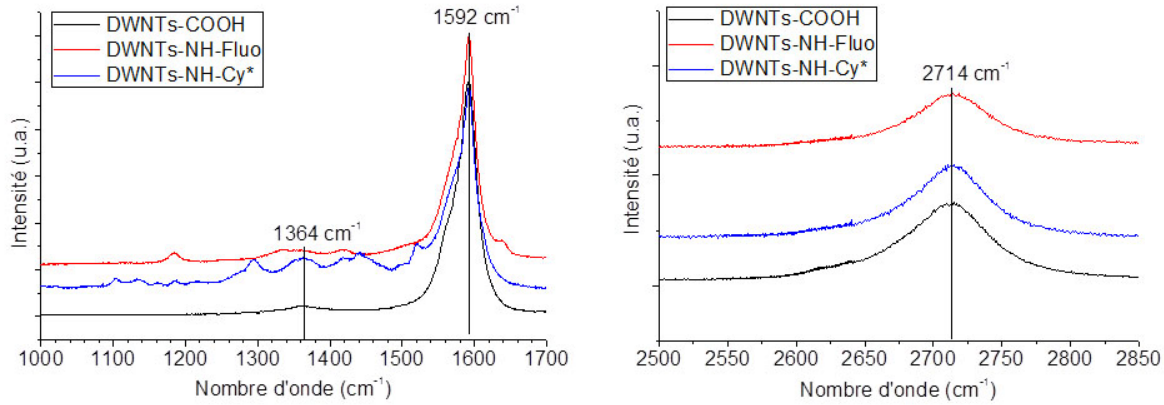



*Figure 4.15 : Spectres Raman des DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–NH–Cy*, focalisés sur les bandes D, G et G'.*

Par spectroscopie Raman, il a donc été possible de mettre en évidence la fonctionnalisation des DWNTs par la fluorescéine et la Cy*. Pour ce qui est des DWNTs−NH−Fluo, nous avons pu montrer que la molécule fixée était principalement sous la forme de fluorescéine et non de FITC ce qui est une preuve indirecte d'une fonctionnalisation covalente. En revanche, il ne faut pas écarter l'hypothèse d'une adsorption de la fluorescéine sur les parois des DWNTs (dégradation du FITC en fluorescéine dans le milieu réactionnel). Concernant les DWNTs–NH–Cy*, ce sont la présence de toute les bandes caractéristiques de la Cy* et l'absence des bandes caractéristiques des liaisons C–O, présentes uniquement dans la forme hémicarboxonium de départ, qui nous amènent à conclure que la Cy* a bien été greffée de façon covalente sur les DWNTs et que l'hémicarboxonium ne semble pas adsorbé sur les parois des DWNTs.

### B.II.4. Mise en évidence par spectrophotométrie UV-Vis-IR

Les DWNTs fonctionnalisés de façon covalente par la fluorescéine et la Cy* ont été analysés sous forme de suspensions (500 $mg.L^{-1}$ dans $D_2O$ à 1% DOC) par spectrophotométrie UV-Vis-IR au laboratoire Charles Coulomb à Montpellier. Le protocole de mise en suspension des différents échantillons de DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–NH–Cy* a été détaillé dans le chapitre 2 paragraphe E.I.3. Les suspensions obtenues après sonication et centrifugation ont un aspect différent en fonction de la nature des échantillons. La **Figure 4.16** est une photo des suspensions de DWNTs bruts, DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–NH–Cy* qui seront par la suite analysées par spectrophotométrie UV-Vis-IR. Avec les DWNTs bruts et les DWNTs–COOH, les suspensions sont très sombres alors qu'avec les DWNTs–NH–Fluo et les DWNTs–NH–Cy* les suspensions sont transparentes et légèrement colorées en vert pour la fluorescéine et jaune pour la Cy*. La fonctionnalisation a donc un impact important sur la dispersion des DWNTs.

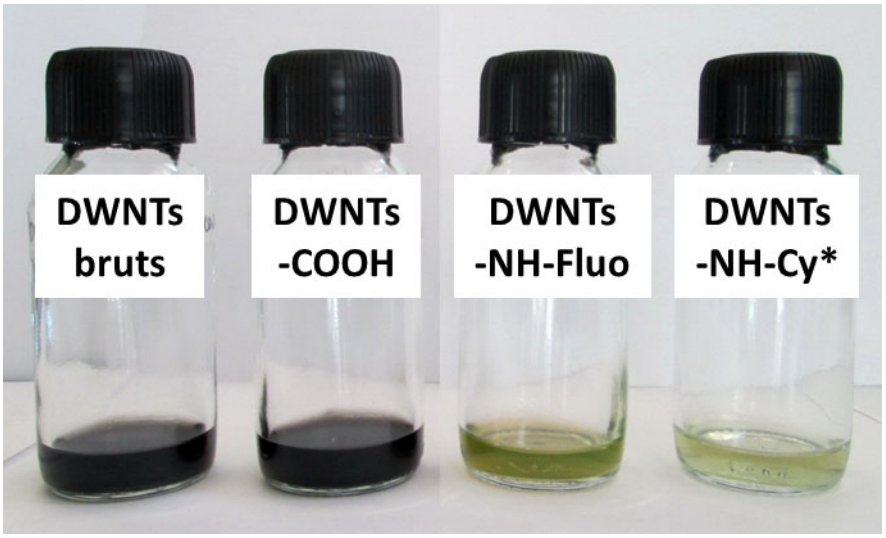



*Figure 4.16 : Photo des surnageants récupérés après centrifugation des suspensions obtenues à partir des échantillons de DWNTs bruts, DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–NH–Cy*.*

Les mesures d'absorbance ont été enregistrées sur une fenêtre de longueurs d'onde s'étendant de 200 à 2500 nm, donc de l'UV à l'IR. Un aperçu des spectres entiers obtenus pour les DWNTs bruts, les DWNTs–COOH, les DWNTs–NH–Fluo et les DWNTs–NH–Cy* est représenté sur la **Figure 4.17 (a)**. Tout d'abord, une bande très intense à 263 nm, caractéristique des systèmes aromatiques poly-cycliques et des chaines carbonées conjuguées, est présente sur les quatre spectres, ce qui est en accord avec les structures des DWNTs et des chromophores utilisés. De plus, l'absorbance globale est plus importante pour les DWNTs bruts et les DWNTs–COOH (bruit de fond plus élevé) : il s'agit là d'une conséquence directe de l'aspect très sombre des suspensions (**Figure 4.16**) qui absorbent forcément plus la lumière incidente.

Après avoir normalisé les spectres sur la bande à 263 nm, un zoom a été effectué sur les spectres des DWNTs bruts et des DWNTs–COOH sur la zone comprise entre 650 et 2500 $cm^{-1}$ (**Figure 4.17. b**). Les bandes comprises entre 1000 et 1600 $cm^{-1}$ et entre 1600 et 2250 $cm^{-1}$ correspondent respectivement à la première transition optique des tubes internes et des tubes externes des DWNTs **[16]**. Les bandes d'absorption des DWNTs bruts sont plus intenses que celles des DWNTs–COOH ce qui pourrait signifier que l'oxydation aurait conduit à l'élimination d'une partie des DWNTs.

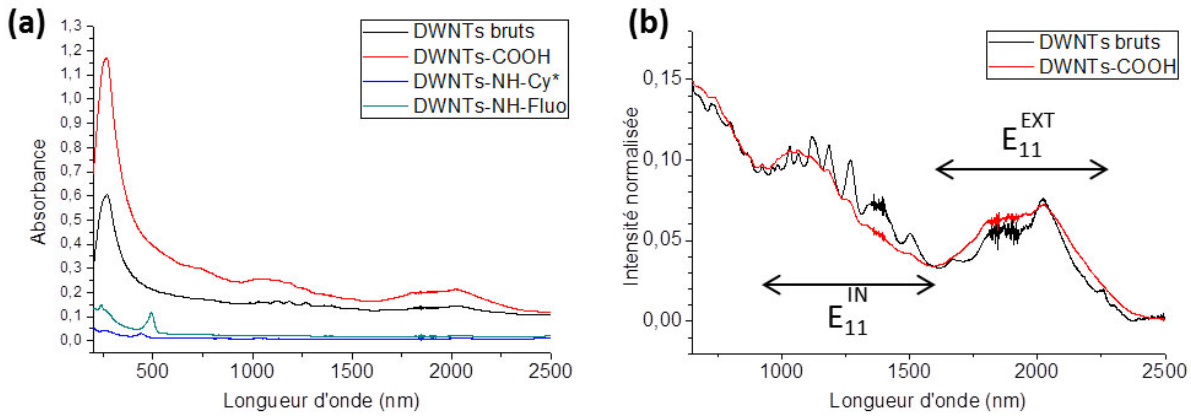



*Figure 4.17 : Graphiques représentant en (a) les spectres entiers des DWNTs bruts, DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–NH–Cy*, et en (b) un zoom sur les bandes d'absorption des DWNTs bruts et DWNTs–COOH.*

Toujours à partir des spectres normalisés, nous nous sommes par la suite davantage intéressés à l'impact de la fonctionnalisation par la fluorescéine et la Cy* sur l'absorption des DWNTs dans l'UV-Vis. Sur la **Figure 4.18 (a)**, les bandes correspondant à l'absorption des fluorophores sont clairement visibles et intenses sur les échantillons de DWNTs–NH–Fluo et de DWNTs–NH–Cy* autour de 450 nm, ce qui confirme encore une fois la présence de ces molécules sur les DWNTs fonctionnalisés. En regardant d'un plus près, il est possible de déterminer à quelles longueurs d'onde se situent les intensités maximales de ces bandes et de les comparer à la bande obtenue dans le cas de la molécule fluorescente libre **(Figure 4.18. b-c)**. Dans le cas des DWNTs–NH–Fluo (**Figure 4.18. b**), nous pouvons constater que leur bande d'absorption est parfaitement alignée sur celle du FITC seul à $\lambda$ = 492 nm, impliquant que le greffage de la fluorescéine sur les DWNTs n'a pas d'impact sur sa longueur d'onde d'excitation. Sur la **Figure 4.18 (c)** sont représentés cette fois les spectres des DWNTs–NH–Cy* et de la Cy*T. Cette fois-ci, un décalage significatif de 3 nm vers le rouge (l'incertitude de mesure étant de 0,1 nm) du maximum d'absorption est constaté pour les DWNTs–NH–Cy* par rapport à la CY*T ($\lambda$ = 440 nm). Cela est sûrement lié la différence de structure entre la Cy* liée aux DWNTs et la Cy*T. De plus, aucune bande autour de 392 nm correspondant à l'hémicarboxonium de départ n'est visible sur le spectre des DWNTs–NH–Cy*, garantissant que la cyanine est bien greffée de façon covalente et qu'aucune molécule n'est adsorbée.

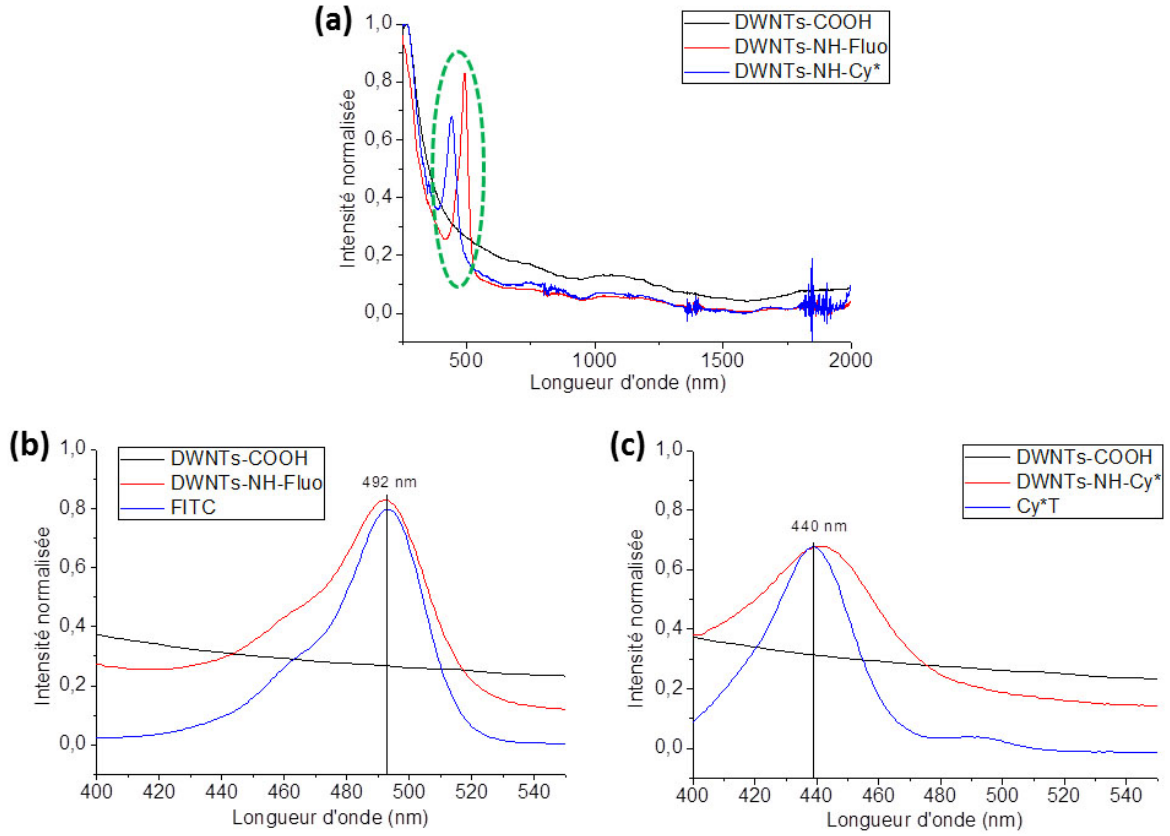



*Figure 4.18 : Graphiques représentant en (a) les spectres normalisés par rapport à la bande à 263 nm des DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–NH–Cy*, en (b) un zoom sur la bande d'absorption principale de la fluorescéine au niveau des spectres des DWNTs–COOH, des DWNTs–NH–Fluo et du FITC, et en (c) un zoom sur la bande d'absorption principale de la Cy* au niveau des spectres des DWNTs–COOH, des DWNTs–NH–Cy*et de la Cy*T.*

Par spectroscopie UV-Vis-IR, il est donc possible de mettre en évidence la présence des molécules fluorescentes sur les DWNTs fonctionnalisés. Cependant, aucun indice ne nous permet de dire de quelle(s) nature(s) est/sont les liaisons entre la fluorescéine et les DWNTs, une seule bande d'absorption étant présente sur le spectre des DWNTs–NH–Fluo. Pour ce qui est de la Cy*, nous avons pu prouver qu'une fonctionnalisation covalente s'est produite (présence de la streptocyanine et non de l'hémicarboxonium), et qu'il n'y a pas d'adsorption de l'hémicarboxonium.

### B.II.5. Mise en évidence par spectroscopie de photoluminescence

Les mêmes suspensions de DWNTs, précédemment utilisées pour les mesures d'absorption UV-Vis-IR, ont par la suite été analysées par spectroscopie de photoluminescence au laboratoire Charles Coulomb à Montpellier.

Les échantillons de départ de DWNTs bruts et DWNTs–COOH ont été caractérisés en premier lieu. Sur la **Figure 4.19** en **(a)** et **(b)** sont représentées les cartes d'excitation de la photoluminescence enregistrées pour ces deux types de DWNTs. Sur la carte correspondant aux DWNTs bruts, ce sont les DWNTs de types (9,4), (10,2), (7,5) et (8,3) qui sont majoritairement présents, mais aussi en quantités moindres des (7,6) et (8,6). Pour les DWNTs–COOH, les DWNTs (6,5) répondent avec une intensité de photoluminescence vraiment plus forte, suivis de plus loin par les (10,2), (9,4), (8,3) et (7,5). Tous ces tubes correspondent à des tubes internes semi-conducteurs. En effet, d'une part les mesures de photoluminescence ne permettent de détecter que ce type de NTCs, et d'autre part le calcul du diamètre d'après les indices démontre qu'il ne peut pas s'agir du diamètre d'un tube externe dans le cas de DWNTs. Les DWNTs bruts et DWNTs–COOH présentent ainsi des signatures bien différentes en photoluminescence traduisant une modification de la distribution des diamètres des DWNTs après oxydation, ce qui appuie les résultats obtenus précédemment par spectroscopie UV-Vis-IR. De plus, comme il est possible de l'observer sur les échelles d'intensité de photoluminescence, le rendement quantique de photoluminescence est 1000 fois plus élevé après oxydation.

Pour ce qui est des cartes d'excitation des DWNTs fonctionnalisés de façon covalente par la fluorescéine et la Cy*, de nouveaux pics de photoluminescence sont apparus à des longueurs d'onde d'excitation respectivement autour de 495 nm et 440 nm. Sur la **Figure 4.20** sont représentées les cartes d'excitation correspondantes dans la gamme de longueurs d'onde d'émission comprise entre 400 et 900 nm, zone caractéristique de l'émission des fluorophores greffés. Des signaux de photoluminescence ont effectivement été enregistrés à ($\lambda_{exc}$ = 495 nm ; $\lambda_{ém}$ = 525 nm) pour les DWNTs–NH–Fluo et à ($\lambda_{exc}$ = 440 nm ; $\lambda_{ém}$ = 520 nm) pour les DWNTs–NH–Cy*, confirmant bien la présence des molécules fluorescentes dans les échantillons de DWNTs fonctionnalisés. Pour la fluorescéine, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission correspondent bien à celles attendues, en

revanche il existe un décalage de la longueur d'émission de la Cy* par rapport à celle de la Cy*T ($\lambda_{ém}$ = 490 nm en tampon phosphate). Cet effet batochrome peut être expliqué par la différence de structure moléculaire entre la Cy* et la Cy*T ainsi que par la légère variation de composition du milieu aqueux (effet solvatochrome).

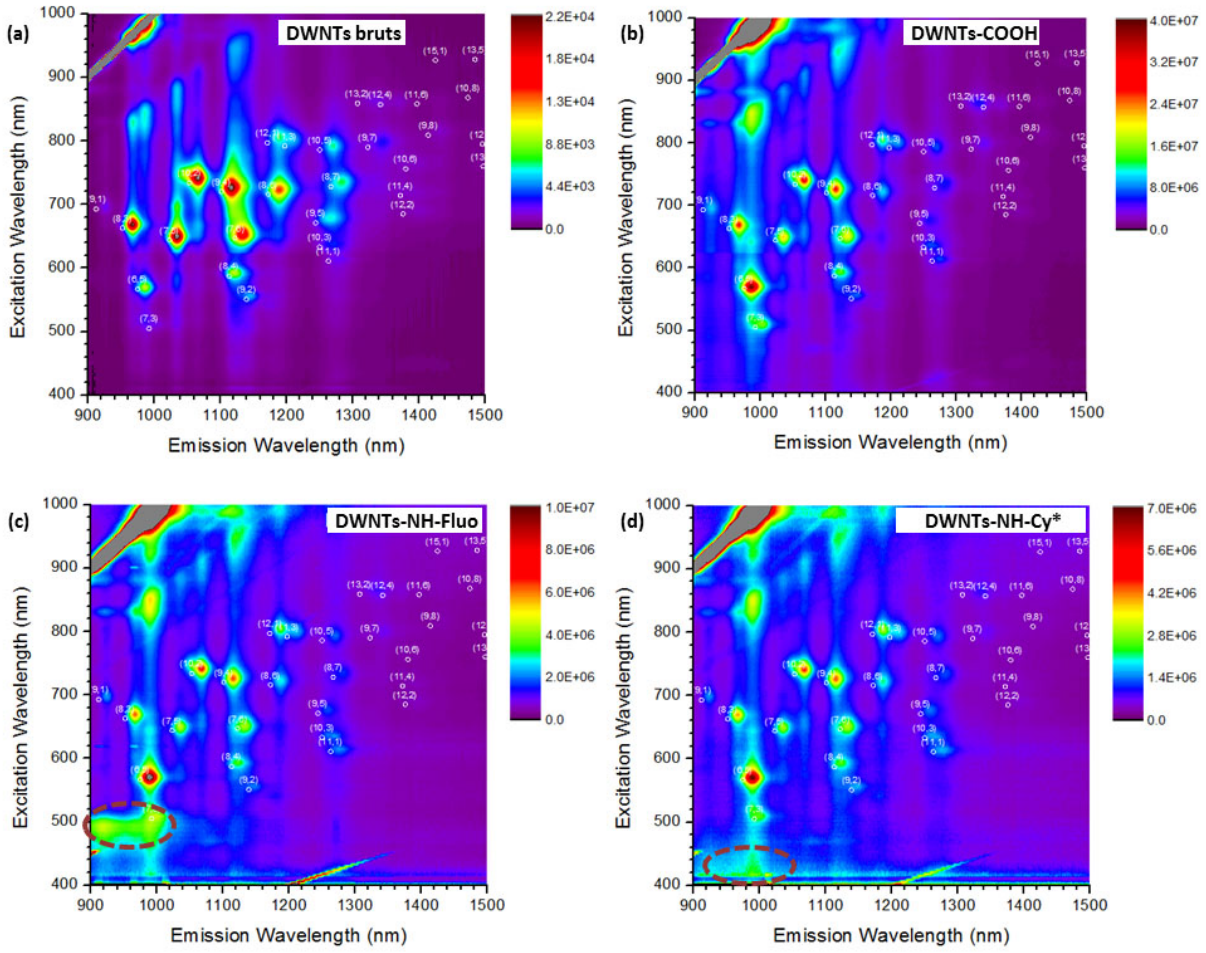



*Figure 4.19 : Cartes d'excitation de la photoluminescence des (a) DWNTs bruts, (b) DWNTs–COOH, (c) DWNTs–NH–Fluo et (d) DWNTs–NH–Cy*.*

En se focalisant sur la gamme d'émission comprise entre 900 et 1500 nm (**Figure 4.19. c-d**), deux bandes de photoluminescence sont apparues à $\lambda_{ém}$ = 920 et 990 nm pour les DWNTs−NH–Fluo à la longueur d'onde d'excitation de la fluorescéine, et une bande à $\lambda_{ém}$ = 990 nm pour les DWNTs–NH–Cy* à la longueur d'onde d'excitation de la Cy*. Il est possible d'analyser plus en détail les spectres d'excitation et d'émission de ces DWNTs fonctionnalisés au niveau de ces bandes de photoluminescence.

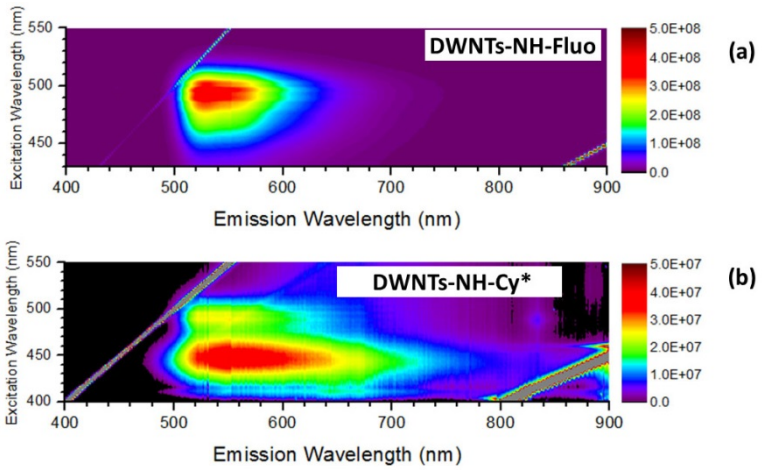



*Figure 4.20 : Grossissement des cartes d'excitation de la photoluminescence des (a) DWNTs–NH–Fluo et (b) DWNTs–NH–Cy*.*

Pour les DWNTs–NH–Fluo, à $\lambda_{ém}$ = 920 nm (**Figure 4.21. a**), une bande de photoluminescence apparait à une longueur d'onde d'excitation de 493 nm, absente pour les DWNTs–COOH. Celle-ci coïncide parfaitement avec la bande d'absorption du FITC ce qui signifie qu'elle est directement reliée à la fluorescéine greffée sur les DWNTs. En se fixant cette fois à la longueur d'onde d'excitation de la fluorescéine égale à 493 nm (**Figure 4.21. b**), les DWNTs–NH–Fluo présentent deux bandes d'émission de photoluminescence à 920 et 990 nm, précédemment observées sur la carte d'excitation.

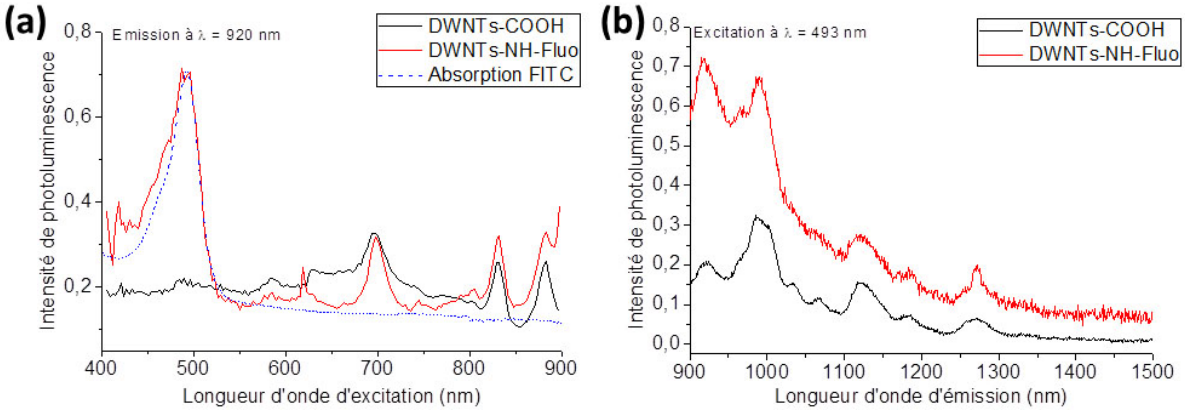



*Figure 4.21 : Graphiques représentant en (a) les spectres d'excitation des DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo à une longueur d'onde d'émission de 920 nm, et en (b) leurs spectres d'émission à une longueur d'onde d'excitation de 493 nm.*

Toujours à une longueur d'onde d'excitation de 493 nm, les spectres d'émission du FITC, de la fluorescéine et des DWNTs–NH–Fluo ont été comparés (**Figure 4.22. a**) et normalisés par rapport à la bande à 525 nm (**Figure 4.22. b**). La bande d'émission à 920 nm (**Figure 4.22. b**) apparait pour les trois échantillons, ce qui signifie que cette bande est propre à la molécule fluorescente, qu'elle soit libre ou non. En revanche, la bande à $\lambda_{ém}$ = 990 nm n'est présente qu'au niveau des DWNTs–NH–Fluo, ce qui est probablement dû à un transfert d'énergie de la fluorescéine vers les DWNTs.

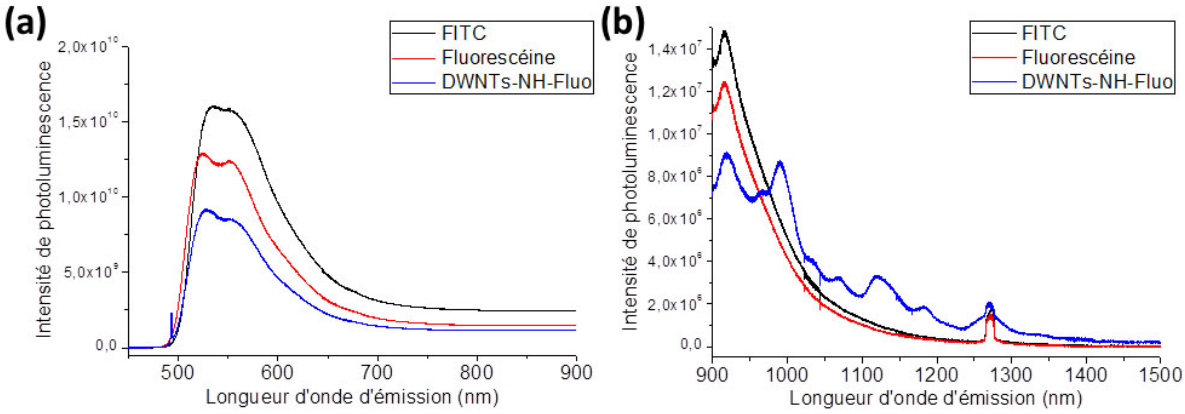



*Figure 4.22 : Graphiques représentant les spectres d'émission des DWNTs–NH–Fluo, de la fluorescéine et du FITC à une longueur d'onde d'excitation de 493 nm, (a) entre 450 et 900 nm et (b) entre 900 et 1500 nm (normalisés par rapport à la bande à 525 nm).*

Concernant la fonctionnalisation par la Cy*, lorsque l'on regarde les spectres d'excitation pour une longueur d'onde d'émission égale à 990 nm, à l'endroit même où un nouveau signal de photoluminescence semblait être apparu sur la carte d'excitation de photoluminescence (**Figure 4.19. d**), aucune différence significative ne peut être relevée entre les DWNTs–COOH et les DWNTs–NH–Cy* (**Figure 4.23. a**). De plus, aucune bande à $\lambda_{exc}$ = 440 nm, longueur d'onde d'excitation de la Cy* n'est visible. Les spectres d'émissions des DWNTs avant et après fonctionnalisation par la Cy* à $\lambda_{exc}$ = 439 nm (**Figure 4.23. b**) montrent l'apparition d'une nouvelle bande de photoluminescence à une longueur d'onde d'émission de 1318 nm.

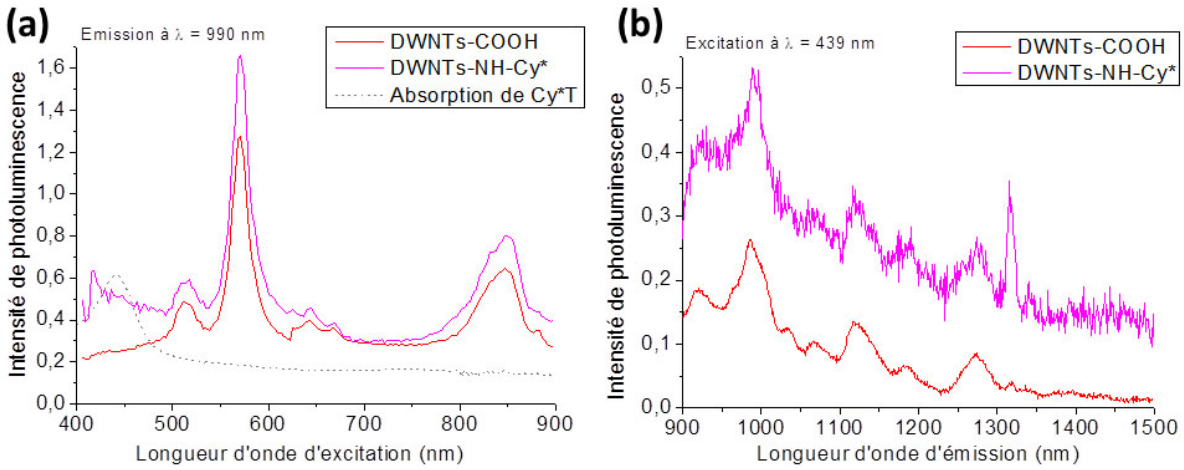



*Figure 4.23 : Graphiques représentant en (a) les spectres d'excitation des DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Cy* à une longueur d'onde d'émission de 990 nm, et en (b) leurs spectres d'émission à une longueur d'onde d'excitation de 439 nm.*

Lorsque les spectres d'émission de la molécule seule et des DWNTs–NH–Cy* à $\lambda_{exc}$ = 439 nm sont comparés et normalisés par rapport à la bande à 525 nm (**Figure 4.24**), cette même bande d'émission apparait à 1318 nm dans les deux échantillons traduisant bien la présence de la Cy* sur les DWNTs–NH–Cy*, donc une fonctionnalisation covalente.

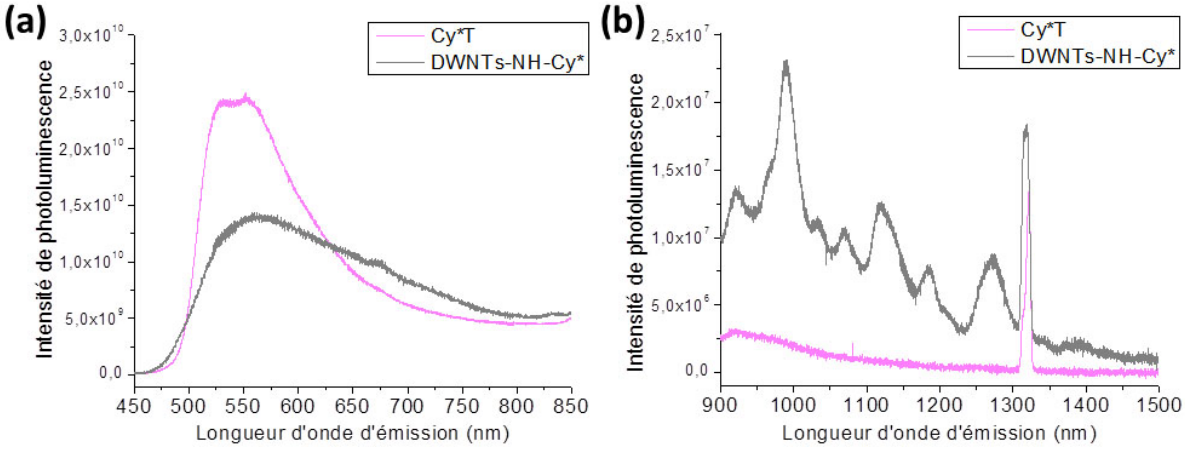



*Figure 4.24 : Graphiques représentant les spectres d'émission des DWNTs– NH–Cy* et de la Cy*T à une longueur d'onde d'excitation de 439 nm, (a) entre 450 et 900 nm et (b) entre 900 et 1500 nm (normalisés par rapport à la bande à 520 nm ).*

Les analyses de photoluminescence sur les suspensions de DWNTs–COOH et fonctionnalisés par les molécules fluorescentes de fluorescéine et de Cy* nous ont permis de confirmer le greffage de ces fluorophores sur les DWNTs par la présence de bandes d'émission caractéristiques. Un possible transfert d'énergie a également été mis en évidence entre la fluorescéine et le tube interne des DWNTs. Enfin, que ce soit dans le cas des DWNTs–NH–Fluo ou des DWNTs–NH–Cy*, la bande d'émission caractéristique du fluorophore, autour de 520 nm, voit son intensité de photoluminescence diminuée d'environ 1,7 fois une fois greffé sur les DWNTs, ce qui rendra l'observation probablement plus difficile en microscopie de fluorescence.

### B.II.6. Mise en évidence par diffusion de neutrons

Des expériences préliminaires de diffusion de neutrons ont été menées sur un spectromètre vibrationnel à neutrons (chapitre 2 partie E.III.2) situé à l'Institut Laue-Langevin à Grenoble, en collaboration avec la Division de Diffraction des Neutrons (Unités Triple-Axis Spectrometers et Time Of Flight and High Resolution spectrometers). La technique de diffusion de neutrons possède plusieurs avantages : elle est particulièrement sensible aux fonctions hydrogénées, non-destructive et possède un pouvoir de pénétration assez important pour permettre une étude de l'échantillon dans sa globalité et pas de sa surface uniquement. Pour toutes ces raisons, cette méthode d'analyse semble appropriée pour caractériser les DWNTs fonctionnalisés par différentes molécules.

Ces premiers essais ont été réalisés sur les échantillons de DWNTs–COOH, DWNTs–$NH_2$ et DWNTs–NH–Fluo, caractéristiques de chacune des étapes de la fonctionnalisation covalente. Leurs spectres sont représentés sur la **Figure 4.25**. L'énergie, en abscisse, exprimée ici en $cm^{-1}$ peut être convertie en meV $(1\ cm^{-1} = 1\ meV \times 8{,}065)$ selon la relation de Planck-Einstein : $E = \frac{\hbar . c}{\lambda}$ , avec l'énergie E en joule (J), la constante de Planck $\hbar = 6{,}63.10^{-34}$ J.s, la célérité de la lumière dans le vide $c = 3{,}0.10^{8}$ $m.s^{-1}$ et la longueur d'onde λ (nm).

Les différences observées entre le greffage de la diamine et celui de la fluorescéine ont été pointées par les numéros 1, 2 et 3. Ces bandes correspondent probablement à des vibrations de type :

1. Déformation de liaison C–H : bandes autour de 1000 $cm^{-1}$,
2. Déformation de liaison N–H : bande autour de 1600 $cm^{-1}$,
3. Elongation de liaison N–H : bande autour de 3300 $cm^{-1}$.

Des bandes N–H font leur apparition au cours de la fonctionnalisation des DWNTs, correspondant très certainement à des vibrations au niveau des molécules de 1,4-diaminobutane et de fluorescéine. Ces résultats prouvent que des différences spectrales peuvent être mises en évidence entre les différentes étapes de fonctionnalisation par la technique de diffusion de neutrons et qu'elles confirment le greffage de la diamine et du FITC sur les DWNTs.

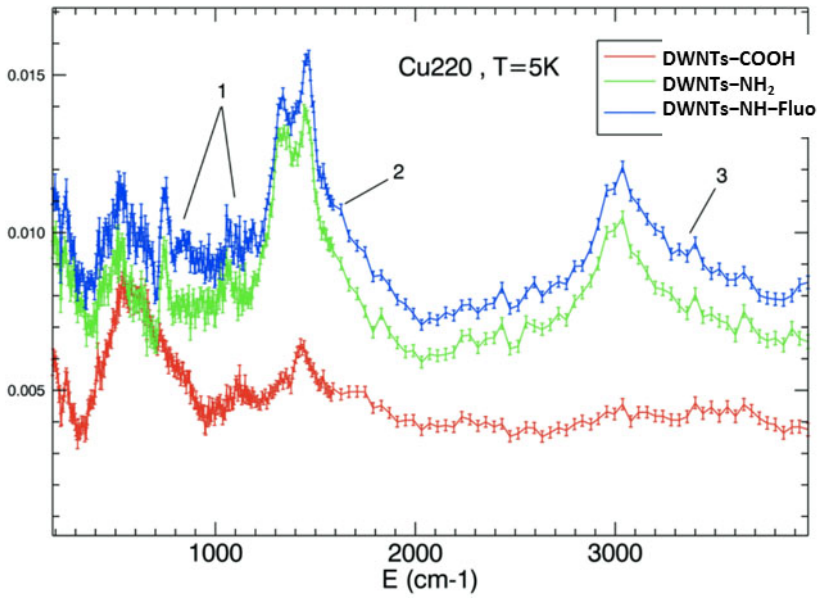



*Figure 4.25 : Spectres vibrationnels par diffusion des neutrons des DWNTs–COOH (rouge), des DWNTs–$NH_2$ (vert) et des DWNTs–NH–fluo (bleu).*

Des analyses plus poussées seront entreprises dans le cadre d'une autre thèse basée sur la collaboration entre le CIRIMAT et l'ILL (*T. Lorne, Understanding the grafting of fluorophore molecules on carbon nanotubes, Directeurs de thèse : E. Flahaut, M. Jimenez-Ruiz, S. Rols*). Davantage de données statistiques seront acquises sur la partie du spectre aux plus basses énergies (jusqu'à 1000 $cm^{-1}$) afin de pouvoir accéder à une quantification du greffage. D'autre part, des mesures avec une meilleure résolution au niveau des hautes énergies permettraient de définir plus précisément les vibrations liées aux liaisons N–H.

## B.III. Analyses quantitatives

Après avoir démontré par différentes techniques la présence des molécules fluorescentes (fluorescéine, Cy* et Cy5) sur les DWNTs fonctionnalisés, ainsi que la création de fonctions covalentes entre les DWNTs et les fluorophores, il est pertinent de s'intéresser de plus près aux quantités de molécules d'intérêt qui ont pu ainsi être greffées. Pour cela, plusieurs méthodes de quantification plus ou moins directes (microanalyse élémentaire, test de Kaiser et UPLC) ont ainsi été exploitées, puis les résultats ont été comparés afin d'obtenir la meilleure estimation possible et de déterminer la méthode la plus fiable.

### B.III.1. Quantification par microanalyse élémentaire

Les différents échantillons de DWNTs, bruts, aminés et fonctionnalisés par les trois fluorophores sélectionnés, ont été analysés au SCA de Lyon afin de déterminer les teneurs massiques en éléments chimiques bien particuliers. En effet, les DWNTs–$NH_2$, les DWNTs–NH–Cy5 et les DWNTs–NH–Cy* présentent des molécules contenant plusieurs atomes d'azote, alors que le FITC fixé sur les DWNTs–NH–Fluo contient quant à lui un atome de soufre. A partir des teneurs massiques en azote et en soufre, il est alors possible de remonter à la quantité de molécules greffées sur les DWNTs (diamine et molécules fluorescentes) exprimée en µmol par gramme de DWNTs.

Pour les DWNTs–$NH_2$, la teneur massique en azote est égale à 2,96 ± 0,30 %. Cela signifie qu'un gramme de DWNTs contient 29,6 mg de N, soit 2,11 mmol de N. Etant donné que la 1,4-diaminobutane possède deux atomes d'azote, on en déduit qu'il y a

$\frac{2,11}{2} = 1,06$ mmol de 1,4-diaminobutane dans 1 g de DWNTs, soit une quantité de molécules greffées de 1060 µmol/g DWNTs. Toutes les incertitudes sont calculées de la même manière.

Pour les DWNTs–NH–Fluo préparés dans le THF, la teneur massique en soufre est égale à 0,52 ± 0,30 %. Cela signifie qu'un gramme de DWNTs contient 5,2 mg de S, soit 0,16 mmol de S. Etant donné que le FITC possède un seul atome de soufre, on en déduit qu'il y a 0,16 mmol de fluorescéine dans 1 g de DWNTs, soit une quantité de molécules greffées de 160 µmol/g DWNTs. Pour ce même échantillon, la teneur en azote a également été évaluée et atteint la valeur de 3,67± 0,30 %. Deux méthodes de calcul sont alors possibles : soit les quantités de diamine et de fluorescéine sont directement déduites du %N, soit on réalise une nouvelle estimation de la quantité de diamine greffée à partir des %N et %S.
En suivant la 1ère méthode, nous considérons que 1 g de DWNTs contient 36,7 mg de N, soit 2,62 mmol de N. Sachant que le greffage covalent de la diamine puis de la fluorescéine apporte 3 atomes d'azote, nous pouvons alors en déduire :

Quantité de 1,4-diaminobutane $= 2,62 \times \frac{2}{3} = 1,75$ mmol/g DWNTs $= 1750$ µmol/g DWNTs

Quantité de fluorescéine $= 2,62 \times \frac{1}{3} = 0,87$ mmol/g DWNTs $= 870$ µmol/g DWNTs.

Ces résultats sont aberrants compte tenu des valeurs précédemment obtenues et de leurs incertitudes. D'autre part, cette approche fait aussi l'hypothèse importante que toutes les molécules de FITC sont en relation directe avec celles de diamine, et donc non greffées séparément. Etant donné qu'il est probable que du FITC soit adsorbé sur les parois des DWNTs, cette approche n'est pas la plus appropriée.
En considérant la 2ème méthode, 1 g de DWNTs contient 2,62 mmol de N mais également 0,16 mmol de S. Le FITC apportant un atome d'azote et un atome de soufre, la quantité d'azote apportée par le FITC est donc égale à 0,16 mmol. Il est alors possible d'en déduire la quantité de diamine greffée : $\frac{2,62-0,16}{2} = 1,23$ mmol/g DWNTs. Cette valeur est très proche de celle calculée pour les DWNTs–$NH_2$, donc par cette méthode il est possible de remonter à la quantité de diamine greffée sur les DWNTs fonctionnalisés.

En ce qui concerne les DWNTs–NH–Fluo préparés dans le tampon hydrogénocarbonate de sodium, le %S = 1,79 ± 0,30 ce qui revient à 560 ± 90 molécules de fluorescéine greffées sur les DWNTs.

Pour les échantillons de DWNTs–NH–Cy5 et DWNTs–NH–Cy* le raisonnement est différent étant donné que le seul atome permettant une quantification des fluorophores greffés est l'azote. Les DWNTs fonctionnalisés par la Cy5 possèdent un pourcentage massique d'azote égal à 3,50 ± 0,30 soit 35,0 mg ou 2,50 mmol de N pour 1 g de DWNTs. Pour une molécule de diamine et une molécule de Cy5 greffées, quatre atomes d'azote sont introduits. Si l'on fait l'hypothèse qu'il y a autant de diamine que de Cy5, alors :

Quantité de diamine=Quantité de Cy5 $= \frac{2,50}{4} = 0,63$ mmol/g DWNTs $= 630$ µmol/g DWNTs

Or ce résultat est bien trop faible comparé à la valeur obtenue pour les DWNTs–$NH_2$. Il est donc plus cohérent de soustraire la quantité d'azote provenant de la diamine, et déterminée pour les DWNT–$NH_2$ (2,11 mmol/g DWNTs), à la quantité d'azote totale de l'échantillon de DWNTs–NH–Cy5 : la quantité d'azote provenant de la Cy5 fixée sur les DWNTs $= 2,50 - 2,11 = 0,39$ mmol/g DWNTs. Comme la Cy5 contient deux atomes d'azote, la quantité de Cy5 greffée sur les DWNTs est donc égale à $\frac{0,39}{2} = 0,195$ mmol soit 195 µmol de Cy5 par gramme de DWNTs.

