

Université  
de Toulouse

# 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 Larssonneur-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 1<sup>er</sup> 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 Payrastra 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 avons 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 reconforter 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

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>23</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>29</b>
<b>A. Les nanotubes de carbone .....</b>	<b>31</b>
<b>A.I. Structure des nanotubes de carbone .....</b>	<b>31</b>
<b>A.I.1. Formes allotropiques du carbone.....</b>	<b>31</b>
<b>A.I.2. SWNTs, DWNTs et MWNTs.....</b>	<b>34</b>
<b>A.II.Synthèse des nanotubes de carbone.....</b>	<b>35</b>
<b>A.II.1. Synthèse par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (CCVD) .....</b>	<b>35</b>
<b>A.II.2. Autres méthodes de synthèse .....</b>	<b>37</b>
<b><i>A.II.2.a. Synthèse par arc électrique.....</i></b>	<b><i>37</i></b>
<b><i>A.II.2.b. Synthèse par ablation laser.....</i></b>	<b><i>37</i></b>
<b>A.III. Propriétés et applications des nanotubes de carbone .....</b>	<b>38</b>
<b>A.III.1. Propriétés et applications mécaniques.....</b>	<b>38</b>
<b>A.III.2. Propriétés et applications électroniques.....</b>	<b>38</b>
<b>A.III.3. Propriétés et applications thermiques .....</b>	<b>39</b>
<b>A.III.4. Propriétés et applications biomédicales.....</b>	<b>39</b>
<b>A.III.5. Toxicité des nanotubes de carbone .....</b>	<b>44</b>
<b>B. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone.....</b>	<b>45</b>

<b>B.I. Purification des nanotubes de carbone .....</b>	<b>45</b>
<b>B.I.1. Purification par la voie humide.....</b>	<b>45</b>
<b>B.I.2. Purification par la voie sèche.....</b>	<b>47</b>
<b>B.II. Fonctionnalisation des nanotubes de carbone.....</b>	<b>48</b>
<b>B.II.1. Fonctionnalisation covalente.....</b>	<b>48</b>
<i>B.II.1.a. Estérification-Amidation .....</i>	<i>48</i>
<i>B.II.1.b. Halogénéation.....</i>	<i>50</i>
<i>B.II.1.c. Cycloaddition.....</i>	<i>51</i>
<i>B.II.1.d. Addition radicalaire.....</i>	<i>51</i>
<i>B.II.1.e. Addition nucléophile .....</i>	<i>53</i>
<b>B.II.2. Fonctionnalisation non-covalente .....</b>	<b>54</b>
<i>B.II.2.a. Interactions avec des tensio-actifs et des polymères.....</i>	<i>54</i>
<i>B.II.2.b. Composés aromatiques polycycliques .....</i>	<i>56</i>
<i>B.II.2.c. Interactions avec des biomolécules .....</i>	<i>59</i>
<b>B.II.3. Remplissage .....</b>	<b>61</b>
<b>C. Détection <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des nanotubes de carbone .....</b>	<b>61</b>
<b>D. Bibliographie du Chapitre 1 .....</b>	<b>67</b>
<b>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>87</b>
<b>A. Synthèse des DWNTs par CCVD .....</b>	<b>89</b>
<b>A.I. Synthèse de la poudre de catalyseur <math>Mg_{0,99}Co_{0,0075}Mo_{0,0025}O</math>.....</b>	<b>89</b>
<b>A.I.1. Préparation de la poudre de catalyseur par combustion à l'acide citrique .....</b>	<b>89</b>
<b>A.I.2. Calcination de la poudre de catalyseur.....</b>	<b>90</b>

A.II.Synthèse des DWNTs par CCVD à partir de la poudre de catalyseur Mg <sub>0,99</sub> Co <sub>0,0075</sub> Mo <sub>0,0025</sub> O .....	90
A.III. Extraction des DWNTs à partir de la poudre composite.....	92
<b>B. Purification des DWNTs.....</b>	<b>93</b>
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
<i>B.I.2.a. Oxydation par un mélange HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 : 3) à 70°C (Méthode 2).....</i>	<i>93</i>
<i>B.I.2.b. Oxydation par un mélange HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 : 3) à 130°C (Méthode 3).....</i>	<i>94</i>
<i>B.I.2.c. Oxydation par un mélange HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 : 3) à 130°C utilisant les micro-ondes             (Méthode 4).....</i>	<i>95</i>
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
<i>B.II.1. Reflux dans une solution de soude (Méthode A) .....</i>	<i>97</i>
<i>B.II.2. Incubation et ultra-sonication dans une solution de soude (Méthodes B et C).97</i>	<i>97</i>
<b>C. Fonctionnalisation des DWNTs.....</b>	<b>98</b>
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