La quantité de Cy* fixée sur les DWNTs–NH–Cy* a été calculée suivant la même logique et évaluée à 230 µmol de Cy* par gramme de DWNTs.

*Tableau 4.2 : Comparaison du greffage de différentes molécules fluorescentes par microanalyse élémentaire de l'azote et du soufre. Les données non déterminées sont symbolisées par un tiret.*

| Echantillons analysés | Teneur en N (%) | Teneur en S (%) | Qté de molécules greffées (µmol/g DWNTs) | % greffage |
|---|---|---|---|---|
| **DWNTs bruts** | < 0,10 | - | - | - |
| **DWNTs–$NH_2$** | 2,96 ± 0,30 | - | 1060 ± 105 | - |
| **DWNTs–NH–Fluo (THF)** | 3,67 ± 0,30 | 0,52 ± 0,30 | 160 ± 90 | 15 |
| **DWNTs–NH–Fluo (Tampon)** | - | 1,79 ± 0,30 | 560 ± 90 | 53 |
| **DWNTs–NH–Cy5 (Tampon)** | 3,50 ± 0,30 | - | 195± 105 | 18 |
| **DWNTs–NH–Cy* (Tampon)** | 3,27 ± 0,30 | - | 230 ± 70 | 22 |

Une fois que les différentes quantités de molécules greffées (diamine et fluorophores) sur les DWNTs ont été déterminées, il est possible de calculer aisément les

pourcentages de greffage des molécules fluorescentes par rapport au nombre de fonctions amines primaires disponibles, qui est égal au nombre de molécules de diamine fixées sur les DWNTs. Ces résultats sont présentés dans la dernière colonne du **Tableau 4.2**.

Pour ce qui est de la fixation de la fluorescéine (dans le THF ou le tampon), le taux de greffage sur les DWNTs est quasiment 5 fois plus élevé lorsque la réaction a lieu dans le tampon basique, ce qui montre que le type de milieu réactionnel utilisé influence fortement la fixation du FITC sur les DWNTs. Ceci est plutôt cohérent du fait que le milieu basique privilégie la forme $–NH_2$ des fonctions amines, et non $–NH_3^+$, donc la réaction avec la fonction isothiocyanate du FITC est facilitée. Concernant le greffage de la Cy5 ou de la Cy*, les DWNTs$–NH_2$ ne semblent pas avoir une affinité particulière avec l'une ou l'autre des deux cyanines, cependant les taux de fonctionnalisation obtenus pour ces deux molécules sont bien inférieurs à celui de la fluorescéine. L'hypothèse qui peut être faite, compte tenu de la structure et la géométrie des différents fluorophores utilisés, est que le FITC ou la fluorescéine a la possibilité de s'adsorber à la surface des DWNTs par des interactions de $\pi$-$\pi$ stacking (molécules aromatique polycyclique plane), possible pour la Cy5 et très peu probable pour la Cy*, l'agencement des phényls rendant impossible le $\pi$-stacking de la Cy* sur les DWNTs.

### B.III.2. Quantification des fonctions amines primaires par le test de Kaiser

Un autre moyen de déterminer quelle quantité de molécules (diamine et molécules fluorescentes) a pu être fixée sur les DWNTs repose sur un test chimique colorimétrique permettant à la fois de mettre en évidence et d'évaluer le nombre de fonctions amines primaires : il s'agit du test de Kaiser. Entre 500 µg et 1 mg de DWNTs secs pesé avec précision est suspendu dans un mélange de quatre solutions, préalablement préparées (à base de ninhydrine, phénol, cyanure de potassium) et rentrant dans la composition du test de Kaiser. Le protocole a été détaillé dans la partie E.II.4 du chapitre 2. La ninhydrine réagit avec une fonction amine pour donner un composé, le pourpre de Ruhemann, absorbant à $\lambda$ = 570 nm. A titre d'exemple, le spectre enregistré sur le surnageant des DWNTs$–NH_2$ est présenté sur la **Figure 4.26**. La valeur de l'absorbance, mesurée par spectroscopie UV-visible, est ainsi directement proportionnelle à la quantité de fonctions $NH_2$ ayant réagi, et donc à la quantité de fonctions $NH_2$ disponibles à la surface des DWNTs. Dans ces conditions, le

pourpre de Ruhemann a un coefficient d'extinction molaire de ε = 15000 L.mol$^{-1}$.cm$^{-1}$, ce qui permet de calculer facilement la quantité de fonctions amines sur les DWNTs selon la formule suivante **[17]** :

$$\text{Quantité de fonctions amines (µmol/g DWNTs)} = \frac{Abs_{mesurée} \times dilution(5\ mL) \times 10^6}{\varepsilon \times l \times \text{masse d'échantillon(mg)}}$$

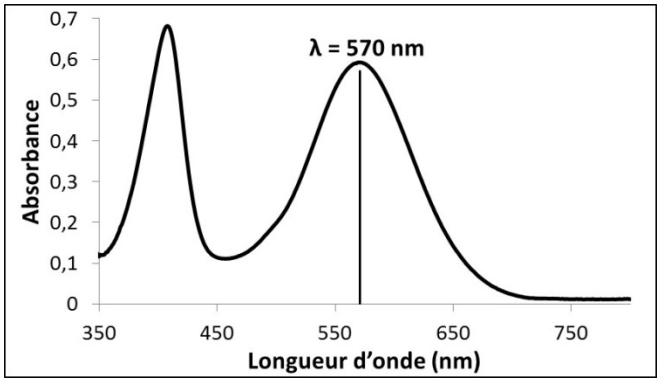



*Figure 4.26 : Spectre UV-visible du surnageant obtenu après le test de Kaiser sur les DWNTs–$NH_2$.*

Comme nous pouvons nous y attendre, une forte coloration bleue est visible au niveau des DWNTs–$NH_2$, alors que les autres suspensions de DWNTs fonctionnalisés par les différents fluorophores présentent une coloration plus ou moins soutenue (**Figure 4.27**). Il s'agit d'une preuve qualitative qu'après fonctionnalisation par des molécules fluorescentes, moins de fonctions amines sont disponibles, donc une partie des fluorophores s'est bien fixée de façon covalente sur les DWNTs.

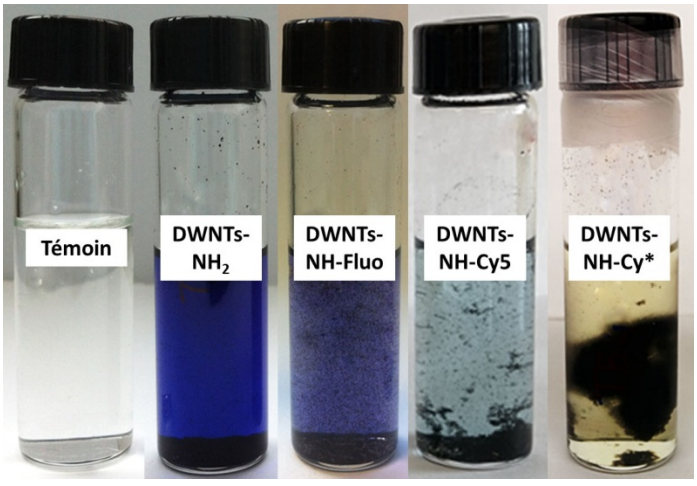



*Figure 4.27 : Photos des suspensions obtenues pour les différents échantillons de DWNTs à l'issue du test de Kaiser.*

Les échantillons de DWNTs–$NH_2$, DWNTs–NH–fluo, DWNTs–NH–Cy5 et DWNTs–NH–Cy* ont été analysés au minimum à deux reprises. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 4.3** ci-dessous. La quantité de molécules greffées est calculée par différence du nombre de fonctions –$NH_2$ disponibles entre les DWNTs–$NH_2$ et les DWNTs fonctionnalisés par les fluorophores. Le taux de greffage, quant à lui, correspond au taux de greffage covalent seul et est égal à :

$$\%\ greffage\ (\text{DWNTs–NH–fluorophore}) = \frac{Quantité\ de\ molécules\ greffées\ (\text{fluorophore})}{Quantité\ de\ molécules\ greffées\ (\text{DWNTs–NH}_2)} \times 100$$

*Tableau 4.3 : Comparaison du greffage des différents fluorophores via le test de Kaiser.*

| Echantillons analysés | Qté de $NH_2$ libres (µmol/g DWNTs) | Qté de molécules greffées (µmol/g DWNTs) | % greffage covalent |
|---|---|---|---|
| **DWNTs–$NH_2$** | 310 ± 133 | 310 ± 133 | - |
| **DWNTs–NH–Fluo (THF)** | 215 ± 47 | 95 | 31 |
| **DWNTs–NH–Fluo (Tampon)** | 50 ± 1 | 260 | 84 |
| **DWNTs–NH–Cy5 (Tampon)** | 91 ± 4 | 219 | 71 |
| **DWNTs–NH–Cy* (Tampon)** | 10 ± 4 | 300 | 97 |

Concernant les DWNTs–$NH_2$, le test de Kaiser révèle la présence de 310 ± 133 µmol de diamine greffée par gramme de DWNTs, c'est-à-dire un taux de greffage compris entre 36 et 98 % si l'on compare cette valeur au nombre de fonctions acides disponibles déterminé par dosage acido-basique dans le chapitre 3. On retrouve ainsi quasiment le même nombre de groupements fonctionnels à la surface des DWNTs en utilisant deux tests chimiques en solution différents.

Pour les DWNTs–NH–Fluo, le taux de greffage de la fluorescéine est bien plus élevé dans un tampon basique (84%) que dans le THF (31%), ce qui appuie les résultats obtenus par microanalyse élémentaire. Le milieu basique favorise bien la réaction entre le FITC et les DWNTs– $NH_2$.

Les DWNTs fonctionnalisés par la Cy5 et la Cy* révèlent des taux de greffage respectivement de 71 et 97%, valeurs assez proches de celle obtenue pour les

DWNTs−NH−Fluo (Tampon) (84%). Cela confirme bien qu'une fonctionnalisation covalente a bien eu lieu entre les fonctions amines libres et les différents fluorophores en milieu tampon. En outre, le greffage de ces fluorophores en milieu tampon semble relativement facile puisque presque tous les sites aminés accessibles sur les DWNTs se sont vus attribuer une molécule fluorescente, et ce dans des conditions expérimentales douces.

La différence entre les résultats obtenus par la microanalyse élémentaire et par le test de Kaiser peut être expliquée de plusieurs façons, surtout en fonction de l'échantillon.

Pour les DWNTs–$NH_2$, la valeur estimée par le test de Kaiser est plus de trois fois inférieure à celle calculée par microanalyse élémentaire. Cela est dû au fait que les deux méthodes ne mesurent pas les mêmes grandeurs : pour la première, c'est la teneur massique en azote dans l'ensemble de l'échantillon qui est déterminée, alors que pour la deuxième c'est la quantité de fonctions amines libres qui est évaluée. Avec le test de Kaiser la caractérisation nécessite de mettre les DWNTs en suspension, ce qui amène au problème de l'individualisation des NTCs qui est souvent assez difficile. Bien que les suspensions soient soumises à des ultrasons, il subsiste toujours des agglomérats de DWNTs ou des DWNTs regroupés sous forme de faisceaux. Donc la ninhydrine peut uniquement réagir avec les fonctions amines facilement accessibles pour former le pourpre de Ruhemann. Toutes les fonctions amines dissimulées à l'intérieur des faisceaux ne peuvent alors être détectées : le test de Kaiser donne ainsi une valeur sous-estimée de ce qui peut être calculé par microanalyse.

En ce qui concerne les DWNTs–NH–Fluo, la même observation a été effectuée par microanalyse élémentaire et par le test de Kaiser, à savoir que la fonctionnalisation covalente est plus efficace en milieu tampon basique que dans le THF. En outre, avec la microanalyse élémentaire, nous nous intéressons à la globalité des molécules de FITC fixées sur les DWNTs via la teneur massique en soufre dans l'échantillon, que ce soit de manière covalente ou non-covalente, alors que par le test de Kaiser nous sommes uniquement focalisés sur la part de molécules greffées de façon covalente. Il serait possible d'imaginer qu'une partie du FITC se serait fixé de façon covalente sur de la diamine simplement adsorbée, faussant ainsi les résultats et conclusions. Cependant, du fait que la chaine aliphatique de la diamine est très courte rendant ainsi l'adsorption difficile, et que les

DWNTs sont abondamment lavés après fonctionnalisation pour éliminer tout l'excès de diamine, cette hypothèse peut être écartée.

Lorsque le greffage est réalisé dans le tampon, le rendement obtenu par microanalyse élémentaire est deux fois plus important que par le test de Kaiser. Deux hypothèses sont alors possibles : soit encore une fois c'est l'état d'agglomération des DWNTs qui empêche le réactif du test de Kaiser d'atteindre tous les groupements fonctionnels aminés, soit une partie du FITC s'est adsorbée à la surface des DWNTs ce qui n'est pas détectable avec le test de Kaiser.

Pour ce qui est des DWNTs–NH–Cy5 et des DWNTs–NH–Cy*, les quantités de fluorophores greffés évaluées via le test de Kaiser ne sont pas aberrantes et se positionnent dans les fourchettes données par les écarts-types calculés par microanalyse élémentaire. Les résultats obtenus par ces deux techniques se recoupent donc. Nous pouvons confirmer que, pour le greffage de la Cy5 et de la Cy*, seule la fonctionnalisation covalente a pu être mise en jeu.

En comparant ces deux premières méthodes de quantification de la fonctionnalisation des DWNTs, nous avons pu mettre en évidence que le test de Kaiser permet une estimation de ce qui a pu être greffé sur les DWNTs de façon covalente uniquement, mais les résultats obtenus sont la plupart du temps sous-estimés probablement à cause de l'état d'agglomération des DWNTs (surtout pour les DWNTs–$NH_2$). D'autre part, nous avons également pu montrer que probablement une part de FITC est en réalité adsorbée à la surface des DWNTs–NH–Fluo, et qu'au niveau des DWNTs–NH–Cy5 et des DWNTs–NH–Cy* seule la fonctionnalisation covalente s'est produite.

### B.III.3. Quantification indirecte par UPLC

Une autre méthode a également été envisagée pour remonter à la quantité de molécules fluorescentes fixées sur les DWNTs, mais cette fois de façon plus indirecte. Le but est de mesurer l'absorbance des filtrats successifs récupérés après chaque lavage des DWNTs fonctionnalisés, les fluorophores étant facilement détectable en UV-visible. Ces analyses ont été effectuées au Laboratoire des Interactions Moléculaires et de la Réactivité Chimique et Photochimique (IMRCP), dans l'équipe Systèmes Moléculaires Organisés et

Développement Durable (SMODD). Les mesures ont été réalisées sur une chaine UPLC, dont toutes les conditions expérimentales ont été précédemment détaillées dans le chapitre 2 partie E.II.3.

Afin de remonter à la concentration en fluorophore de chacun des filtrats à partir de l'absorbance ou de l'aire du pic correspondant, il est nécessaire d'établir une droite d'étalonnage à partir d'une gamme de calibration pour chacune des molécules fluorescentes utilisées. Des solutions de concentrations comprises entre $10^{-8}$ M et $10^{-3}$ M ont ainsi été préparées. Les chromatogrammes de chaque composé sont présentés sur la **Figure 4.28**.

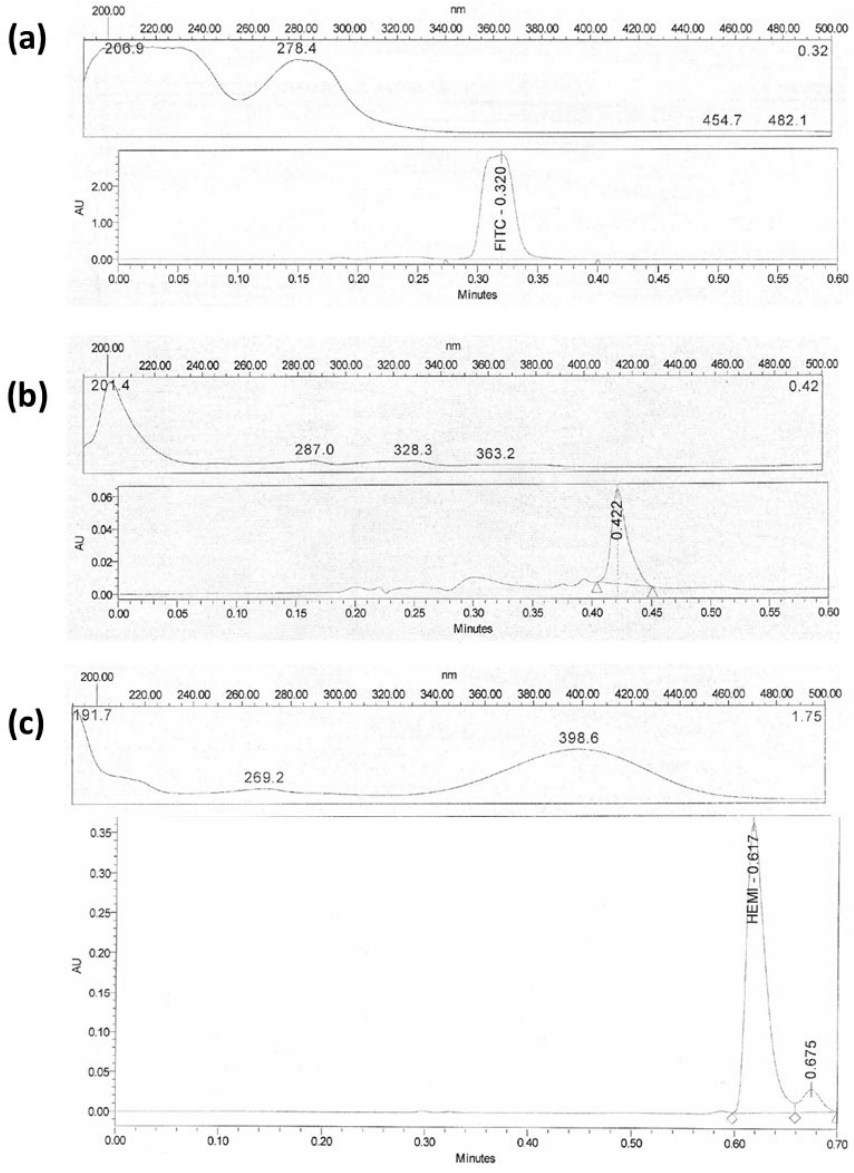



*Figure 4.28 : Chromatogrammes et spectres UV-vis du pic d'élution (a) du FITC, (b) de la Cy5 NHS Ester et (c) de l'hémicarboxonium.*

Nous pouvons observer que les trois fluorophores sont correctement élués et qu'un seul composé très largement majoritaire est détecté à 0,32 min, 0,42 min et 0,62 min respectivement pour le FITC, la Cy5 NHS Ester et l'hémicarboxonium. Les spectres UV-Vis de ces pics d'élution sont représentés juste au-dessus de chacun des chromatogrammes. C'est à partir des spectres d'absorption optique que la longueur d'onde la plus adaptée (bien caractéristique du composé et à laquelle l'absorbance est la plus élevée) sera sélectionnée pour chacun des fluorophores afin d'établir les droites d'étalonnage et d'extraire les résultats qui nous intéressent à partir des mesures réalisées sur les filtrats de lavage. Ainsi, ont pu être tracées les droites d'étalonnage du FITC dans l'EtOH absolu à $\lambda$ = 280 nm (**Figure 4.29. a**), de la Cy5 NHS Ester dans le tampon basique à $\lambda$ = 287 nm (**Figure 4.29. b**) et l'hémicarboxonium dans le $CHCl_3$ à $\lambda$ = 398 nm (**Figure 4.29. a**).

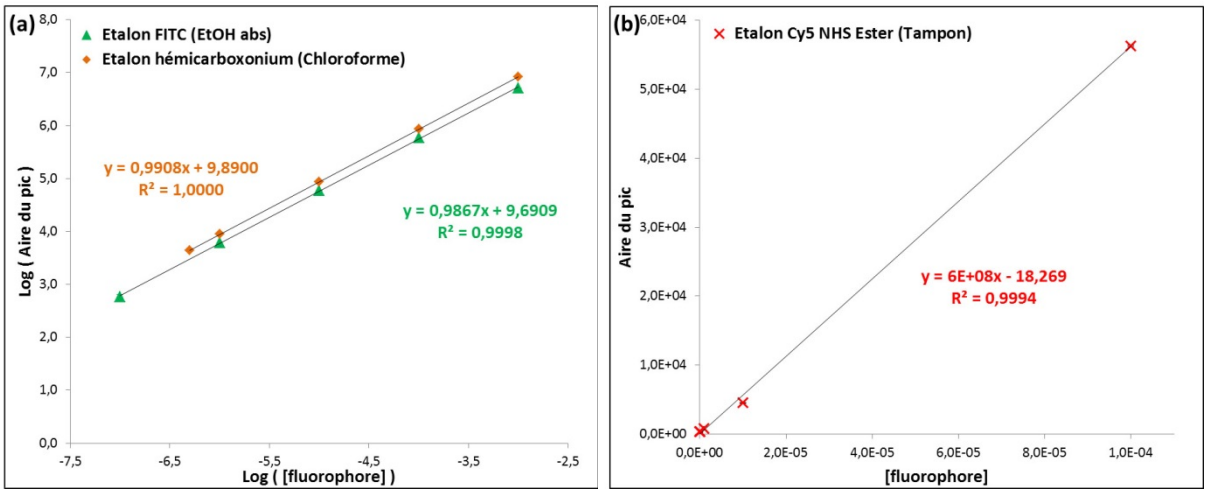



*Figure 4.29 : Droites d'étalonnage (a) du FITC dans l'EtOH abs à $\lambda$ = 280 nm et de l'hémicarboxonium dans un tampon basique à $\lambda$ = 398 nm, et (b) de la Cy5 NHS Ester dans le $CHCl_3$ à $\lambda$ = 287 nm.*

Ces droites sont tracées selon deux possibilités :

- soit du type Aire du pic = f ([fluorophore]),
- soit log (Aire du pic)=f (log ([fluorophore]).

La première méthode est celle utilisée le plus couramment puisqu'elle relie simplement et directement l'aire du pic à la concentration du composé. Cependant, si la gamme étalon s'étale sur plusieurs ordres de grandeur, cette droite perd alors en précision. Dans ce cas, il est plus opportun de tracer la droite d'étalonnage en utilisant le logarithme décimal. Pour le FITC et l'hémicarboxonium, les droites d'étalonnage ont été tracées en utilisant le log (**Figure 4.29. a**), alors que pour la Cy5 NHS Ester la méthode classique a été choisie (**Figure 4.29. b**), afin d'obtenir à chaque fois le meilleur coefficient de détermination $R^2$. Une fois les équations des droites déterminées, il sera facile de déterminer les concentrations en fluorophore de chacun des filtrats à partir des aires des pics d'élution :

- pour une droite d'équation $Aire\ du\ pic = a \times [fluorophore] + b$,

  alors $[fluorophore] = \frac{Aire\ du\ pic - b}{a}$

- pour une droite d'équation $\log(Aire\ du\ pic) = a \times \log([fluorophore]) + b$,

  alors $[fluorophore] = \frac{Aire^{\frac{1}{a}}}{10^{\frac{b}{a}}}$

Rappelons qu'après la mise en contact des DWNTs–$NH_2$ avec les solutions mères S0 des différentes molécules à greffer (voir chapitre 2 partie C.I.4.), ceux-ci sont filtrés, puis immergés dans un volume précis de solvant (EtOH abs pour le FITC, $CH_2Cl_2$ pour l'hémicarboxonium et la Cy5), soumis à des ultrasons (bain) pendant 10 min et enfin filtrés. Ce cycle de filtration / récupération du filtrat / lavage / sonication est répété six fois. Chaque filtrat de lavage a ainsi été analysé à trois reprises par UPLC, et l'aire du pic d'élution du fluorophore relevé à la longueur d'onde précédemment sélectionnée et utilisée pour l'établissement de chacune des droites d'étalonnage. De cette façon, un suivi de la cinétique de lavage a pu être réalisé (**Figure 4.30**).

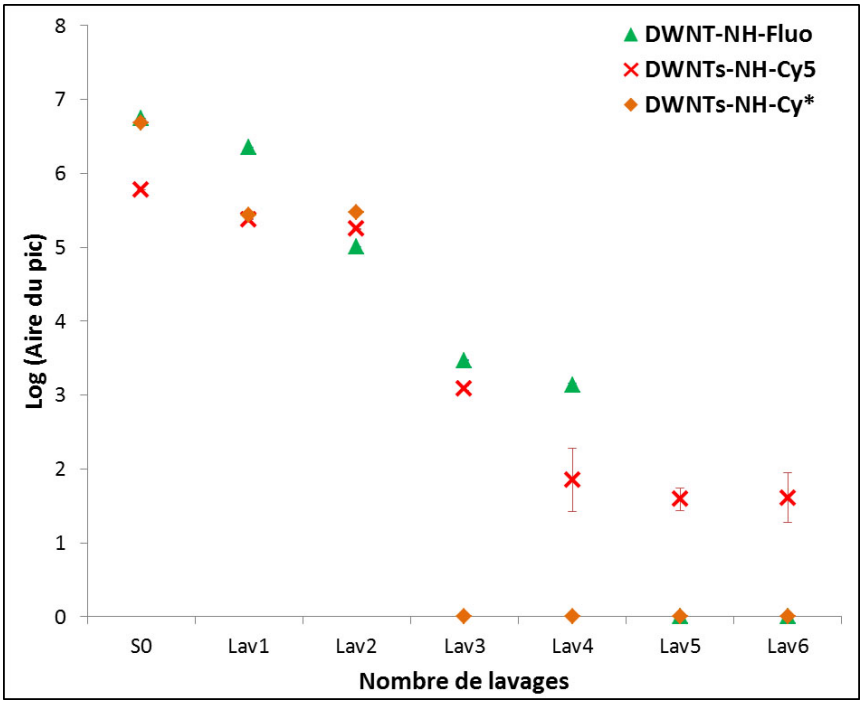



*Figure 4.30 : Suivi de la cinétique de lavage des différents DWNTs fonctionnalisés par la fluorescéine et par les cyanines Cy5 et Cy*. S0 correspond à la solution mère de départ ; Lav1 à Lav6 correspondent aux filtrats récupérés après les lavages 1 à 6.*

Au bout du 4ème lavage, il ne reste quasiment plus de molécules d'intérêt dans le filtrat. Seule la Cy5 NHS Ester reste encore détectable (bien qu'elle soit présente en très faible quantité) probablement grâce à son coefficient d'extinction molaire très élevé. Il est donc certain qu'après six lavages les DWNTs fonctionnalisés par les différents fluorophores ont été correctement lavés.

Les aires de pic relevées sont ensuite rassemblées et les concentrations correspondantes calculées à partir des formules établies précédemment. Connaissant quel volumes de solvant ont été utilisés pour la mise en contact des DWNTs avec les molécules à greffer, puis pour les lavages successifs, il est possible de remonter à la quantité de matière de fluorophore éliminée à chaque lavage. Dans le **Tableau 4.4**, sont présentés à titre d'exemple les résultats obtenus pour les filtrats des DWNTs–NH–Fluo (THF).

*Tableau 4.4 : Exemple des valeurs relevées et calculées à partir de l'analyse des filtrats issus de la fonctionnalisation covalente des DWNTs par le FITC.*

| | Aire du pic | [FITC] ($mol.L^{-1}$) | $V_{EtOH}$ (mL) | $n_{FITC}$ (mol) |
|---|---|---|---|---|
| **S0 (solution mère)** | 5495409 | $1,03.10^{-3}$ | 10 | $1,03.10^{-5}$ |
| **Lav1** | 2240304 | $4,12.10^{-4}$ | 10 | $4,12.10^{-6}$ |
| **Lav2** | 101597 | $1,79.10^{-5}$ | 15 | $2,68.10^{-7}$ |
| **Lav3** | 2946 | $4,95.10^{-7}$ | 15 | $7,42.10^{-9}$ |
| **Lav4** | 1364 | $2,27.10^{-7}$ | 15 | $3,40.10^{-9}$ |
| **Lav5** | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Lav6** | 0 | 0 | 0 | 0 |

A partir de ces valeurs, il est alors facile de calculer la quantité de molécules fixées en soustrayant la quantité de molécules éliminées à la quantité initiale introduite. Pour 10 mg de DWNTs–NH–FITC, on obtient :

$$n_{initiale}\,(FITC) = n_{FITC}\,(S0) = 1,03.10^{-5}\ mol$$

$$n_{éliminée}\,(FITC) = 4,39.10^{-6}\ mol$$

$$n_{fixée}\,(FITC) = n_{initiale}\,(FITC) - n_{éliminée}\,(FITC) = 5,91.10^{-6}\ mol$$

Soit 591 µmol FITC / g DWNTs.

Le taux de greffage peut alors être déterminé en faisant le rapport de la quantité de fluorophore greffé sur la quantité de fonctions amines primaires présentes sur les DWNTs−$NH_2$. En effet, étant donné que ce sont les quantités de molécules éliminées qui sont déterminées par cette méthode d'analyse des filtrats, nous ne pouvons pas faire la différence entre fonctionnalisation covalente et non-covalente. De ce fait, les données acquises dans cette technique se rapprochent plutôt en terme d'interprétation à celles obtenues par microanalyse élémentaire, c'est-à-dire que nous avons une vision globale sur ce qui s'est fixé sur les DWNTs.

Pour plus de clarté, les résultats déterminés par chacune des trois techniques de quantification utilisées ont été regroupés dans le **Tableau 4.5**.

*Tableau 4.5 : Comparaison du greffage des différents fluorophores par analyses UPLC des filtrats de lavage.*

| Echantillons analysés | | Microanalyse élémentaire | Test de Kaiser | UPLC |
|---|---|---|---|---|
| **DWNTs–$NH_2$** | µmol/g DWNTs | 1060 ± 105 | 310 ± 133 | - |
| | % greffage | - | - | - |
| **DWNTs–NH–Fluo (THF)** | µmol/g DWNTs | 160 ± 90 | 95 | 468 |
| | % greffage | 15 | 31 | 44 |
| **DWNTs–NH–Fluo (Tampon)** | µmol/g DWNTs | 560 ± 90 | 260 | - |
| | % greffage | 53 | 84 | - |
| **DWNTs–NH–Cy5 (Tampon)** | µmol/g DWNTs | 195± 105 | 219 | 531 |
| | % greffage | 18 | 71 | 50 |
| **DWNTs–NH–Cy* (Tampon)** | µmol/g DWNTs | 230 ± 70 | 300 | 453 |
| | % greffage | 22 | 97 | 43 |

Les filtrats récupérés au cours des lavages successifs des DWNTs–NH–Fluo préparés dans le tampon ont également été analysés par UPLC mais aucune quantification n'a pu être réalisée. En effet, un composé a bien été séparé et détecté par UPLC mais son pic d'élution ne sort pas à 0,32 min, et son spectre UV-visible n'est pas celui du FITC (bandes décalées). Le premier filtrat n'était pas jaune, comme cela était le cas dans l'EtOH ou le THF, mais marron. Comme les filtrats n'ont pas été passés rapidement sur la chaine UPLC, le FITC a eu le temps de se dégrader dans l'eau **[18]** et sa concentration dans chacun des filtrats des DWNTs–NH–Fluo (Tampon) n'a pas pu être déterminée.

Par UPLC, en plus d'avoir obtenu des taux de greffage quasiment identiques (entre 43 et 50%) pour les trois fluorophores dans des conditions différentes, les quantités de molécules greffées par gramme de DWNTs sont deux fois plus élevées que celles obtenues par microanalyse élémentaire et par le test de Kaiser. Ceci peut être expliqué de deux manières. D'une part, la perte de produit lors des transferts des DWNTs au cours des six cycles de filtration/lavage conduit à une sous-estimation de la quantité de molécules d'intérêt éliminée, donc à une surestimation de ce qui est resté fixer sur les DWNTs. D'autre part, le dosage des filtrats de lavage est une méthode de quantification indirecte du greffage ce qui conduit forcément à une incertitude plus élevée de la mesure.

La comparaison de ces trois différentes techniques de quantification de la fonctionnalisation covalente utilisées dans le cadre de cette thèse a permis de mettre en évidence plusieurs aspects plus ou moins prévisibles. L'UPLC ne permet de donner qu'une estimation vraiment approximative de la quantité de molécules fluorescentes qui a pu être greffée sur les DWNTs, les résultats étant fortement surestimés (perte de produits au cours des lavages, méthode de dosage indirecte).

La microanalyse élémentaire et le test de Kaiser, quant à eux, permettent effectivement d'estimer le nombre de molécules d'intérêt greffées sur les DWNTs et ce avec des résultats se recoupant de manière tout à fait acceptable. Cependant, des différences ont pu être relevées, notamment pour les DWNTs–$NH_2$ et les DWNTs–NH–Fluo (Tampon), conséquences directes de deux paramètres variant d'une méthode à l'autre. En premier lieu, avec la microanalyse élémentaire, ce sont toutes les molécules contenues dans l'échantillon analysé qui peuvent être quantifiées, alors que le test de Kaiser lui permet uniquement d'évaluer la fonctionnalisation covalente. De ce fait, il est possible de mettre en évidence l'existence d'une adsorption des molécules par comparaison des résultats obtenus par les deux techniques (DWNTs–NH–Fluo préparés dans le tampon). En second lieu, l'état d'agglomération des DWNTs n'influence aucunement les résultats de microanalyse élémentaire puisque l'échantillon est soumis à une combustion totale au cours de l'analyse (chapitre 2 partie E.II.1), ce qui n'est pas le cas avec le test de Kaiser, la réaction ayant lieu dans une suspension de DWNTs. La dispersion des DWNTs–$NH_2$ étant difficile, il devient alors impossible au réactif mis en jeu par le test de Kaiser d'atteindre les fonctions aminées situées au sein des faisceaux de DWNTs et les valeurs obtenues en sont alors affectées. D'autre part, bien que le nombre de fonctions amines soit sous-estimé par le test de Kaiser par rapport à la microanalyse élémentaire, il donne tout de même une indication très intéressante sur le nombre de fonctions amines réellement disponibles et accessibles pour toute fonctionnalisation covalente ultérieure.

## C. Fonctionnalisation non-covalente

La fonctionnalisation non-covalente est une autre méthode couramment utilisée afin de greffer des molécules d'intérêt sur les parois des NTCs sans création de liaisons fortes. Ce sont principalement des composés aromatiques ou à caractère très hydrophobe qui sont sélectionnés, ce type de fonctionnalisation étant basé sur des interactions de nature hydrophobe ou de $\pi$-$\pi$ stacking.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes demandés, dans un premier temps, quelle pouvait être l'influence de l'état de surface des DWNTs sur leur pouvoir d'adsorption vis-à-vis de deux molécules très souvent utilisées : le FITC et la pyrène méthylamine ($PyMeNH_2$). Le FITC peut être greffé de façon covalente comme nous avons pu le voir précédemment, mais son aromaticité lui permet également de s'adsorber sur les parois des NTCs **[19]** qui peuvent alors être suivis *in vitro* par microscopie de fluorescence **[20,21]**. Néanmoins, la quantité de FITC fixée et la détection simultanée du FITC et des NTCs dans les cellules sont rarement bien déterminées. Le pyrène, quant à lui, est principalement utilisé sous ses formes dérivées ioniques pour mieux disperser les NTCs (dérivé carboxylique **[22]** ou aminé **[23]**), mais également comme points d'ancrage pour fixer des molécules biologiques (biocapteurs ADN) **[24]** ou des nanoparticules métalliques **[25]**. Ainsi dans une première partie, la mise en évidence et la quantification de l'adsorption de ces deux molécules sur différents types de DWNTs ont donc été réalisées par spectroscopie UV-Vis, ATG, test de Kaiser et enfin microanalyse élémentaire.

La seconde partie est consacrée à la comparaison des fonctionnalisations covalente et non-covalente des DWNTs par le FITC dans les mêmes conditions expérimentales. Sachant que le FITC est capable de s'adsorber à la surface des DWNTs, il est très probable que, lors du processus de greffage par liaison covalente du FITC sur les DWNTs–$NH_2$, il y ait une partie des molécules fluorescentes qui se fixent par $\pi$-$\pi$ stacking sur les parois de ces mêmes DWNTs. Il est donc intéressant de déterminer quelles sont les proportions de chacune de ces fonctionnalisations, cette information étant particulièrement importante pour les études de nanotoxicologie et des éventuelles applications biomédicales. Les échantillons de DWNTs ont ainsi été analysés par MET ; spectroscopies IR, Raman, UV-Vis et de photoluminescence ; microanalyse élémentaire et ATG.

Enfin, la dernière partie traite de la fonctionnalisation de deux types de DWNTs par un dérivé lipidique, le 25-hydroxycholestérol (25-HC), impliqué dans le métabolisme des

stérols dans le cas du cancer du sein. Cette étude, basée notamment sur l'utilisation de dérivés radioactifs du 25-HC, a pour but d'évaluer quel est le potentiel des DWNTs en tant que vecteurs de molécules hydrophobes d'intérêt biologique et d'identifier quels sont les DWNTs ayant le plus d'affinité pour le 25-HC. La quantification de l'adsorption a, de ce fait, été réalisée par mesure de la radioactivité ainsi que par UPLC.

## C.I. Etude des différents états de surface des DWNTs

### C.I.1. Adsorption du FITC et de la $PyMeNH_2$

L'intérêt de cette première étude est de déterminer quels sont les états de surface les plus favorables à l'adsorption de deux fluorophores, le FITC et la $PyMeNH_2$ (**Figure 4.31**), sur les DWNTs.

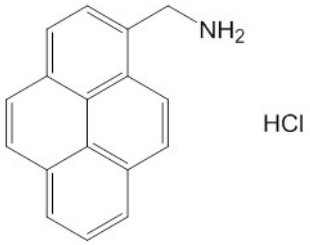



*Figure 4.31 : 1-pyrenemethylamine hydrochloride*

Quatre types de DWNTs ont ainsi été utilisés :

- DWNTs bruts
- DWNTs purifiés par la Méthode 6 (DWNTs Meth6) (Chapitre 2, partie B.I.4)
- DWNTs oxydés par la Méthode 1 et lavés par la Méthode A (DWNTs Meth1+A) (Chapitre 2, parties B.I.1 et B.II.1.a)
- DWNTs oxydés par la Méthode 2 et lavés par la Méthode C (DWNTs Meth2+C) (Chapitre 2, parties B.I.2.a et B.II.1.c).

Alors que les DWNTs bruts et les DWNTs Meth6 ont leurs parois externes fortement hydrophobes du fait qu'ils présentent peu de groupements fonctionnels à leur surface, les DWNTs Meth1+A et les DWNTs Meth2+C quant à eux auront un caractère davantage

hydrophile grâce aux fonctions oxygénées créées au cours de l'étape d'oxydation. Il est donc très probable que le FITC et la $PyMeNH_2$ n'aient pas la même affinité vis-à-vis de ces quatre surfaces.

Les différents DWNTs ont ainsi été mis en présence soit du FITC (dans l'EtOH abs) soit de la $PyMeNH_2$ (dans le THF), de sorte que les DWNTs soient recouverts au maximum à 50% par les molécules d'intérêt (pour éviter la saturation des solutions). Pour cela, l'aire occupée par une molécule de FITC ou de $PyMeNH_2$ a été calculée, puis sachant que la surface spécifique des DWNTs est d'environ 900 $m^2.g^{-1}$, il est ensuite facile de remonter aux quantités nécessaire pour obtenir un taux maximum de 50% de couverture. Des suspensions de DWNTs ont été réalisées dans l'EtOH abs ou le THF, puis les solutions de fluorophores ont ensuite été ajoutées. Les mélanges ont ensuite été soumis à des ultrasons puis agités à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant deux jours. Les suspensions ont par la suite été centrifugées, les surnageants récupérés, et les culots ont été lavés plusieurs fois avec le solvant initialement utilisé. Les protocoles ont été détaillés dans le chapitre 2, partie C.II.1 (FITC) et C.II.2 ($PyMeNH_2$). Les surnageants ont ensuite été analysés par spectroscopie UV-Vis, et les culots, une fois lyophilisés, par ATG, test de Kaiser et microanalyse élémentaire.

### C.I.2. Mise en évidence d'une cinétique de désorption au cours des lavages par spectroscopie UV-visible

Dans un premier temps, les spectres d'absorption du FITC dans l'EtOH abs et de la $PyMeNH_2$ dans le THF ont été enregistrés afin de déterminer les longueurs d'onde les plus appropriées pour une étude quantitative ultérieure par spectroscopie UV-Vis. Sur la **Figure 4.32** sont représentés les spectres des deux molécules. Comme ce qui avait déjà été vu dans la partie B.III.3 relative à la quantification de la fonctionnalisation covalente par UPLC, la bande d'absorption à $\lambda$ = 283 nm, la plus intense, a été sélectionnée pour le FITC. La $PyMeNH_2$ présente quant à elle plusieurs bandes d'absorption très intenses, et c'est la plus élevée d'entre elles, à $\lambda$ = 343 nm, qui a été choisie.

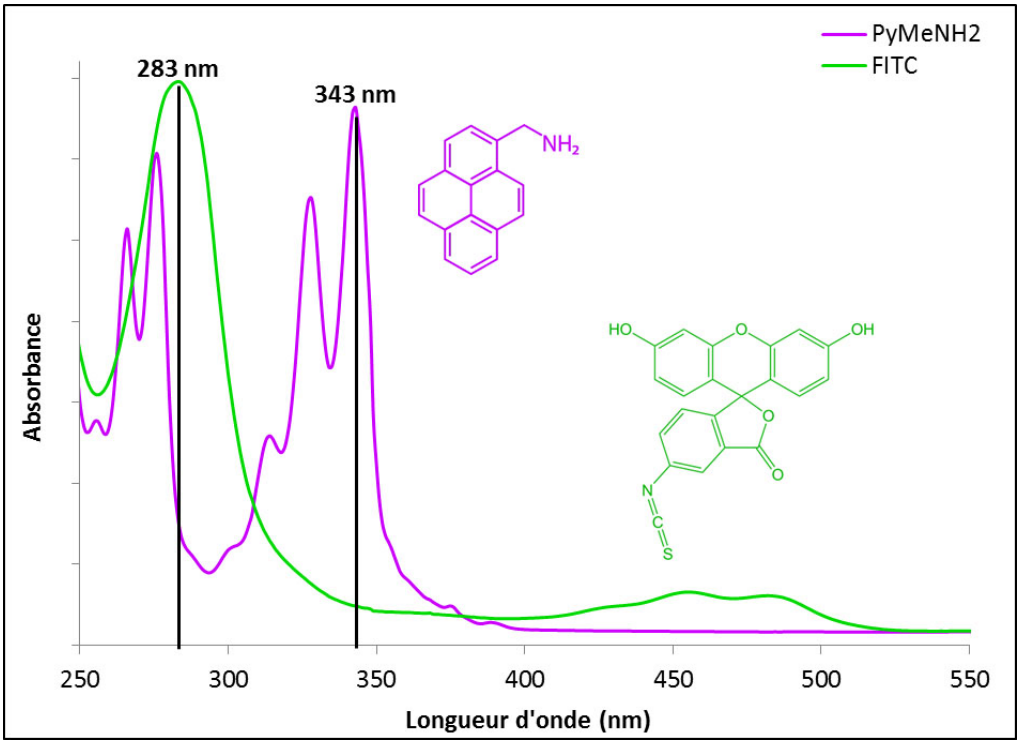



*Figure 4.32 : Spectres d'absorption des solutions de FITC dans l'EtOH abs (en vert) et de $PyMeNH_2$ dans le THF (en violet).*

Les surnageants récupérés à chaque cycle de lavage ont par la suite été analysés par spectroscopie UV-Vis, et les valeurs d'absorbance enregistrées, à $\lambda$ = 283 nm et $\lambda$ = 343 nm respectivement pour le FITC et la $PyMeNH_2$. Il a alors été possible de réaliser un suivi de la cinétique de désorption (**Figure 4.33**). Dans les deux cas, tout le FITC et la $PyMeNH_2$ n'ont pas été éliminée d'un coup au premier lavage, mais progressivement. Cela témoigne de l'existence d'interactions faibles entre les DWNTs et les fluorophores, donc d'un équilibre entre les molécules libres en solution et celles qui se sont adsorbées. Dans le cas du FITC, la quantité de fluorophore éliminé semble se stabiliser à partir du 3$^{ème}$ lavage, ce qui appuie l'hypothèse d'un équilibre FITC libre / FITC adsorbé. La courbe de lavage de la $PyMeNH_2$ est moins nette et lisse que celle du FITC, avec la présence de deux points aberrants, ce qui est probablement dû à des erreurs de manipulation.