<b>C.II. Fonctionnalisation non-covalente .....</b>	<b>100</b>
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
<b>D. Tests sur cellules .....</b>	<b>103</b>
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
<b>E. Caractérisation .....</b>	<b>105</b>
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
<b>F. Bibliographie du chapitre 2 .....</b>	<b>132</b>

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

<b>A. Introduction .....</b>	<b>137</b>
<b>B. Présentation des DWNTs bruts et des méthodes de purification .....</b>	<b>138</b>
B.I. Les DWNTs bruts .....	138
B.II. Méthodes de purification .....	141
<b>C. Effets des différentes méthodes d'oxydation sur les DWNTs .....</b>	<b>144</b>
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

<b>D. Bibliographie du chapitre 3 .....</b>	<b>168</b>
<b>CHAPITRE 4 : FONCTIONNALISATION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROIS.....</b>	<b>171</b>
<b>A. Introduction .....</b>	<b>173</b>
<b>B. Fonctionnalisation covalente.....</b>	<b>174</b>
<b>B.I. Etapes de fixation du fluorophore .....</b>	<b>174</b>
B.I.1. Activation des fonctions carboxyliques .....	174
B.I.2. Fixation d'une diamine.....	176
B.I.3. Greffage du fluorophore .....	179
<b>B.II. Analyses qualitatives.....</b>	<b>183</b>
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>B.III. Analyses quantitatives .....</b>	<b>206</b>
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
<b>C. Fonctionnalisation non-covalente .....</b>	<b>221</b>
<b>C.I. Etude des différents états de surface des DWNTs .....</b>	<b>222</b>
C.I.1. Adsorption du FITC et de la PyMeNH <sub>2</sub> .....	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
<i>C.I.3.a. Détermination de la quantité de FITC adsorbé par spectroscopie UV-Vis.....</i>	<i>225</i>
<i>C.I.3.b. Détermination de la quantité de FITC adsorbé par ATG.....</i>	<i>226</i>
<i>C.I.3.c. Détermination de la quantité de PyMeNH<sub>2</sub> adsorbée par le test de Kaiser ....</i>	<i>229</i>
<i>C.I.3.d. Détermination des quantités de FITC et de PyMeNH<sub>2</sub> adsorbées par microanalyse élémentaire.....</i>	<i>231</i>
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
<i>C.II.2.a. Comparaison par MET.....</i>	<i>234</i>
<i>C.II.2.b. Comparaison par spectroscopie IR.....</i>	<i>235</i>
<i>C.II.2.c. Analyse par spectroscopie Raman .....</i>	<i>236</i>
<i>C.II.2.d. Analyse par spectrophotométrie d'absorption UV-Vis-IR.....</i>	<i>238</i>
<i>C.II.2.e. Analyse par spectroscopie de photoluminescence .....</i>	<i>240</i>
C.II.3. Analyse quantitative .....	244
<i>C.II.3.a. Comparaison basée sur les résultats de microanalyse élémentaire.....</i>	<i>244</i>
<i>C.II.3.b. Comparaison par ATG.....</i>	<i>245</i>
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

<b>D. Bibliographie du chapitre 4 .....</b>	<b>258</b>
---------------------------------------------	------------

## **CHAPITRE 5 : DETECTION DES NANOTUBES DE CARBONE BIPAROI DANS LES CELLULES DE MAMMIFERES ..... 263**

<b>A. Introduction .....</b>	<b>265</b>
------------------------------	------------

<b>B. Détection de la fluorescence par microscopie de fluorescence à champ large.....</b>	<b>266</b>
-----------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>B.I. Observation de suspensions de DWNTs fonctionnalisés par le FITC .....</b>	<b>266</b>
-----------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>B.II. Incubation des DWNTs avec des macrophages .....</b>	<b>269</b>
--------------------------------------------------------------	------------

<b>B.III. Observation des cellules MCF7 .....</b>	<b>271</b>
---------------------------------------------------	------------

<b>B.III.1. Fonctionnalisation par le FITC.....</b>	<b>272</b>
-----------------------------------------------------	------------

<b>B.III.2. Fonctionnalisation par la streptocyanine Cy* .....</b>	<b>275</b>
--------------------------------------------------------------------	------------

<b>B.III.3. Fonctionnalisation par la Cy5.....</b>	<b>277</b>
----------------------------------------------------	------------

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

<b>C.I. Mise en évidence par microscopie confocale de fluorescence.....</b>	<b>279</b>
-----------------------------------------------------------------------------	------------

<b>C.I.1. Observation des contrôles .....</b>	<b>279</b>
-----------------------------------------------	------------

<b>C.I.2. Fonctionnalisation par le FITC.....</b>	<b>281</b>
---------------------------------------------------	------------

<b>C.I.3. Fonctionnalisation par la Cy* .....</b>	<b>285</b>
---------------------------------------------------	------------

<b>C.I.4. Fonctionnalisation par la Cy5.....</b>	<b>286</b>
--------------------------------------------------	------------

<b>C.II. Mise en évidence de la présence des DWNTs par microscopie confocale Raman .....</b>	<b>288</b>
--------------------------------------------------------------------------------------------------	------------

<b>C.II.1. Analyse des cellules MCF7 .....</b>	<b>289</b>
------------------------------------------------	------------

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
<b>D. Détection de l'autofluorescence des DWNTs <i>in vitro</i> par microscopie bi-photonique de fluorescence.....</b>	<b>300</b>
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
<b>E. Bibliographie du chapitre 5 .....</b>	<b>312</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>315</b>



## LISTE DES ABREVIATIONS

<b>25-HC</b>	25-hydroxycholestérol
<b>25-HC-<sup>3</sup>H</b>	25-hydroxycholestérol tritié
<b>ACN</b>	Acétonitrile
<b>ADN</b>	Acide DéoxyriboNucléique
<b>ARN</b>	Acide Ribonucléique
<b>ARNm</b>	Acide Ribonucléique messenger
<b>ATG</b>	Analyse Thermo-Gravimétrique
<b>ℓ</b>	Cellule
<b>CCFs</b>	Fragments carbonés carboxylés
<b>CCVD</b>	Dépôt Chimique Catalytique en phase Vapeur
<b>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Dichlorométhane
<b>Cy*</b>	Streptocyanine Cy*
<b>DAPI</b>	4',6'-diamidino-2-phénylindole
<b>DIEA</b>	N,N-diisopropyléthylamine
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DMSO</b>	Diméthylsulfoxyde
<b>DOC</b>	Désoxycholate de sodium
<b>DOX</b>	Doxorubicine
<b>DWNTs</b>	Nanotubes de carbone biparois
<b>EtOH (abs)</b>	Ethanol (absolu)
<b>FITC</b>	Isothiocyanate de fluorescéine
<b>Fluo</b>	Fluorescéine
<b>HCl</b>	Acide chlorhydrique
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Acide nitrique
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peroxyde d'hydrogène

<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Acide sulfurique
<b>HPLC</b>	Chromatographie Liquide à Haute Performance
<b>IR</b>	Infra-rouge
<b>KBr</b>	Bromure de potassium
<b>KMnO<sub>4</sub></b>	Permanganate de potassium
<b>K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub></b>	Dichromate de potassium
<b>MET</b>	Microscopie Electronique à Transmission
<b>MWNTs</b>	Nanotubes de carbone multi-parois
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de sodium (soude)
<b>NTCs</b>	Nanotubes de carbone
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin
<b>PFA</b>	Paraformaldéhyde
<b>PyMeNH<sub>2</sub></b>	1-pyrène-méthylamine
<b>RBM</b>	Radial Breathing Mode ou Mode de vibration radiale
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium
<b>siRNA</b>	ARN interférent
<b>SVF</b>	Sérum de Veau Fœtal
<b>SWNTs</b>	Nanotubes de carbone monoparois
<b>THF</b>	Tétrahydrofurane
<b>UPLC</b>	Chromatographie Liquide à haute Pression
<b>UV</b>	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, Bacsá R and Laurent Ch, *Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes*. Chem Commun, **2003**, 1442-1443.

[3] Flahaut E, Peigney A, Bacsá WS, Bacsá 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).

À 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-feuillets 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**).