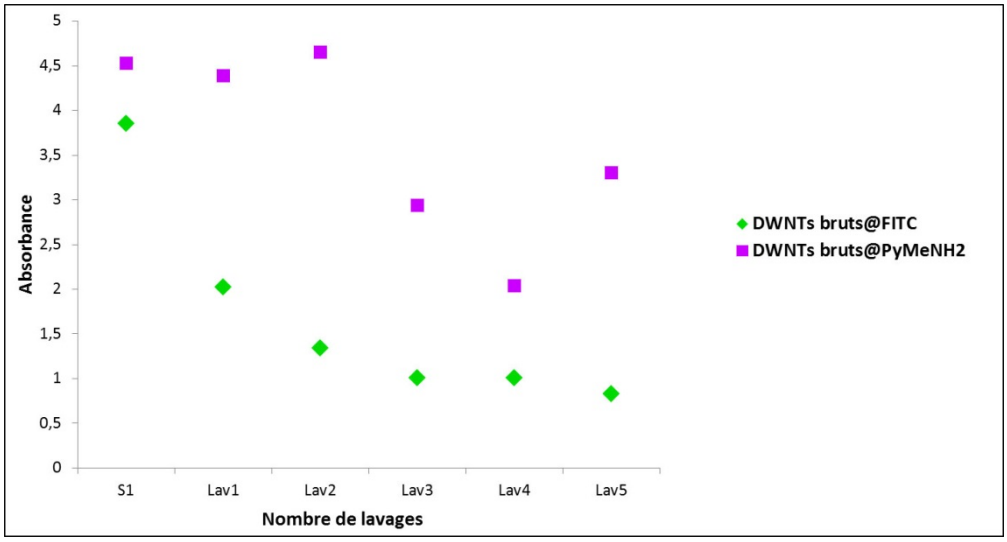



*Figure 4.33 : Suivi de la cinétique de désorption des DWNTs bruts fonctionnalisés de façon non-covalente par le FITC (en vert) et la $PyMeNH_2$ (en violet). S1 correspond au premier surnageant récupéré ; Lav1 à Lav5 correspondent aux surnageants récupérés après les lavages 1 à 5.*

## C.I.3. Analyse quantitative

### *C.I.3.a. Détermination de la quantité de FITC adsorbé par spectroscopie UV-Vis*

Afin de quantifier ce qui a pu s'adsorber sur les parois des DWNTs, les droites d'étalonnage du FITC et de la $PyMeNH_2$ ont été réalisées afin de pouvoir remonter à la concentration de chacun des surnageants à partir des valeurs d'absorbance relevées.

Dans le cas de la $PyMeNH_2$, la quantification n'a pas été possible par cette méthode, les quantités de $PyMeNH_2$ éliminées mesurées, quel que soit le type de DWNTs, étant supérieures aux quantités initialement introduites. Ces valeurs trop élevées, comme pour la courbe de cinétique de lavage, sont probablement liées à l'évaporation du THF, les solutions ayant été stockées pendant une longue période avant analyse.

Pour ce qui est des DWNTs fonctionnalisés par le FITC, le calcul du nombre de molécules greffées a pu aboutir cette fois à des résultats plausibles. Les taux d'absorption ont ainsi pu être déterminés par comparaison de la quantité de FITC adsorbée à la quantité initialement introduite (**Tableau 4.6)**.

*Tableau 4.6 : Comparaison des taux d'absorption du FITC sur différents états de surface de DWNTs calculés à partir des résultats obtenus par spectroscopie UV-Vis des surnageants.*

| Echantillons analysés | % adsorption |
|---|---|
| **DWNTs bruts@FITC** | 27 |
| **DWNTs Meth6@FITC** | 39 |
| **DWNTs Meth1+A@FITC** | - |
| **DWNTs Meth2+C@FITC** | 22 |

Il semble de ce fait que le FITC s'adsorbe un peu plus facilement sur les DWNTs bruts et les DWNTs Meth6. Par conséquent, il aurait une affinité un plus élevée vis-à-vis des surfaces les plus hydrophobes, ce qui parait tout à fait cohérent si l'on considère que le FITC se fixe par $\pi$-$\pi$ stacking sur les parois des DWNTs. Avec les DWNTs Meth1+A@FITC, les surnageant récupérés étaient de couleur vert foncé au lieu du jaune clair habituel, indiquant la présence de DWNTs en suspension. Les DWNTs contribuant fortement à l'absorption de la lumière, les valeurs d'absorbance relevées étaient ainsi trop élevées et ont abouti à une quantification du FITC adsorbé aberrante (quantité adsorbée supérieure à la quantité introduite au départ).

Par conséquent, il est possible d'accéder à une estimation du taux d'adsorption sur les DWNTs par spectroscopie UV-Vis. Cependant, les limites de cette technique sont rapidement atteintes lorsque des NTCs bien suspendus sont présents dans le surnageant et rendent l'analyse infructueuse en faussant le résultat. Une fois de plus, la méthode de quantification indirecte faisant intervenir la spectroscopie UV-Vis, que ce soit à partir des surnageants ou des filtrats (partie B.III.3), ne semble pas la plus appropriée pour obtenir des résultats fiables et précis.

#### *C.I.3.b. Détermination de la quantité de FITC adsorbé par ATG*

Après lyophilisation des DWNTs fonctionnalisés de façon non-covalente, ceux-ci ont pu être analysés par ATG (conditions d'analyse au chapitre 2 partie E.III.1). Nous avons décidé de travailler sous atmosphère d'argon pour éviter la dégradation des DWNTs lors de la montée en température, ceux-ci commençant à se dégrader sous air à partir de 250°C environ.

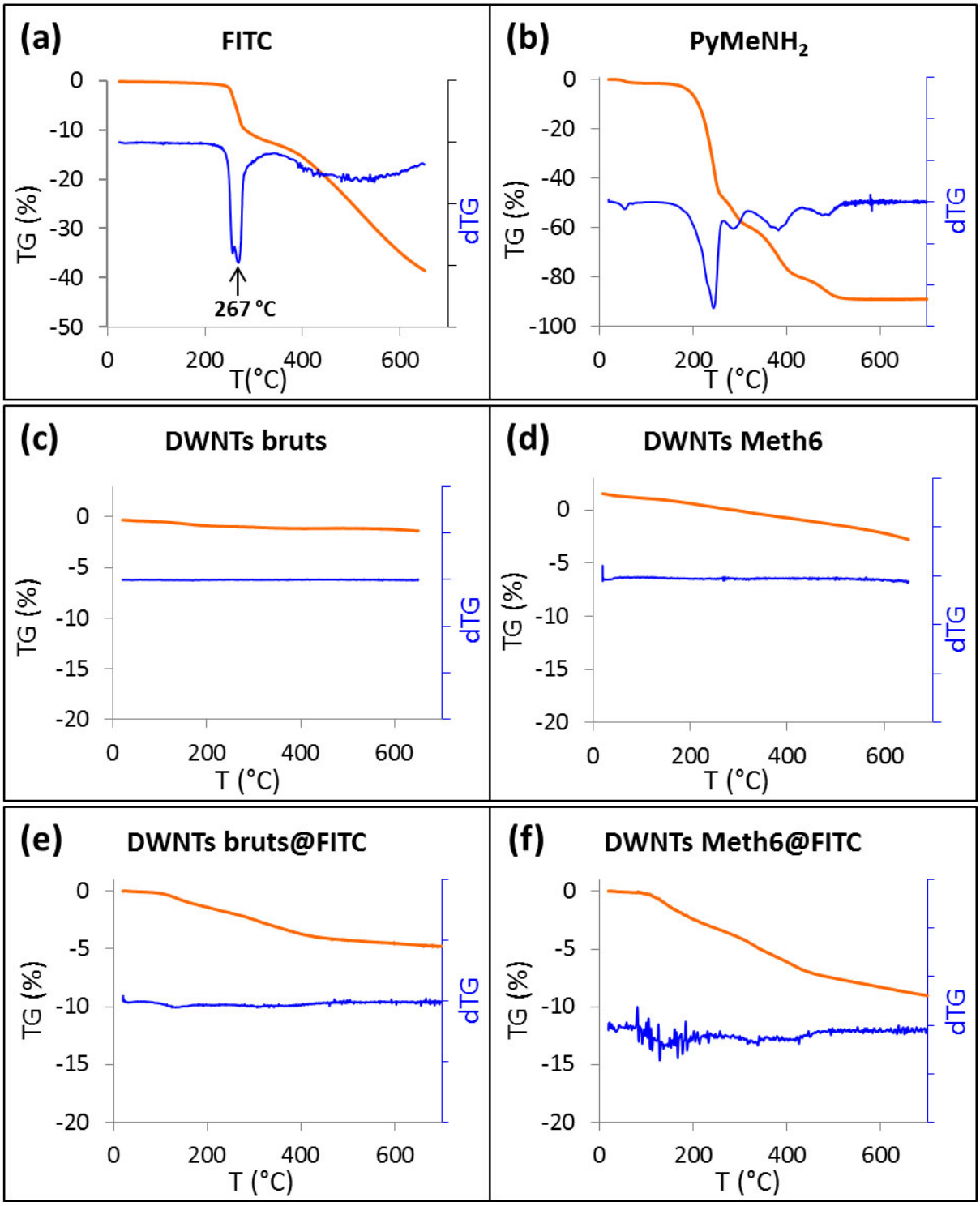



*Figure 4.34 : Courbes thermogravimétriques (orange) et dérivées premières (bleu) (a) du FITC, (b) de la $PyMeNH_2$, (c) des DWNTs bruts, (d) des DWNTs Meth6, (e) des DWNTs bruts@FITC et (f) des DWNTs Meth6@FITC.*

Dans un premier temps, les courbes thermogravimétriques des deux fluorophores seuls ont été enregistrées afin d'identifier des pertes de masse caractéristiques (**Figures 4.34. a-b**). Pour le FITC (**Figure 4.34. a)**, une première perte de masse à 267°C est

clairement observable et assez bien définie, atteignant une valeur de 12,00 %. En revanche dans le cas de la $PyMeNH_2$ (**Figure 4.34. b**), le thermogramme est un peu plus complexe, sans perte de masse bien délimitée. De ce fait, nous nous sommes préférentiellement focalisés sur l'analyse des DWNTs fonctionnalisés par le FITC, la marche à 267°C semblant plus facile à déceler.

Dans un second temps, les DWNTs bruts (**Figure 4.34. c**) et les DWNTs Meth6 (**Figure 4.34. d**), non fonctionnalisés, ont été caractérisés dans les mêmes conditions de manière à avoir les thermogrammes contrôles correspondants, et à connaitre quelle quantité de DWNTs est dégradée à une température donnée. Les DWNTs bruts et les DWNTs Meth6 ne sont pratiquement pas dégradés jusqu'à 700°C, avec des pertes de masse inférieures à 5%. Avec les DWNTs Meth6, la perte de masse plus marquée est attribuée à la décomposition des fonctions oxygénées.

Par la suite, ce sont les DWNTs fonctionnalisés de façon non-covalente par le FITC, à savoir les DWNTs bruts@FITC (**Figure 4.34. e**) et les DWNTs Meth6@FITC (**Figure 4.34. f**), qui ont été analysés. Il est important de noter que ces échantillons ont été fonctionnalisés par le FITC, non pas dans le but d'avoir 50% de couverture maximum, mais suivant les mêmes proportions utilisées par Liu Q *et al.* **[19]** (6,6% de couverture maximum). Une première perte de masse est identifiable dans les deux cas et atteint un palier respectivement à 180 °C et à 200 °C : elles correspondraient donc à la première perte de masse caractéristique du FITC, mais avec un décalage d'environ 80°C. Le FITC adsorbé serait plus facile à dégrader une fois fixé sur les DWNTs. En relevant les pertes de masse à 180°C et 200°C sur les courbes thermogravimétriques des DWNTs fonctionnalisés par le FITC et des DWNTs seuls, il est alors possible de remonter à la quantité de FITC adsorbé sur les DWNTs. Prenons l'exemple des DWNTs bruts@FITC : à 180°C, la perte de masse enregistrée est de 1,19%. Or, les DWNTs bruts sont dégradés à 0,82% à la même température, ce qui signifie que 1,19 – 0,82 = 0,37% de la perte de masse des DWNTs bruts@FITC correspondent à la dégradation du FITC. La masse initiale de l'échantillon étant de 1,80 mg, la perte de masse liée au FITC est donc de 1,80 x 0,0037 = $6{,}66.10^{-3}$ mg. Or cette masse correspond à 12% de la masse de FITC initiale, d'après la courbe thermogravimétrique du FITC :

$m_{initiale}(FITC) = \frac{6{,}66.10^{-3}}{0{,}12} = 5{,}55.10^{-2}\ mg$ soit $1{,}43.10^{-4}$ mmol dans un échantillon de 1,80 mg de DWNTs. Donc pour 1 g de DWNTs, la quantité de FITC adsorbée est de 79 µmol.

Les taux d'absorption ont été calculés par rapport à la quantité de FITC introduite au départ (322 µmol/g DWNTs) et les résultats ont été regroupés dans le **Tableau 4.7**.

*Tableau 4.7 : Comparaison par ATG de l'adsorption du FITC sur deux types de DWNTs.*

| Echantillons analysés | Perte de masse (%) | Perte de masse liée aux DWNTs seuls (%) | Qté de FITC adsorbé (µmol/g DWNTs) | % adsorption |
|---|---|---|---|---|
| **FITC** | -12,00 | - | - | - |
| **DWNTs bruts@FITC** | -1,19 à 180°C | -0,82 à 180°C | 79 | 25 |
| **DWNTs Meth6@FITC** | -2,42 à 200°C | -0,92 à 200°C | 321 | 100 |

Le taux d'absorption au niveau des DWNTs bruts@FITC correspond à celui déterminé par spectroscopie UV-Vis. Cependant, dans le cas des DWNTs Meth6@FITC la quantité de FITC adsorbé calculée à partir des courbes thermogravimétriques est égale à la quantité initiale de FITC, ce qui rend ce résultat aberrant lorsqu'on le compare à celui obtenu par spectroscopie UV-Vis. Du fait que la première perte de masse du FITC soit plus ou moins décalée en température d'un échantillon à l'autre, il est difficile de déterminer avec précision la TG correspondante. Malgré cette incohérence, les résultats vont tout de même dans le sens d'une affinité plus forte du FITC vis-à-vis des DWNTs Meth6.

#### *C.I.3.c. Détermination de la quantité de $PyMeNH_2$ adsorbée par le test de Kaiser*

Les molécules de $PyMeNH_2$ comportant une fonction amine primaire, il était donc intéressant d'utiliser le test de Kaiser pour quantifier le nombre de molécules adsorbées sur les DWNTs. Les quatre différents DWNTs ont ainsi été soumis au test de Kaiser, suivant le même protocole décrit précédemment dans la partie E.II.4 du chapitre 2.

Comme nous pouvions nous y attendre, le test a bien fonctionné puisqu'une coloration bleue a pu être observée à l'œil nu (**Figure 4.35**) surtout pour l'échantillon de DWNTs Meth2+C@$PyMeNH_2$. Donc des molécules de $PyMeNH_2$ sont bien présentes dans les échantillons de DWNTs fonctionnalisés.

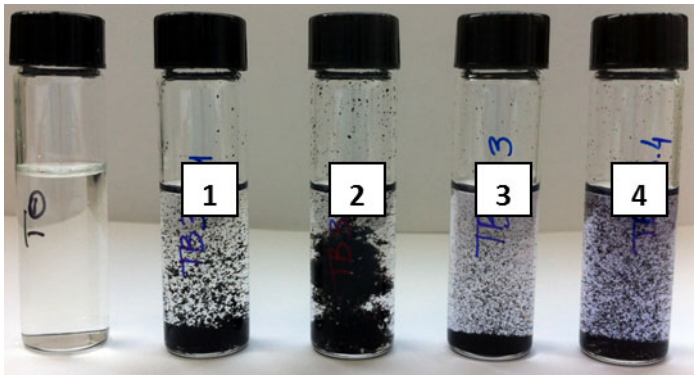



*Figure 4.35 : Photos des suspensions obtenues à l'issue du test de Kaiser pour les échantillons de (1) DWNTs bruts@PyMeNH$_2$, (2) DWNTs Meth6@PyMeNH$_2$, (3) DWNTs Meth1+A@PyMeNH$_2$ et (4) DWNTs Meth2+C@PyMeNH$_2$.*

Dans le **Tableau 4.8**, les résultats obtenus suite au test de Kaiser ont été rassemblés, et les taux d'adsorption calculés par rapport à la quantité de PyMeNH$_2$ initialement introduite.

*Tableau 4.8 : Comparaison de l'adsorption de la PyMeNH$_2$ sur différents états de surface de DWNTs via le test de Kaiser.*

| Echantillons analysés | Qté de fonctions NH$_2$ (µmol/g DWNTs) | Qté de PyMeNH$_2$ adsorbée (µmol/g DWNTs) | % adsorption |
|---|---|---|---|
| **DWNTs bruts@PyMeNH$_2$** | 12 | 12 | 0,3 |
| **DWNTs Meth6@PyMeNH$_2$** | 21 | 21 | 0,6 |
| **DWNTs Meth1+A@PyMeNH$_2$** | 31 | 31 | 0,8 |
| **DWNTs Meth2+C@PyMeNH$_2$** | 69 | 69 | 2 |

Etonnamment, quel que soit le type de DWNTs, les taux d'adsorption sont tous très faibles (≤ 2%) comparés à ceux obtenus pour le FITC par d'autres techniques, alors que les deux molécules ont des structures assez proches (taille, aromaticité). Deux hypothèses sont possibles pour expliquer ces résultats. D'une part, l'un des problèmes relatif au test de Kaiser, et qui a déjà été rencontré dans le cas de la quantification de la fonctionnalisation covalente, est l'état d'agglomération des DWNTs. Il est probable qu'une partie des molécules de PyMeNH$_2$ se retrouve piégée dans les faisceaux de DWNTs, rendant alors impossible leur détection par le test de Kaiser. D'autre part, la PyMeNH$_2$ commerciale est sous la forme de (PyMeNH$_2$, HCl), donc la fonction amine sera probablement préférentiellement sous sa forme –NH$_3^+$. De ce fait, les molécules de ninhydrine du test de

Kaiser ne pourront pas réagir correctement avec les fonctions amines pour former le pourpre de Ruhemann. La quantité de fonctions amines, donc de molécules de $PyMeNH_2$, serait alors sous-estimée.

En outre, la $PyMeNH_2$ aurait une affinité légèrement supérieure pour les parois des DWNTs Meth2+C@$PyMeNH_2$. Si l'on considère que le groupement fonctionnel de la $PyMeNH_2$ est plutôt sous la forme de $–NH_3^+$, alors il est tout à fait possible que l'affinité de la molécule soit plus importante vis-à-vis des surfaces plus hydrophiles et chargées négativement, comme cela est le cas au niveau des parois des DWNTs oxydés comportant des fonctions –COOH/$–COO^-$ (DWNT–$COO^-$ $^+H_3N$–PyMe).

### *C.I.3.d. Détermination des quantités de FITC et de $PyMeNH_2$ adsorbées par microanalyse élémentaire*

Les molécules de FITC et de $PyMeNH_2$ comportent toutes les deux un atome d'azote, ce qui rend leur quantification envisageable par microanalyse élémentaire. Les analyses des DWNTs fonctionnalisés de façon non-covalente par ces deux molécules ont été réalisées au SCA de Lyon (chapitre 2, partie E.II.1).

Les teneurs massiques en N ont été exploitées, exactement de la même manière que dans la partie précédente traitant de la fonctionnalisation covalente (B.III.1), afin de déterminer les quantités de molécules adsorbées sur les différents DWNTs. Les taux de greffage ont quant à eux été calculés par rapport à la quantité initiale de produit introduite et tous les résultats ont été rassemblés dans le **Tableau 4.9.**

Dans le cas de la fonctionnalisation par la $PyMeNH_2$, les taux d'adsorption déterminés par microanalyse élémentaire sont 10 fois plus élevés que ceux obtenus par le test de Kaiser. Cela confirme donc que le test de Kaiser donne une valeur sous-estimée de ce qui est réellement fixé sur les DWNTs. En outre, la $PyMeNH_2$ est davantage présente au niveau des DWNTs Meth1+A et des DWNTs Meth2+C, donc celle-ci a une affinité nette pour les surfaces plus hydrophiles et chargées négativement. De ce fait, ce sont plutôt des interactions ioniques entre les fonctions $–COO^-$ des parois des DWNTs et les fonctions $–NH_3^+$ des

molécules de $PyMeNH_2$ qui seraient impliquées, plutôt que des interactions du type π-π stacking.

*Tableau 4.9 : Comparaison de l'adsorption de la $PyMeNH_2$ et du FITC sur différents états de surface de DWNTs déterminée par microanalyse élémentaire.*

| Echantillons analysés | Teneur en N (%) | Qté de molécules adsorbées (µmol/g DWNTs) | % adsorption |
|---|---|---|---|
| **DWNTs bruts** | < 0,10 ± 0,10 | - | - |
| | | | |
| **DWNTs bruts@$PyMeNH_2$** | < 0,10 ± 0,10 | < 70 ± 70 | < 2 ± 2 |
| **DWNTs Meth6@$PyMeNH_2$** | < 0,10 ± 0,10 | < 70 ± 70 | < 2 ± 2 |
| **DWNTs Meth1+A@$PyMeNH_2$** | 0,56 ± 0,20 | 400 ± 140 | 11 ± 4 |
| **DWNTs Meth2+C@$PyMeNH_2$** | 0,96 ± 0,20 | 686 ± 140 | 18 ± 4 |
| | | | |
| **DWNTs bruts@FITC** | < 0,10 ± 0,10 | < 70 ± 70 | < 3 ± 3 |
| **DWNTs Meth6@FITC** | 0,18 ± 0,10 | 129 ± 70 | 5 ± 3 |
| **DWNTs Meth1+A@FITC** | 0,17 ± 0,10 | 121 ± 70 | 5 ± 3 |
| **DWNTs Meth2+C@FITC** | 0,29 ± 0,10 | 207 ± 70 | 9 ± 3 |

En ce qui concerne la fonctionnalisation non-covalente par le FITC, la microanalyse élémentaire révèle des taux d'adsorption bien inférieurs à ceux déterminés par spectroscopie UV-Vis ou par ATG. Ces résultats confirment les observations qui avaient pu être faites précédemment : la méthode de quantification indirecte par analyse des surnageants par spectroscopie UV-Vis surestime les taux de greffage (perte de produit, évaporation de solvant) ; les courbes thermogravimétriques sont difficiles à interpréter après la fonctionnalisation des DWNTs, puisque les pertes de masses liées aux molécules fixées sont mal définies et décalées.

Ainsi, même en combinant plusieurs techniques analytiques, la quantification de ce qui a pu se fixer de façon non-covalente de manière générale n'est pas aussi simple qu'il y parait. Certaines méthodes sont plus adaptées à l'analyse des surnageants (spectroscopie UV-Vis) alors que d'autres sont plutôt appropriées à la caractérisation des DWNTs eux-mêmes (ATG, test de Kaiser, microanalyse élémentaire). Néanmoins, il en résulte que la microanalyse élémentaire reste la seule technique donnant des résultats cohérents quels

que soient les DWNTs analysés ou les molécules greffées. Le FITC ne semble pas avoir d'affinité pour un type de paroi en particulier, ce qui révèle que les interactions mises en jeu sont davantage de nature $\pi$-$\pi$ stacking. Quant à la $PyMeNH_2$, le test de Kaiser et la microanalyse élémentaire ont montré qu'elle se fixe préférentiellement sur les parois des DWNTs oxydés, révélant ainsi très certainement des interactions de type ionique entre les fonctions ammoniums de la molécule et les fonctions carboxylates des DWNTs. Ces résultats soulignent donc, par l'existence d'interactions compétitives, que l'état de surface des DWNTs influence l'adsorption et la désorption des molécules.

## C.II. Comparaison des fonctionnalisations covalente et non-covalente : le cas du FITC

### C.II.1. Fonctionnalisations covalente et non-covalente réalisées dans les mêmes conditions

Les analyses réalisées sur les DWNTs fonctionnalisés de façon covalente par le FITC (DWNTs−NH−Fluo) ont montré que la différence entre les résultats obtenus par microanalyse élémentaire et par le test de Kaiser pouvait être expliquée par l'adsorption d'une partie des molécules de FITC à la surface des DWNTs. En outre, l'étude précédente, sur l'influence de l'état de surface des DWNTs vis-à-vis de la capacité, notamment du FITC, à s'adsorber sur leurs parois, a quant à elle mis en évidence l'existence d'interactions entre le FITC et les DWNTs. Cependant, cette fonctionnalisation non-covalente se produit avec un rendement très faible (inférieur à 10%) lorsqu'elle a lieu dans l'EtOH absolu.

Il parait donc pertinent de savoir quelles sont les proportions de FITC fixé par fonctionnalisations covalente et non-covalente, et ce, dans les mêmes conditions expérimentales utilisées pour l'obtention des DWNTs−NH−Fluo, à savoir : un milieu tampon basique ; une quantité de FITC initialement introduite de 1,11 mmol/g DWNTs, ce qui correspondrait à 23% de couverture théorique. Les résultats déjà obtenus dans le cas des DWNTs−NH−Fluo (Tampon) par MET, spectroscopies IR, Raman, UV-Vis et de photoluminescence, ont ainsi été directement comparés à ceux recueillis pour des DWNTs oxydés par la Méthode 5 et lavés par la Méthode C (DWNTs−COOH) puis mis en présence de

FITC selon le même protocole (chapitre 2, partie C.I.4). Ceux-ci ont été complétés par une analyse supplémentaire par ATG.

## C.II.2. Analyse qualitative

### *C.II.2.a. Comparaison par MET*

Sur la **Figure 4.36**, ont été présentées, à titre de rappel, une image de MET des DWNTs−COOH (**Figure 4.36. a**) montrant des parois propres, et une des DWNTs−NH−Fluo (**Figure 4.36. b**) mettant en évidence la présence de dépôts de matière organique désorganisée sur les parois et au niveau des intersections de faisceaux de DWNTs. Les DWNTs−COOH@FITC (**Figure 4.36. c**) semblent présenter quelques dépôts au niveau de leurs parois, mais ces observations sont beaucoup moins nettes que pour les DWNTs−NH−Fluo. Cela signifierait que du FITC se serait bien adsorbé aux parois des DWNTs, ce qu'il faut vérifier par des techniques plus précises et appropriées à la détection de petites molécules.

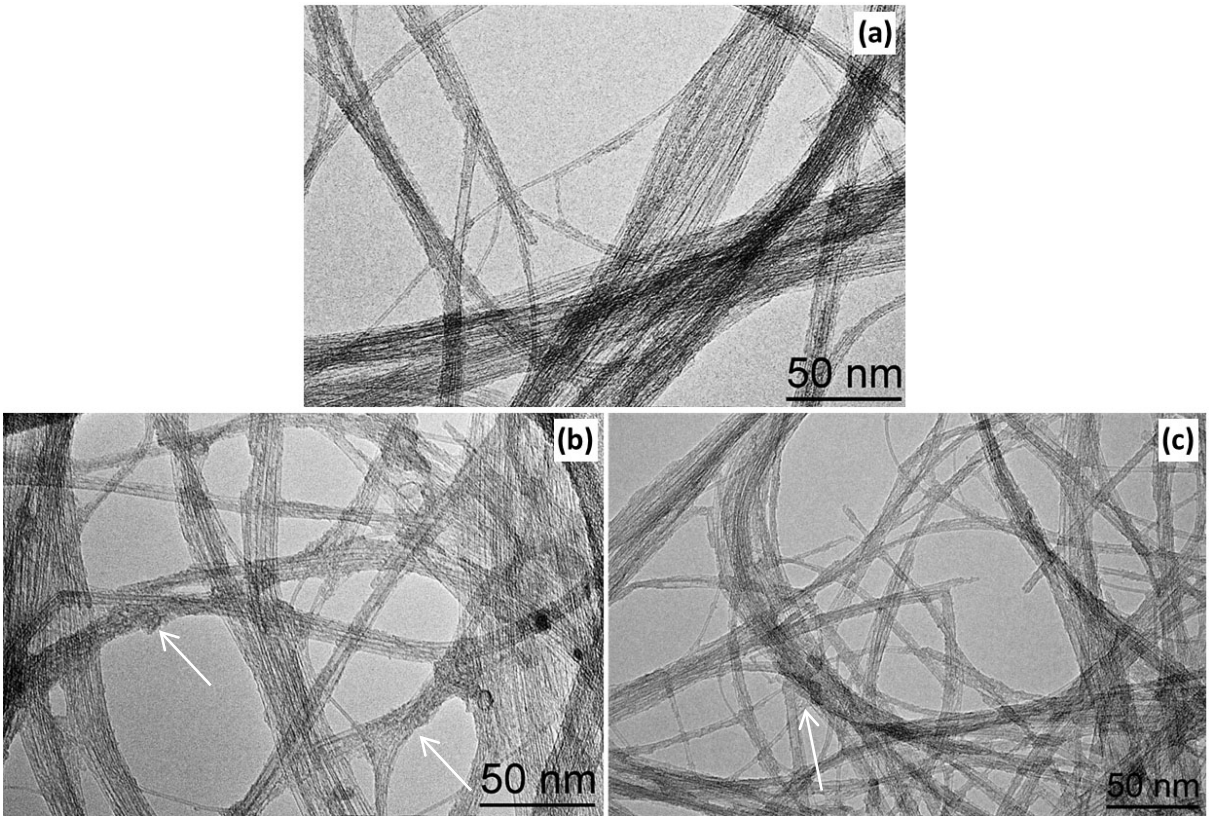



*Figure 4.36 : Images MET des (a) DWNTs−COOH, (b) DWNTs−NH−Fluo et (c) DWNTs−COOH@FITC, avec mise en évidence de dépôts organiques désorganisés (flèches blanches).*

### *C.II.2.b. Comparaison par spectroscopie IR*

Les DWNTs−COOH@FITC ont donc par la suite été caractérisés, sous forme de pastille de KBr, par spectroscopie IR. Dans la partie B.II.2, une bande très intense à 2037 $cm^{-1}$, correspondant à l'élongation de la fonction isothiocyanate –N=C=S, avait pu être identifiée au niveau du spectre du FITC (**Figure 4.11. a**). Cependant, cette bande avait disparu au niveau des DWNT−NH−Fluo, au profit de l'apparition d'un massif de bandes entre 1630 et 1750 $cm^{-1}$ correspondant à des élongations de liaisons C=O et HN−(C=S) –NH (**Figure 4.37. a**).

Le spectre enregistré pour dans le cas des DWNTs−COOH@FITC (**Figure 4.37. b**) est quasiment identique à celui des DWNTs−NH−Fluo : toutes les bandes caractéristiques des DWNTs y sont présentes ainsi que le massif entre 1630 et 1750 $cm^{-1}$ ; et la bande correspondant à l'élongation de la liaison –N=C=S en est également absente. Une explication possible serait qu'une quantité suffisante de FITC a bien été adsorbée sur les DWNTs−COOH pour être détectée par spectroscopie IR (massif de bandes), mais que la molécule n'existe plus sous sa forme FITC (perte de la fonction isothiocyanate). Le FITC étant instable en milieu aqueux, la fonction –N=C=S très réactive a pu réagir avec une molécule d'eau pour former un thiocarbamate, qui correspondrait à la molécule détectée par IR.

La spectroscopie IR a donc permis de mettre en évidence l'existence d'une fonctionnalisation sur les DWNTs−COOH@FITC, par la présence de bandes communes au FITC et aux DWNTs−NH−Fluo. Cependant, la molécule adsorbée serait probablement une forme dégradée du FITC, hypothèse déjà évoquée après les analyses par spectroscopie IR et par UPLC des échantillons de DWNTs−NH−Fluo. Cette technique d'analyse ne semble donc pas la plus appropriée pour différencier les fonctionnalisations covalente et non-covalente.

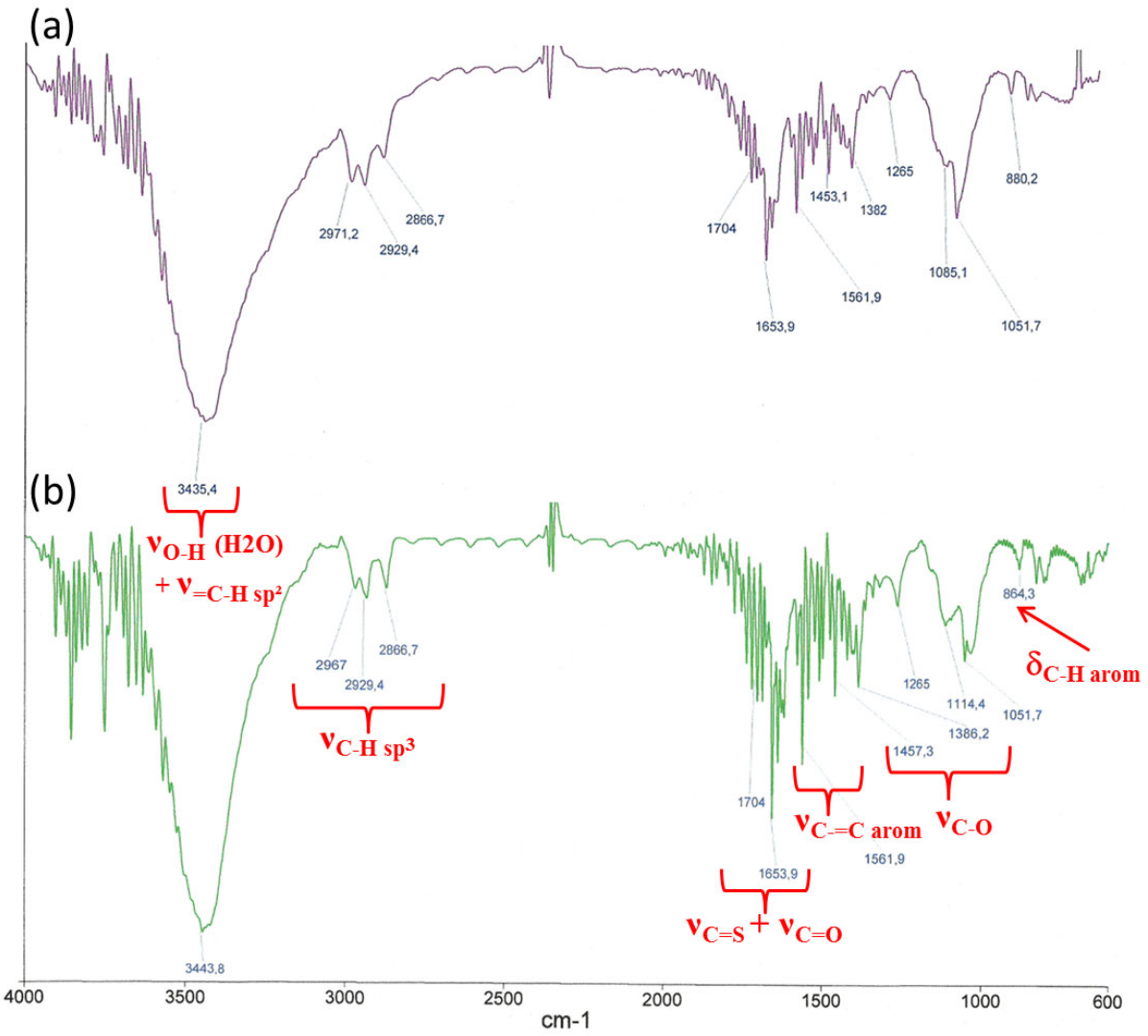



*Figure 4.37 : Spectres IR des (a) DWNTs−NH−Fluo et (b) DWNTs−COOH@FITC.*

### *C.II.2.c. Analyse par spectroscopie Raman*

Les DWNT−COOH@FITC ont par la suite été analysés par spectroscopie Raman (Laboratoire Charles Coulomb, Montpellier), à une longueur d'onde de $\lambda$ = 457 nm, dans les mêmes conditions expérimentales que celles utilisées pour la caractérisation des DWNTs fonctionnalisés de façon covalente (partie B.II.3).

La **Figure 4.38** représente les spectres Raman des échantillons de DWNTs qui avaient déjà été interprétés ainsi que celui des DWNTs−COOH@FITC. Il est possible de constater que toutes les bandes caractéristiques de la fluorescéine et du FITC sont également présentes au niveau des DWNTs−COOH@FITC, confirmant bien la fixation du fluorophore sur les DWNTs.

En outre, comme pour les DWNTs−NH−Fluo, ces mêmes bandes sont plutôt alignées sur celles de la fluorescéine et non du FITC (un léger décalage des bandes existant entre les deux molécules), ce qui signifie que le fluorophore est plutôt présent sous la forme de fluorescéine que de FITC. Le FITC aurait donc été transformé en un composé dont la structure se rapprocherait de celle de la fluorescéine.

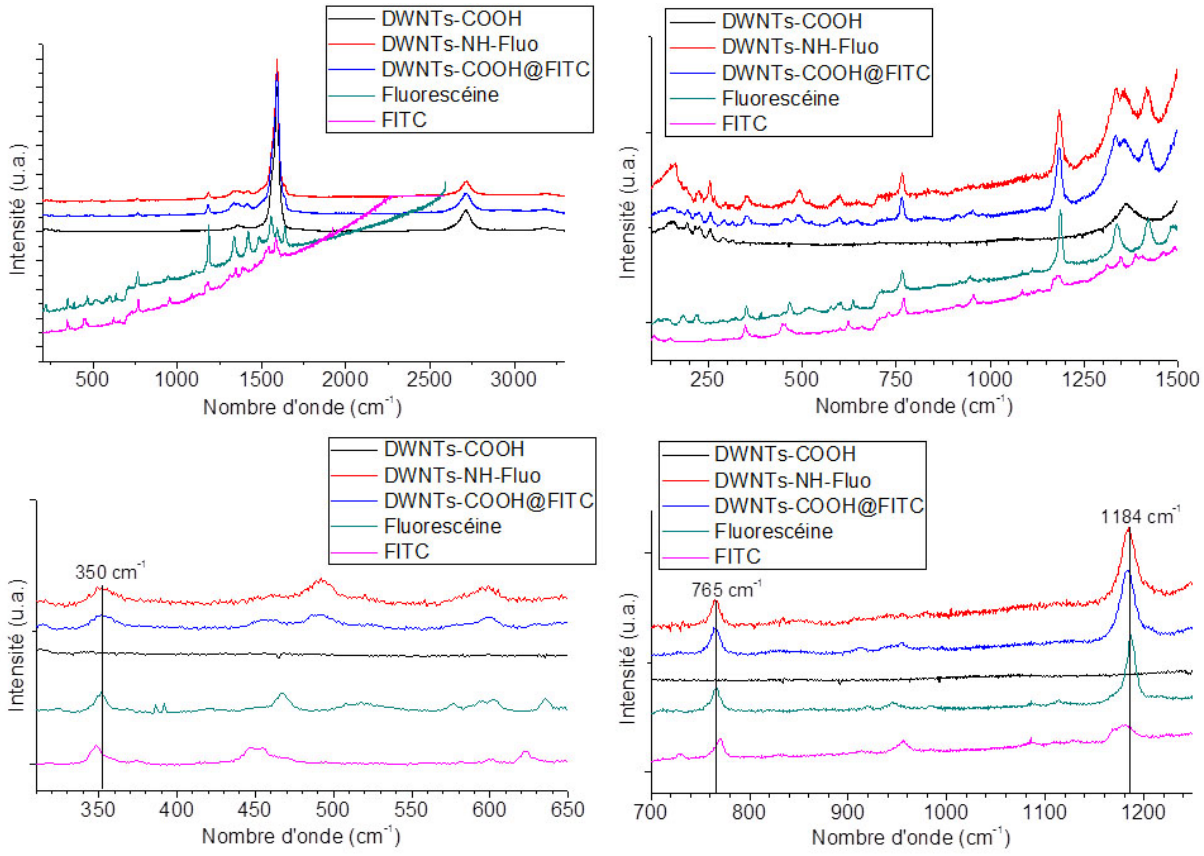



*Figure 4.38 : Spectres Raman des DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo, DWNTs–COOH@FITC, de la fluorescéine et du FITC.*

Quant aux bandes D, G et G' des DWNTs−COOH@FITC (**Figure 4.39**), celles-ci n'ont subi aucune modification, ni en intensité ni en nombre d'onde. Cela confirme bien que la fonctionnalisation non-covalente n'a pas d'influence sur la structure des DWNTs, et donc sur la réponse de leurs bandes caractéristiques.

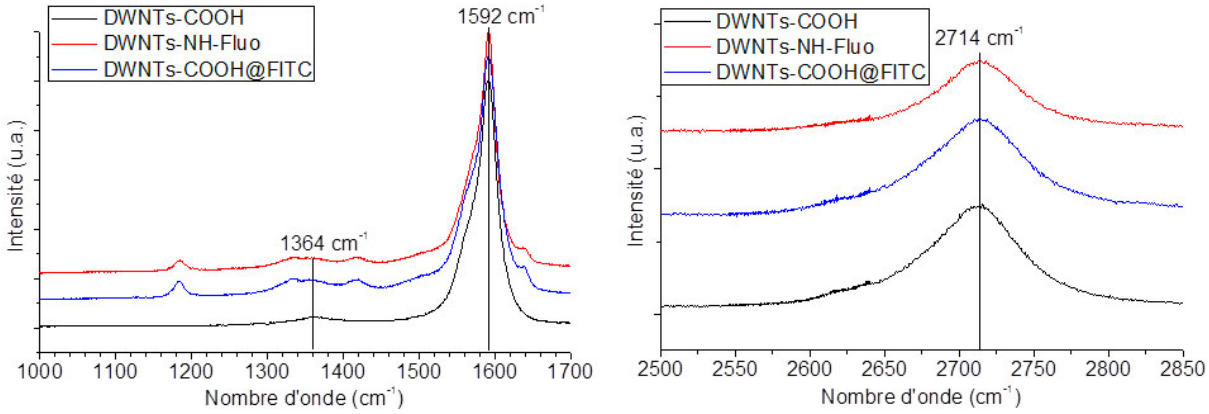



*Figure 4.39 : Spectres Raman des DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–COOH@FITC, focalisés sur les bandes D, G et G'.*

La fonctionnalisation par le fluorophore a donc bien été mise en évidence sur les DWNTs−COOH@FITC, et une fois encore les analyses ont montré que la molécule finalement greffée sur les DWNTs n'était pas du FITC mais une molécule proche de la fluorescéine. D'autre part, tout comme la spectroscopie IR, cette technique d'analyse n'est pas efficace pour différencier les fonctionnalisations covalente et non-covalente.

### *C.II.2.d. Analyse par spectrophotométrie d'absorption UV-Vis-IR*

Les DWNTs−COOH@FITC ont ensuite été analysés (Laboratoire Charles Coulomb, Montpellier) sous forme de suspension par spectroscopie UV-Vis-IR selon les mêmes conditions déjà utilisées (chapitre 2, partie E.I.3). La **Figure 4.40** est une photo des suspensions analysées des différents DWNTs, avant et après fonctionnalisation (covalente ou non-covalente) par le FITC.

Comme déjà vu précédemment, la suspension de DWNTs−COOH est vraiment sombre alors que celle de DWNTs−NH−Fluo est teintée jaune-vert, révélant ainsi une dispersion des DWNTs plus difficile après ajout de fluorophores par fonctionnalisation covalente. En revanche, l'adsorption du FITC sur les DWNTs−COOH ne semble pas avoir modifié leur comportement puisqu'une suspension aussi sombre est obtenue. Donc, deux explications s'offrent à nous, l'une n'excluant pas l'autre : d'une part, le nombre de molécules de FITC adsorbées est peut-être tellement faible que celles-ci n'influencent pas l'état de dispersion des DWNTs ; d'autre part, l'adsorption des molécules de FITC n'a pas

d'incidence sur la quantité de fonctions –COOH/$COO^-$ disponibles sur les parois des DWNTs, ce qui n'est pas le cas par fonctionnalisation covalente. De ce fait, les DWNTs−COOH et DWNT−COOH@FITC seraient bien plus hydrophiles que les DWNTs−NH−Fluo.

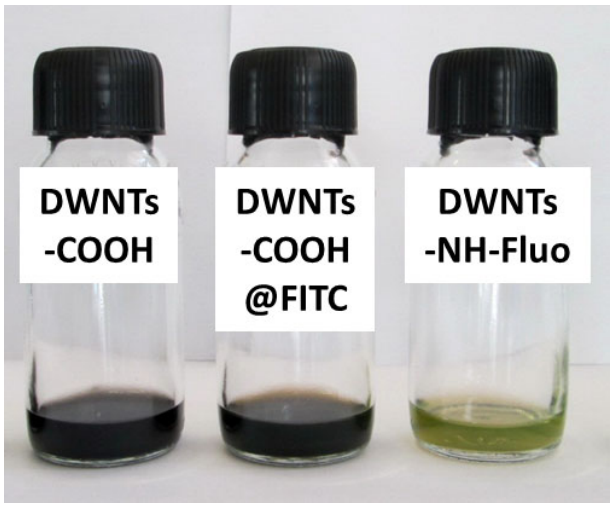



*Figure 4.40 : Photo des surnageants obtenus après centrifugation des suspensions de DWNTs–COOH, DWNTs−COOH@FITC et DWNTs–NH–Fluo.*

Les spectres d'absorbance des DWNTs–COOH, des DWNTs–NH–Fluo et des DWNTs−COOH@FITC, enregistrés entre 250 et 2000 nm et normalisés par rapport à la bande à 263 nm, sont présentés sur la **Figure 4.41 (a)**. La bande située à 492 nm, correspondant à l'absorption du FITC ou de la fluorescéine, est visible aux niveaux des DWNTs–NH–Fluo et des DWNTs–COOH@FITC (**Figures 4.41. a-b**), révélant bien la présence du fluorophore, qu'il soit greffé de façon covalente ou non-covalente. De plus, les bandes d'absorption des deux types de DWNTs fonctionnalisés sont alignés sur celle du FITC libre, ce qui signifie que la longueur d'onde d'excitation du fluorophore n'est pas influencée qu'il soit sous sa forme libre ou greffée. Enfin, l'absorbance mesurée à 492 nm est d'intensité plus faible dans le cas des DWNTs–COOH@FITC que dans celui des DWNTs–NH–Fluo, ce qui pourrait indiquer qu'une quantité plus faible de FITC se soit fixée sur les DWNTs–COOH@FITC.

En conclusion, la spectroscopie UV-Vis-IR permet de détecter si oui ou non un fluorophore, dans ce cas le FITC, s'est fixé sur les DWNTs, mais le type de fonctionnalisation mis en jeu ne peut être identifié par cette technique.

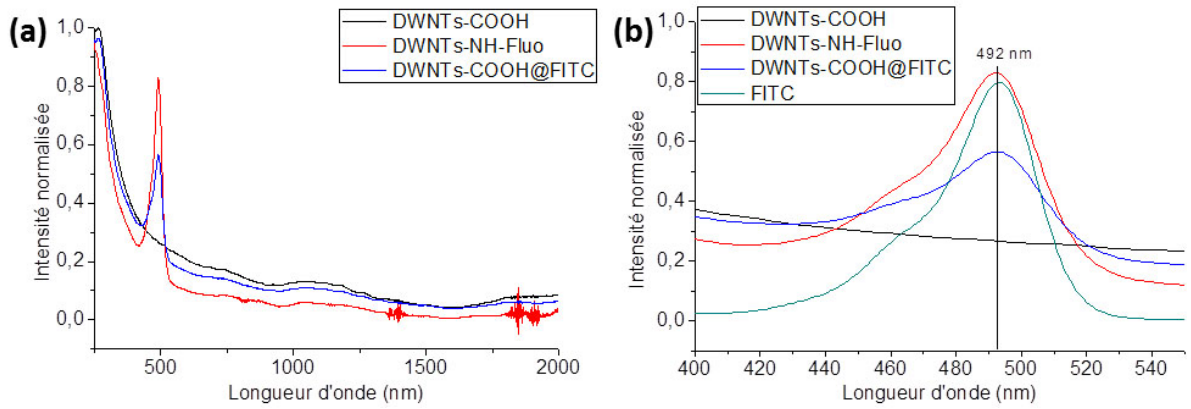



*Figure 4.41 : Graphiques représentant en (a) les spectres normalisés par rapport à la bande à 263 nm des DWNTs–COOH, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–COOH@FITC, et en (b) un zoom sur la bande d'absorption principale de la fluorescéine au niveau des spectres des DWNTs–COOH, des DWNTs–NH–Fluo, DWNTs−COOH@FITC et du FITC.*

### *C.II.2.e. Analyse par spectroscopie de photoluminescence*

A l'instar de ce qui a été vu dans la partie B.II.5, les suspensions utilisées pour la spectroscopie UV-Vis-IR ont été réemployées pour les mesures par spectroscopie de photoluminescence (Laboratoire Charles Coulomb, Montpellier).

En comparant les cartes d'excitation de la photoluminescence enregistrées pour les DWNTs–COOH (**Figures 4.42. a**), les DWNTs–NH–Fluo (**Figures 4.42. b**) et les DWNTs−COOH@FITC (**Figures 4.42. c**), nous observons que les cartes obtenues pour les DWNTs–COOH, avant et après fonctionnalisation non-covalente, sont identiques. Aucune fonctionnalisation par adsorption n'est donc mise en évidence à partir de ces cartes.

Sur la **Figure 4.43** sont présentées les cartes d'excitation de photoluminescence des DWNTs fonctionnalisés par le FITC de façons covalente et non-covalente, mais cette fois-ci au niveau de la zone d'émission du FITC. Dans les deux cas, un signal de photoluminescence ($\lambda_{exc}$ = 495 nm ; $\lambda_{ém}$ = 525 nm) est bien présent, ce qui montre bien que ces DWNTs contiennent du FITC.

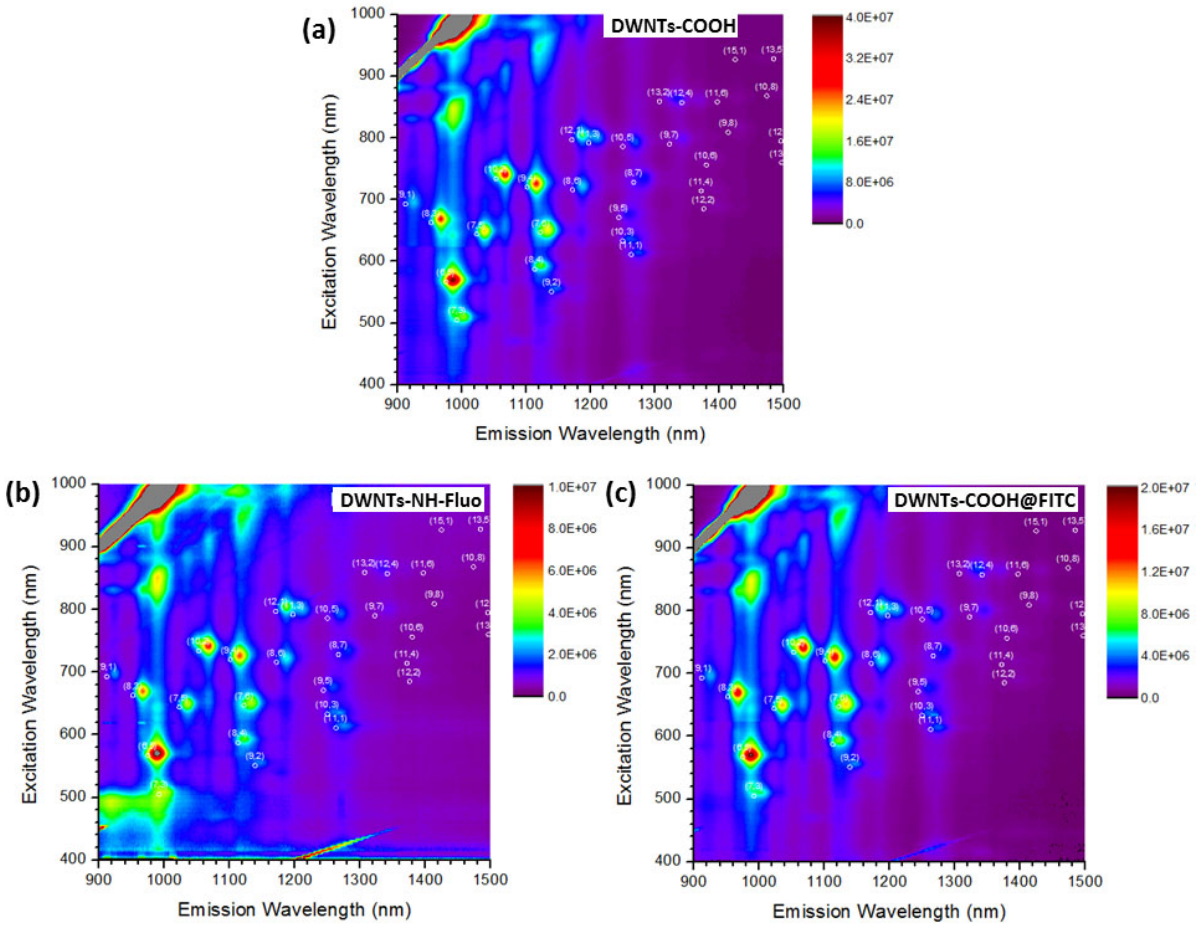



*Figure 4.42: Cartes d'excitation de la photoluminescence des (a) DWNTs–COOH, (b) DWNTs–NH–Fluo et (c) DWNTs–COOH@FITC.*

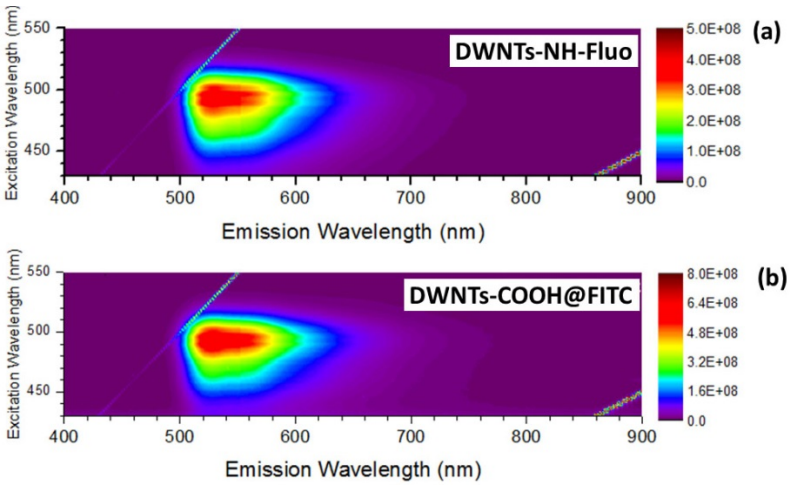



*Figure 4.43 : Grossissement des cartes d'excitation de la photoluminescence des (a) DWNTs–NH–Fluo et (b) DWNTs–COOH@FITC.*

En se focalisant à $\lambda_{ém}$ = 920 nm (**Figure 4.44**), longueur d'onde à laquelle un signal de photoluminescence caractéristique du FITC ($\lambda_{exc}$ = 493 nm) a été observé sur la suspension de DWNTs–NH–Fluo, une bande est également visible sur l'échantillon de DWNTs−COOH@FITC mais d'intensité vraiment très faible, raison pour laquelle le signal n'était pas visible sur la carte d'excitation (**Figure 4.42. c**).

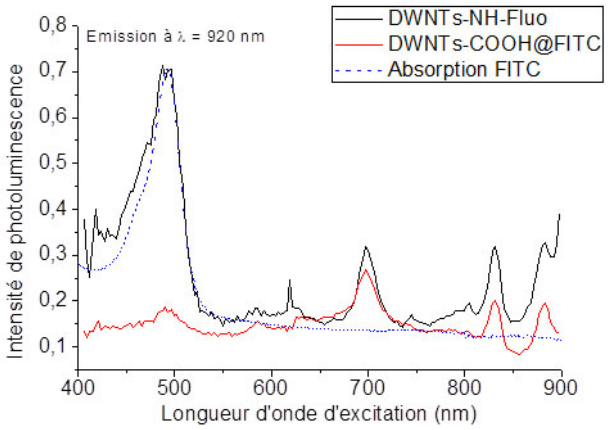



*Figure 4.44 : Graphiques représentant en les spectres d'excitation des DWNTs–NH–Fluo et des DWNTs–COOH@FITC à une longueur d'onde d'émission de 920 nm.*

Sur la **Figure 4.45**, sont présentés les spectres d'émission du FITC, de la fluorescéine, des DWNTs–NH–Fluo et des DWNTs–COOH@Fluo, à une longueur d'onde d'excitation de 493 nm. La bande caractéristique du fluorophore à $\lambda_{ém}$ = 525 nm est bien visible sur les quatre spectres (**Figure 4.45. a**), confirmant bien la présence de la molécule fluorescente au niveau des DWNTs fonctionnalisés. En revanche, l'intensité de la bande est 4 fois plus faible dans le cas des DWNTs–COOH@FITC que dans celui des DWNTs–NH–Fluo, donc il y aurait 4 fois moins de FITC adsorbé que greffé de façon covalente. Après normalisation des spectres par rapport à la bande à 525 nm, ceux-ci ont été comparés sur la gamme d'émission comprise entre 900 et 1500 nm (**Figure 4.45. b**).

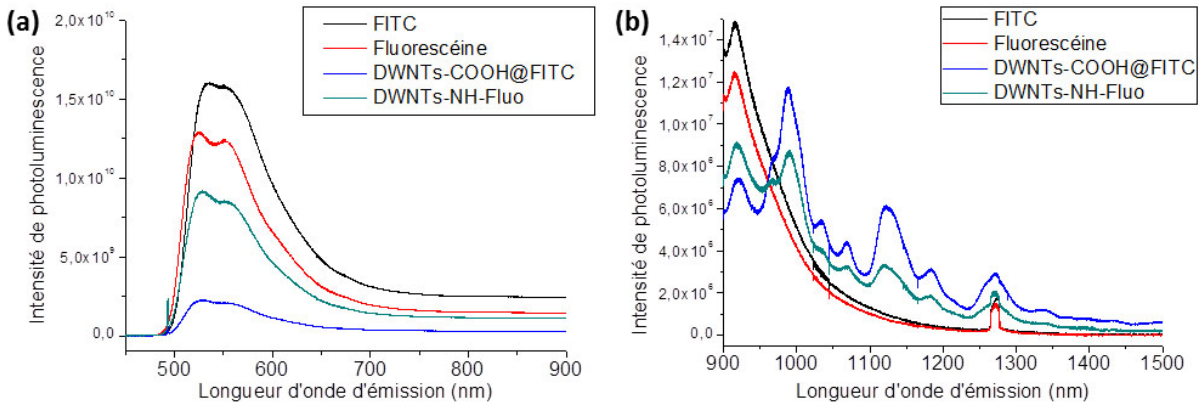



*Figure 4.45 : Graphiques représentant les spectres d'émission des DWNTs–NH–Fluo, des DWNTs–COOH@FITC, de la fluorescéine et du FITC à une longueur d'onde d'excitation de 493 nm, (a) entre 450 et 900 nm et (b) entre 900 et 1500 nm (normalisés par rapport à la bande à 525 nm).*

Dans la partie B.II.5, il avait été établi que la bande à 920 nm était propre au fluorophore, qu'il soit sous sa forme de fluorescéine ou de FITC, et cette bande est présente sur les spectres des DWNTs fonctionnalisés. La bande à 990 nm est également visible au niveau des deux types de DWNTs fonctionnalisés par le FITC. Cette bande n'existant pas lorsque la fluorescéine ou le FITC est libre, il avait été émis l'hypothèse que cette bande était probablement la conséquence d'un transfert d'énergie du fluorophore vers les DWNTs. Etant donné que l'intensité du signal est plus intense à cette longueur d'onde pour les DWNTs–COOH@FITC que pour les DWNTs–NH–Fluo, cela appuie notre hypothèse puisque, si transfert d'énergie il y a, celui-ci sera plus facile si les molécules donneuses sont adsorbées.

Ainsi la spectroscopie de photoluminescence a mis en évidence la présence du FITC sur les DWNTs–COOH@FITC et les DWNTs–NH–Fluo, a montré que la quantité de FITC adsorbé serait bien inférieure à celle fixée de façon covalente et qu'un transfert d'énergie, plus ou moins important en fonction du type de fonctionnalisation, aurait lieu du fluorophore vers les DWNTs.

### C.II.3. Analyse quantitative

Après avoir montré par différentes techniques d'analyse (spectroscopies IR, Raman, UV-Vis-NIR, de photoluminescence) que les DWNTs–NH–Fluo et les DWNTs–COOH@FITC contenaient du FITC, une étude un peu plus poussée a par la suite été mise en œuvre afin de quantifier ce qui avait pu se fixer sur les DWNTs.

#### *C.II.3.a. Comparaison basée sur les résultats de microanalyse élémentaire*

La molécule fluorescente fixée par liaison covalente ou non-covalente étant le FITC, un dosage du greffage a pu être effectué en déterminant la teneur en soufre des échantillons de DWNTs fonctionnalisés par microanalyse élémentaire. La quantité de FITC fixé sur les DWNTs a été calculée selon le même raisonnement décrit en B.III.1. et le taux de greffage par rapport à la quantité de FITC initialement introduite ($1{,}11.10^3$ µmol/g DWNTs). Les résultats ont été regroupés dans le **Tableau 4.10**.

*Tableau 4.10 : Comparaison du greffage du FITC par microanalyse élémentaire du soufre sur les DWNTs−NH−Fluo et les DWNTs−COOH@FITC.*

| Echantillons analysés | Teneur en S (%) | Qté de FITC greffé (µmol/g DWNTs) | % greffage |
|---|---|---|---|
| **DWNTs–NH–Fluo (Tampon)** | 1,79 ± 0,30 | 560 ± 90 | 51 |
| **DWNTs–COOH@FITC (Tampon)** | 1,67 ± 0,30 | 520 ± 90 | 47 |

Il en résulte que le nombre de molécules de FITC adsorbées sur les DWNTs–COOH@FITC serait équivalent au nombre de molécules fixées sur les DWNTs–NH–Fluo, c'est-à-dire qu'il n'y aurait quasiment pas de fluorophores greffés de façon covalente. Ce résultat est complètement aberrant étant donné que le test de Kaiser avait montré un greffage covalent du FITC égal à 260 µmol/g DWNTs (partie B.III.2) et que les taux d'adsorption du FITC sur différents DWNTs étaient inférieurs à 10% (partie C.I.3.d). La microanalyse élémentaire ayant été réalisée sur un seul échantillon de DWNTs–COOH@FITC, il se pourrait qu'il y ait eu une erreur au cours de l'analyse ou que la fraction d'échantillon de DWNTs fonctionnalisés soit particulièrement riche en FITC et non représentative de l'échantillon dans sa globalité.

### *C.II.3.b. Comparaison par ATG*

Le FITC, le 1,4-diaminobutane et les échantillons de DWNTs, avant et après fonctionnalisation par le FITC, ont été analysés par ATG suivant les mêmes conditions décrites dans la partie E.III.1 du Chapitre 2. Les courbes thermogravimétriques enregistrées sont représentées sur la **Figure 4.46**.

Les courbes thermogravimétriques des DWNTs–COOH@FITC (**Figure 4.46. d**) et des DWNTs−NH–Fluo (**Figure 4.46. e**) montrent quant à elles une légère diminution de la masse qui correspondrait à la première perte de masse du FITC. En relevant les %TG avant (DWNTs–COOH, **Figure 4.46. b** ; DWNTs–$NH_2$, **Figure 4.46. c**) et après (DWNTs–COOH@FITC, **Figure 4.46. d** ; DWNTs–NH–Fluo, **Figure 4.46. e**) fonctionnalisation par le FITC, il est possible de remonter à la quantité globale de FITC greffé (calcul déjà décrit en C.I.3.b). Le taux de greffage est déterminé par rapport à la quantité de FITC initialement introduite pour la fonctionnalisation ($1{,}11.10^3$ µmol/g DWNTs). Les résultats ainsi calculés sont présentés dans le **Tableau 4.11**.

*Tableau 4.11 : Comparaison par ATG du greffage covalent et non-covalent du FITC sur les DWNTs.*

| Echantillons analysés | Perte de masse à 180°C (%) | Perte de masse liée aux DWNTs seuls à 180°C (%) | Qté de FITC greffé (µmol/g DWNTs) | % greffage |
|---|---|---|---|---|
| **FITC** | 12,00 | - | - | - |
| **DWNTs–NH–Fluo (Tampon)** | 6,71 | 4,67 | 436 | 39 |
| **DWNTs–COOH@FITC** | 5,33 | 4,90 | 92 | 8 |

Pour les DWNTs fonctionnalisés de façon covalente par le FITC (DWNTs–NH–Fluo), la quantité de molécules greffées, égale à 436 µmol/g DWNTs, est quasiment équivalente à celle déterminée par microanalyse élémentaire (560 ± 90, partie B.III.1).

Pour les DWNTs–COOH@FITC, seulement 92 µmol/g DWNTs de FITC se sont adsorbées, soit un taux d'adsorption de 8%. Ce résultat concorde tout à fait aux estimations précédemment obtenues par microanalyse élémentaire de l'adsorption du FITC sur différents types de DWNTs (partie C.I.3.d) qui étaient toutes inférieures à 10% d'adsorption.

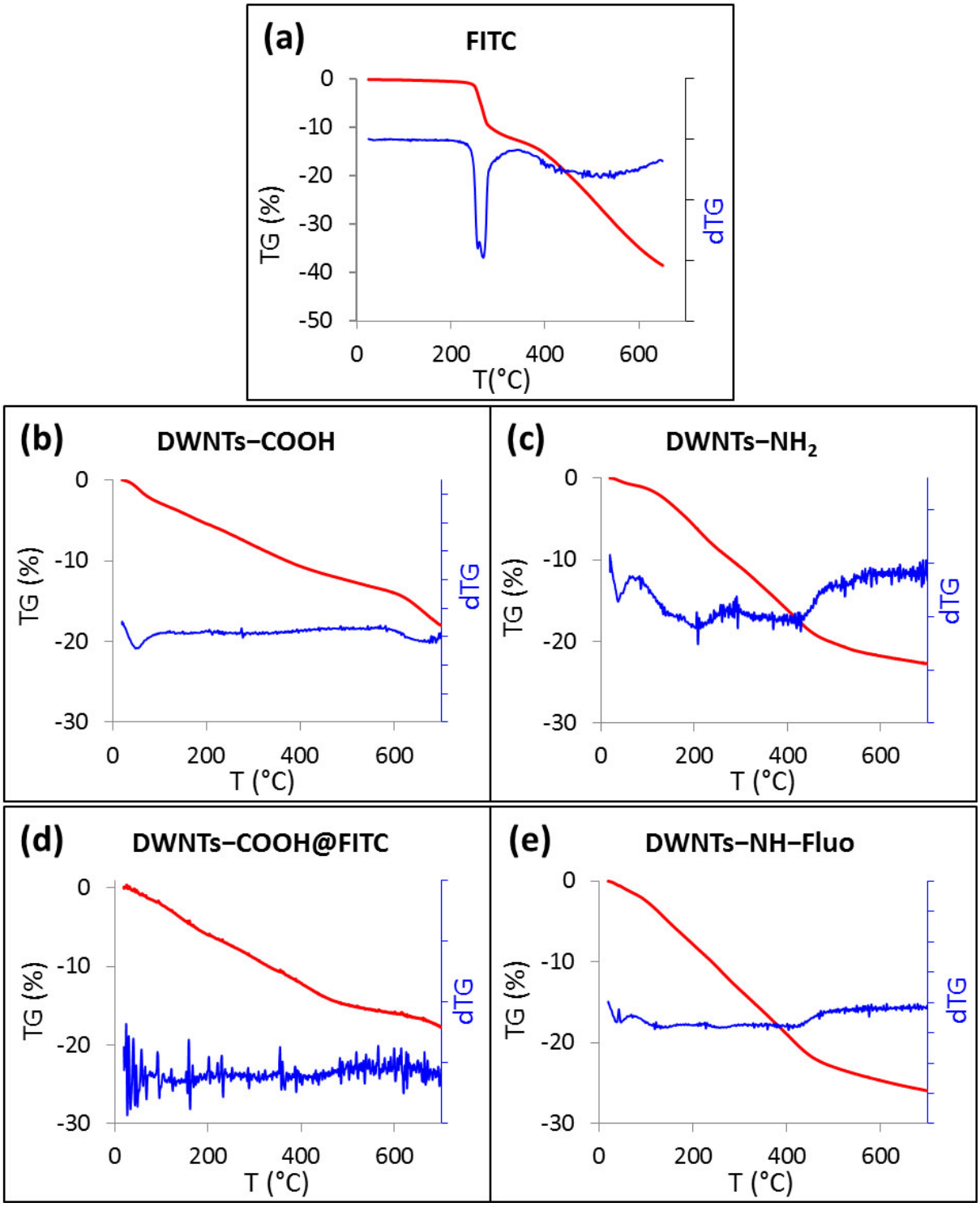



*Figure 4.46 : Courbes thermogravimétriques (rouge) et dérivées premières (bleu) (a) du FITC, (b) des DWNTs–COOH, (c) des DWNTs–$NH_2$, (d) des DWNTs–COOH@FITC et (e) des DWNTs–NH–Fluo.*

Bien qu'il soit difficile de donner une incertitude sur les taux de greffage déterminés à partir des courbes thermogravimétriques, essentiellement à cause de la première perte de masse liée au FITC qui n'est pas très nette, il est possible de donner des estimations des greffages covalent et non-covalent. Ces valeurs sont d'ailleurs proches de ce qui avait pu être calculé auparavant par microanalyse élémentaire, l'une des méthodes de quantification apparaissant comme des plus fiables et reproductibles. Ainsi, il apparaitrait que sur des DWNTs–NH–Fluo, environ 1/5$^{ème}$ des molécules de FITC présentes seraient adsorbées sur les parois des DWNTs, et ce malgré les lavages abondants effectués.

D'autre part, La quantification par UPLC du FITC contenu dans ces mêmes échantillons de DWNTs−NH−Fluo et des DWNTs–COOH@FITC n'a pas été possible, le FITC se dégradant en solution aqueuse.

Des analyses par diffusion des neutrons sont envisageables afin de différencier les DWNTs−NH–Fluo des DWNTs–COOH@FITC. En effet, si les vibrations associées aux DWNTs fonctionnalisés et/ou les modifications du spectre de la molécule fixée sont identifiées, alors il sera possible de savoir quel(s) type(s) de greffage est (sont) présent(s) et dans quelles quantités à partir des fréquences et des intensités des signaux. Ainsi, ces études par diffusion des neutrons font l'objet d'une thèse qui a tout récemment débuté dans notre équipe, en collaboration avec l'ILL (*T. Lorne, Understanding the grafting of fluorophore molecules on carbon nanotubes, Directeurs de thèse : E. Flahaut, M. Jimenez-Ruiz, S. Rols*).

## C.III. Adsorption d'un dérivé du cholestérol : le 25-Hydroxycholestérol

Une collaboration avec l'équipe de Marc Poirot et Sandrine Silvente-Poirot du Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, travaillant sur le métabolisme des stérols et l'innovation thérapeutique en oncologie, nous a amené à nous intéresser à l'adsorption d'un dérivé lipidique, le 25-hydroxycholestérol (25-HC) (**Figure 4.47**) sur les DWNTs.

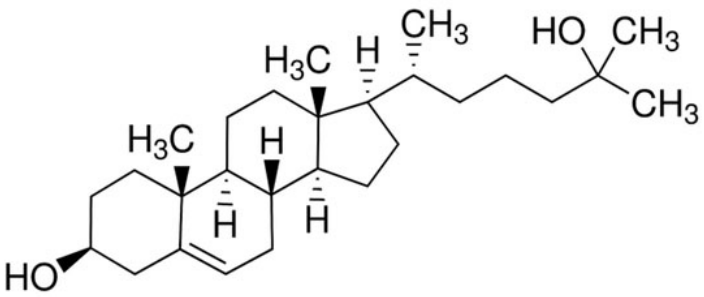



*Figure 4.47 : Représentation du 25-hydroxycholestérol (25-HC).*

En effet, le 25-HC est un oxystérol, l'un des moins cytotoxiques, provenant du cholestérol alimentaire qui a été converti par l'enzyme cholestérol-25-hydroxylase dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi des cellules **[26]**. Il est produit dans les tissus des mammifères et détectable dans le plasma après un régime riche en cholestérol alimentaire **[27]**. Le 25-HC, comme d'autres oxystérols, est impliqué dans de nombreuses étapes du métabolisme des lipides, notamment au niveau de l'homéostasie du cholestérol en modulant l'activité des facteurs de transcription afin de limiter l'accumulation excessive de cholestérol. Le 25-HC est un inhibiteur de l'enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase et donc inhibe la biosynthèse du cholestérol **[28]**.

Le 25-HC possède également des capacités immunorégulatrices en tant que ligand de faible affinité du LXR (Liver X Receptor), qui est un récepteur nucléaire, présent dans tous les tissus **[27,29]**. Cette molécule possède également des propriétés antivirales à large spectre (démontrées chez la souris pour le VIH, Ebola) puisqu'elle conduit au blocage de la fusion de la membrane entre la cellule et le virus **[30]**.

Le 25-HC serait aussi un ligand du récepteur à œstrogènes (RE). Les RE sont des récepteurs nucléaires appartenant à la classe des facteurs de transcription inductibles par un

ligand. Environ 70% des cancers du sein chez la femme impliquent l'expression du RE, donc sont sensibles à la présence d'œstrogènes : ce sont les cancers du sein hormono-dépendants **[31]**. Le 25-HC, en se fixant au RE, induirait des changements au niveau de l'expression de certains gènes et de la croissance des cellules de cancer du sein et des ovaires **[32]**.

Cependant, l'absorption de cette molécule par les cellules du cancer du sein reste encore faible (1% des molécules rentre naturellement dans les cellules) et l'utilisation de DWNTs fonctionnalisés comme vecteur permettrait à la fois d'augmenter la pénétration du 25-HC dans les cellules afin de mieux définir son action proliférative ou anti-proliférative au niveau des tumeurs. La capacité de deux types de surfaces de DWNTs (bruts et DWNTs−COOH) à adsorber le 25-HC a ainsi été étudiée en menant deux expériences consistant à mettre les DWNTs en contact avec le 25-HC, puis à les laver suivant une série de cycles de centrifugation/récupération du surnageant/lavage (Chapitre 2, partie C.II.4). Dans un premier temps, l'utilisation d'un dérivé radioactif tritié, le 25-HC-$^{3}$H ou 25-HC « chaud » (**Figure 4.48**), a permis une analyse des surnageants de lavage et des culots contenant les DWNTs fonctionnalisés par mesure de la radioactivité (Chapitre 2, partie E.III.3), et ainsi de remonter à un taux d'adsorption du 25-HC. Dans un second temps, en reproduisant la même expérience en utilisant uniquement du 25-HC non-radioactif « froid », il a été possible d'analyser les surnageants de lavage par chromatographie liquide (UPLC) et ainsi comparer les résultats à ceux précédemment obtenus.

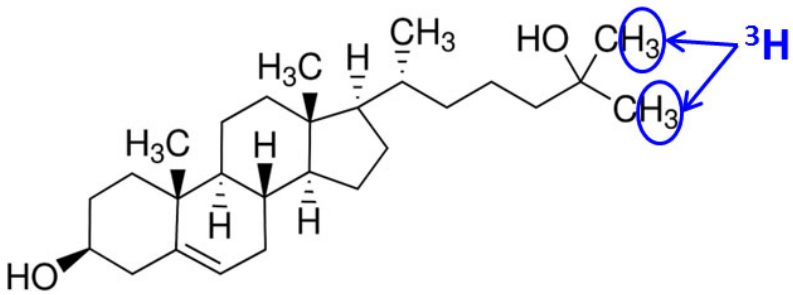



*Figure 4.48 : Représentation du 25-hydroxycholestérol tritié (25-HC-$^{3}$H).*

### C.III.1. Quantification indirecte du taux d'adsorption par mesure de la radioactivité par scintillation liquide

A des suspensions de DWNTs bruts et les DWNTs−COOH ont été ajoutés une quantité connue de 25-HC « froid » ainsi qu'une quantité précise de 25-HC-$^{3}$H selon le protocole décrit dans la partie C.II.4 du chapitre 2, afin d'obtenir au maximum un taux de couverture de 50%. Ce taux de couverture a été choisi en raison de la solubilité limitée du 25-HC dans l'EtOH absolu. Les milieux sont mis à agiter à température ambiante pendant 96h, puis des cycles de centrifugations et de lavages sont entrepris. Les surnageants de lavage et les culots de chaque échantillon (DWNTs bruts@25-HC-$^{3}$H et DWNTs−COOH@25-HC-$^{3}$H) sont alors récupérés afin d'en mesurer la radioactivité par scintillation liquide (Chapitre 2, partie E.III.3). La radioactivité mesurée est exprimée en désintégrations par minute (dpm), et elle peut être convertie en Curie sachant que 1 µCi = 2,2.10$^{6}$ dpm. Les résultats enregistrés ont été regroupés dans les **Tableaux 4.12 et 4.13**.

*Tableau 4.12 : Résultats obtenus par mesure de la radioactivité des surnageants et du culot des DWNTs bruts@25-HC-$^{3}$H.*

**DWNTs bruts@25-HC-$^{3}$H**

| Echantillons | Volume analysé | Radioactivité mesurée (dpm) | Volume initial (mL) | Radioactivité correspondante (dpm) | Radioactivité correspondante (µCi) |
|---|---|---|---|---|---|
| Surnageant 1 | 1 mL | 143110 | 9 | 858663 | 0,3903 |
| Surnageant 2 | 50 µL | 2705,7 | 2 | 108228 | 0,0492 |
| Surnageant 3 | 50 µL | 1222,5 | 2 | 48900 | 0,0222 |
| Surnageant 4 | 50 µL | 891 | 2 | 35640 | 0,0162 |
| Surnageant 5 | 50 µL | 591 | 2 | 23640 | 0,0107 |
| Surnageant 6 | 50 µL | 508,5 | 2 | 20340 | 0,0092 |
| Culot de DWNTs | - | 0 | - | 0 | 0 |
| | | | | | Total = 0,4979 |

*Tableau 4.13 : Résultats obtenus par mesure de la radioactivité des surnageants et du culot des DWNTs–COOH@25-HC-$^{3}$H.*

**DWNTs–COOH@25-HC-$^{3}$H**

| Echantillons | Volume analysé | Radioactivité mesurée (dpm) | Volume initial (mL) | Radioactivité correspondante (dpm) | Radioactivité correspondante (µCi) |
|---|---|---|---|---|---|
| Surnageant 1 | 1 mL | 191759 | 9 | 1150557 | 0,5230 |
| Surnageant 2 | 50 µL | 2147 | 2 | 85880 | 0,0390 |
| Surnageant 3 | 50 µL | 813 | 2 | 32520 | 0,0148 |
| Surnageant 4 | 50 µL | 417,5 | 2 | 16700 | 0,0076 |
| Surnageant 5 | 50 µL | 329 | 2 | 13160 | 0,0060 |
| Surnageant 6 | 50 µL | 222,5 | 2 | 8900 | 0,0040 |
| Culot de DWNTs | - | 0 | - | 0 | 0 |
| | | | | | Total = 0,5944 |

Les radioactivités mesurées sur les culots des deux échantillons sont égales à zéro, ce qui est anormal. Il faut noter qu'à l'état naturel, la radioactivité n'est jamais nulle et tourne autour de 20 dpm. Donc les DWNTs empêchent très probablement le transfert de l'énergie des molécules de solvant au soluté scintillant et aucun signal n'est ainsi détecté.

La radioactivité totale calculée à partir de la radioactivité relevée dans chacun des surnageants et de la radioactivité initialement introduite permet de déterminer le taux d'adsorption du 25-HC-$^{3}$H :

Pour les DWNTs bruts@25-HC-$^{3}$H : $\% \, élimination = \frac{0{,}4979}{1{,}5} \times 100 = 33$

$\% \, adsorption = 100 - 58 = 67$

Pour les DWNTs–COOH@25-HC-$^{3}$H : $\% \, élimination = \frac{0{,}5944}{1{,}5} \times 100 = 40$

$\% \, adsorption = 100 - 40 = 60$

En supposant que l'affinité du 25-HC est la même que celle du 25-HC-$^{3}$H vis-à-vis de la surface des DWNTs, les taux d'adsorption calculés pour le 25-HC-$^{3}$H peuvent être transposés au 25-HC. La même expérience a été reproduite une seconde fois et a permis de calculer des taux d'adsorption du 25-HC sur les DWNTs bruts et les DWNTs−COOH respectivement de 42 et 60 %. Le 25-HC étant plutôt hydrophobe, on peut s'attendre à une affinité plus forte pour les DWNTs bruts qui ont une surface plus hydrophobe que celle des DWNTs oxydés DWNTs−COOH. Ces résultats montrent cependant, qu'aux erreurs expérimentales près, les taux d'adsorption obtenus sont quasiment identiques quels que soient les DWNTs utilisés.

La mesure de la radioactivité par scintillation liquide permet donc de déterminer le taux d'adsorption de molécules radioactives sur des DWNTs, mais uniquement à partir de surnageants de lavage qui sont transparents et ne contiennent pas de DWNTs pouvant affaiblir le signal. Le taux d'adsorption du 25-HC est d'environ 60% par rapport à la quantité initialement introduite, quel que soit le type de DWNTs, ce qui représente un taux de couverture global de 30%.

### C.III.2. Quantification indirecte du taux d'adsorption par UPLC

Les mêmes expériences ont par la suite été réalisées à partir de 25-HC « froid » uniquement afin de soumettre les surnageants de lavage à une analyse par UPLC. Les conditions d'analyse par chromatographie liquide du 25-HC ont été établies à partir des travaux de Osada K *et al.* **[33]**. Sur la **Figure 4.49** est représenté le chromatogramme d'une solution de 25-HC dans l'EtOH absolu à $\lambda = 202$ nm sur lequel un seul pic d'élution correspondant au composé est clairement visible.

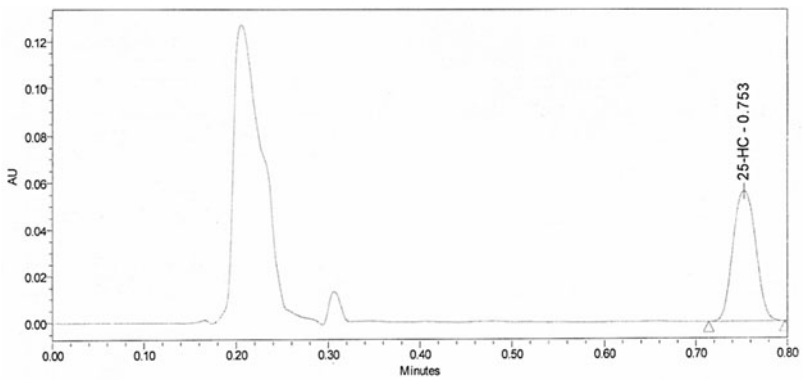



*Figure 4.49 : Chromatogramme caractéristique d'une solution de 25-HC dans l'EtOH absolu à $\lambda = 202$ nm.*

Une droite d'étalonnage a alors été tracée à partir des aires de pic relevées suite à l'analyse d'une gamme de solutions étalons à $\lambda = 202$ nm. La droite ainsi que son équation sont présentées sur la **Figure 4.50**.

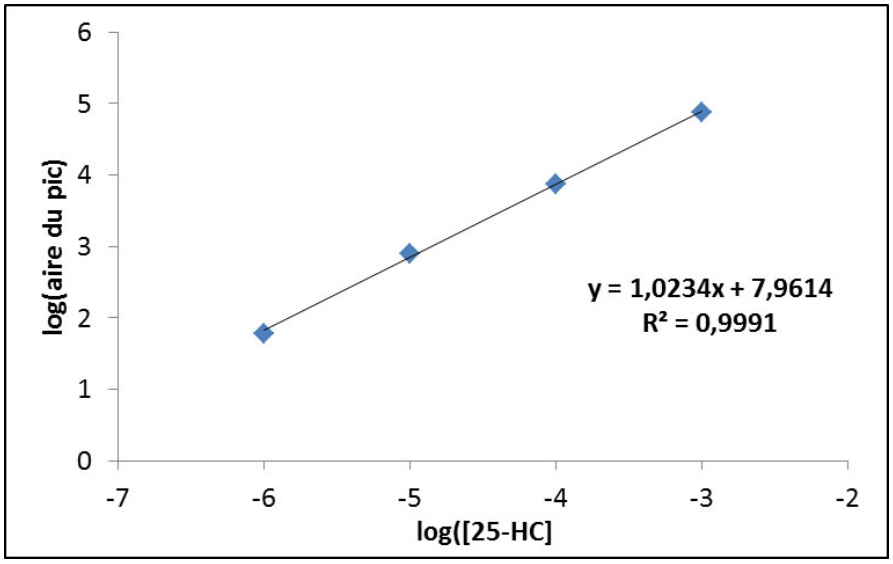



*Figure 4.50 : Droite d'étalonnage du 25-HC dans l'EtOH absolu à $\lambda$ = 202 nm.*

Les surnageants de lavage ont par la suite été analysés dans les conditions décrites dans la partie E.II.3 du chapitre2. Les résultats obtenus ont été regroupés dans les **Tableaux 4.14 et 4.15**.

*Tableau 4.14 : Résultats obtenus par analyse par UPLC des surnageants de lavage des DWNTs bruts@25-HC.*

**DWNTs bruts@25-HC**

| | Aire | [25-HC] (mol.L$^{-1}$) | $V_{EtOH}$ (mL) | $n_{25\text{-}HC}$ (mol) |
|---|---|---|---|---|
| ***Témoin*** | 1531640 | $1,84.10^{-2}$ | 5 | $9,19.10^{-5}$ |
| ***W1*** | 1193674 | $1,44.10^{-2}$ | 3 | $4,32.10^{-5}$ |
| ***W2*** | 579093 | $7,11.10^{-3}$ | 2 | $1,42.10^{-5}$ |
| ***W3*** | 374633 | $4,64.10^{-3}$ | 2 | $9,29.10^{-6}$ |
| ***W4*** | 219231 | $2,75.10^{-3}$ | 2 | $5,50.10^{-6}$ |
| ***W5*** | 145818 | $1,85.10^{-3}$ | 2 | $3,69.10^{-6}$ |
| ***W6*** | 96178 | $1,23.10^{-3}$ | 2 | $2,46.10^{-6}$ |

***$n_{25\text{-}HC}$ (initial) =*** $9,19.10^{-5}$ mol

***$n_{25\text{-}HC}$ (éliminé) =*** $7,84.10^{-5}$ mol

$n_{25\text{-}HC}$ (fixé) = $1,35.10^{-5}$ mol

*Tableau 4.15 : Résultats obtenus par analyse par UPLC des surnageants de lavage des DWNTs–COOH@25-HC.*

**DWNTs–COOH@25-HC**

| | Aire | [25-HC] (mol.L$^{-1}$) | $V_{EtOH}$ (mL) | $n_{25\text{-}HC}$ (mol) |
|---|---|---|---|---|
| ***Témoin*** | 1531640 | $1{,}84.10^{-2}$ | 5 | $9{,}19.10^{-5}$ |
| ***W1*** | 1505330 | $1{,}81.10^{-2}$ | 3 | $5{,}42.10^{-5}$ |
| ***W2*** | 751386 | $9{,}17.10^{-3}$ | 2 | $1{,}83.10^{-5}$ |
| ***W3*** | 382376 | $4{,}74.10^{-3}$ | 2 | $9{,}47.10^{-6}$ |
| ***W4*** | 193162 | $2{,}43.10^{-3}$ | 2 | $4{,}86.10^{-6}$ |
| ***W5*** | 104879 | $1{,}34.10^{-3}$ | 2 | $2{,}68.10^{-6}$ |
| ***W6*** | 61712 | $7{,}97.10^{-4}$ | 2 | $1{,}59.10^{-6}$ |

***$n_{25\text{-}HC}$ (initial) =*** $9{,}19.10^{-5}$ mol

***$n_{25\text{-}HC}$ (éliminé) =*** $9{,}12.10^{-5}$ mol

$n_{25\text{-}HC}$ (fixé) = $7{,}52.10^{-7}$ mol

Il est alors possible d'en déduire les taux d'adsorption du 25-HC sur les deux types de DWNTs en comparant la quantité adsorbée à la quantité initialement introduite (donnée par le témoin sans DWNTs) :

Pour les DWNTs bruts@25-HC : $\% \, adsorption = \frac{1{,}35.10^{-5}}{9{,}19.10^{-5}} \times 100 = 15$

Pour les DWNTs–COOH@25-HC : $\% \, adsorption = \frac{7{,}52.10^{-7}}{9{,}19.10^{-5}} \times 100 = 1$

Les taux d'adsorption obtenus sont largement inférieurs à ceux déterminés par mesure de la radioactivité par scintillation liquide, néanmoins un phénomène d'adsorption a pu être mis en évidence puisque 15% du 25-HC a pu se fixer sur les DWNTs bruts. Les précédentes quantifications par UPLC avaient montré que cette technique était loin d'être la plus précise du fait que le taux de greffage était déterminé de façon indirecte. Mais le fait que les surnageants aient été stockés pendant une longue période avant analyse par UPLC a probablement faussé les résultats : une partie de l'EtOH absolu a du s'évaporer, d'où une concentration en 25-HC plus importante que ce qu'elle devrait, donc une quantité de 25-HC éliminé surestimée et un taux d'adsorption sous-estimé. Les taux de greffage du 25-HC obtenus par les deux techniques d'analyse ne peuvent donc être comparés.

Ainsi, les mesures de radioactivité des surnageants de lavage ont montré que le 25-HC s'adsorbe relativement bien sur les DWNTs avec un taux de couverture de 30%, peu importe l'état de leur surface. Etant donné que seulement 1% des molécules de 25-HC rentre naturellement dans les cellules, les DWNTs seraient donc des vecteurs potentiels afin de délivrer cette molécule en quantités plus importantes dans les cellules. De plus, il serait également possible d'utiliser les DWNTs comme vecteurs d'autres molécules de la même famille, telle que la dendrogénine A (DDA) mise en évidence par l'équipe de Marc Poirot et Sandrine Silvente-Poirot **[34]**, plus prometteuse contre les cellules cancéreuses. Des expériences *in vitro* d'incubation de DWNTs fonctionnalisés par le 25-HC avec des cellules peuvent de ce fait être envisagées.