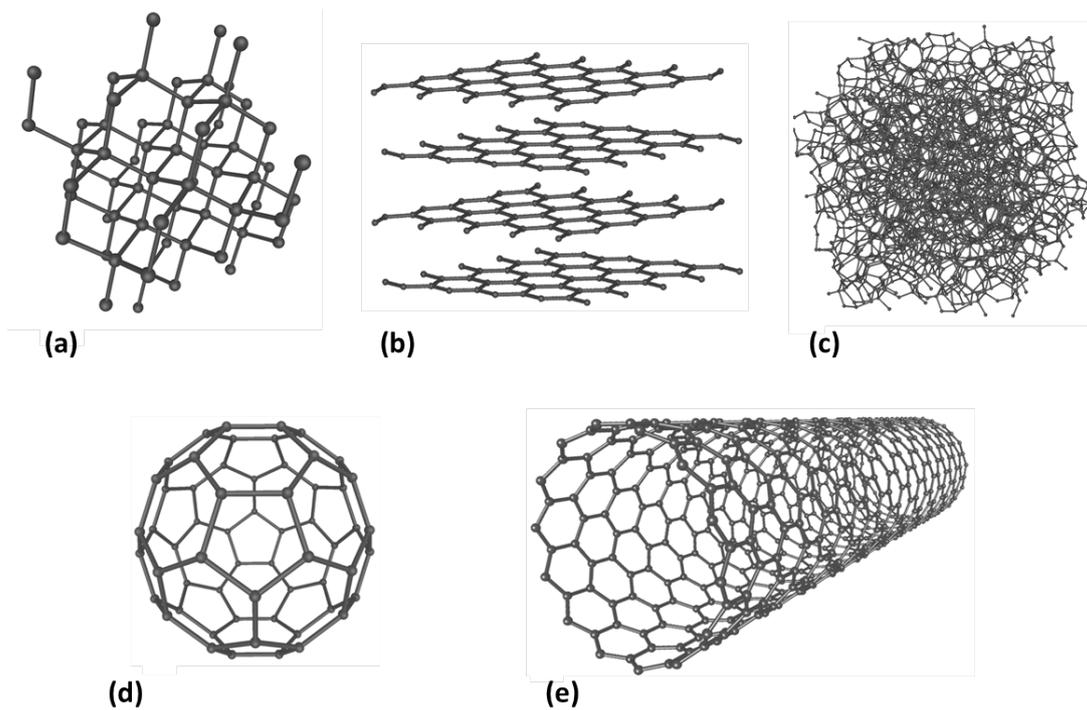


Figure 1.1 : Formes allotropiques du carbone : (a) diamant, (b) graphite (ici avec quatre feuillets de graphène), (c) carbone désorganisé, (d) fullerène ( $C_{60}$ ) et (e) nanotube de carbone.

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 :  $C_h = n \cdot a_1 + m \cdot a_2$ , 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].

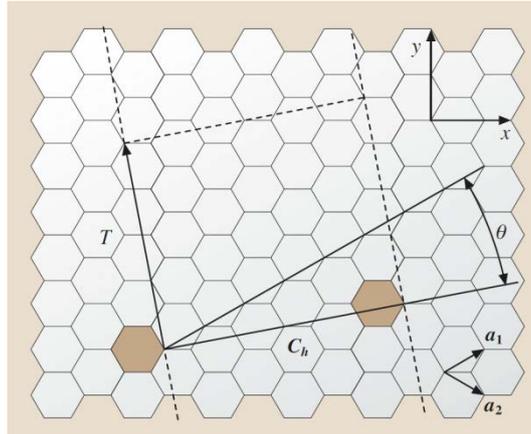


Figure 1.2 : Schéma représentant les vecteur  $C_h$  et angle  $\theta$  d'hélicité ou de chiralité d'un nanotube de carbone, obtenu à partir de l'enroulement d'un feuillet de graphène.

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

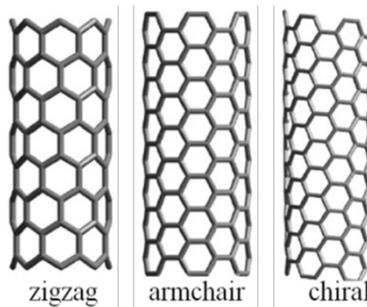


Figure 1.3 : Schémas des différentes structures de NTCs.