En conclusion de ce chapitre, les DWNTs−COOH ont pu être fonctionnalisés de façon covalente par amidation via la fixation d'une diamine puis d'un fluorophore. Trois types de molécules fluorescentes, chacune avec ces avantages et inconvénients, ont été greffés sur les DWNTs. La fonctionnalisation a pu être mise en évidence par différentes techniques, à savoir par MET, spectroscopies IR, UV-Vis-NIR, Raman, de photoluminescence et par diffusion de neutrons. Par spectroscopies IR, Raman et UV-Vis-NIR, nous avons pu montrer que la Cy* s'est bien fixée de façon covalente et que son précurseur (hémicarboxonium) ne s'est pas adsorbé sur les parois des DWNTs. Concernant les DWNTs fonctionnalisés par le FITC, le greffage covalent a également été démontré grâce aux spectroscopies IR et Raman, mais la présence de molécules proches de la fluorescéine a également été mise en évidence annonçant ainsi la probable adsorption de molécules sur les DWNTs.

Des estimations de la fonctionnalisation ont par la suite été réalisées par microanalyse élémentaire, le test de Kaiser et UPLC, montrant que les quantités de molécules greffées sont comprises entre 200 et 400 µmol/g DWNTs. Nous avons pu montrer que l'analyse des filtrats de lavage par UPLC ne permet qu'une estimation du greffage du fait qu'il s'agit d'une technique de quantification indirecte. D'autre part, alors que la microanalyse élémentaire permet de quantifier la totalité des molécules présentes dans un échantillon de DWNTs fonctionnalisés, le test de Kaiser quant à lui nous donne la quantité de molécules uniquement greffées de façon covalente. En comparant les résultats obtenus par ces deux techniques, il a alors été possible de mettre en évidence le phénomène d'adsorption ayant lieu avec le FITC.

Le phénomène d'adsorption du FITC et de la $PyMeNH_2$, molécules aromatiques couramment utilisées dans la fonctionnalisation non-covalente des NTCs, a de ce fait été étudié plus en détail par spectroscopie UV-Vis, ATG, test de Kaiser et microanalyse élémentaire). Il s'est avéré que la quantification de ce type de fonctionnalisation n'est pas aussi aisée que l'on pourrait le croire et que la microanalyse élémentaire est la seule technique permettant d'obtenir des résultats cohérents quels que soient les DWNTs ou les molécules utilisés. Le FITC n'a pas d'affinité particulière pour un type de DWNTs, ce qui montre que des interactions du type $\pi$-$\pi$ stacking seraient mises en jeu. Pour ce qui est de la $PyMeNH_2$, celle-ci se fixe préférentiellement sur les parois plutôt hydrophiles et chargées ce qui impliquerait davantage des interactions ioniques entre les charges négatives des groupements carboxylates sur les DWNTs et les charges positives des $PyMeNH_2$ protonées.

La comparaison par MET, spectroscopies IR, Raman, UV-Vis-NIR, de photoluminescence et ATG des fonctionnalisations covalente et non-covalente des DWNTs par le FITC dans les mêmes conditions expérimentales a montré que le FITC adsorbé sur les DWNTs est en réalité une forme dégradée de la molécule et plus proche en structure à la fluorescéine et qu'il est en quantité bien inférieure (20%) comparé au FITC greffé de façon covalente.

Enfin, le 25-HC, molécule d'intérêt biologique, a pu être adsorbé sur les DWNTs, peu importe l'état de surface utilisé, avec un taux de couverture de 30% déterminé par mesure de la radioactivité par scintillation liquide.

Les DWNTs ont ainsi pu être fonctionnalisés de façon covalente et non-covalente par différents types de molécules, les types d'interaction mis en jeu ont été identifiés et quantifiés de la façon la plus précise possible par les techniques à disposition.

*Tableau 4.16: Tableau récapitulatif des résultats obtenus pour la quantification des greffages sur les DWNTs par microanalyse élémentaire, le test de Kaiser, UPLC et ATG.*

| Echantillons analysés | | Microanalyse élémentaire | Test de Kaiser | UPLC | ATG |
|---|---|---|---|---|---|
| **DWNTs–$NH_2$** | µmol/g DWNTs | **1060 ± 105** | **310 ± 133** | - | - |
| | % greffage | - | - | - | - |
| **DWNTs–NH–Fluo (THF)** | µmol/g DWNTs | **160 ± 90** | **95** | 468 | - |
| | % greffage | 15 | 31 | 44 | - |
| **DWNTs–NH–Fluo (Tampon)** | µmol/g DWNTs | **560 ± 90** | **260** | - | 436 |
| | % greffage | 53 | 84 | - | 39 |
| **DWNTs–COOH@FITC** | µmol/g DWNTs | 520 ± 90 | - | - | 92 |
| | % greffage | 47 | - | - | 8 |
| **DWNTs–NH–Cy5 (Tampon)** | µmol/g DWNTs | **195± 105** | **219** | 531 | - |
| | % greffage | 18 | 71 | 50 | - |
| **DWNTs–NH–Cy* (Tampon)** | µmol/g DWNTs | **230 ± 70** | **300** | 453 | - |
| | % greffage | 22 | 97 | 43 | - |

## D. Bibliographie du chapitre 4

[1] Goto H, Zhang HQ and Yashima E, *Chiral stimuli-responsive gels : helicity induction in poly(phenylacetylene) gels bearing a carboxyl roup with chiral amines.* J Am Chem Soc, **2003**, 125, 2516-2523.

[2] Zhao X, Jia XK, Wu LZ, Li ZT and Chen GJ, *Zipper-featured $\delta$-peptide foldamers friven by donor-acceptor interaction. Design, synthesis, and characterization.* J Org Chem, **2004**, 69, 270-279.

[3] Singh P, Samori C, Toma FM, Bussy C, Nunes A, Al-Jamal KT, Ménard-Moyon C, Prato M, Kostarelos K and Bianco A, *Polyamine functionalized carbon nanotubes: synthesis, characterization, cytotoxicity and siRNA binding*. J Mater Chem, **2011**, 21, 4850-4860.

[4] Wang Y, Iqbal Z and Malhotra SV, *Functionalization of carbon nanotubes with amines and enzymes*. Chem Phys Lett, **2005**, 402, 96-101.

[5] Lee TY and Yoo JB, *Adsorption characteristics of Ru(II) dye on carbon nanotubes for organic solar cell*. Diamond Relat Mater, **2005**, 14, 1888-1890.

[6] Ou Z, Wu B, Xing D, Zhou F, Wang H and Tang Y, *Functional single-walled carbon nanotubes based on an integrin $\alpha_v\beta_3$ monoclonal antibody for highly efficient cancer cell targeting.* Nanotechnology, **2009**, 20, 105102.

[7] Basiuk EV, Basiuk VA, Meza-Laguna V, Contreras-Torres FF, Martínez M, Rojas-Aguilar A, Salerno M, Zavala G, Falqui A and Brescia R, *Solvent-free covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes and nanodiamond with diamines : looking for cross-linking effects.* **2012**, 259, 465-476.

[8] Gul H, Lu W, Xu P, Xing J and Chen J, *Magnetic carbon nanotube labelling for haematopoietic stem/progenitor cell tracking*. Nanotechnology, **2010**, 21 (15), 155101.

[9] Carpino LA, Ionescu D and et El-Faham A, *Peptide coupling in the presence of highly hindered tertiary amine*. J Org Chem, **1996**, 61, 2460-2465.

[10] Harlow E and Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, NY, **1988**, 353-355.

[11] Jiang L, Zhou Q, Mu K, Xie H, Zhu Y, Zhu W, Zhao Y, Xu H and Yang X, *pH/temperature sensitive magnetic nanogels conjugated with Cy5.5-labled lactoferrin for MR and fluorescence imaging of glioma in rats*. Biomaterials, **2013**, 34, 7418-7428.

[12] Lin YH, Dayananda K, Chen CY, Liu GC, Luo TY, Hsu HS and Wang YM, *In vivo MR/optical imaging for gastrin releasing peptide receptor of prostate cancer tumor using Gd-TTDA-NP-BN-Cy5.5*. Bioorg Med Chem, **2011**, 19, 1085-1096.

[13] Maether MP, Lapin K, Muntean A, Payrastre C and Escudier JM, *Oligonucleotide labelling using a fluorogenic « click » reaction with a hemicarboxonium salt*. Molecules, **2013**, 18 (10), 12966-12976.

[14] Obaya N, Payrastre C and Madaule Y, *Synthesis of new pentacarbon chain streptocyanines (pentamethinium salts)*. Tetrahedron, **2001**, 57, 9137-9147.

[15] Maether MP, Bernat V, Maturano M, André-BArrès C, Ladeira S, Valentin A, Vial H and Payrastre C, *Synthesis and antiplasmodial activity of streptocyanine/peroxide and streptocyanine/4-aminoquinoline hybrid dyes.* Org Biomol Chem, **2011**, 9, 7400-7410.

[16] Bouilly D, Cabana J, Meunier F, Desjardins-Carrière M, Lapointe F, Gagnon P, Larouche FL, Adam E, Paillet M and Martel R, *Wall-selective probing of double-walled carbon nanotubes using covalent functionalization.* ACS Nano, **2011**, 5 (6), 4927-4934.

[17] Ménard-Moyon C, Fabbro C, Prato M and Bianco A, *One-pot triple functionalization of carbon nanotubes.* Chem Eur J, **2011**, 17, 3222-3227.

[18] Lebl M, *Peptides – Breaking away : the proceedings of the twenty-first American peptide symposium.* Proc Am Pep Soc, **2009**.

[19] Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N and Dai H, *Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery.* ACS Nano, **2007**, 1 (1), 50-56.

[20] Liu Q, Chen B, Wang Q, Shi X, Xiao Z, Lin J et Fang X, *Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells.* Nano Lett, **2009**, 9 (3), 1007-1010.

[21] Serag MF, Kaji N, Venturelli E, Okamoto Y, Terasaka K, Tokeshi M, Mizukami H, Braeckmans K, Bianco A and Baba Y, *Functional platform for controlled subcellular distribution of carbon nanotubes.* ACS Nano, **2011**, 5 (11), 9264-9270.

[22] Simmons TJ, Bult J, Hashim DP, Linhardt RJ and Ajayan M, *Noncovalent functionalization as an alternative to oxidative acid treatment of single wall carbon nanotubes with applications for polymer composites.* ACS Nano, **2009**, 3 (4), 865-870.

[23] Sanz V, Borowiak E, Lukanov P, Galibert AM, Flahaut E, Coley HM, Silva SRP and McFadden J, *Optimising DNA binding to carbon nanotubes by non-covalent methods.* Carbon, **2011**, 49, 1775-1781.

[24] Baek YK, Jung DH, Yoo SM, Shin S, Kim JH, Jeon HJ, Choi YK, Lee SY and Jung HT, *Label-free detection of DNA hybridization using pyrene-functionalized single-walled carbon nanotubes : effect of chemical structures of pyrene molecules on DNA sensing performance.* J Nanosci Nanotechnol, **2011**, 11 (5), 4210-4216.

[25] Ou YY and Huang MH, *High-density of gold nanoparticles on multiwalled carbon nanotubes using 1-pyrenemethylamine as interlinker.* J Phys Chem B, **2006**, 110, 2031-2036.

[26] Holmes R, VandeBerg J and Cox L, *Genomics and proteomics of vertebrate cholesterol ester lipase (LIPA) and cholesterol 25-hydroxylase (CH25H).* Biotech, **2011**, 3 (1), 99-109.

[27] Bauman DR, Bitmansour AD, McDonald JG, Thompson BM, Liang G and Russel DW, *25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobin A production.* PNAS, **2009**, 106 (39), 16764-16769.

[28] Kandutsch AA and Chen HW, *Inhibition of sterol synthesis in cultured mouse cells by cholesterol derivatives oxygenated in the side chain.* J Biol Chem, **1974**, 249, 19, 6057-6061.

[29] McDonald JG and Russell DW, *25-Hydroxycholesterol : a new life in immunology.* J Leuk Biol, **2010**, 88, 1071-1072.

[30] Liu SY, Aliyari R, Chikere K, Li G, Mersden MD, Smith JK, Pernet O, Guo H, Nusbaum R, Zack JA, Freiberg AN, Su L, Lee B and Cheng G, *Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol.* Immunity, **2013**, 38 (1), 92-105.

[31] Ségala G, *Caractérisation des mécanismes moléculaires impliqués dans l'activité anti-cancéreuse du Tamoxifène et de la Dendrogénine A.* Thèse de Doctorat, Université Toulouse III Paul Sabatier, **2012**.

[32] Lappano R, Recchia AG, De Francesco EM, Angelone T, Cerra MC, Picard D and Maggiolini M, *The cholesterol metabolite 25-hydroxycholesterol activates estrogen receptor $\alpha$-mediated signaling in cancer cells and in cardiomyocytes.* PLoS One, **2011**, 6 (1), e16631.

[33] Osada K, Ravandi A and Kuksis A, *Rapid analysis of oxidized cholesterol derivatives by high-performance liquid chromatography combined with diode-array ultraviolet and evaporative laser light-scattering detection.* JAOCS, **1999**, 76 (7), 863-871.

[34] De Medina P, Paillasse MR, Segala G, Voisin M, Mhamdi L, Dalenc F, Lacroix-Triki M, Filleron T, Pont F, Al Saati T, Morisseau C, Hammock BD, Silvente-Poirot S and Poirot M, *Dendrogenin A arises from cholesterol and histamine metabolism and shows cell differenciation and anti-tumour properties.* Nature Communications, **2013**, 4, article number 1840, doi:10.1038/ncomms2835.

# CHAPITRE 5

# DETECTION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS DANS LES CELLULES DE MAMMIFERES

# A. Introduction

L'utilisation des NTCs, comme agents de vectorisation ou traceurs d'imagerie en biologie, implique un besoin de savoir si les NTCs fonctionnalisés peuvent interagir avec les cellules, s'il est possible de les localiser et s'ils relarguent une partie des molécules qui y sont fixées. Des études ont déjà été réalisées sur l'internalisation par les cellules des NTCs fonctionnalisés. Il a été montré que les NTCs entraient dans les cellules animales et végétales par endocytose ou en traversant les membranes **[1-2]**. Cette internalisation dans les cellules a été mise en évidence par l'utilisation de la fluorescence **[1-4]**, et notamment celle du FITC. Cependant, les études concernant la stabilité de la fonctionnalisation ainsi que la co-localisation des NTCs dans les cellules sont généralement peu approfondies.

Dans ce cinquième chapitre, nous nous sommes attachés à tester les différents DWNTs synthétisés (fonctionnalisés ou non) sur différents types de cellules animales en cultute (*in vitro*), les buts étant ainsi de définir : si les DWNTs fonctionnalisés par les molécules fluorescentes peuvent être détectés simplement par microscopie de fluorescence ; quelle est la stabilité des différents greffages en milieu biologique ; et quels sont les comportements de ces DWNTs vis-à-vis des cellules en fonction de leur fonctionnalisation. Dans cette optique, la première partie de ce chapitre sera consacrée à la mise en évidence de la fluorescence des DWNTs fonctionnalisés par microscopie de fluorescence à champ large. Puis dans la deuxième partie, nous verrons comment la co-localisation des DWNTs fonctionnalisés a été rendue possible par le croisement de deux techniques de microscopie confocale (fluorescence et Raman). Enfin, la microscopie bi-photonique, technique peu répandue et utilisée en ce qui concerne la caractérisation et la détection des NTCs, sera présentée comme une méthode potentielle d'investigation et de localisation des NTCs, même non fonctionnalisés, *in vitro*.

# B. Détection de la fluorescence par microscopie de fluorescence à champ large

La microscopie de fluorescence à champ large est la technique la plus simple et la plus rapide afin d'observer la fluorescence émise par des échantillons de différentes natures (biologiques, chimiques, biomatériaux). Elle permet de visualiser la fluorescence globale de la zone observée (Chapitre 2, partie E.IV.1). Différents types de cellules ont été utilisés pour la visualisation des DWNTs par microscopie de fluorescence à champ large.

Par cette méthode, il sera possible de déterminer dans un premier temps si la fluorescence des DWNTs fonctionnalisés par les différents fluorophores, obtenus à la fin du chapitre 4, est bien observable *in vitro*, où celle-ci se situe et d'en déduire au mieux quel type de fonctionnalisation parait le plus prometteur.

Dans un premier temps, les DWNTs fonctionnalisés par le FITC (DWNTs−NH−Fluo ; DWNTs−COOH@FITC ; DWNTs bruts@FITC) ont été observés seuls afin de déterminer si leur fluorescence est détectable par microscopie de fluorescence. Puis ils ont été mis en présence de macrophages murins, dont le rôle principal est de phagocyter les débris cellulaires et les pathogènes, afin de s'assurer de la présence de DWNTs dans le milieu intracellulaire. Dans un troisième temps, les DWNTs, fonctionnalisés ou non, ont été incubés avec des cellules de cancer du sein MCF7. Les différentes fonctionnalisations par le FITC et les cyanines Cy* et Cy5 ont ainsi pu être comparées en présence des cellules. Pour plus de facilité, les cellules seront représentées dans le nom des échantillons par le symbole « ℭ ».

## B.I. Observation de suspensions de DWNTs fonctionnalisés par le FITC

Dans un premier temps, un dépôt entre lame et lamelle de suspensions dans l'EtOH de DWNTs fonctionnalisés par le FITC a été réalisé afin de rendre compte de leur fluorescence dans un solvant polaire. Sur la **Figure 5.1** sont présentées les images enregistrées en lumière blanche et en fluorescence à $\lambda_{exc} = 488$ nm des suspensions de DWNTs−NH−Fluo, DWNTs−COOH@FITC et DWNTs bruts@FITC.

Pour chacun des trois types de DWNTs fonctionnalisés, nous nous sommes focalisés sur l'observation d'agglomérats de DWNTs, plus faciles à repérer. Les agglomérats de

DWNTs bruts@FITC sont beaucoup plus importants et compacts que ceux de DWNTs−NH−Fluo et de DWNTs−COOH@FITC. Ceci est en accord avec la plus grande difficulté à disperser les DWNTs bruts par rapport aux DWNTs oxydés.

Dans le cas des DWNTs−NH−Fluo, à $\lambda_{exc}$ = 488 nm, une émission de fluorescence est visible, notamment à la périphérie de l'agglomérat. Elle correspond à la présence de FITC fixé sur les DWNTs. En comparant les images en lumière blanche et en fluorescence, on observe que la fluorescence est plus intense dans les zones les moins denses en DWNTs. Cette observation confirme le fait que les DWNTs absorbent la lumière lorsqu'ils sont sous forme d'agglomérats.

Concernant les DWNTs−COOH@FITC, une émission de fluorescence est également détectable. Cependant, le signal de fluorescence est beaucoup moins intense que dans le cas de la fonctionnalisation covalente (DWNTs−NH−Fluo). Deux possibilités déjà évoquées dans le chapitre 4 peuvent expliquer ce phénomène : d'une part, la quantité de FITC fixée par simple adsorption serait bien plus faible que la quantité fixée par liaison covalente, et d'autre part, un transfert d'énergie des fluorophores adsorbés excités vers les DWNTs pourrait empêcher l'émission de fluorescence (chapitre 4, partie C.II.2.e.).

Pour ce qui est des DWNT bruts@FITC, le FITC semble être relargué très rapidement dans le milieu confirmant la faible stabilité de ce type de greffage non-covalent sur des DWNTs bruts. Par ailleurs, il avait été montré au chapitre précédent (partie C.I.3.d du chapitre 4) que l'adsorption était plus difficile sur les DWNTs bruts que sur les DWNTs oxydés.

Ainsi, les DWNTs−COOH@FITC, mais surtout les DWNTs−NH−Fluo, semblent être les meilleurs candidats pour la détection et la localisation des DWNTs *in vitro*, ceux-ci présentant les meilleurs rendements de fluorescence et la meilleure stabilité.

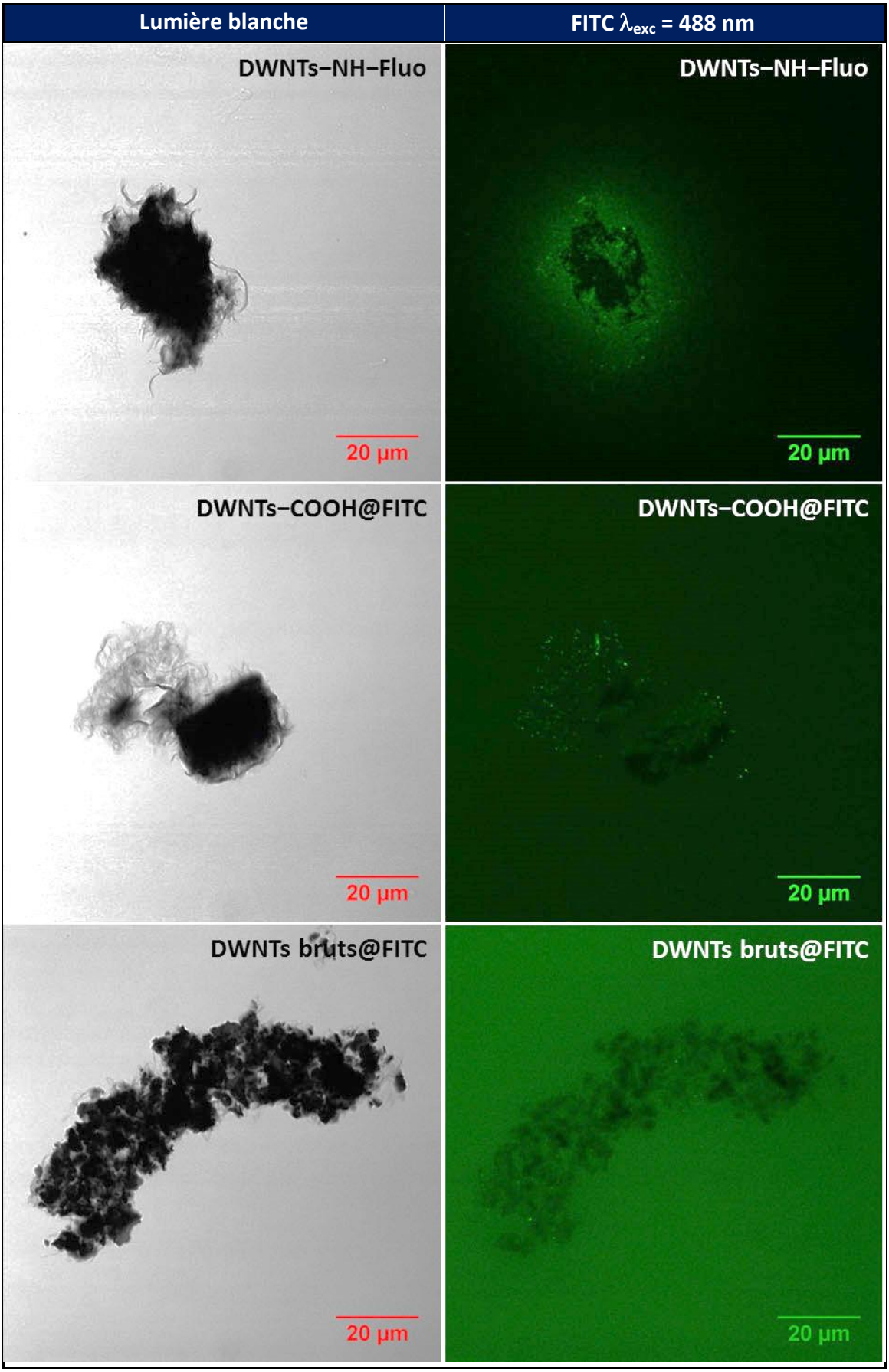



*Figure 5.1 : Images de microscopie confocale de fluorescence de suspensions de DWNTs–NH–Fluo, DWNTs–COOH@FITC et DWNTs bruts@FITC. Images en lumière blanche (à gauche) et en fluorescence à $\lambda_{exc}$ = 488 nm (à droite).*

## B.II. Incubation des DWNTs avec des macrophages

Des macrophages murins ont été incubés pendant 1h-1h30 avec des DWNTs−NH−Fluo, DWNTs−COOH@FITC, DWNTs bruts@FITC (0,1 $mg.mL^{-1}$). Une fois les préparations fixées (Chapitre 2, partie D.I.1.), les échantillons ont été observés au microscope de fluorescence à champ large. Les observations des préparations ont été réalisées à la plateforme d'imagerie de Toulouse (TRI) avec la collaboration de Muriel Golzio de l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS). Les images obtenues en lumière blanche et en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du FITC sont regroupées dans la **Figure 5.2**.

Que ce soit pour les DWNTs−NH−Fluo et les DWNTs−COOH@FITC, aucun gros agglomérat noir de DWNTs n'est visible en lumière blanche, suggérant que les DWNTs ont été correctement dispersés. En fluorescence, une émission de fluorescence assez intense est visible dans les cellules : celle-ci n'est pas uniquement diffuse et semble être localisée dans des vésicules se situant essentiellement en périphérie du noyau des macrophages. Ces vésicules marquées au FITC peuvent correspondre à des vésicules d'endocytose ou des lysosomes. Cependant, les DWNTs à l'intérieur de ces vésicules ne sont pas visibles et détectables par cette technique, ce qui nous amène à nous demander si la fluorescence émise dans ces cellules provient du FITC greffé sur les DWNTs ou du FITC qui se serait décroché et libéré.

La fluorescence est plus intense avec les DWNTs−NH−Fluo comparée à celle émise en présence des DWNTs−COOH@FITC, ce qui serait en accord avec les conclusions de la partie C.II.3. du chapitre 4 : le taux de greffage de FITC sur les DWNTs serait cinq fois plus faible par adsorption seule que par fonctionnalisation covalente.

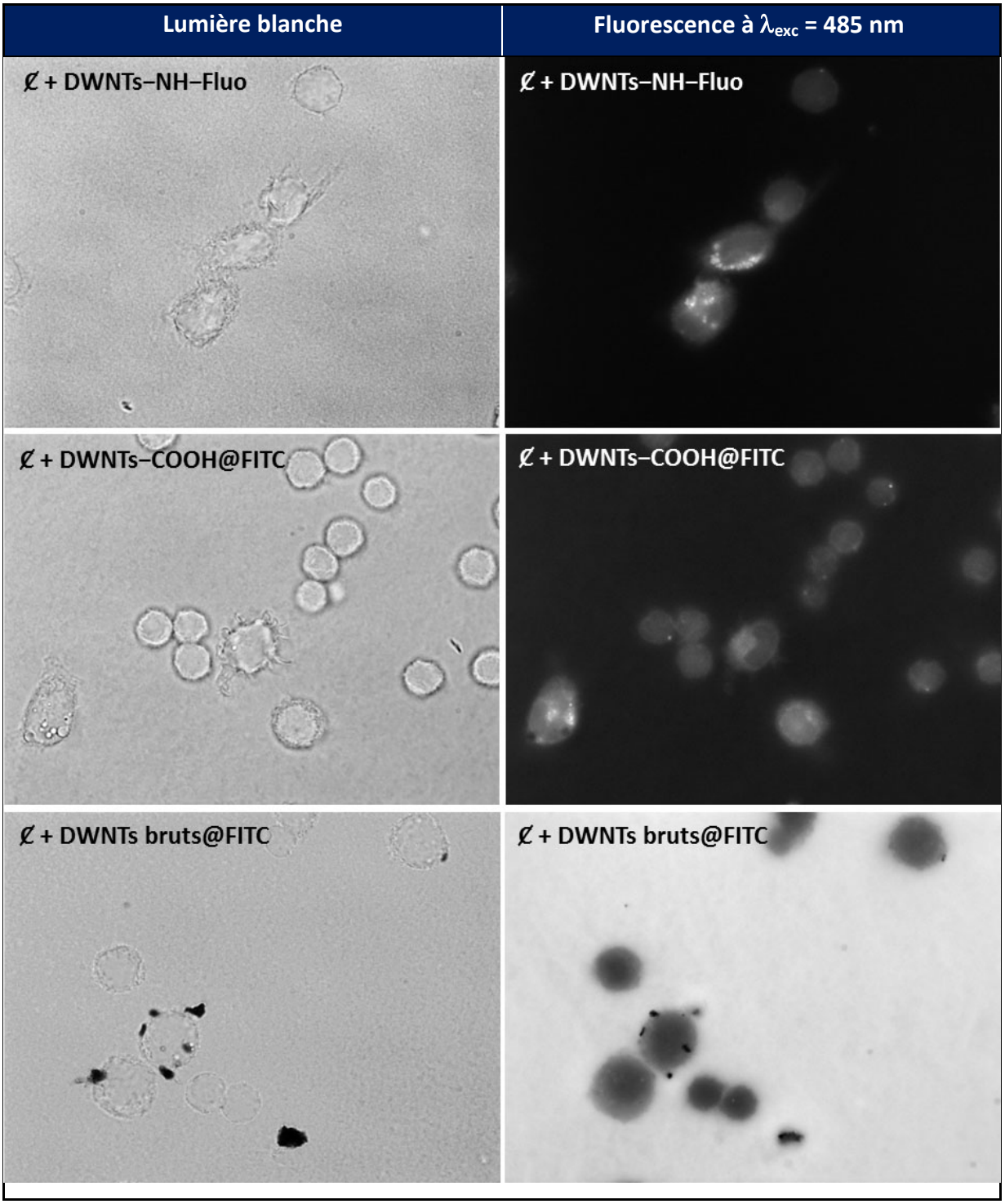



*Figure 5.2 : Images de microscopie de fluorescence à champ large de préparations de macrophages murins mis en présence de DWNTs–NH–Fluo, DWNTs–COOH@FITC et DWNTs bruts@FITC. Images en lumière blanche (à gauche) et en fluorescence à $\lambda_{exc}$ = 485 nm (à droite).*

Dans le cas des DWNTs bruts@FITC, de gros agglomérats noirs sont visibles en lumière blanche, surtout collés à la surface des cellules montrant bien que les DWNTs bruts sont bien plus difficiles à disperser. Quelques spots noirs, correspondant aux DWNTs, sont repérables au niveau des macrophages mais il est impossible de dire s'ils se situent dans le

milieu intra ou extracellulaire. En excitant la préparation à $\lambda$ = 485 nm, une forte fluorescence est observée à l'extérieur des macrophages. Le FITC pourrait être relargué des DWNTs bruts après la fixation au PFA et le montage au mowiol : cette constatation, déjà mentionnées précédemment, montre que l'adsorption du FITC est plus forte sur les DWNTs−COOH que sur les DWNTs bruts, ce qui avait déjà été mis en évidence dans la partie C.I. du chapitre 4 traitant de l'affinité de deux fluorophores pour différents états de surface des DWNTs. Il est difficile de discerner la présence de fluorescence localisée dans les cellules à cause de l'intensité de la fluorescence extérieure.

L'incubation de DWNTs fonctionnalisés par le FITC avec des macrophages a montré un marquage intracellulaire au FITC avec les DWNTs−NH−Fluo et les DWNTs−COOH@FITC. Cependant, aucune certitude sur le fait que le fluorophore est toujours greffé aux DWNTs n'a été établie. Ces observations ont également appuyé l'hypothèse d'une meilleure affinité, et par conséquent d'une meilleure stabilité, de l'adsorption du FITC sur les DWNTs−COOH@FITC par rapport aux DWNTs bruts@FITC.

## B.III. Observation des cellules MCF7

Des incubations avec des cellules de cancer du sein MCF7 ont été menées sur les différents types de DWNTs au Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse avec la collaboration de l'équipe de Marc Poirot et Sandrine Silvente-Poirot. La mise au point des conditions expérimentales a ainsi été entreprise en injectant des quantités différentes de suspensions de DWNTs (0,05 et 0,09 $mg.mL^{-1}$) et en faisant varier le temps d'incubation (24h, 48h ou72h). Le protocole d'incubation, de fixation et de montage utilisé pour les cellules MCF7 a été détaillé dans la partie D.I.3. du chapitre 2.

Les DWNTs fonctionnalisés par les différents fluorophores ont pu ainsi être testés :

- Cellules + DWNTs−NH−Fluo
- Cellules + DWNTs−COOH@FITC
- Cellules + DWNTs−NH−Cy*
- Cellules + DWNTs−NH−Cy5.

Des contrôles ont également été réalisés afin de déterminer si les cellules sont auto-fluorescentes aux longueurs d'onde d'excitation utilisées et comment se comportent les DWNTs non fonctionnalisés et les fluorophores libres :

- Cellules seules
- Cellules + DWNTs bruts
- Cellules + DWNTs−COOH
- Cellules + FITC
- Cellules + Cy*T
- Cellules + Cy5 NHS Ester.

Les observations et résultats ont été regroupés en trois parties, en fonction du type de molécule fluorescente greffée.

### B.III.1. Fonctionnalisation par le FITC

Afin de repérer plus rapidement les cellules, les noyaux des cellules ont été marqués au DAPI, intercalant de l'ADN fluorescent. Une fois les lames montées et séchées, les préparations ont pu être observées au microscope de fluorescence à champ large. Les échantillons ont été soumis à deux longueurs d'onde d'excitation : à la longueur d'onde d'excitation maximale du DAPI ($\lambda_{exc}$ = 405 nm) et celle du FITC ($\lambda_{exc}$ = 488 nm). Des photos ont été prises à chacune de ces longueurs d'onde, puis ont été superposées pour mieux localiser les fluorescences détectées. Les images enregistrées ont été regroupées sur la **Figure 5.3**.

Dans tous les cas, à $\lambda_{exc}$ = 405 nm, les noyaux des cellules sont clairement visibles et les cellules sont ainsi bien repérables

Concernant les lames contrôles de ℭ seules, ℭ + DWNTs bruts et ℭ + DWNTs−COOH, à $\lambda_{exc}$ = 488 nm, une très légère fluorescence presque indiscernable émane des cellules entières. Il s'agit très probablement de l'autofluorescence des cellules, ce qui expliquerait pourquoi elle est visible dans tous les échantillons.

Les cellules mises au contact d'une solution de FITC (∅ + FITC) quant à elles présentent une fluorescence intense plutôt située dans le cytoplasme des cellules et dans des vésicules non identifiées en périphérie. Le FITC est donc capable d'entrer dans les cellules, probablement par endocytose, et s'est retrouvé concentré dans des vésicules. D'autre part, du fait de la forte réactivité de sa fonction isothiocyanate, si celle-ci n'a pas déjà réagi en milieu aqueux, il se peut que des molécules de FITC aient pu réagir avec des fonctions amines de protéines cellulaires, d'où une fluorescence un peu plus diffuse.

Les résultats obtenus pour les cellules MCF7 incubées avec les DWNTs fonctionnalisés par le FITC, les DWNTs−NH−Fluo et les DWNTs−COOH@FITC, sont similaires. L'autofluorescence des cellules est visible **[5-6]**, et quelques points de fluorescence plus intense, probablement des vésicules, sont visibles en périphérie, proche de la membrane plasmique. Les mêmes observations avaient pu être faites avec les macrophages, à la seule différence que la fluorescence paraissait plus intense avec ces derniers. Cela peut être expliqué par la fonction même des macrophages qui est de phagocyter les éléments étrangers : la probabilité de trouver davantage de FITC dans les cellules est donc augmentée. D'autre part, il faut noter que la fluorescence émise par ces deux préparations est bien inférieure à celle enregistrée dans le cas des cellules incubées avec du FITC libre, sachant que celui-ci avait été ajouté dans le contrôle en quantité équivalente à ce qui a pu être greffé sur les DWNTs. Il en découle deux hypothèses : d'une part, le FITC greffé sur les DWNTs−NH−Fluo et les DWNTs−COOH@FITC est bien fixé ; et d'autre part, l'entrée du FITC dans les cellules MCF7 est plus difficile que dans le cas des ∅ + FITC.

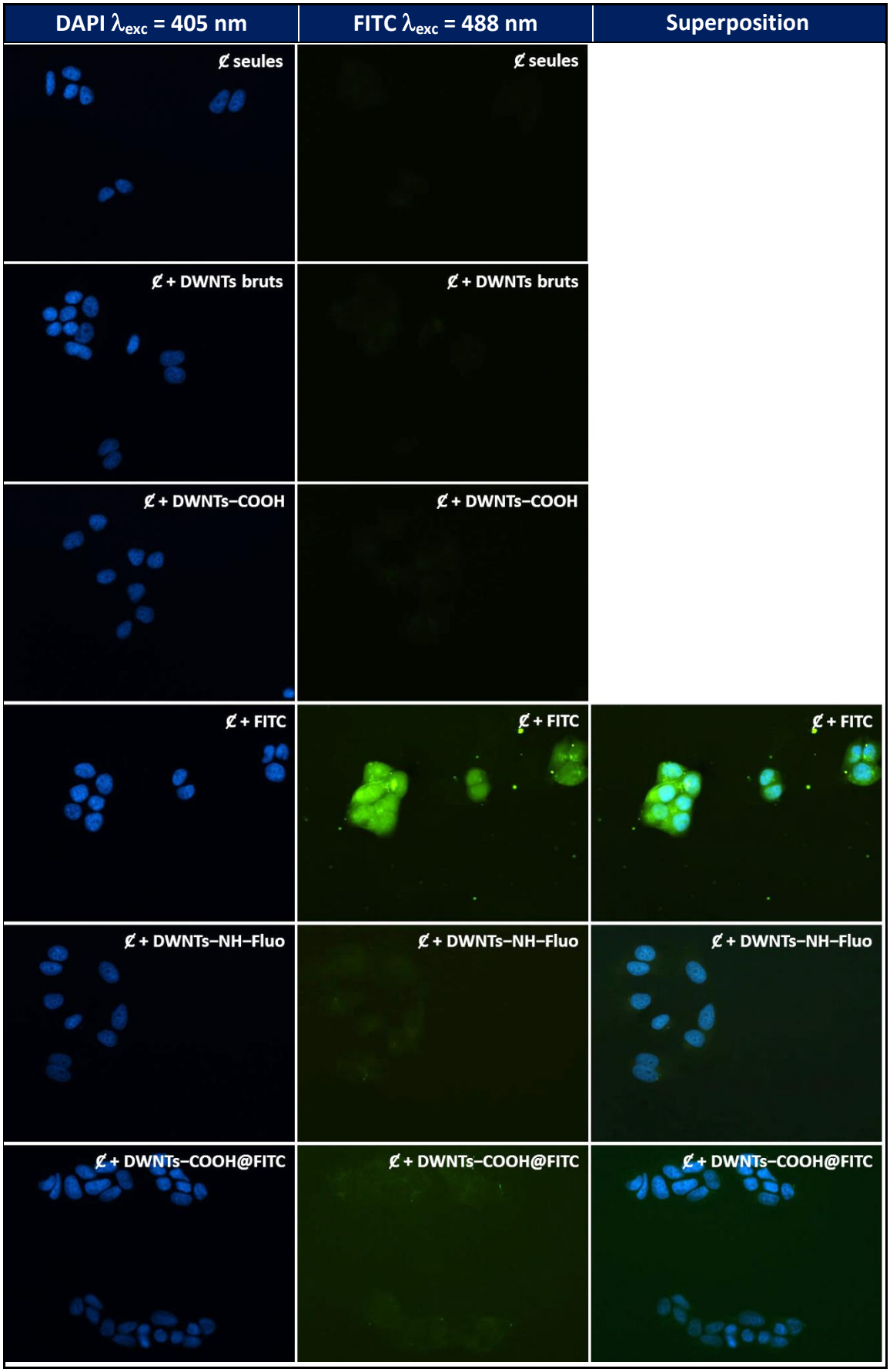



*Figure 5.3 : Images de microscopie de fluorescence à champ large de préparations de cellules MCF7 seules, et mises en présence de DWNTs bruts, DWNTs–COOH, FITC, DWNTs–NH–Fluo et DWNTs–COOH@FITC. Images en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm (à gauche), à la longueur d'onde d'excitation du FITC $\lambda_{exc}$ = 488 nm (au milieu) et superposition de ces images (à droite).*

### B.III.2. Fonctionnalisation par la streptocyanine Cy*

De la même manière que dans la partie précédente, les contrôles et les différentes préparations de cellules MCF7 mises en présence de la Cy* ont été observées aux longueurs d'onde d'excitation maximales du DAPI et de la Cy*, respectivement $\lambda_{exc}$ = 405 nm et $\lambda_{exc}$ = 440 nm. Les images ont été regroupées dans la **Figure 5.4**.

Au niveau des contrôles ∅ seules, ∅ + DWNTs bruts et ∅ + DWNTs−COOH, les cellules ne sont pratiquement pas discernables à $\lambda_{exc}$ = 440 nm, ce qui signifie que leur autofluorescence est moins intense à cette longueur d'onde qu'à $\lambda_{exc}$ = 488 nm.

Dans le cas des ∅ + Cy*T, il était très difficile de trouver des cellules sur la lame. La plupart des cellules a été tuée, s'est donc décrochée de la lame de verre et a été éliminée au cours des lavages avant la fixation et le montage. La Cy*T présente ainsi une nette toxicité vis-à-vis des cellules MCF7. Les cellules restantes et observables ne présentent pas beaucoup de fluorescence (diffuse et peu intense). En effet, les cellules qui auraient le plus absorbé de Cy*T sont mortes alors que celles qui en ont absorbé le moins sont toujours présentes sur la préparation. Il parait donc normal que la fluorescence émise par ces cellules soit quasi-nulle et correspondrait très probablement à l'autofluorescence des cellules.

Pour ce qui est des cellules MCF7 incubées avec les DWNTs fonctionnalisés par la Cy* (∅ + DWNTs−NH−Cy*), la fluorescence émise est tout aussi négligeable que dans le cas précédent ce qui signifie que les molécules de Cy* n'ont pas pénétré dans les cellules. De plus, il faut noter que moins de cellules sont mortes en présence des DWNTs−NH−Cy* comparé au test avec la Cy*T libre. Donc, une fois greffée sur les DWNTs, la streptocyanine Cy* serait moins cytotoxique. Alors que ce fluorophore nous permettait de nous assurer d'une fonctionnalisation uniquement covalente, et donc de l'absence d'un relargage *in vitro*, celui-ci ne permet en réalité de visualiser aucune fluorescence au niveau des cellules. Cette molécule ne semble donc pas la plus adaptée pour une détection et une localisation des DWNTs en milieu biologique, du moins dans nos conditions expérimentales.

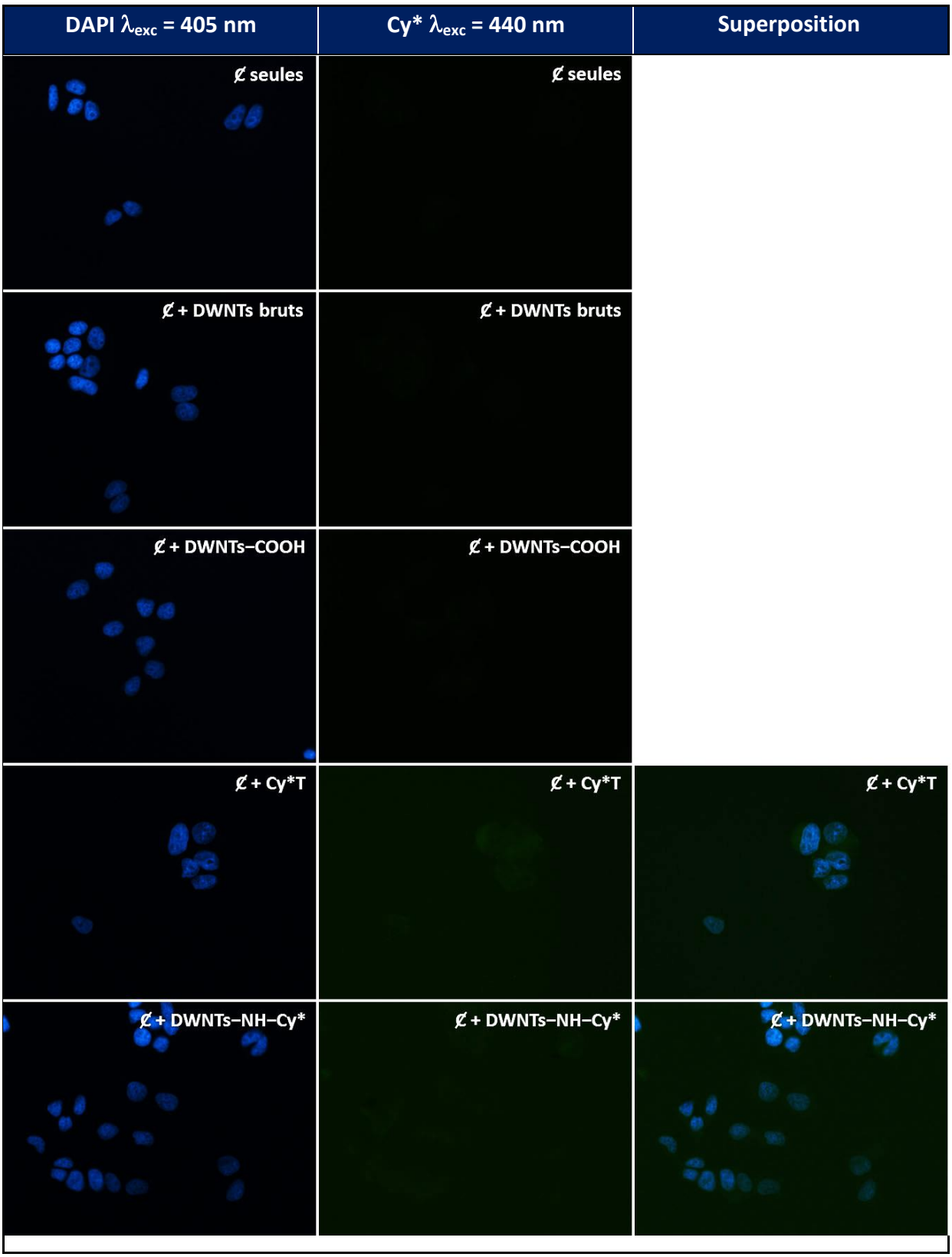



*Figure 5.4 : Images de microscopie de fluorescence à champ large de préparations de cellules MCF7 seules, et mises en présence de DWNTs bruts, DWNTs–COOH, Cy*T, DWNTs–NH–Cy*. Images en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm (à gauche), à la longueur d'onde d'excitation de la Cy* $\lambda_{exc}$ = 440 nm (au milieu) et superposition de ces images (à droite).*

### B.III.3. Fonctionnalisation par la Cy5

Par la suite, la même série d'observations a été réalisée sur les différents contrôles et les cellules MCF7 mises en présence de la Cy5 NHS Ester et les DWNTs−NH−Cy5. Pour cela, les préparations ont été soumises aux longueurs d'onde d'excitation du DAPI ($\lambda_{exc}$ = 405 nm) et de la Cy5 ($\lambda_{exc}$ = 635 nm). Les images enregistrées ont été regroupée dans la **Figure 5.5**.

En excitant les échantillons à $\lambda_{exc}$ = 635 nm, il est impossible de détecter les cellules sur les différents contrôles, ℭ seules, ℭ + DWNTs bruts et ℭ + DWNTs−COOH, ce qui confirme bien que les cellules n'émettent aucune autofluorescence à cette longueur d'onde. Cette condition était l'une des raisons de l'utilisation la Cy5 comme fluorophore.

Lorsque qu'une solution de Cy5 NHS Ester est injectée dans le milieu de culture cellulaire (ℭ + Cy5 NHS Ester), une fluorescence intense et nette est détectée au niveau de toutes les cellules. Celle-ci semble localisée de façon assez homogène dans le cytoplasme des cellules mais reste absente du noyau. La Cy5 pénètre donc facilement dans les cellules MCF7 et son coefficient d'extinction molaire très élevé lui assure une très bonne détectabilité par microscopie de fluorescence. En revanche, beaucoup de cellules sont mortes en présence de la Cy5 NHS Ester mais la cytotoxicité de la molécule semble tout de même moins importante que celle de la Cy*T.

Dans le cas des ℭ + DWNTs−NH−Cy5, la fluorescence observée est équivalente à celle détectée avec la molécule fluorescente libre. Les cellules sont toutes marquées et la fluorescence est bien nette et intense. Comme il avait été montré, dans la partie B.III.2 du chapitre 4, que les cyanines (Cy* et Cy5) avaient été fixées uniquement de façon covalente, il est donc possible d'en déduire que la fluorescence observée dans les cellules provient de la Cy5 greffée aux DWNTs. Les DWNTs−NH−Cy5 auraient donc pénétré dans les cellules MCF7, mais cela reste encore à confirmer par d'autres techniques.

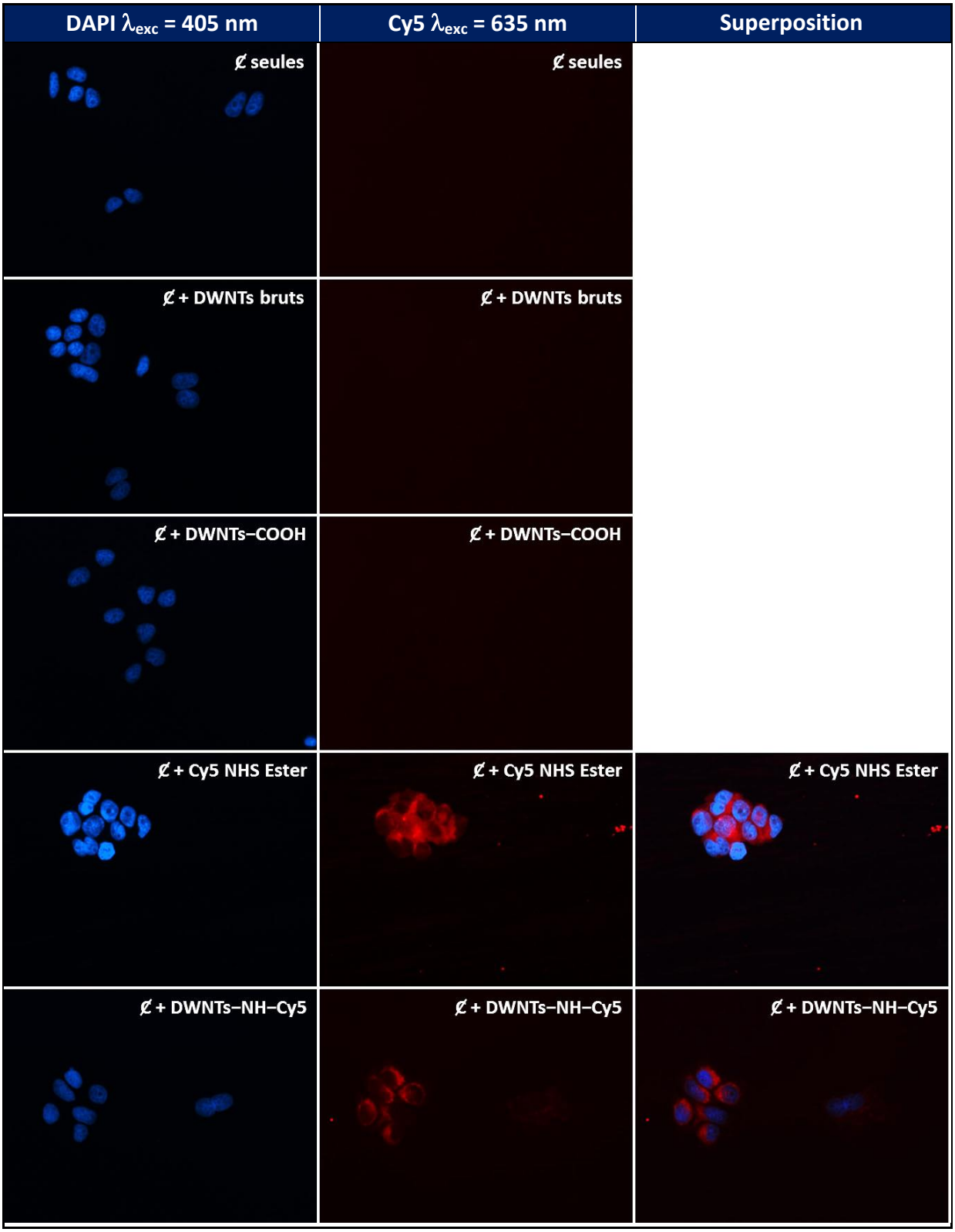



*Figure 5.5 : Images de microscopie de fluorescence à champ large de préparations de cellules MCF7 seules, et mises en présence de DWNTs bruts, DWNTs–COOH, Cy5 NHS Ester, DWNTs–NH–Cy5. Images en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm (à gauche), à la longueur d'onde d'excitation de la Cy5 $\lambda_{exc}$ = 635 nm (au milieu) et superposition de ces images (à droite).*

Par microscopie de fluorescence à champ large, il a été possible de montrer qu'une fluorescence était détectable au niveau des cellules, lorsque celles-ci sont incubées avec des DWNTs fonctionnalisés par du FITC (macrophages, cellules MCF7) et par de la Cy5. Cette fluorescence est localisée au niveau de vésicules proches de la membrane plasmique dans le cas du FITC, et de façon plus diffuse dans le cytoplasme dans le cas de la Cy5. Les fluorophores ne sont donc pas localisés au même endroit dans les cellules, ce qui signifie que différentes voies d'internalisation sont utilisées dans les cellules en fonction du fluorophore employé. D'autre part, pour ce qui est des incubations avec les cellules MCF7, quel que soit le temps d'incubation (24, 48 ou 72h) et quelle que soit la quantité de suspension de DWNTs ou de solution de fluorophore injectée, le même niveau de fluorescence et de cytotoxicité a été observé pour les trois molécules fluorescentes. Enfin, bien que la présence des fluorophores ait pu être mise en évidence au niveau des cellules, une localisation précise, notamment par rapport au plan du noyau, reste à faire.

# C. La microscopie confocale au service de la détection et de la co-localisation des DWNTs dans les cellules

## C.I. Mise en évidence par microscopie confocale de fluorescence

Notre collaboration avec l'équipe de Biophysique Cellulaire à l'IPBS (Toulouse) nous a permis de tester tous les types de DWNTs sur des cellules de mélanome de souris (B16) puis de réaliser des observations par microscopie confocale de fluorescence. Des cellules B16 ont été incubées avec des suspensions de DWNTs (0,18 $mg.mL^{-1}$) et avec des solutions de molécules fluorescentes ($4{,}7.10^{-5}$ $mol.L^{-1}$) pendant 24h (partie D.I.2. du chapitre 2). L'utilisation de la microscopie confocale de fluorescence permettra de localiser avec précision dans quel plan focal, et donc à quel niveau de la cellule, la fluorescence est la plus forte (chapitre 2, partie E.IV.2).

### C.I.1. Observation des contrôles

Les contrôles de ∅ seules, ∅ + DWNTs bruts et ∅ + DWNTs−COOH ont été observés dans un premier temps à la lumière blanche, puis aux longueurs d'onde d'excitation des différents fluorophores. Il faut noter que la longueur d'onde d'excitation utilisée pour la Cy*

et le FITC est la même ($\lambda_{exc}$ = 488 nm), celle-ci étant déterminée par les types de laser à disposition. La Cy* n'est donc pas excitée à son maximum d'absorbance et l'intensité de son émission devrait de ce fait en être affectée. Sur la **Figure 5.6**, sont présentées les images collectées pour ces contrôles.

De façon identique à ce qui avait pu être observé pour les macrophages en lumière blanche, les DWNTs bruts forment des agglomérats imposants se collant à la membrane plasmique des cellules. Pour ce qui est des DWNTs−COOH, ceux-ci ne sont quasiment pas discernables à l'exception de quelques rares petits agglomérats également collés aux membranes cellulaires.

A $\lambda_{exc}$ = 488 nm, les cellules présentent une nette autofluorescence pour les trois contrôles. Cependant à $\lambda_{exc}$ = 635 nm, l'autofluorescence des cellules est beaucoup moins intense, voire indiscernable.

Globalement, aucune différence n'est relevée pour ces contrôles entre les cellules B16 et MCF7 vues précédemment.

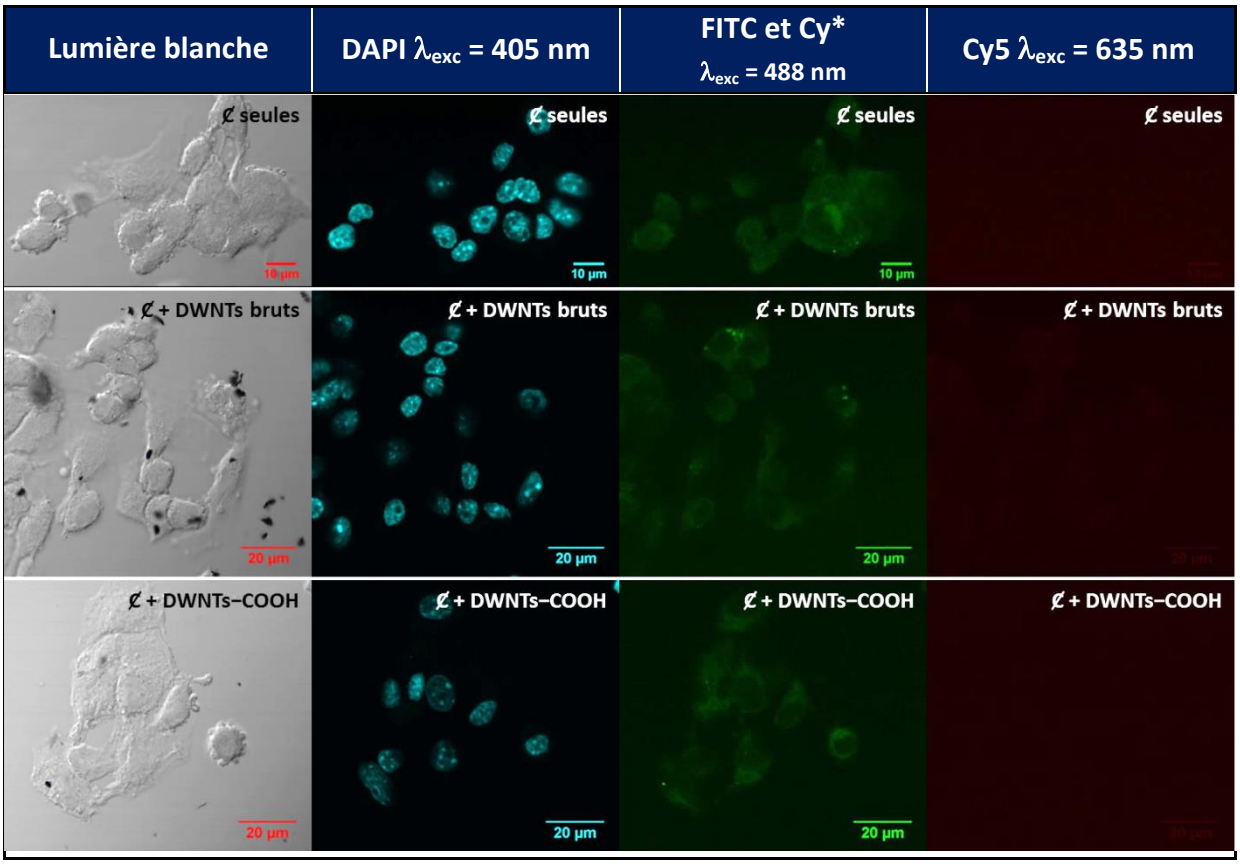



Figure 5.6 : Images de microscopie confocale de fluorescence de préparations de cellules B16 seules, et mises en présence de DWNTs bruts et de DWNTs−COOH. Images en lumière blanche (1ère colonne) ; en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm (2ème colonne), à la longueur d'onde d'excitation du FITC $\lambda_{exc}$ = 488 nm (3ème colonne) et à la longueur d'onde d'excitation de la Cy5 $\lambda_{exc}$ = 635 nm (4ème colonne).

### C.I.2. Fonctionnalisation par le FITC

Par la suite, les cellules B16 incubées avec les molécules de fluorescéine, de FITC, et avec les différents types de DWNTs fonctionnalisés par le FITC (DWNTs−NH−Fluo, DWNTs−COOH@FITC, DWNTs bruts@FITC) ont également été observées. Il est intéressant d'effectuer un contrôle avec de la fluorescéine afin de suivre la molécule fluorescente lorsque celle-ci n'est pas chimiquement active (la fonction isothiocyanate du FITC pouvant réagir avec une fonction amine de protéine présente dans la cellule par exemple). Les images enregistrées en lumière blanche et en fluorescence aux longueurs d'onde d'excitation du DAPI et du FITC sont regroupées dans la **Figure 5.7**.

Lorsque les cellules B16 sont incubées avec de la fluorescéine ou du FITC (∅ + fluorescéine, ∅ + FITC), un signal de fluorescence à $\lambda_{exc}$ = 488 nm est détecté, bien que celui-ci paraisse moins intense pour la fluorescéine que pour le FITC. L'internalisation de la fluorescéine par les cellules B16 serait donc plus difficile, ce qui impliquerait que celle des DWNTs−NH−Fluo le serait également, étant donné que la fonction isothiocyanate du FITC a déjà réagi avec la fonction amine des DWNTs. Néanmoins, la fluorescéine, tout comme le FITC, semble localisée dans de petites vésicules à l'intérieur de la cellule. En effet, l'avantage de la microscopie confocale réside dans le fait que la fluorescence observée provient uniquement du plan focal dans lequel on se positionne. Donc, en réalisant la mise au point sur le noyau, de manière à avoir une intensité de fluorescence maximale pour le DAPI, nous sommes certains que toute autre fluorescence enregistrée se situera sur le même plan que le noyau, donc potentiellement à l'intérieur de la cellule.

Dans le cas des ∅ + DWNTs−NH−Fluo, les cellules présentent une fluorescence intense localisée clairement dans des vésicules à l'intérieur de la cellule. Il est certain que le FITC a pu pénétrer les cellules, mais il est impossible de visualiser par cette technique les DWNTs sur lesquels il devrait être fixé.

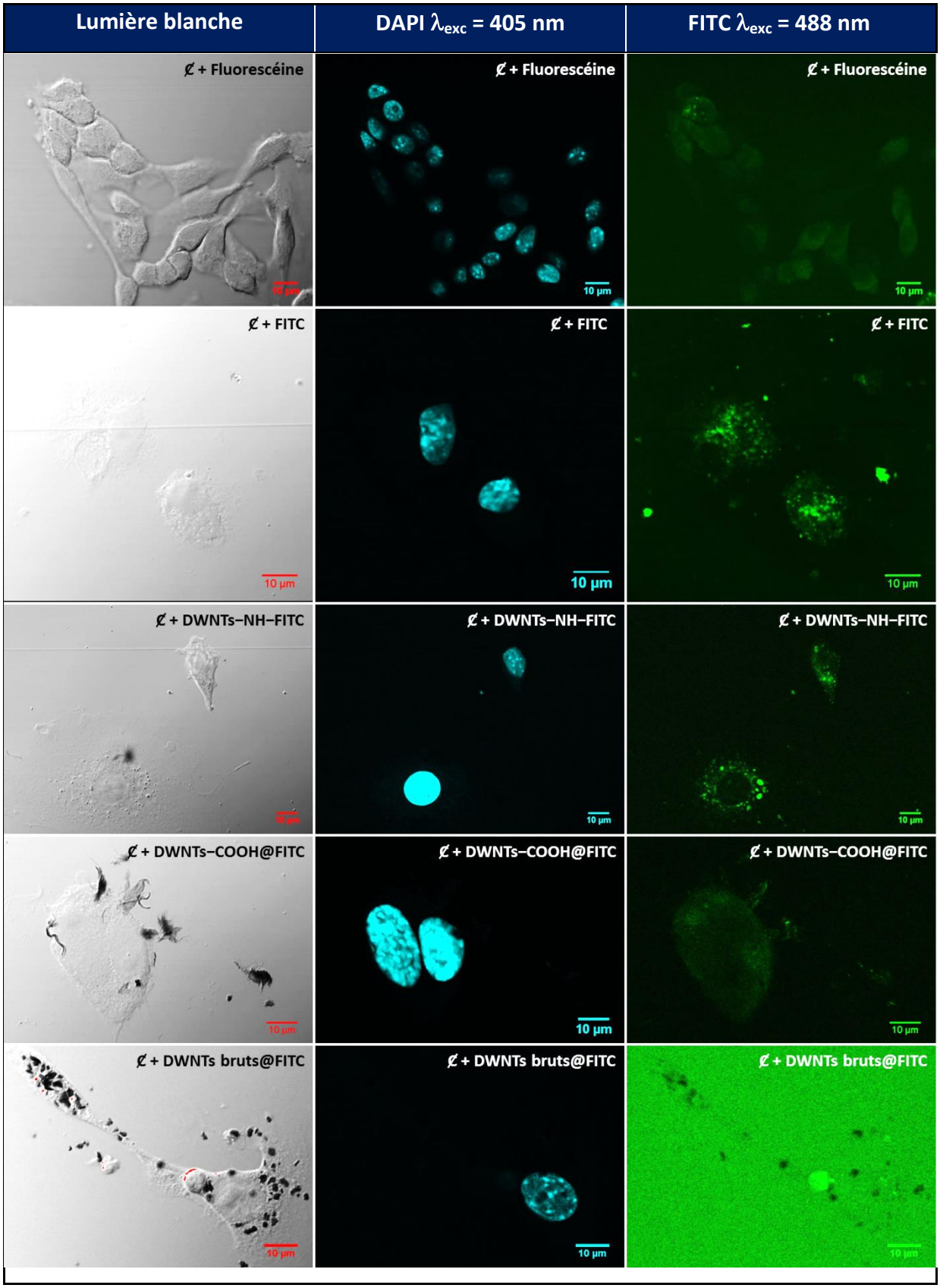



*Figure 5.7 : Images de microscopie confocale de fluorescence de préparations de cellules B16 mises en présence de fluorescéine, de FITC, de DWNTs–NH–Fluo, de DWNTs–COOH@FITC et de DWNTs bruts@FITC. Images en lumière blanche (1ère colonne) ; en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm (2ème colonne), à la longueur d'onde d'excitation du FITC $\lambda_{exc}$ = 488 nm (3ème colonne).*

Pour ce qui est des ∉ + DWNTs−COOH@FITC, des agglomérats de DWNTs accrochés à la membrane plasmique de la cellule sont observables en lumière blanche. En y regardant de plus près en fluorescence ($\lambda_{exc}$ = 488 nm), les agglomérats de DWNTs les plus fins fluorescent bien alors que ceux les plus denses bloquent la fluorescence du FITC (transfert d'énergie ou absorption). La fluorescence au niveau de la cellule est quant à elle de très faible intensité (semblable à l'autofluorescence des cellules) ce qui conduirait à penser que le FITC n'a pas pu rentrer dans la cellule, ou alors en quantité tellement faible que le phénomène d'émission de fluorescence n'est pas visualisable.

Les ∉ + DWNTs bruts@FITC révèlent une désorption massive du FITC présent initialement sur les DWNTs bruts@FITC. L'instabilité de cette combinaison associant DWNTs bruts au FITC et l'impossibilité d'exploiter de tels résultats sont une fois de plus mises en évidence.

Afin d'exploiter au mieux la microscopie confocale de fluorescence, un profil en profondeur (suivant l'axe z) a été réalisé au niveau de l'échantillon de ∉ + DWNTs−NH−Fluo sur une épaisseur de 6,08 µm (pas = 0,76 µm). Les images enregistrées tous les 0,76 µm sont présentées sur la **Figure 5.8**.

La superposition de ces photos permet alors de reconstituer une image en 3D et de rendre compte de la localisation précise de la fluorescence dans la cellule (**Figure 5.9**). Cette représentation confirme bien que la fluorescence émanant du FITC provient de vésicules à l'intérieur de la cellule, et se situant au même niveau que le noyau.

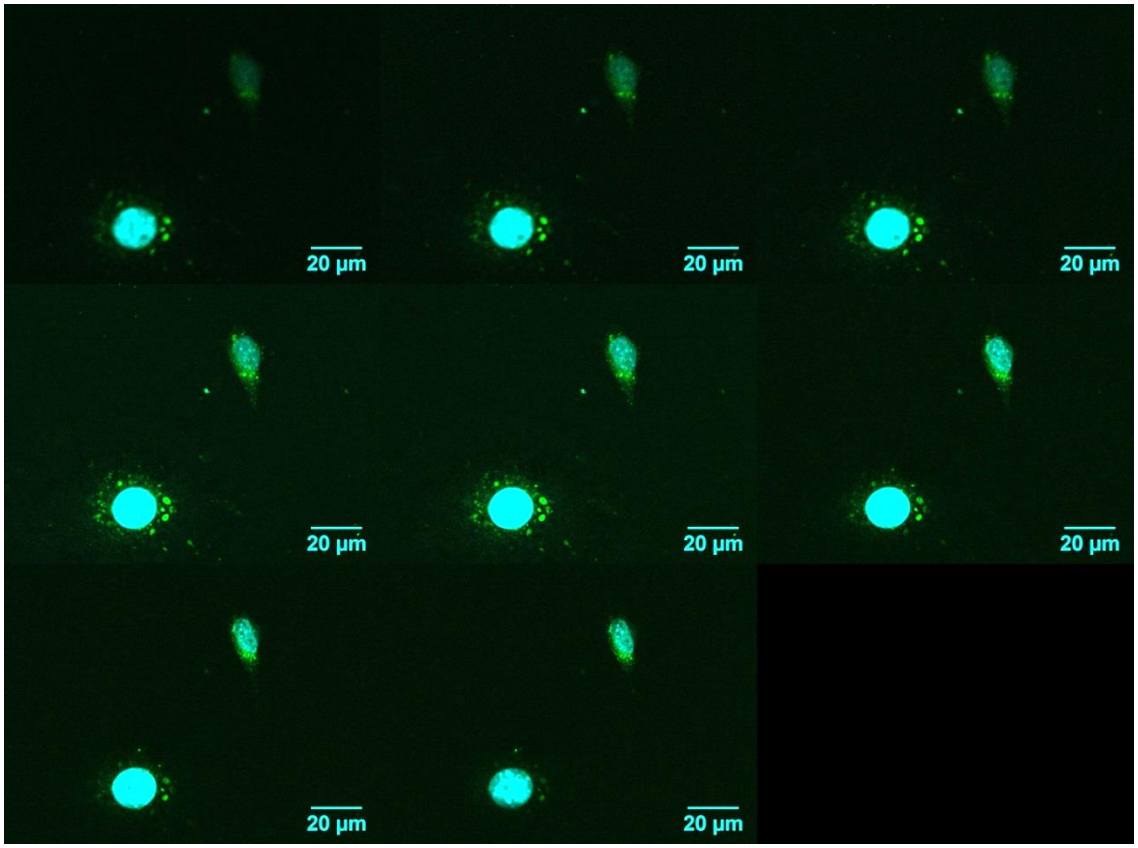



*Figure 5.8 : Profil en z réalisé par microscopie confocale de fluorescence de la préparation de cellules B16 incubées avec les DWNTs−NH−Fluo. Chacune des images a été obtenue par superposition des images enregistrées en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm et à la longueur d'onde d'excitation du FITC $\lambda_{exc}$ = 488 nm.*

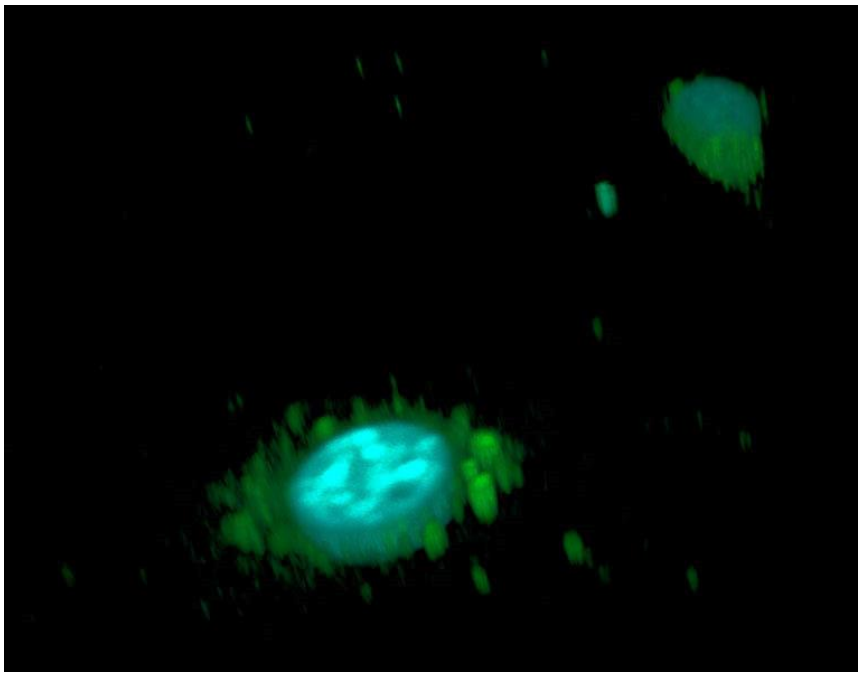


*Figure 5.9 : Représentation en 3D du profil en z réalisé par microscopie confocale de fluorescence de la préparation de cellules B16 incubées avec les DWNTs−NH−Fluo.*

### C.I.3. Fonctionnalisation par la Cy*

Les cellules B16 ont ensuite été mises en contact de la Cy*T (∅ + Cy*T) et des DWNTs fonctionnalisés de façon covalente par la Cy* (∅ + DWNTs−NH−Cy*). Les images de microscopie sont présentées sur la **Figure 5.10**.

Avec la Cy*T, beaucoup de cellules B16 sont mortes et il reste très peu de cellules à observer sur la lame. D'ailleurs, comme il est possible de le voir en lumière blanche et en fluorescence à la longueur d'excitation du DAPI, les cellules ainsi que leur noyau ont des formes anormales, ce qui signifie que la Cy*T a eu impact cytotoxique assez important sur les cellules B16. Etant donné l'allure des noyaux des cellules qui sont en train de se fragmenter, celles-ci sont en pleine apoptose **[8-9]**. Cette constatation avait déjà été établie dans le cas des cellules MCF7 (partie B.III.2). A $\lambda_{exc}$ = 488 nm, une fluorescence intense est détectée et localisée au niveau des noyaux des cellules. La pénétration de la Cy*T dans les cellules est cette fois-ci visualisable, alors qu'elle n'avait pas pu être détectée lors des observations des préparations avec les cellules MCF7.

Lorsque les cellules B16 sont mises au contact de DWNTs−NH−Cy*, quelques agglomérats de DWNTs fonctionnalisés sont visibles en lumière blanche et semblent collés aux parois des cellules. Le taux de mortalité des cellules est moins important que dans le cas de la Cy*T seule, donc la molécule serait moins cytotoxique une fois liée aux DWNTs, ce qui avait également été observé avec les MCF7. A $\lambda_{exc}$ = 488 nm, les cellules présentent une très légère fluorescence comparable à l'autofluorescence des cellules. Tout comme dans le cas des MCF7, il semble donc qu'il soit plus difficile à la Cy* de rentrer dans les cellules une fois fixée sur les DWNTs.

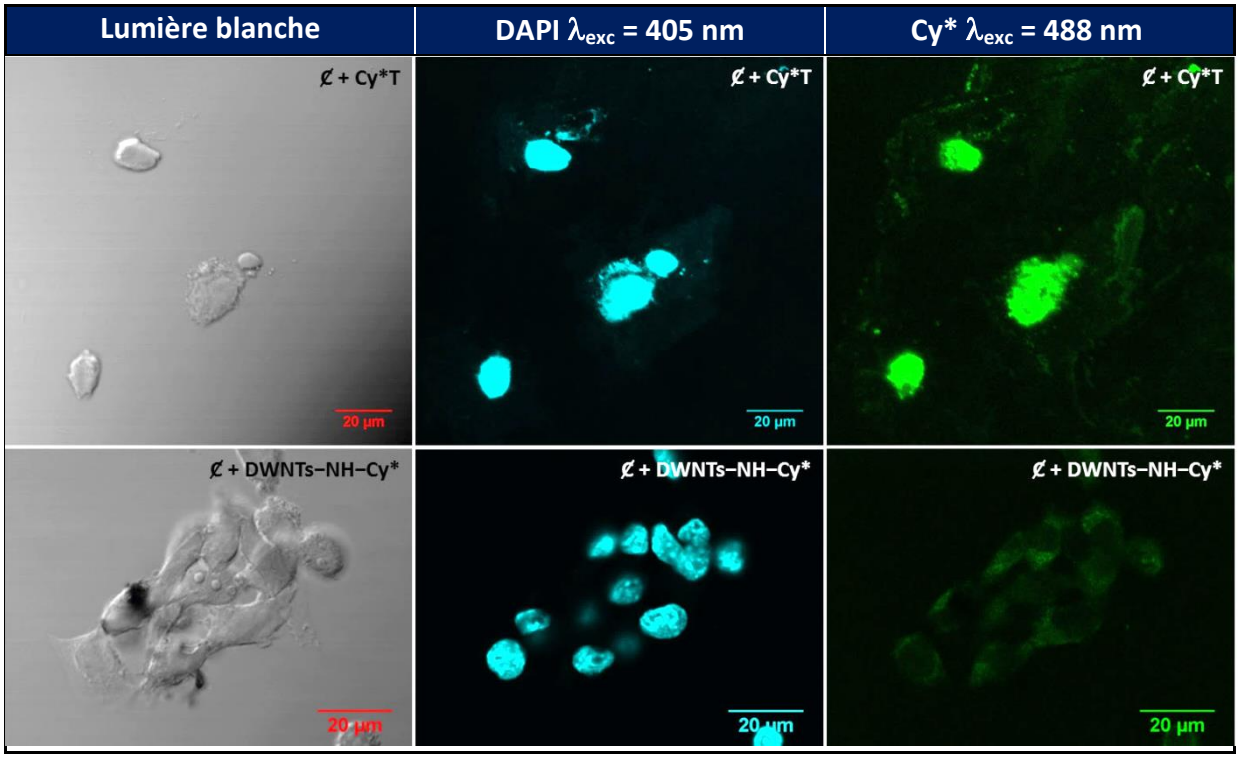



*Figure 5.10 : Images de microscopie confocale de fluorescence de préparations de cellules B16 mises en présence de Cy*T et de DWNTs–NH–Cy*. Images en lumière blanche (1ère colonne) ; en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm (2ème colonne), à une longueur d'onde d'excitation proche de celle de la Cy* $\lambda_{exc}$ = 488 nm (3ème colonne).*

### C.I.4. Fonctionnalisation par la Cy5

Les cellules B16 ont également été exposées à la Cy5 NHS Ester (ℰ + Cy5 NHS Ester) et aux DWNTs–NH–Cy5 (ℰ + DWNTs–NH–Cy5) dans les mêmes conditions expérimentales que précédemment, puis ont été observées par microscopie confocale de fluorescence (**Figure 5.11**).

Que ce soit dans le cas des ℰ + Cy5 NHS Ester ou celui des ℰ + DWNTs–NH–Cy5, une fluorescence intense est visible dans le cytoplasme de toutes les cellules à $\lambda_{exc}$ = 635 nm. Les noyaux quant à eux ne présentent que la fluorescence provenant du DAPI. Donc les molécules fluorescentes ont pu pénétrer dans les cellules B16 sous leur forme libre mais également sous leur forme liée aux DWNTs. L'hypothèse d'une éventuelle adsorption de la Cy5 NHS Ester sur les DWNTs–$NH_2$ avait été écartée suite aux résultats obtenus dans le chapitre 4. Donc la fluorescence au niveau des ℰ + DWNTs–NH–Cy5 ne proviendrait pas d'un relargage de la Cy5 dans le milieu mais bien des DWNTs–NH–Cy5. Il serait tout de même

intéressant de confirmer la présence des DWNTs à l'intérieur des cellules par une autre technique de caractérisation.

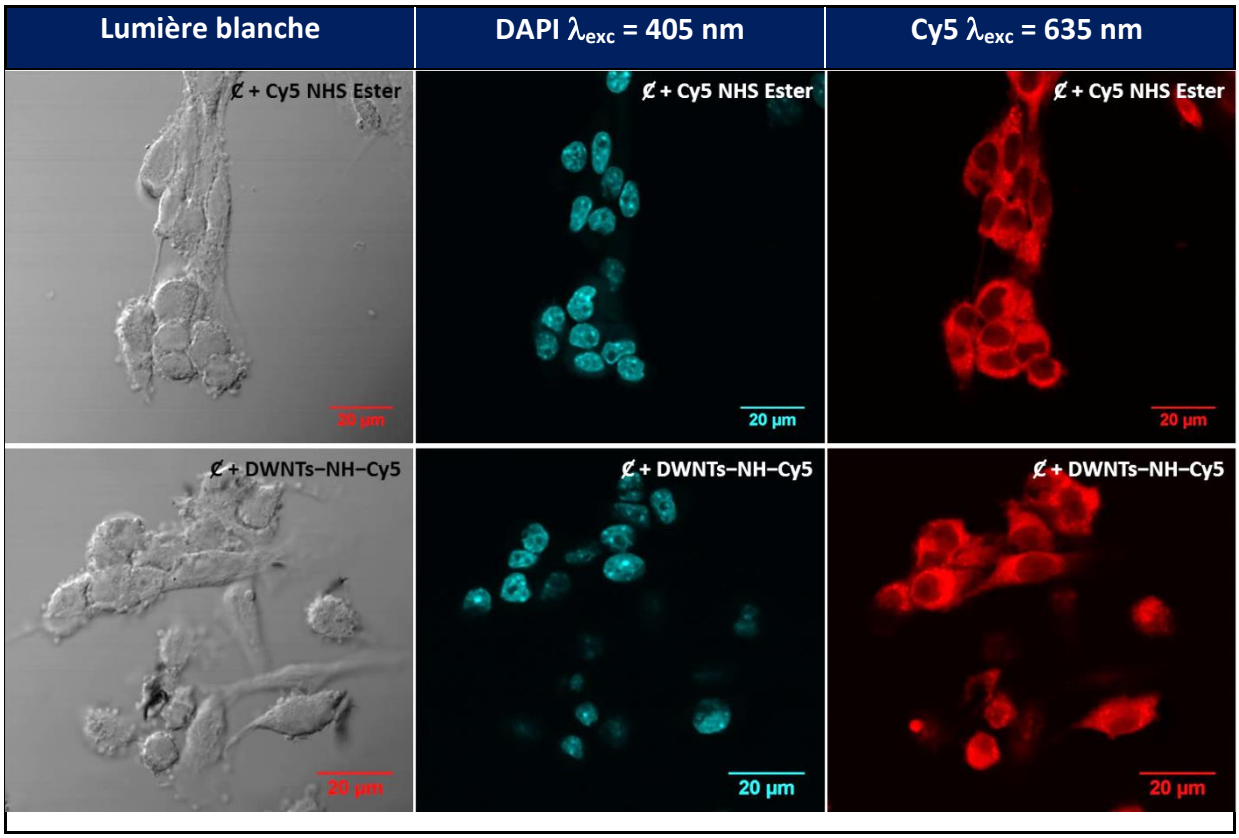



*Figure 5.11 : Images de microscopie confocale de fluorescence de préparations de cellules B16 mises en présence de la Cy5 NHS Ester et des DWNTs–NH–Cy5. Images en lumière blanche (1ère colonne) ; en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm (2ème colonne), à la longueur d'onde d'excitation de la Cy5 $\lambda_{exc}$ = 635 nm (3ème colonne).*

La microscopie confocale de fluorescence, utilisée pour l'observation des cellules B16 ayant incubé avec les fluorophores ainsi que les DWNTs fonctionnalisés par ces molécules, a permis de mettre en évidence que la fluorescence qui avait été détectée par microscopie de fluorescence à champ large était bien située à l'intérieur des cellules.

Concernant les DWNTs fonctionnalisés par le FITC, c'est avec les DWNTs fonctionnalisés de façon covalente (DWNTs–NH–Fluo) que la fluorescence, d'intensité assez élevée, a pu être localisée assez facilement dans les cellules et permettre ainsi une reconstitution tridimensionnelle probante.

Les DWNTs–NH–Cy* quant à eux ne laissent entrevoir aucune fluorescence dans les cellules B16 pouvant provenir de la Cy*, comme cela avait déjà été le cas avec les cellules

MCF7. De ce fait, ce fluorophore ne semble pas le plus adapté pour la détection des DWNTs *in vitro*.

Les DWNTs−NH−Cy5 constituent eux-aussi d'excellents candidats pour la détection in vitro, une fluorescence intense étant visualisable dans toutes les cellules.

D'autre part, que ce soit dans le cas des B16 ou des MCF7, le FITC est localisé préférentiellement dans des vésicules, alors que la Cy5 apparait quant à elle dans tout le cytoplasme ce qui signifierait que des voies d'internalisation différentes seraient empruntées.

Enfin, il ne faut pas exclure une désorption du FITC présent sur les DWNTs−NH−Fluo qui aurait alors pu être internalisé par les cellules sous sa forme libre. Il avait été conclu au chapitre 4 que dans les cas des DWNTs fonctionnalisés par la Cy* et la Cy5, seule la fonctionnalisation covalente avait été mise en jeu, donc une potentielle désorption de la Cy5 NHS Ester des DWNTs−NH−Cy5 semble moins plausible. Cependant, la présence des DWNTs à l'intérieur des cellules reste à mettre en évidence afin d'effectuer une co-localisation de la fluorescence et des DWNTs et ainsi démontrer que les DWNTs fonctionnalisés ont bien été internalisés par les cellules.

## C.II. Mise en évidence de la présence des DWNTs par microscopie confocale Raman

Afin de déterminer si les DWNTs sont bien situés à l'intérieur des cellules, la technique de Raman confocal a été utilisée pour les détecter, les DWNTs ayant une signature bien caractéristique et intense en Raman **[10-11]**.

Dans un premier temps, les conditions expérimentales de détection des DWNTs *in vitro* ont été recherchées avec la collaboration de Pascal Puech de l'équipe Nanomatériaux au CEMES. Puis dans un second temps, une fois ces conditions déterminées, nous avons réalisé des profils en z et des cartographies par microscopie confocale Raman des mêmes cellules précédemment observées par microscopie confocale de fluorescence afin de recouper les informations obtenues par ces deux techniques.

## C.II.1. Analyse des cellules MCF7

### *C.II.1.a. Recherche des conditions opératoires*

La caractérisation des échantillons de DWNTs par spectroscopie Raman, réalisée au CIRIMAT, est habituellement effectuée à l'aide du laser rouge de longueur d'onde $\lambda = 633$ nm (Chapitre2, partie E.I.1). Nous avons donc décidé de partir sur les mêmes paramètres que ceux précédemment utilisés. Sur une préparation de cellules MCF7 incubées avec des DWNTs−COOH, un profil en z a été réalisé au niveau d'une cellule (point d'analyse signalé par un carré rouge sur la **Figure 5.12**), et ce, sur une épaisseur de 30 µm, un spectre étant enregistré tous les 5 µm. Sur une épaisseur de 30 µm, il est certain que la cellule a été traversée de part en part, et donc qu'un signal potentiel caractéristique de la cellule puisse être détecté.

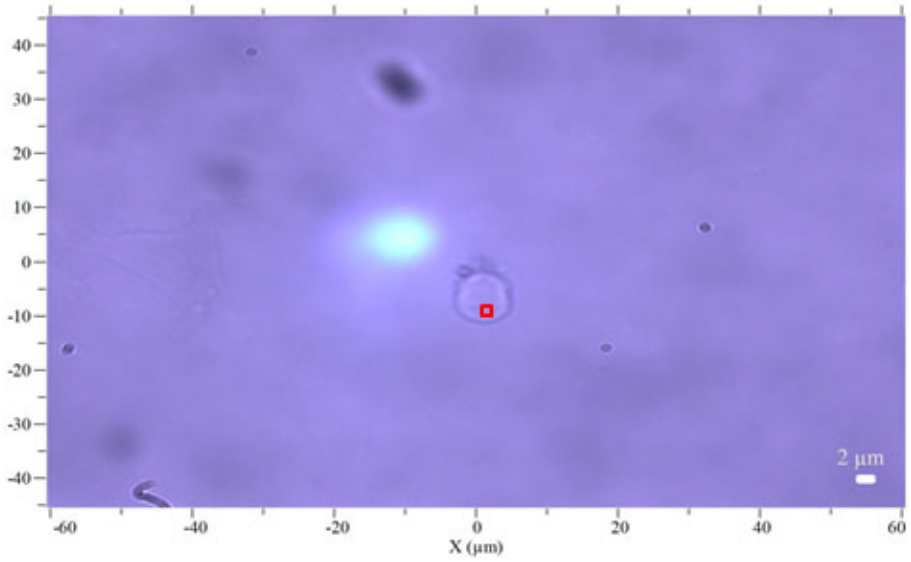



*Figure 5.12 : Image enlumière balnche montrant la zone analysée (carré rouge) par microscopie confocale Ramanau niveau d'une cellule d'une préparation de cellules MCF7 mises en présence de DWNTs−COOH.*

Les spectres successifs obtenus de ce profil en z sont présentés sur la **Figure 5.13 (a)**. On peut observer une bande très peu intense à 1060 $cm^{-1}$ présente sur tous les spectres ce qui signifie qu'elle est plutôt liée au milieu de montage qu'à la cellule. A 2916 $cm^{-1}$, une autre bande très peu intense apparait sur les spectres de 50 à 60 µm correspondant à des élongations de liaison C−H de C $sp^3$. Cette bande pourrait être caractéristique de la cellule, cependant, le signal reste tout de même très faible et les spectres dérivent fortement ce qui rend les traitements ultérieurs des données plus compliqués et approximatifs.

Par conséquent, une analyse identique a été réitérée mais en utilisant un laser plus énergétique à une longueur d'onde de $\lambda$ = 532 nm (**Figure 5.13. b**).

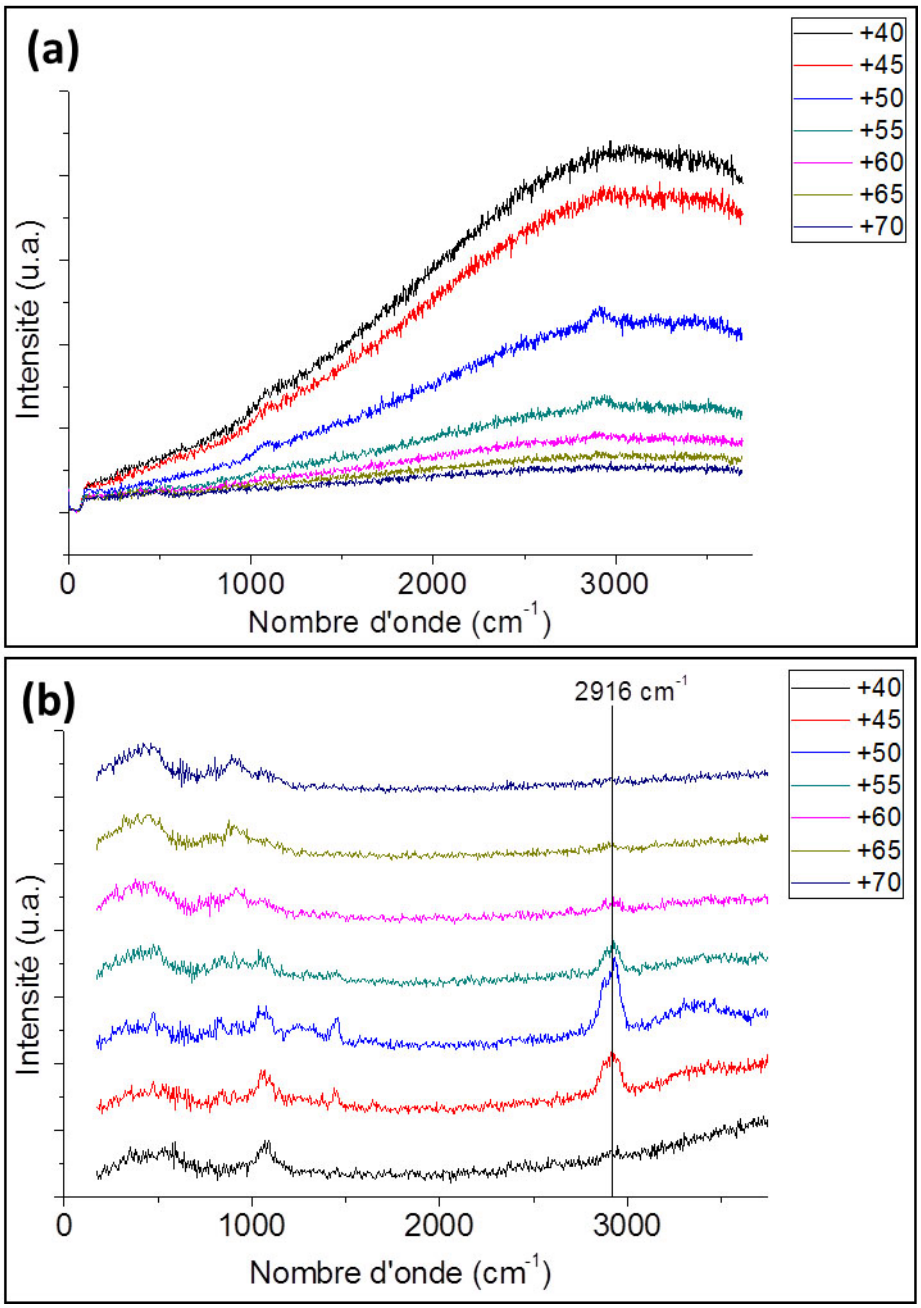



*Figure 5.13 : Spectres Raman enregistrés lors d'un profil en z au niveau d'une cellule MCF7 incubée avec des DWNTs–COOH (Figure 5.12) avec un laser de longueur d'onde (a) $\lambda$ = 633 nm et (b) $\lambda$ = 532 nm.*

En effet, avec le laser à 532 nm, le signal précédemment décelé à 2916 $cm^{-1}$ est à présent nettement plus intense et visible entre 55 et 45 µm, soit une épaisseur de 10 µm ce qui correspondrait tout à fait à l'épaisseur de la cellule. Lors de profils en z ou de cartographies, la présence ou l'absence de cette bande sur le spectre Raman permettra ainsi

à l'observateur de déterminer s'il se situait respectivement à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule.

Cette comparaison entre les signaux recueillis avec les lasers rouge (λ = 633 nm) et vert (λ = 532 nm) a été répétées sur une autre zone de cette même cellule MCF7 incubées avec des DWNTs−COOH (carré rouge sur la **Figure 5.14**).

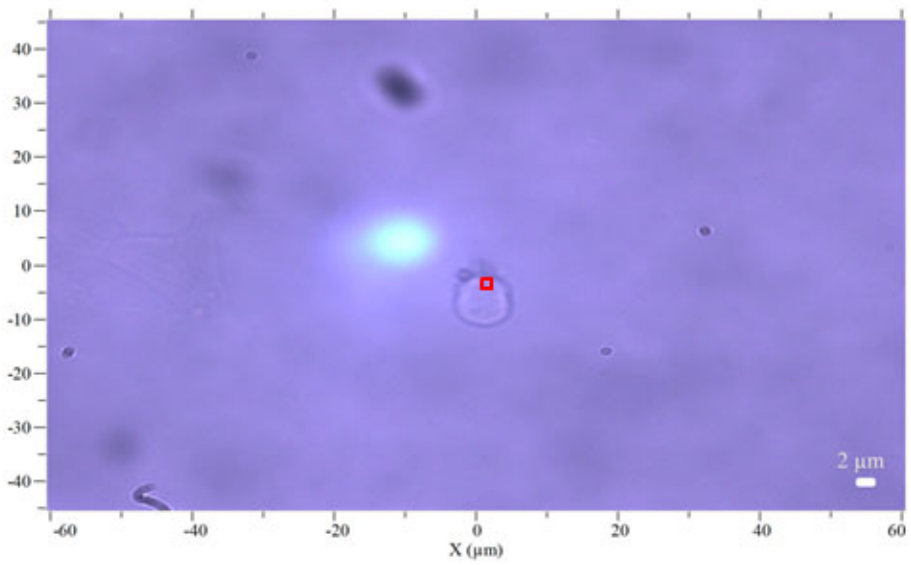



*Figure 5.14 : Image en lumière blanche montrant la zone analysée (carré rouge) par microscopie confocale Ramanau niveau d'une cellule d'une préparation de cellules MCF7 mises en présence de DWNTs−COOH.*

Les spectres enregistrés au cours du profil en z sont regroupés sur la **Figure 5.15** en **(a)** pour le laser rouge (λ = 633 nm) et en **(b)** pour le laser vert (λ = 532 nm). Dans les deux cas, il est possible d'observer deux bandes à 1578 et 2666 $cm^{-1}$ correspondant respectivement aux bandes G et G' des DWNTs sur cette zone de la cellule. A λ = 633 nm (**Figure 5.15. a**), le signal précédemment détecté à 2916 $cm^{-1}$, caractéristique de la cellule, est à peine perceptible. Cependant, à λ = 532 nm (**Figure 5.15. b**), ce même signal de la cellule est clairement visible.

Ainsi, en utilisant le laser à 532 nm, sont détectables à la fois les bandes spécifiques aux DWNTs et aux cellules et ce qui rend alors possible la localisation des DWNTs par rapport aux cellules.

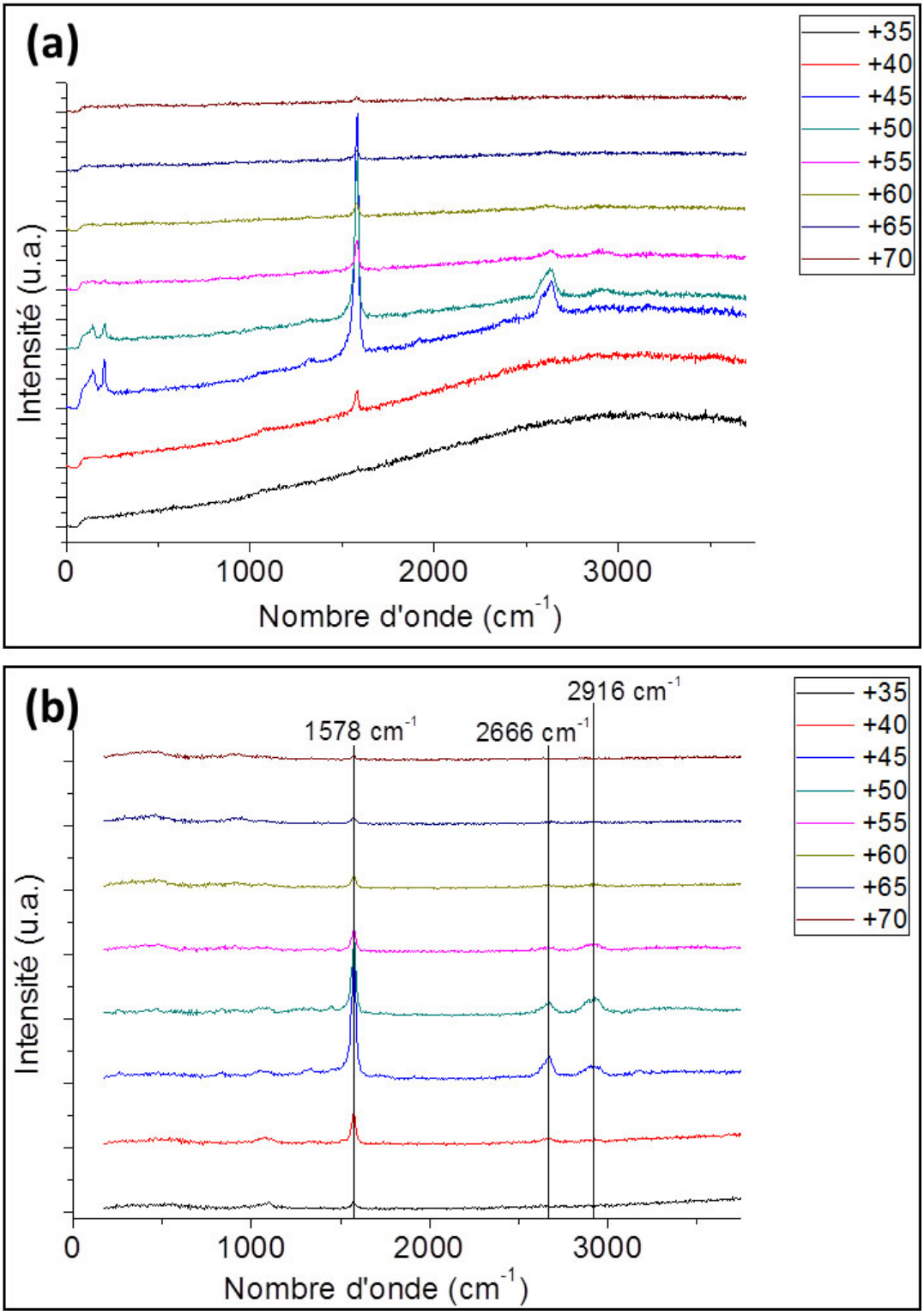



*Figure 5.15 : Spectres Raman enregistrés lors d'un profil en z au niveau d'une cellule MCF7 incubée avec des DWNTs–COOH (Figure 5.14) avec un laser de longueur d'onde (a) $\lambda$ = 633 nm et (b) $\lambda$ = 532 nm.*

### *C.II.1.b. Profils en z*

En utilisant les spectres enregistrés précédemment, dans les conditions déterminées et détaillées dans la partie E.IV.3 du chapitre 2, et attestant de la présence simultanée des DWNTs et de la cellule, peuvent alors être tracées des courbes décrivant l'intensité d'une bande particulière en fonction de la profondeur de l'analyse. Ces courbes, ou profils en z, ont ainsi été réalisées à la fois pour la bande G des DWNTs et la bande caractéristique de la cellule (**Figure 5.16**).

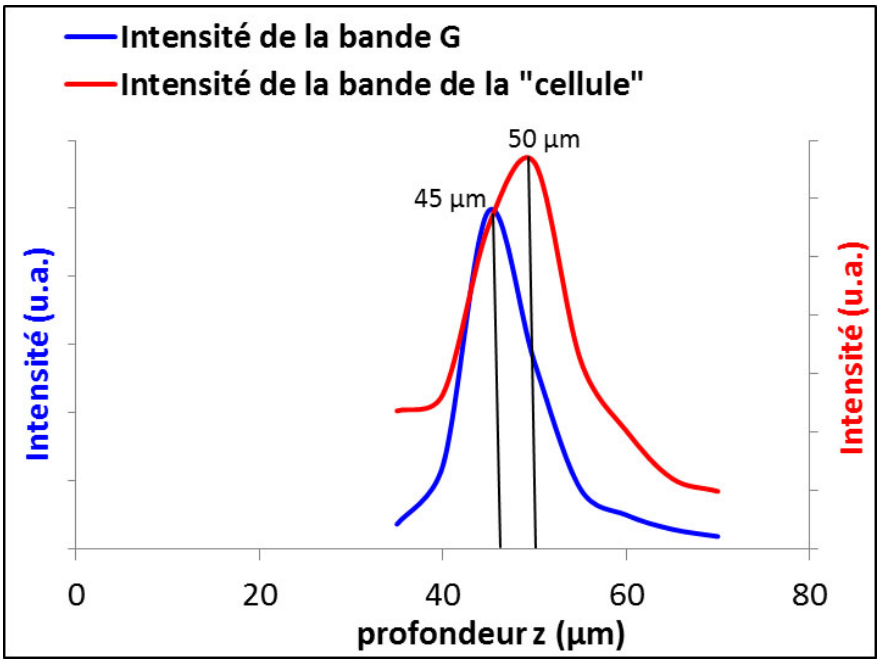



*Figure 5.16 : Profils en z (Intensité de bande = f (profondeur z)) au niveau d'une cellule MCF7 incubée avec des DWNTs–COOH (Figure 5.14) par rapport à la bande G (en bleu) et par rapport à la bande de la cellule (en rouge) à λ = 532 nm.*

Ces deux profils indiquent que les maxima d'intensité des bandes G et de la cellule sont atteints respectivement à 45 et 50 µm, soit à 5 µm d'écart. Sur ce point précis de la cellule, dès qu'il y a un signal de DWNTs, celui-ci est accompagné du signal de la cellule. Cela signifie donc que les DWNTs ont été internalisés par la cellule, et qu'ils ne se situent pas exactement au centre de la cellule mais plutôt en périphérie (écart de 5 µm).

La microscopie confocale Raman permet donc à la fois de détecter les DWNTs en milieu cellulaire et de les situer par rapport aux cellules observées.

## C.II.2. Analyse des cellules B16

La combinaison des microscopies confocales de fluorescence et Raman permettrait, en analysant exactement les mêmes cellules, de recouper les résultats obtenus par chacune des méthodes, c'est-à-dire de déterminer si les signaux caractéristiques des DWNTs (Raman) sont directement corrélés aux signaux de fluorescence, donc des fluorophores. Il serait alors possible d'en déduire si la fluorescence observée dans les cellules provient des fluorophores greffés aux DWNTs ou de fluorophores qui se seraient désorbés de la surface des DWNTs.

### *C.II.2.a. Profils en z*

Le premier essai a été réalisé sur une préparation de cellules B16 mises au contact de DWNTs−NH−Fluo. La cellule précédemment observée en microscopie confocale de fluorescence (**Figures 5.8-5.9 et 5.17. a-b**) a été repérée en transmission par microscopie confocale Raman (**Figures 5.17. c**). Les contours de la cellule et du noyau ont été entourés en noir, la cellule étant difficilement discernable en transmission.

Un profil en z, sur une profondeur de 60 µm avec un pas de 5 µm, a par la suite été réalisé au niveau du point vert visible sur l'image de la **Figure 5.17 (c)** et correspondant à un spot de fluorescence au niveau d'une vésicule de la cellule (**Figure 5.17. b**). L'ensemble des spectres enregistrés au cours de ce profil en z ont été regroupés sur la **Figure 5.18**. Nous pouvons constater que la bande G des DWNTs et la bande caractéristique des cellules sont toutes deux présentes sur ces spectres.

Le tracé des intensités de ces bandes en fonction de la profondeur permettra de situer à quel(s) niveau(x) est (sont) obtenue(s) les intensités maximales des deux bandes en question (**Figure 5.19**). Les profils en z des bandes G et de la cellule révèlent des maxima d'intensité respectivement à 12,8 et 17,8 µm. Comme dans le cas précédent des cellules MCF7 incubées avec les DWNTs−COOH, les deux profils sont quasiment superposés, donc le signal des DWNTs est accompagné du signal de la cellule sur ce point précis. Les DWNTs ont ainsi bien été internalisés par la cellule. Par conséquent, la fluorescence observée est directement reliée à la présence des DWNTs dans la cellule, ce qui signifie que la fluorescence provient bien des DWNTs−NH−Fluo et non des molécules de FITC qui se seraient désorbées des parois des DWNTs.

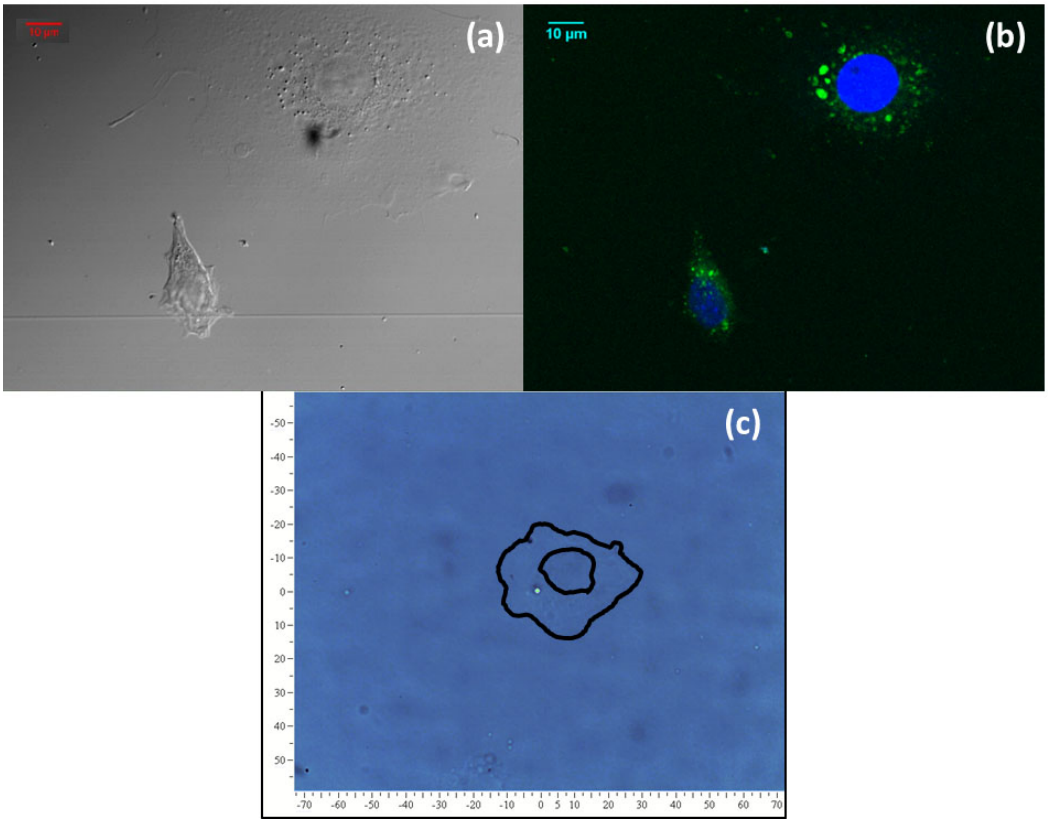



*Figure 5.17 : Images de microscopie confocale de fluorescence et Raman de préparations de cellules B16 mises en présence des DWNTs−NH−Fluo. Images de microscopie confocale de fluorescence (a) en lumière blanche ; (b) en fluorescence, superposition des images enregistrées aux longueurs d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 405 nm et du FITC $\lambda_{exc}$ = 488 nm, et (c)en lumière blanche de la zone observée en microscopie confocale Raman.*

En outre, l'intensité maximale de la bande G est un petit peu décalée par rapport à celle de la bande de la cellule (5 µm), donc les DWNTs ne se situent pas exactement au centre de la cellule, ce qui serait en accord avec les observations réalisées par microscopie de fluorescence : les DWNTs−NH−Fluo seraient accumulés dans des vésicules situées plutôt en périphérie de la cellule.

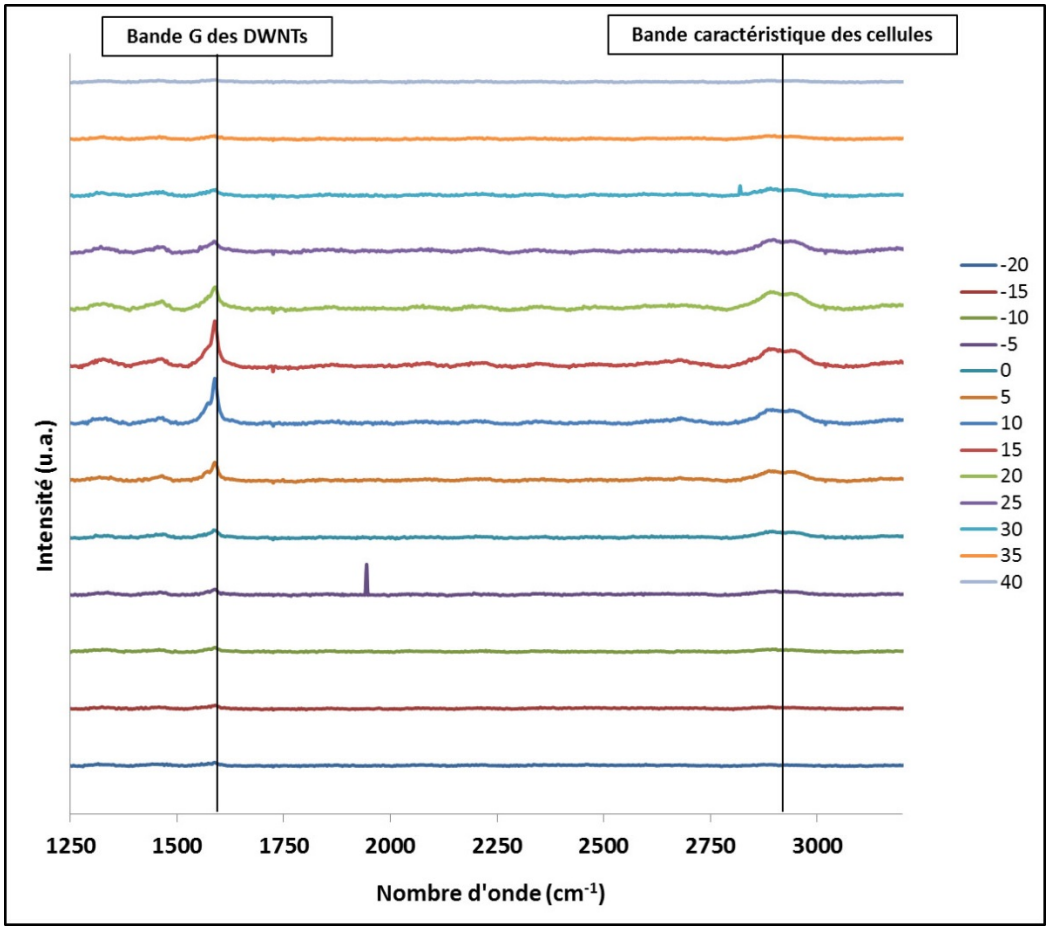



*Figure 5.18 : Spectres Raman enregistrés lors du profil en z au niveau d'une cellule B16 incubée avec des DWNTs–NH–Fluo (Figure 5.17) avec le laser vert de longueur d'onde $\lambda$ = 532 nm.*

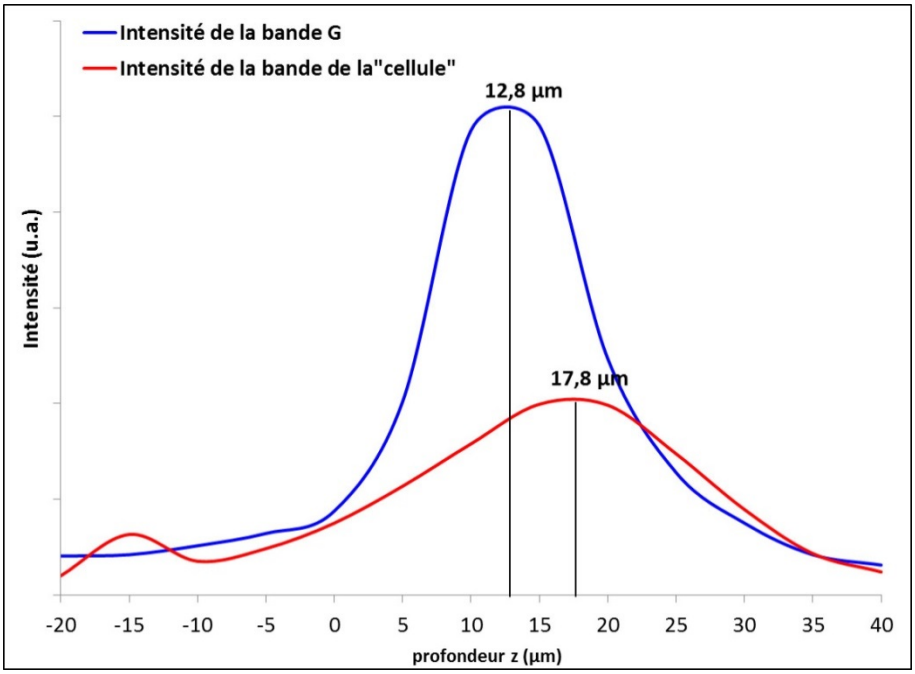



*Figure 5.19 : Profils en z (Intensité de bande = f (profondeur z)) au niveau d'une cellule B16 incubée avec des DWNTs–NH–Fluo (Figure 5.17) par rapport à la bande G (en bleu) et par rapport à la bande de la cellule (en rouge) à $\lambda$ = 532 nm.*

### *C.II.2.b. Cartographies*

En utilisant les mêmes conditions expérimentales d'analyse (Chapitre 2, partie E.IV.3), la réalisation de cartographies par spectroscopie confocale Raman a été entreprise sur des cellules B16 incubées avec des DWNTs−NH−Cy5 précédemment observées par microscopie confocale de fluorescence. Une fois que les mêmes cellules ont été repérées (**Figure 5.11 et 5.20 a-c**), une zone à cartographier est sélectionnée (cadre rouge sur la **Figure 5.20**) afin de réaliser une analyse en fonction de l'axe z (profondeur) avec un pas de 5 µm. L'intensité du signal obtenu correspond à l'ensemble du spectre Raman sur toute la plage de nombre d'onde analysée (1500 – 3100 $cm^{-1}$).

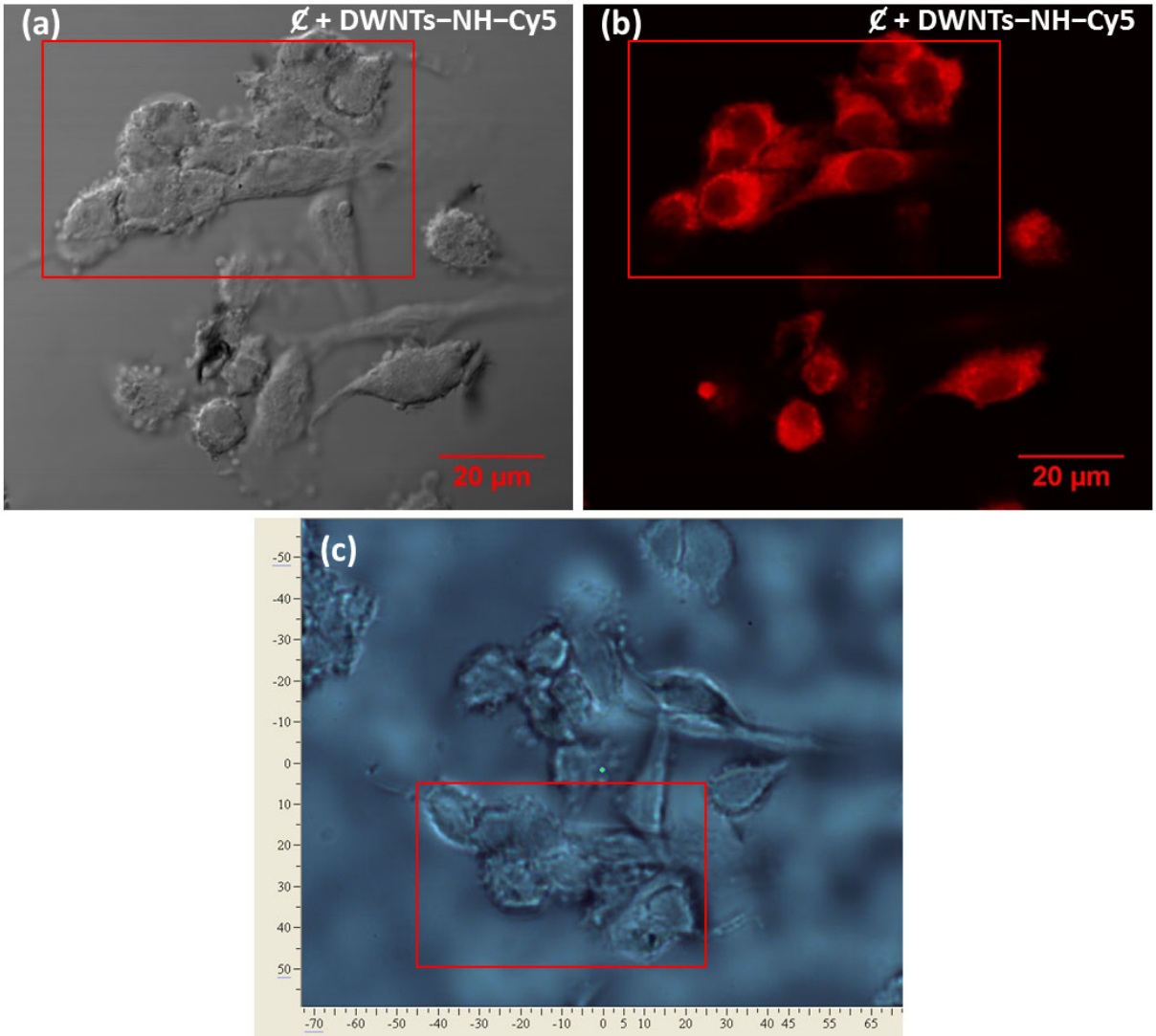



*Figure 5.20 : Images de microscopie confocale de fluorescence et Raman de préparations de cellules B16 mises en présence des DWNTs−NH−Cy5. Images de microscopie confocale de fluorescence (a) en lumière blanche ; (b) en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation de la Cy5 $\lambda_{exc}$ = 635 nm, et (c) de microscopie confocale Raman en transmission (image inversée à1 180°).*

Les cartes obtenues en fonction du plan focal observé ont été regroupées sur la **Figure 5.21**. Les formes des cellules commencent à être visibles à partir de z = -5 µm, puis sont de mieux en mieux définies jusqu'à z = +10 µm, pour finalement devenir plus en plus floues jusqu'à z = +20 µm. Des spots, d'intensité beaucoup plus élevée, sont également visibles sur la même gamme de z. Il reste à vérifier à partir des spectres Raman à quoi correspondent ces formes et ces différences d'intensité sur les cartes.

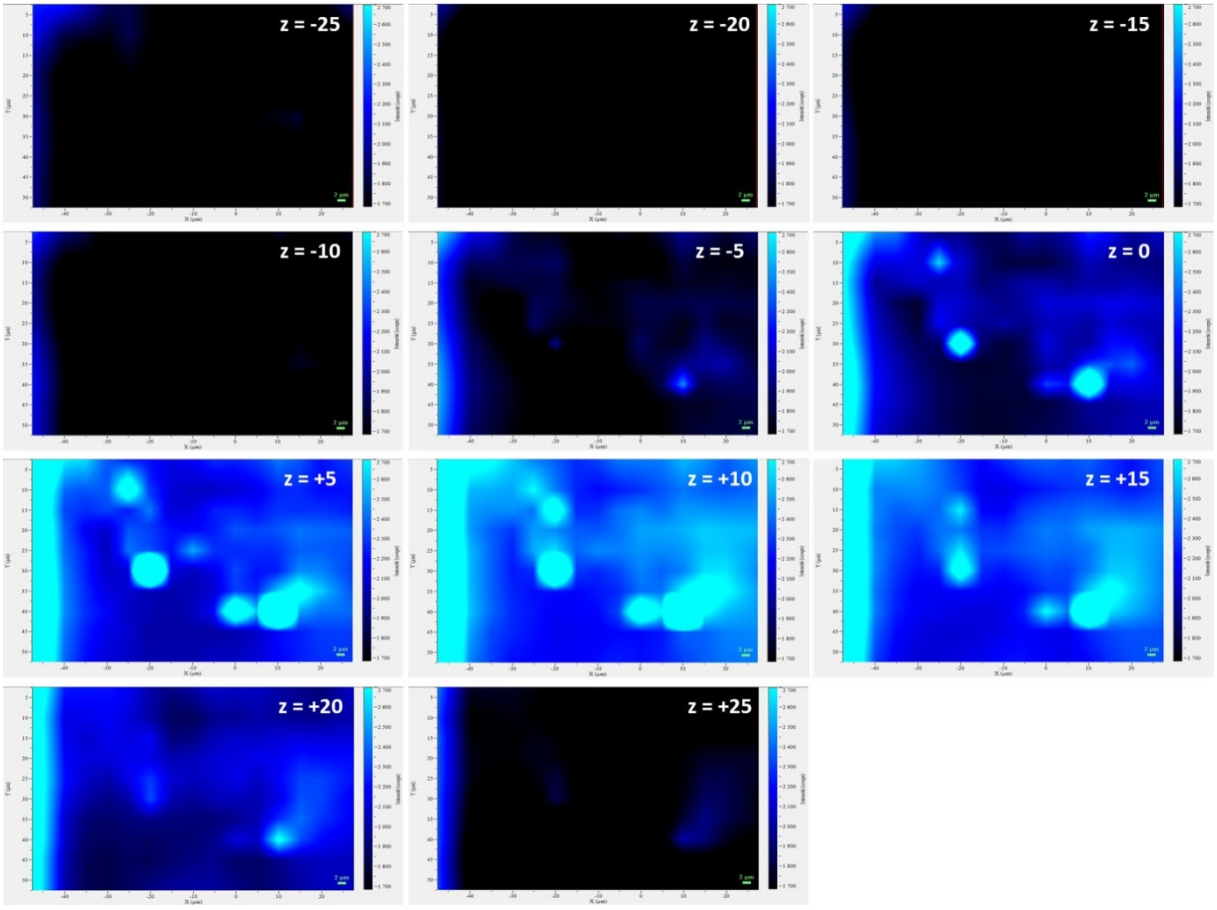



*Figure 5.21 : Cartographies obtenues par microscopie confocale Raman à λ = 532 nm d'une préparation de cellules B16 mises en présence des DWNTs–NH–Cy5 (Figure 5.20. c).*

En comparant la zone observée en transmission (**Figure 5.22. a**) à la carte obtenue à z = 0 (**Figure 5.22. b**), nous avons relevé les spectres Raman au niveau de deux points bien précis : au niveau de la zone de faible intensité en bleu moyen (croix orange), et au niveau de l'un des spots de très forte intensité (croix rouge). Les spectres correspondant sont présentés sur la **Figure 5.23**.

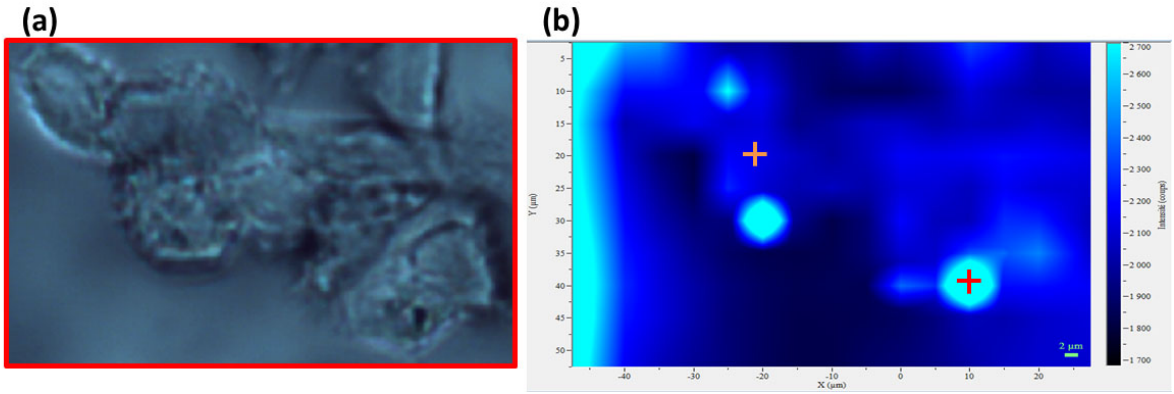



*Figure 5.22 : Comparaison de l'image enregistrée en transmission et de la cartographie correspondante obtenue (z = 0) par microscopie confocale Raman à λ = 532 nm d'une préparation de cellules B16 mises en présence des DWNTs−NH−Cy5 (Figure 5.20. c).*

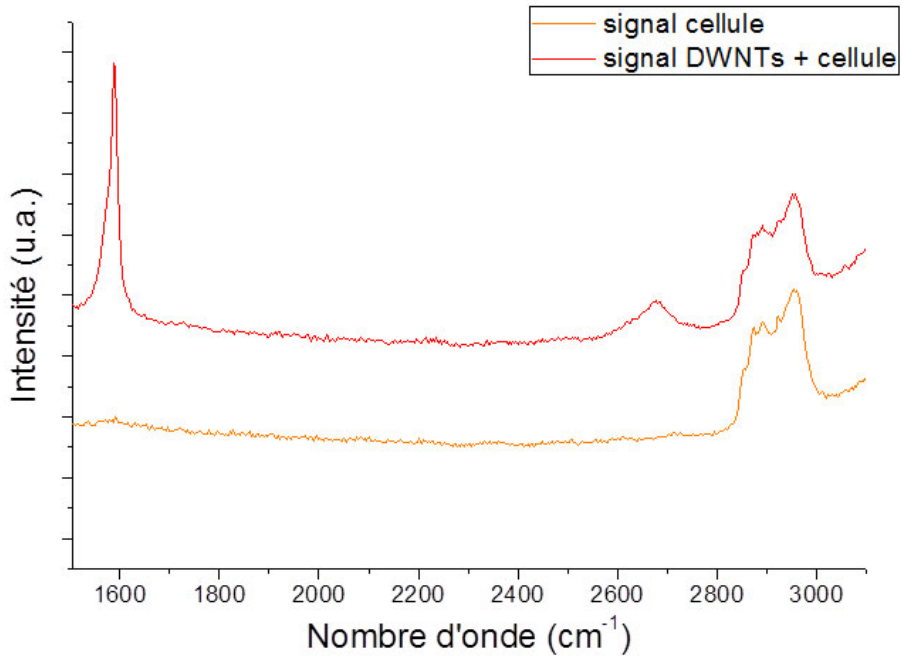



*Figure 5.23 : Spectres Raman à λ = 532 nm correspondant aux zones marquées de croix orange et rouge de la cartographie (Figure 5.20) effectuée au niveau d'une cellule B16 ayant incubée avec des DWNTs−NH−Cy5.*

On observe ainsi qu'au niveau de la croix orange seule la bande de la cellule est présente. Donc le signal, de faible à moyenne intensité, repéré sur les cartes et redessinant les formes des cellules, correspond uniquement au signal des cellules. Pour ce qui est du spectre enregistré au niveau de la croix rouge, la bande G ainsi que celle de la cellule sont clairement visibles. Ces spots de forte intensité correspondent ainsi à l'accumulation des signaux des DWNTs−NH−Cy5 et des cellules. Cela signifie que les DWNTs ne seraient pas

présents partout dans les cellules mais seulement au niveau de quelques points bien délimités. Cette constatation est en contradiction avec les observations faites en microscopie confocale de fluorescence qui montrait que la Cy5 était présente dans toutes les cellules et de façon assez homogène dans tout le cytoplasme. Donc la grande majorité de la fluorescence observée sur les cellules B16 incubées avec les DWNTs−NH−Cy5 proviendrait non pas des DWNTs−NH−Cy5, qui auraient pénétré dans les cellules et se seraient répartis dans tout le cytoplasme, mais des molécules de Cy5 seules. De ce fait, nous pouvons en déduire que des molécules de Cy5 seraient détachées des parois des DWNTs peut-être suite à une coupure enzymatique. De plus, l'observation de fluorescence par microscopie, après incubation de cellules avec des DWNTs−NH−Cy5, ne signifie pas forcément qu'elle provient des NTCs fonctionnalisés mais probablement des molécules seules qui se sont détachées.

En conclusion, nous avons pu montrer que les techniques de microscopies confocales de fluorescence et Raman sont tout à fait complémentaires. Bien que cela soit plutôt fastidieux, en analysant exactement les mêmes cellules par les deux types de microscopie, il est possible de recouper les signaux de fluorescence et Raman et ainsi en déduire si la fluorescence provient bien des DWNTs fonctionnalisés par les fluorophores ou des molécules fluorescentes qui se seraient détachées.

## D. Détection de l'autofluorescence des DWNTs *in vitro* par microscopie bi-photonique de fluorescence

Outre l'utilisation combinée des techniques de microscopie confocale Raman et de fluorescence, afin de visualiser les DWNTs fonctionnalisés par des fluorophores dans les cellules, nous avons eu l'opportunité de pouvoir observer les différentes suspensions de DWNTs ainsi que les préparations de cellules B16 incubées avec ces mêmes suspensions par microscopie bi-photonique de fluorescence. Ce type de microscopie, dont le principe a été décrit dans la partie E.IV.4 du chapitre 2, a déjà montré son intérêt au niveau des NTCs en révélant leur autofluorescence. En effet, une étude réalisée *in vivo* avec des MWNTs non fonctionnalisés sur des racines de blé a montré qu'il était possible de détecter et de visualiser directement les MWNTs dans le milieu biologique **[12]**. Cependant, cette méthode de détection des NTCs a été très peu approfondie (appareil peu répandu, coût assez élevé de

l'analyse). Notre collaboration avec Muriel Golzio et Elizabeth Bellard de l'équipe de Biophysique Cellulaire à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS, Toulouse) nous a permis de tester la microscopie bi-photonique sur nos échantillons de DWNTs.

## D.I. Recherche des conditions optimales d'observation

Dans un premier temps, les meilleures conditions expérimentales ont été recherchées afin de pouvoir visualiser au mieux les DWNTs par microscopie bi-photonique de fluorescence. Sachant que cette technique est basée sur l'absorption simultanée de deux photons par une molécule, les photons en question doivent avoir chacun une énergie égale à la moitié de l'énergie nécessaire afin d'exciter la molécule, c'est-à-dire $\lambda_{photon} \approx 2 \times \lambda_{excitation}$. La gamme de longueurs d'onde utilisable avec le laser pulsé à disposition est comprise entre 690 et 900 nm.

Sur une suspension de DWNTs bruts a été effectué un spectre d'excitation biphotonique et les DWNTs ont alors été observés sur deux bandes d'émission : l'une correspondant aux $\lambda_{ém}$ comprises entre 430 à 485 nm, et l'autre aux $\lambda_{ém}$ comprises entre 500 et 550 nm. Les images enregistrées dans chacune de ces conditions ont été regroupées sur la **Figure 5.24**.

Quelle que soient les longueurs d'onde d'excitation utilisées et la gamme d'émission observée, les DWNTs bruts sont visibles et donc auto-fluorescents. Il est ainsi bien possible de visualiser des DWNTs non fonctionnalisés grâce à leur autofluorescence. En outre, l'état d'agglomération des DWNTs ne semble pas influencer l'intensité de l'autofluorescence, ce qui n'était pas le cas avec la microscopie de fluorescence à un photon (blocage de la fluorescence des fluorophores par les agglomérats denses de DWNTs).

La meilleure réponse est obtenue dans les deux gammes d'émission à une longueur d'onde d'excitation de 880 nm. Par conséquent, c'est à cette $\lambda_{exc}$ = 880 nm que toutes les analyses ultérieures ont été réalisées sur les diverses suspensions de DWNTs et les préparations cellulaires afin de pouvoir détecter les DWNTs.

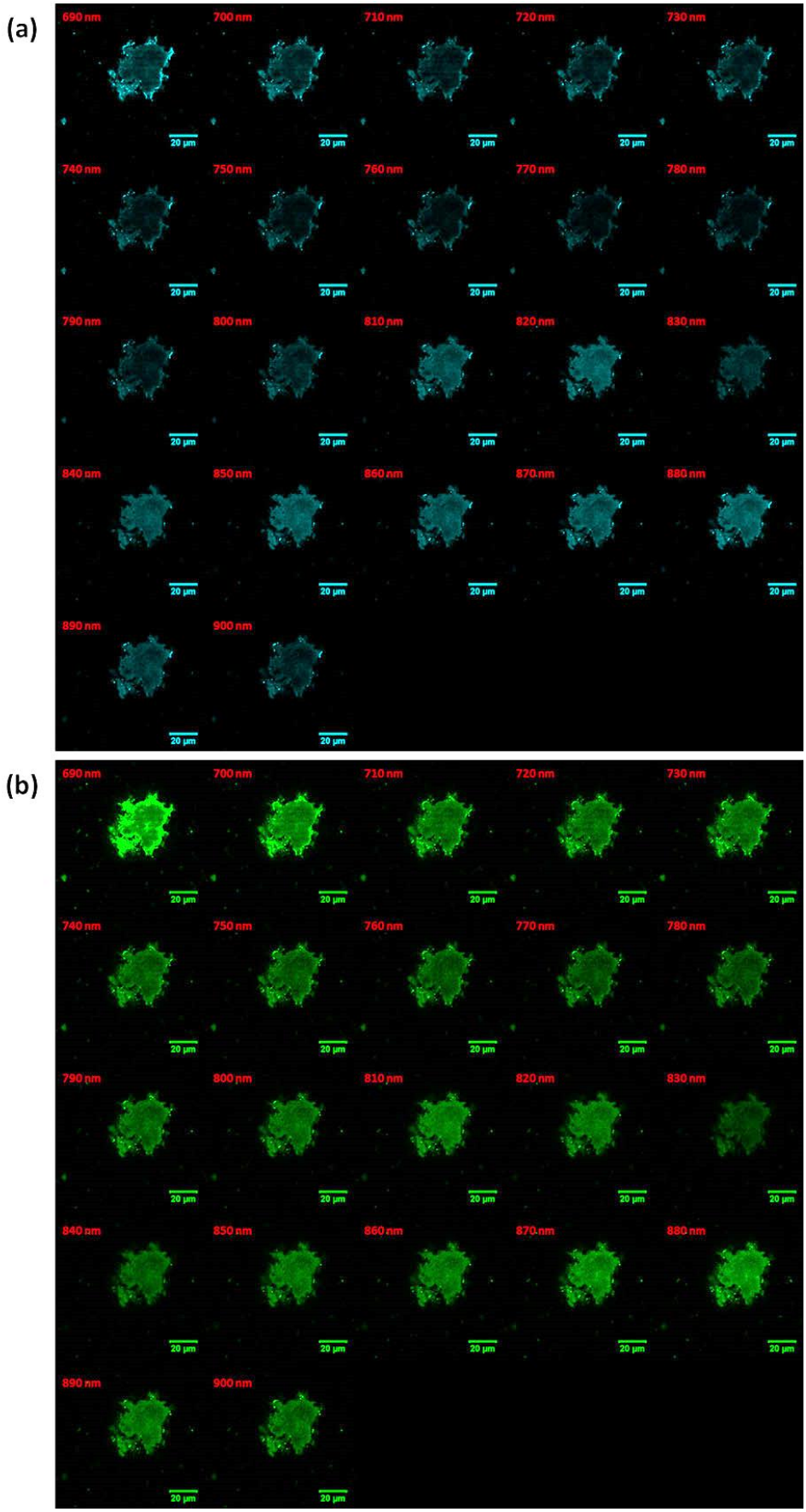



*Figure 5.24 : Images d'un agglomérat de DWNTs bruts en microscopie bi-photonique de fluorescence à différentes longueurs d'onde d'excitation comprises entre 690 et 900 nm et à des longueurs d'onde d'émission (a) comprises entre 430 et 485 nm et (b) comprises entre 500 et 550 nm.*

## D.II. Observation de suspensions de DWNTs seuls en microscopie bi-photonique

Chacune des suspensions de DWNTs, à savoir les DWNTs−COOH, les DWNTs−NH−Fluo, les DWNTs−COOH@FITC, les DWNTs−NH−Cy* et les DWNTs−NH−Cy5, a ainsi été soumise à une excitation lumineuse de 880 nm par microscopie bi-photonique de fluorescence et observée aux gammes d'émission des DWNTs (430-485 nm ; 500-550 nm), du DAPI (430-485 nm), du FITC et de la Cy*(500-550 nm), et de la Cy5 (655-725 nm). Toutes les images ainsi enregistrées sont présentées dans la **Figure 5.25** ci-dessous.

Tous les DWNTs sont détectables sur les trois gammes d'émission, mais l'intensité de fluorescence la plus élevée est clairement atteinte sur 430-485 nm et 500-550 nm, ce qui avait été déterminé par Wild E *et al.* pour les MWNTs **[12]**.

Concernant les DWNTs fonctionnalisés par le FITC (DWNTs−NH−Fluo, DWNTs−COOH@FITC), des points de fluorescence localisés plus intenses sont visibles entre 500 et 550 nm, mais également sur les deux autres gammes d'émission. Donc cette fluorescence localisée et située sur la périphérie des agglomérats ne proviendrait pas de molécules de FITC mais plutôt des DWNTs eux-mêmes. La fonctionnalisation des DWNTs par le FITC n'est donc pas visualisable par cette technique. Cette dernière constatation est également valable pour les DWNTs fonctionnalisés par la streptocyanine Cy* (DWNTs−NH−Cy*).

En revanche, dans le cas des DWNTs−NH−Cy5, la fluorescence dans le rouge (655-725 nm) est plus soutenue que dans les cas précédents et quelques zones localisées, bien visibles lorsque les images sont superposées, sont uniquement fluorescentes dans cette gamme. Ces deux observations nous amènent donc à en déduire que la fluorescence spécifique à la Cy5 serait bien détectable par ce type de microscopie, probablement à cause de son coefficient d'extinction molaire presque quatre fois supérieur à ceux du FITC et de la Cy*.

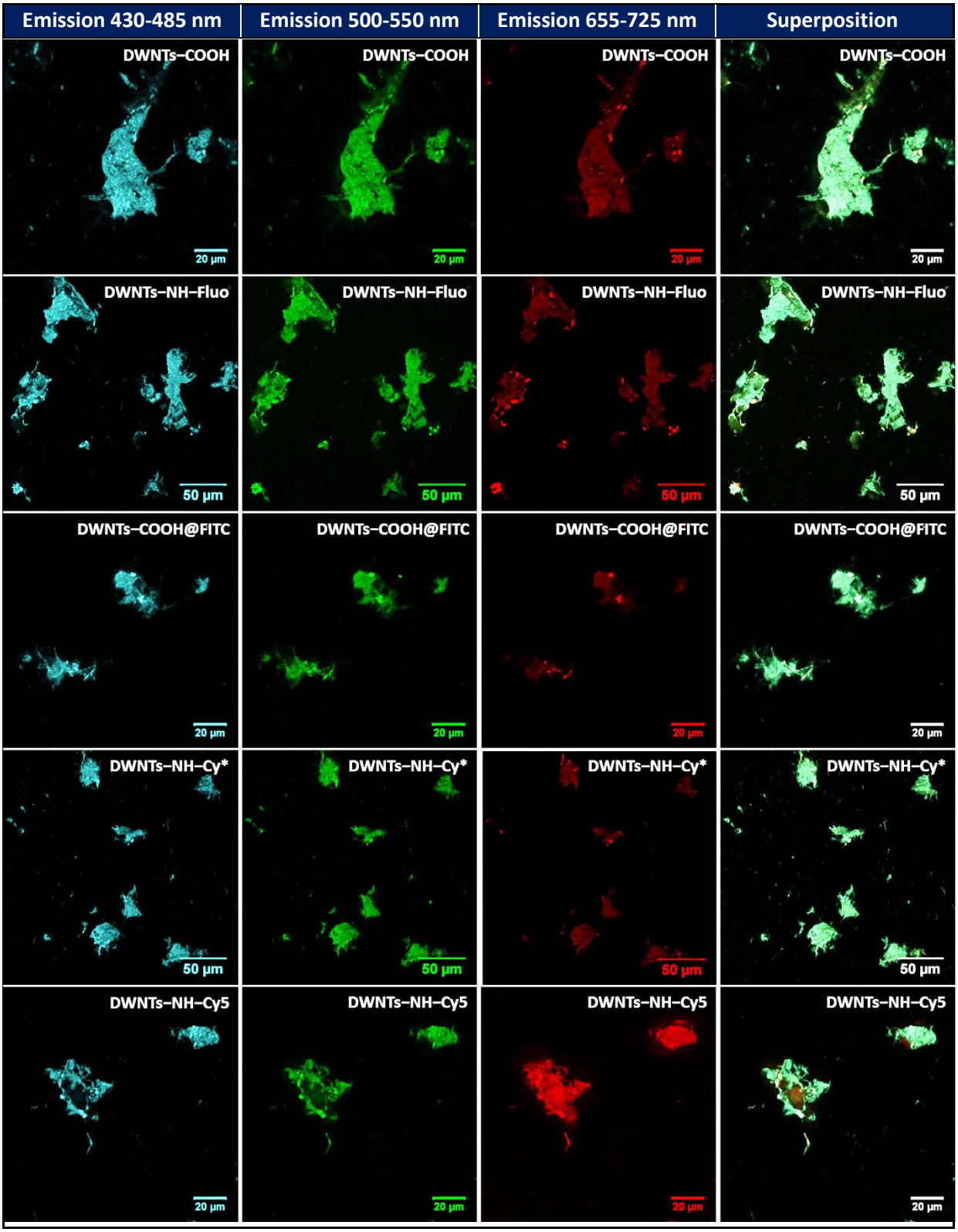



*Figure 5.25 : Images de suspensions de DWNTs−COOH, DWNTs−NH−Fluo, DWNTs−COOH@FITC, DWNTs−NH−Cy* et DWNTs−NH−Cy5 en microscopie bi-photonique de fluorescence à $\lambda_{exc}$ = 880 nm et sur trois différentes gammes d'émission (430-485 nm ; 500-550 nm ; 655-725 nm).*

## D.III. Observation des cellules B16

Nous avons montré que tous les DWNTs, qu'ils soient fonctionnalisés ou non, émettent un signal de fluorescence (meilleur compromis) lorsqu'ils sont excités par un laser pulsé à 880 nm. Les cellules B16 ayant incubé avec ces différentes suspensions de DWNTs peuvent à leur tour être observées par microscopie bi-photonique de fluorescence. Les images ont été acquises en mode séquentiel afin de bien séparer les signaux de fluorescence provenant du DAPI et des DWNTs. Pour cela, le DAPI, marqueur fluorescent du noyau, a été excité à 800 nm et visualisé entre 430 et 485 nm. Habituellement, le DAPI est excité à 720 nm en microscopie bi-photonique, cependant, pour des raisons pratiques, nous n'avons pu descendre au-delà de 800 nm le jour des observations. Les DWNTs quant à eux ont été excités comme précédemment à 880 nm mais seule leur émission entre 500 et 550 nm a été enregistrée. Les images obtenues pour le DAPI et les DWNTs ont par la suite été superposées pour la discussion.

Des profils en z, comme en microscopie confocale de fluorescence à un photon, ont été réalisés sur chacune des préparations pour localiser au mieux les DWNTs par rapport aux cellules. La **Figure 5.26** est un exemple de profil en z (pas de 2 µm) obtenu à partir des cellules incubées avec les DWNTs−COOH (ℭ + DWNTs−COOH). Nous pouvons nous rendre compte sur ce profil que plus les noyaux des cellules sont nets et plus la fluorescence provenant des agglomérats de DWNTs est faible. De même, lorsque l'intensité maximale des DWNTs est atteinte, les noyaux des cellules ne sont plus discernables. Ceci peut s'expliquer simplement par la difficulté pour les cellules d'internaliser les agglomérats. Toutefois, ces observations ne permettent pas d'exclure la présence de NTC dans le cytoplasme.

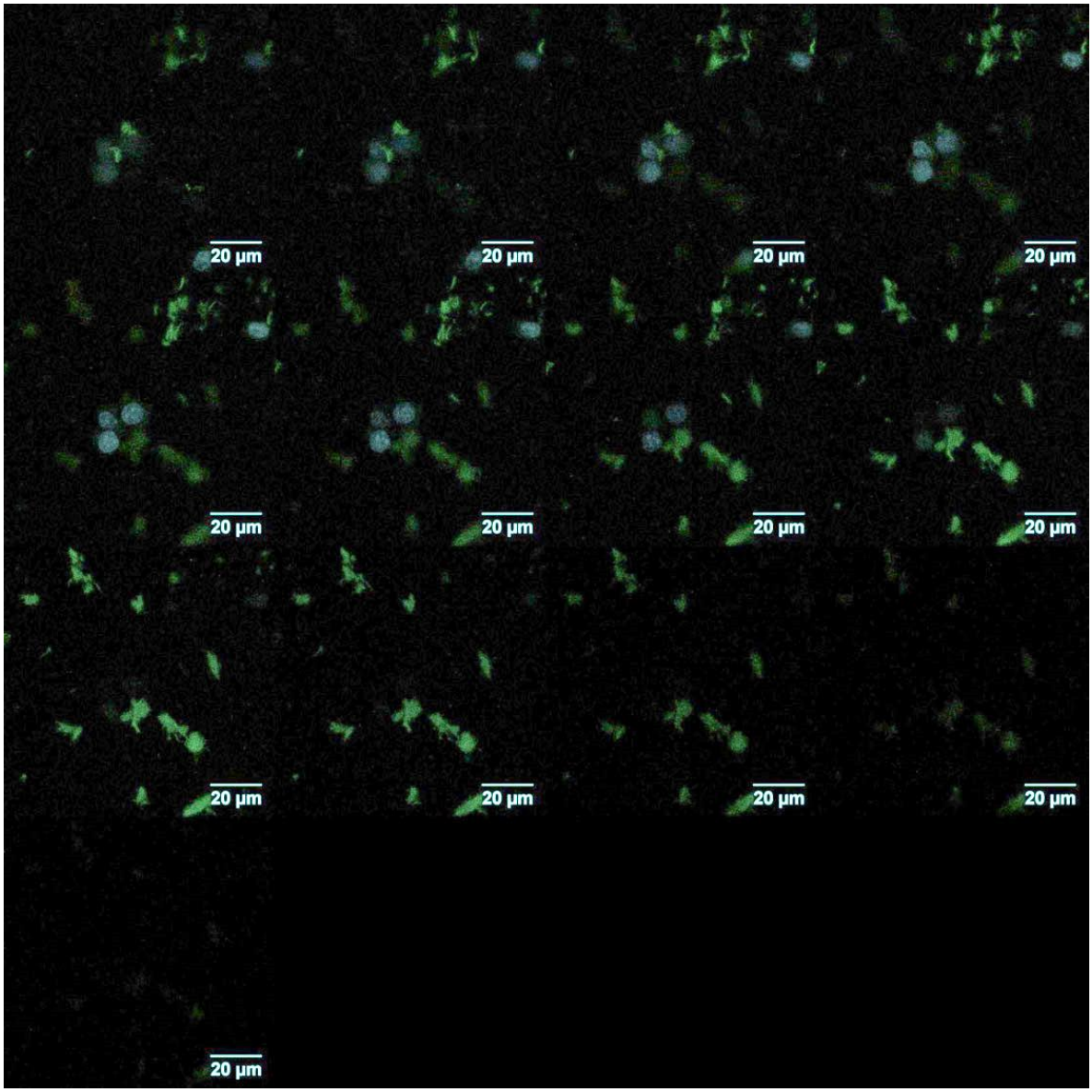



*Figure 5.26 : Profil en z réalisé par microscopie bi-photonique de fluorescence de la préparation de cellules B16 incubées avec les DWNTs–COOH. Chacune des images a été obtenue par superposition des images enregistrées en fluorescence à la longueur d'onde d'excitation du DAPI $\lambda_{exc}$ = 800 nm et à la longueur d'onde d'excitation des DWNTs $\lambda_{exc}$ = 880 nm.*

Les mêmes types d'analyse et de raisonnement ont été effectués avec les différentes préparations de cellules B16 incubées avec des DWNTs. Des images représentatives en lumière blanche et en fluorescence ont été regroupées sur les **Figures 5.27** et **5.28**.

Pour les ℭ + DWNTs bruts ainsi que pour les ℭ + DWNT–COOH, un décalage observé entre les intensités maximales du noyau et des agglomérats de DWNTs, confirmant ce que l'on peut voir en lumière blanche : les agglomérats semblent collés à la surface des cellules et n'ont pas pu être internalisés probablement à cause de leur taille trop importante.

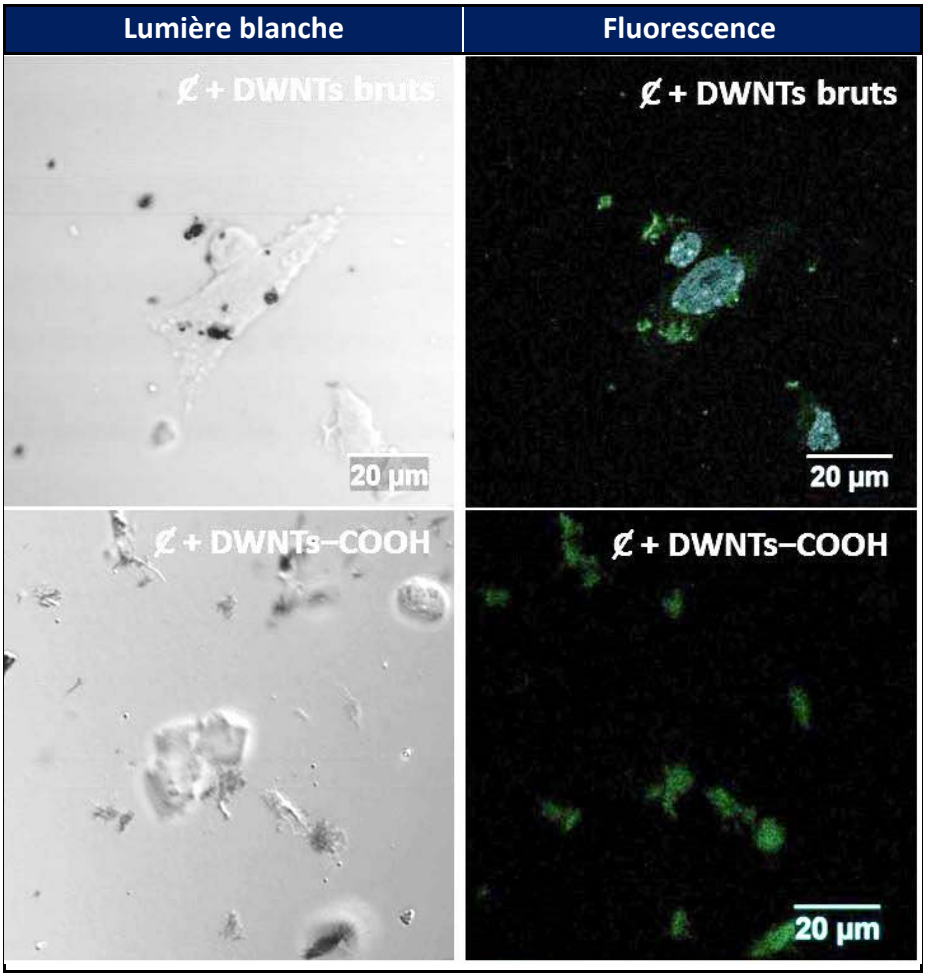



*Figure 5.27 : Images de microscopie bi-photonique de fluorescence de préparations de cellules B16 mises en présence de la de DWNTs bruts et de DWNTs–COOH. Images en lumière blanche (à gauche) ; en fluorescence (à droite), superposition des émissions enregistrées à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{exc}$ = 800 nm pour le DAPI et à la longueur d'onde d'excitation des DWNTs $\lambda_{exc}$ = 880 nm.*

Le même constat a pu être fait pour les échantillons de ℭ + DWNTs–NH–Fluo, ℭ + DWNTs–COOH@FITC et ℭ + DWNTs–NH–Cy* (**Figure 5.28**). En effet, les agglomérats de DWNTs semblaient tous collés à l'extérieur des membranes cellulaires.

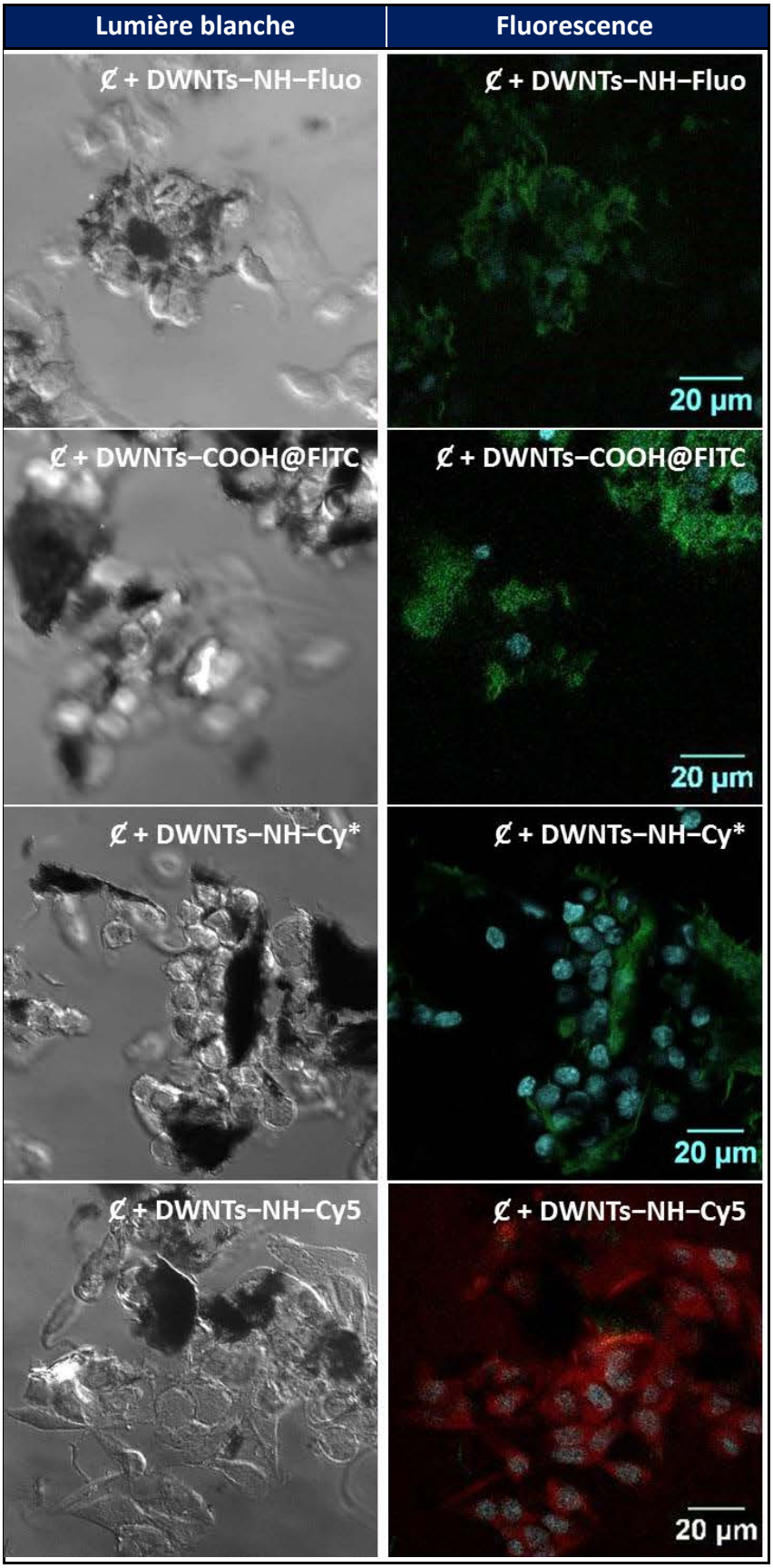



*Figure 5.28 : Images de microscopie bi-photonique de fluorescence de préparations de cellules B16 mises en présence de la de DWNTs–NH–Fluo, de DWNTs–COOH@FITC, de DWNTs–NH–Cy* et de DWNTs–NH–Cy5. Images en lumière blanche (à gauche) ; en fluorescence (à droite), superposition des émissions enregistrées à une longueur d'onde d'excitation de $\lambda_{exc}$ = 800 nm pour le DAPI et à la longueur d'onde d'excitation des DWNTs $\lambda_{exc}$ = 880 nm.*

Concernant les $\not{C}$ + DWNTs−NH−Cy5, les zones observées ont été en plus excitées, toujours en mode séquentiel, par un laser continu (mono-photon) à une longueur d'onde de 633 nm afin de pouvoir détecter la fluorescence provenant des molécules de Cy5. Les images enregistrées sur chaque canal ont par la suite été superposées pour donner le résultat présenté sur la **Figure 5.28**. Les DWNTs sont essentiellement présents autour des cellules et ne coïncident pas avec la fluorescence émise par les molécules de Cy5. Cela confirme bien ce qui avait été supposé par microscopie confocale Raman : une faible quantité de Cy5 aurait été libérée *in vitro*, peut-être par coupure de la liaison par des enzymes, et la fluorescence observée ne proviendrait donc forcément pas des DWNTs−NH−Cy5.

La microscopie bi-photonique de fluorescence permet ainsi de visualiser *in vitro* les DWNTs, qu'ils aient subi ou non une fonctionnalisation. Il a été déterminé que les DWNTs auto-fluorescent le plus à $\lambda_{exc}$ = 880 nm et émettent entre 430 et 725 nm. L'intensité de leur autofluorescence n'est en aucun cas influencée par la densité des agglomérats de DWNTs contrairement à ce qui se passe en microscopie de fluorescence à un photon (blocage de la fluorescence émise par les fluorophores). D'autre part, les observations réalisées sur les préparations de cellules incubées avec les DWNTs ont montré que les agglomérats de DWNTs sont surtout collés aux membranes cellulaires et ne sont pas internalisés par les cellules. Cela semble contredire ce qui avait pu être constaté par microscopies confocales de fluorescence et Raman, qui montraient que des DWNTs−COOH, DWNTs−NH−Fluo, DWNTs−COOH@FITC et DWNTs−NH−Cy5 avaient été internalisés. Cependant, au cours de cette étude préliminaire par microscopie bi-photonique, nous nous sommes uniquement focalisés sur les cellules présentant des DWNTs apparents (agglomérats imposants) afin de savoir s'il était possible de situer les DWNTs par rapport aux cellules. Cependant, les cellules sur lesquelles sont collés ces agglomérats de DWNTs ne sont pas forcément celles qui ont le mieux internalisé les DWNTs et ne sont donc peut-être pas très représentatives de ce qui avait pu être constaté par les autres techniques de microscopie.

En conclusion de ce dernier chapitre, plusieurs techniques de microscopie ont été utilisées afin de visualiser la fluorescence *in vitro* et de mettre en évidence la présence des DWNTs. La **microscopie à champ large** a montré que les DWNTs fonctionnalisés par le FITC sont bien fluorescents. La fluorescence mise en évidence est surtout détectable sur les bords des agglomérats, là où la densité en DWNTs est la plus faible : les DWNTs peuvent bloquer la fluorescence émise par les fluorophores lorsqu'ils sont trop agglomérés.

Les **microscopies de fluorescence à champ large et confocale** ont montré que de la fluorescence est visualisable dans les cellules lorsque celles-ci sont mises au contact de DWNTs fonctionnalisés par les fluorophores. Concernant les cellules incubées avec les DWNTs fonctionnalisés de façon covalente (DWNTs−NH−Fluo) ou non-covalente (DWNTs−COOH@FITC), la fluorescence est détectée dans des vésicules situées en périphérie des noyaux. La microscopie confocale Raman nous a permis de démontrer la présence des DWNTs dans les cellules par la détection simultanée des bandes Raman caractéristiques des cellules (2916 $cm^{-1}$) et des DWNTs (bande G à 1578 $cm^{-1}$).

Pour ce qui est de la fonctionnalisation par la streptocyanine Cy* des DWNTs (DWNTs−NH−Cy*), aucune fluorescence n'a pu être détectée au niveau des cellules. De plus, un phénomène de cytotoxicité a été remarqué avec cette molécule **[13]**. Cette molécule ne semble donc pas la plus adaptée pour une visualisation des DWNTs *in vitro* dans nos conditions expérimentales.

Une fluorescence intense et diffuse a pu être observée dans le cytoplasme des cellules en utilisant les DWNTs fonctionnalisés par la cyanine Cy5 (DWNTs−NH−Cy5) par microscopies de fluorescence à champ large et confocale. Grâce à des **cartographies réalisées par microscopie confocale Raman**, nous avons pu nous rendre compte que les DWNTs ne sont en réalité présents qu'aux niveaux de points bien localisés et non dans tout le cytoplasme comme le laissait penser la fluorescence enregistrée. Donc la fluorescence rouge visible dans presque toutes les cellules serait essentiellement dûe à des molécules de Cy5 libres. Etant donné le coefficient d'extinction molaire très élevé de la Cy5, il est probable qu'une infime quantité de molécules soit responsable de la fluorescence observée, ce qui expliquerait qu'aucune adsorption n'ait été mesurée et quantifiée dans le chapitre 4.

La **co-localisation des DWNTs fluorescents à l'aide des microscopies confocales de fluorescence et Raman** est indispensable afin de savoir si la fluorescence observée dans les cellules provient bien des DWNTs fonctionnalisés ou bien des molécules fluorescentes qui se

seraient libérées dans le milieu lors de l'exposition des cellules à ces DWNTs. En effet, nous avons pu montrer que les DWNTs−NH−Fluo avaient bien été internalisés par les cellules, en croisant les résultats des microscopies confocales de fluorescence et Raman : sur une même cellule, la fluorescence détectée au niveau de vésicules a pu être reliée au signal des DWNTs en Raman. En revanche, dans le cas des DWNTs−NH−Cy5, nous avons constaté qu'aucun signal de DWNTs en Raman n'était enregistré dans le cytoplasme de cellule, alors que celui-ci présentait une nette fluorescence. Nous en avons donc conclu que la fluorescence provenait de molécules Cy5, qui se seraient désorbées des parois des DWNTs fonctionnalisés. Ces résultats ont confirmé à quel point il est important de recouper les informations obtenues à partir de techniques différentes afin de savoir ce qui est réellement observé *in vitro*.

D'autre part, un autre type de microscopie encore peu utilisé pour la détection et la visualisation des DWNTs *in vitro* a été entreprise : la **microscopie bi-photonique de fluorescence**. Par cette technique, les DWNTs fonctionnalisés ou non par des fluorophores, sont détectables *in vitro* par leur auto-fluorescence lorsqu'ils sont excités par un laser pulsé à 880 nm. L'état d'agglomération des DWNTs n'a aucune influence sur l'intensité de la fluorescence détectée, celle-ci étant intrinsèque aux DWNTs. Cette méthode permet la détection de nanotubes sous forme d'agglomérats, mais aussi lorsqu'ils sont plus individualisés. Cependant, la fluorescence émise par les fluorophores greffés sur les DWNTs n'a pu être mise en évidence par cette technique. La microscopie bi-photon possède des avantages mais également des inconvénients par rapport à la microscopie mono-photon : la région éclairée correspond à la région imagée (la fluorescence hors du plan focal est quasi inexistante), peu de photoblanchiment, faible photo-toxicité et analyse en profondeur possible dans les tissus biologiques (rayonnement IR) ; et au titre des inconvénients : résolution axiale moins bonne (coupes optiques plus épaisses), risque d'échauffement de l'échantillon, séparation des fluorophores plus difficiles, coût et maintenance élevés. De ce fait, la microscopie bi-photonique de fluorescence serait complémentaire aux microscopies confocales de fluorescence et Raman.

# E. Bibliographie du chapitre 5

[1] Kam NWS, Jessop TC, Wender PA and Dai H, *Nanotube molecular transporters : internalization of carbon nanotube-protein conjugates into Mammalian cells.* JACS, **2004**, 126, 6850-6851.

[2] Serag MF, Kaji N, Gaillard C, Okamoto Y, Terasaka K, Jabasini M, Tokeshi M, Mizukami H, Bianco A and Baba Y, *Trafficking and subcellular localization of multiwalled carbon nanotubes in plant cells.* ACS Nano, **2011**, 5 (1), 493-499.

[3] Liu Q, Chen B, Wang Q, Shi X, Xiao Z, Lin J and Fang X, *Carbon nanotubes as molecular transporters for walled plant cells.* Nano Lett, **2009**, 9 (3), 1007-1010.

[4] Gaillard C, Cellot G, Li S, Toma FM, Dumortier H, Spallut G, Cacciari B, Prato M, Ballerini L and Bianco A, *Carbon nanotubes carrying cell-adhesion peptides do not interfere with neuronal functionality.* Adv Mater, **2009**, 21, 2903-2908.

[5] Monici M, *Cell and tissue autofluorescence research and diagnostic applications.* Biotechnol Annu Rev, **2005**, 11, 227-256.

[6] Aubin JE, *Autofluorescence of viable cultured Mammalian cells.* J Histochem Cytochem, **1979**, 27 (1), 36-43.

[7] Kapuscinski J, *DAPI : a DNA-specific fluorescent probe.* Biotech Histochem, **1995**, 70 (5), 220-233.

[8] Rastogi RP and Sinha P, *Apoptosis : Molecular mechanisms and pathogenicity.* EXCLI J, **2009**, 8, 155-181.

[9] Wong RSY, *Apoptosis in cancer : from pathogenesis to treatment.* J Exp Clin Cancer Res, **2011**, 30 (1), 1-14.

[10] Neves V, Heister E, Costa S, Tîlmaciu C, Borowiak-Palen E, Giusca CE, Flahaut E, Soula B, Coley HM, McFadden J and Silva SRP, *Uptake and release of double-walled carbon nanotubes by Mammalian cells.* Adv Funct Mater, **2010**, 20, 3272-3279.

[11] Neves V, Gerondopoulos A, Heister E, Tîlmaciu C, Flahaut E, Soula B, Silva SRP, McFadden J and Coley HM, *Cellular localization, accumulation and trafficking of double-walled carbon nanotubes in human prostate cancer cells.* Nano Res, **2012**, 5 (4) 223-234.

[12] Wild E and Jones KC, *Novel method for the direct visualization of in vivo nanomaterials and chemical interactions in plants.* Environ Sci Technol, **2009**, 43, 5290-5294.

[13] Maether MP, Bernat V, Maturano M, André-BArrès C, Ladeira S, Valentin A, Vial H and Payrastre C, *Synthesis and antiplasmodial activity of streptocyanine/peroxide and streptocyanine/4-aminoquinoline hybrid dyes.* Org Biomol Chem, **2011**, 9, 7400-7410.

# CONCLUSION

# ET

# PERSPECTIVES

Les objectifs de ce travail de thèse étaient de purifier puis de fonctionnaliser les DWNTs avec des molécules fluorescentes afin de pouvoir les suivre in vitro. L'utilisation de DWNTs en milieu biologique nécessite que ceux-ci soient les plus purs possibles pour éviter tout relargage non souhaité d'impuretés métalliques ou carbonées. D'autre part, un niveau de pureté optimal des parois des DWNTs nous assure que, lors de la fonctionnalisation des DWNTs par des molécules d'intérêt, celles-ci sont bien greffées aux parois des DWNT et non aux impuretés carbonées initialement présentes. Les fonctionnalisations covalente et non-covalente des DWNTs par des molécules fluorescentes avaient pour but de pouvoir directement visualiser les DWNTs fonctionnalisés et ainsi de se rendre compte si le greffage a été un succès. La comparaison des deux types de fonctionnalisation visait à déterminer lequel donnait le meilleur taux de greffage, et quelle était la contribution de l'adsorption lorsque les DWNTs étaient théoriquement fonctionnalisés de façon covalente. Enfin, le dernier objectif consistait à évaluer si les DWNTs fonctionnalisés par les molécules fluorescentes pouvaient être détectés et localisés après incubation avec des cellules par différentes techniques de microscopie.

Dans un premier temps, plusieurs traitements de purification, basés sur des oxydations et des lavages à la soude, ont été expérimentés, et il s'est avéré que les résultats différaient en fonction de la méthode utilisée : pouvaient être éliminés soit les nanoparticules métalliques résiduelles, soit le carbone désorganisé et les CCFs, soit les deux sortes d'impuretés. Toutes ces méthodes ont ainsi pu être classées selon leur efficacité par comparaison des données obtenues, qu'elles soient de nature qualitative ou quantitative, par différentes techniques de caractérisation complémentaires (MET, microanalyse élémentaire, spectroscopies IR et Raman, dosage des fonctions acides). De façon générale, plus le niveau de pureté exigé était élevé, plus les conditions expérimentales étaient contraignantes et plus le rendement final en pâtissait. Diverses méthodes de purification des DWNTs, permettant une élimination sélective des impuretés en fonction des besoins de l'utilisateur, ont ainsi été mises en évidence et comparées. Nous avons réussi à mettre au point une méthode de purification avec laquelle les DWNTs obtenus sont dénués de toute impureté (métallique ou carbonée). Ce traitement de purification comporte trois étapes successives : oxydation reflux des DWNTs bruts par reflux dans $HNO_3$ (3M) pendant 24h, puis par reflux dans un mélange d'acides concentrés $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3) pendant 5h (Méthode 5), et enfin lavage à la soude (4M) (Méthode C). Nous étions ainsi assurés que la

fonctionnalisation covalente entreprise par la suite aurait uniquement lieu sur les parois des DWNTs et non en partie sur les impuretés carbonées présentes généralement dans les échantillons de NTCs oxydés. Le seul inconvénient lié à cette méthode provient de son rendement tout de même peu élevé, rendant les productions en grande quantité longues à obtenir et coûteuses en produit de départ. Le traitement par la Méthode 4, utilisant les micro-ondes sur une suspension de DWNTs bruts dans un mélange d'acides concentrés $HNO_3/H_2SO_4$ (1 : 3), pourrait constituer une alternative, à condition de réaliser les oxydations sur de plus grandes quantités de NTCs. L'oxydation des DWNTs a permis, d'autre part, de créer des fonctions acides sur les parois des DWNTs, groupements fonctionnels indispensables lorsqu'une fonctionnalisation covalente par amidation est envisagée.

Dans un second temps, les DWNTs purifiés ont été fonctionnalisés de façon covalente par amidation par une diamine, le 1,4-diaminobutane, puis par des molécules fluorescentes. Trois fluorophores ont été sélectionnés pour cette étude. Le FITC a été choisi puisqu'il est couramment utilisé pour le marquage des NTCs du fait de son prix très abordable et de son coefficient d'extinction molaire relativement élevé. La streptocyanine Cy*, synthétisée par l'équipe Acides Nucléiques Modifiés au LSPCMIB (Toulouse), était quant à elle intéressante étant donné son caractère fluorogène. En effet, sous sa forme « précurseur » d'hémicarboxonium, la molécule ne présente aucune fluorescence. Ce n'est qu'en réagissant avec une fonction amine que la molécule se transforme en une streptocyanine Cy* fluorescente. Elle constituait ainsi un témoin direct du succès de la fonctionnalisation covalente, avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission et un coefficient d'extinction molaire voisins de ceux du FITC. La dernière molécule à avoir été greffée était la cyanine Cy5. Ce fluorophore est en effet souvent employé en biologie, son coefficient d'extinction molaire étant quatre fois supérieur à celui du FITC et sa longueur d'onde d'excitation n'induisant pas d'auto-fluorescence des cellules. Cependant, toutes les analyses envisagées n'ont pu être réalisées sur les échantillons de DWNTs fonctionnalisés par la Cy5 à cause du coût élevé de ce fluorophore (quantité insuffisante de DWNTs produite).

Le greffage de ces molécules fluorescentes a été mis en évidence de façon qualitative par plusieurs techniques (MET, spectroscopies IR, UV-Vis-NIR, Raman, de photoluminescence et diffusion de neutrons). Il a ainsi été démontré que la Cy* avait pu être fixée uniquement de façon covalente (absence du précurseur hémicarboxonium dans les échantillons finaux) et que le FITC était présent sous forme liée par liaison covalente aux DWNTs mais

probablement aussi sous forme adsorbée. La quantification du greffage a été réalisée par le biais de la microanalyse élémentaire, du test de Kaiser et de l'analyse des filtrats de lavage par UPLC, et a permis d'évaluer les quantités de fluorophores greffés entre 200 et 400 µmol/g DWNTs. La microanalyse élémentaire donne accès à la quantité totale de molécules fluorescentes présentes dans l'échantillon, et le test de Kaiser à la quantité de fluorophores fixés de façon covalente. La comparaison des résultats obtenus par ces deux méthodes a mis en évidence l'existence d'une adsorption du FITC sur les DWNTs alors que la voie de la fonctionnalisation covalente avait été sélectionnée.

L'étude de la fonctionnalisation non-covalente, via l'adsorption du FITC et de la $PyMeNH_2$, s'est avérée plus compliquée et la microanalyse est apparue comme la seule technique permettant d'évaluer le taux de greffage, quelles que soient les molécules ou les conditions expérimentales utilisées. Pour les deux molécules, les taux de couverture des DWNTs étaient tous strictement inférieurs à 10%. D'autre part, la comparaison des fonctionnalisations covalente et non-covalente des DWNTs par le FITC, dans des conditions expérimentales identiques, a montré, via la confrontation des résultats collectés par diverses techniques de caractérisation (MET, spectroscopies IR, Raman, UV-Vis-NIR, de photoluminescence, ATG), que le FITC adsorbé représentait environ 20% de la quantité totale de FITC fixé lorsque la fonctionnalisation covalente était sélectionnée. Des études plus poussées par diffusion des neutrons seront menées sur les DWNTs fonctionnalisés par le FITC (covalent et non-covalent) dans le but de mettre en évidence et de quantifier les deux types de greffage par une seule et même méthode (Thèse en cours de T. Lorne, *Understanding the grafting of fluorophore molecules on carbon nanotubes*, Directeurs de thèse : E. Flahaut, M. Jimenez-Ruiz, S. Rols).

Enfin, il a été évalué par mesure de la radioactivité par scintillation liquide que le 25-HC, dérivé du cholestérol d'intérêt biologique, s'adsorbait sur les DWNTs avec un taux de couverture atteignant les 30%. Etant donné que les cellules ne parviennent à absorber naturellement que 1% des molécules de 25-HC présentes dans le milieu, il serait alors possible d'utiliser les DWNTs comme vecteurs afin de faire pénétrer davantage de 25-HC dans les cellules. Il serait donc intéressant de tester par la suite les DWNTs fonctionnalisés par le 25-HC sur des cellules cancéreuses pour observer si effectivement une quantité plus importante de 25-HC peut être délivrée aux cellules. D'autre part, si les expériences in vitro avec le 25-HC sont concluantes, alors les DWNTs pourraient être utilisés comme vecteurs

d'autres molécules, comme la dendrogénine A (DDA), de la même famille que le 25-HC mais plus prometteuses en terme d'efficacité contre les cellules cancéreuses.

Dans un troisième temps, ces DWNTs fonctionnalisés de façons covalente et non-covalente par des molécules fluorescentes ont été mis en présence de cellules afin de tester leur détectabilité et d'observer leur comportement *in vitro*. Les microscopies à champ large et confocale de fluorescence ont montré que la fluorescence des DWNTs fonctionnalisés, surtout par le FITC, était visualisable lorsque ceux-ci n'étaient pas trop agglomérés. Nous avons pu co-localiser les DWNTs fonctionnalisés de façon covalente par le FITC par microscopies confocales de fluorescence et Raman dans des vésicules à l'intérieur des cellules. Il serait par conséquent pertinent d'identifier les vésicules dans lesquelles sont accumulées les DWNTs en utilisant des marqueurs fluorescents spécifiques des différents organites des cellules.

De plus, il a été démontré que selon les fluorophores utilisés, les DWNTs n'étaient pas localisés au même endroit dans les cellules (vésicules, cytoplasme), ce qui signifie que des voies d'internalisation différentes ont été empruntées. Il faudra voir à l'avenir quelles molécules fluorescentes sont les plus intéressantes en tenant compte de leur localisation dans les cellules et de leur cytotoxicité. Il serait alors possible d'orienter les DWNTs vers des organites cibles des cellules en fonction des molécules greffées.

En outre, nous avons pu observer que la stabilité de la fonctionnalisation en milieu biologique dépend non seulement de la nature de l'interaction mise en jeu entre les DWNTs et les molécules greffées (covalence ou adsorption), mais également de la structure de la molécule elle-même (FITC et Cy*) permettant ou non une adsorption sur les parois des DWNTs, et de l'état de surface des DWNTs (bruts ou oxydés).

Enfin, la microscopie bi-photonique de fluorescence a été mise en avant, permettant de visualiser in vitro les DWNTs, qu'ils soient fonctionnalisés ou non, grâce à leur auto-fluorescence. Du fait de sa résolution axiale moins bonne, de la mise en évidence des fluorophores greffés sur les DWNTs difficiles et de son coût élevé, cette technique reste complémentaire aux microscopies confocales de fluorescence et Raman. Cependant, l'utilisation des IR, peu absorbés par les tissus biologiques, rend la microscopie bi-photonique peu photo-toxique et donc utilisable pour des analyses en profondeur. Il serait ainsi possible d'observer le comportement des DWNTs, avec ou sans fonctionnalisation, dans des tissus *in vivo*.