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 :

$$d = \frac{|C_h|}{\pi} = \frac{a_{C-C} \sqrt{3(n^2 + m^2 + nm)}}{\pi}, \text{ sachant que } a_{C-C} \text{ correspond à la longueur de la liaison entre}$$

deux atomes de carbone d'un NTC ( $a_{C-C} \approx 1,42 \text{ \AA}$ ). 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.1.2. 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.

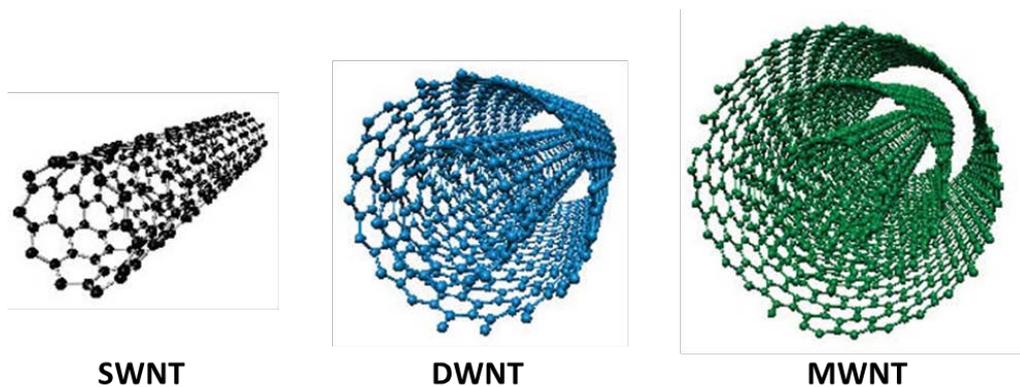


Figure 1.4 : Représentation des différents NTCs synthétisés, à savoir les NTC monoparois (SWNTs), biparois (DWNTs) et multi-parois (MWNTs).

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 croître. 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<sub>4</sub>) [17], l'acétylène (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) [18-19], l'éthylène (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) [19] et le propylène (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>) [19]. Des synthèses ont également été réalisées à partir de sources carbonées liquides comme le benzène (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>) [20] ou l'éthanol (EtOH, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) [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<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ou la silice (SiO<sub>2</sub>) [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<sub>2</sub>) [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/cm<sup>2</sup>, 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  $\text{W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ) [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].

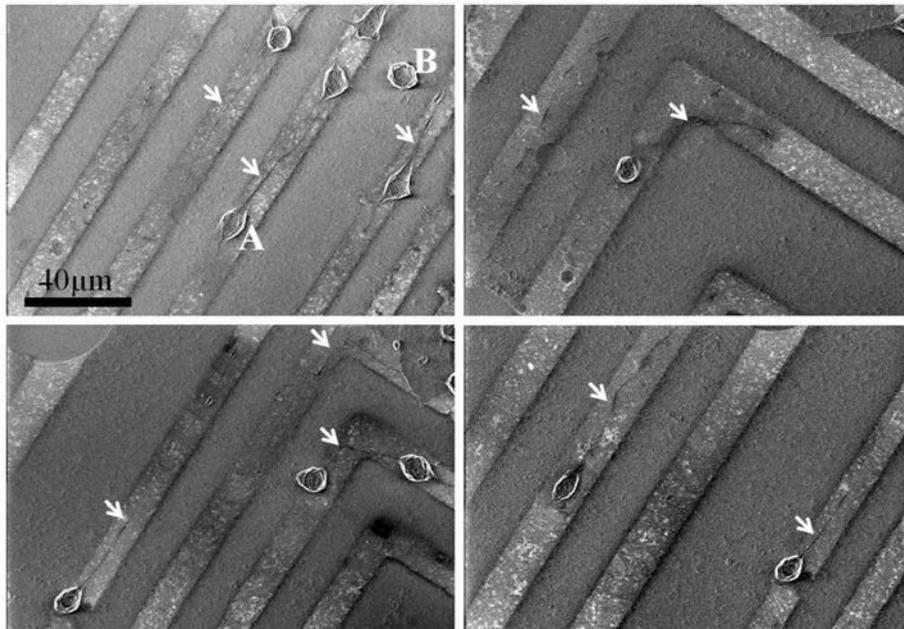


Figure 1.4 : Images MEB de cultures cellulaires de neurones sur une surface SiO<sub>2</sub> présentant des motifs de DWNTs. Les flèches blanches indiquent les neurites qui se sont développées sur le substrat de DWNTs. [44]

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).

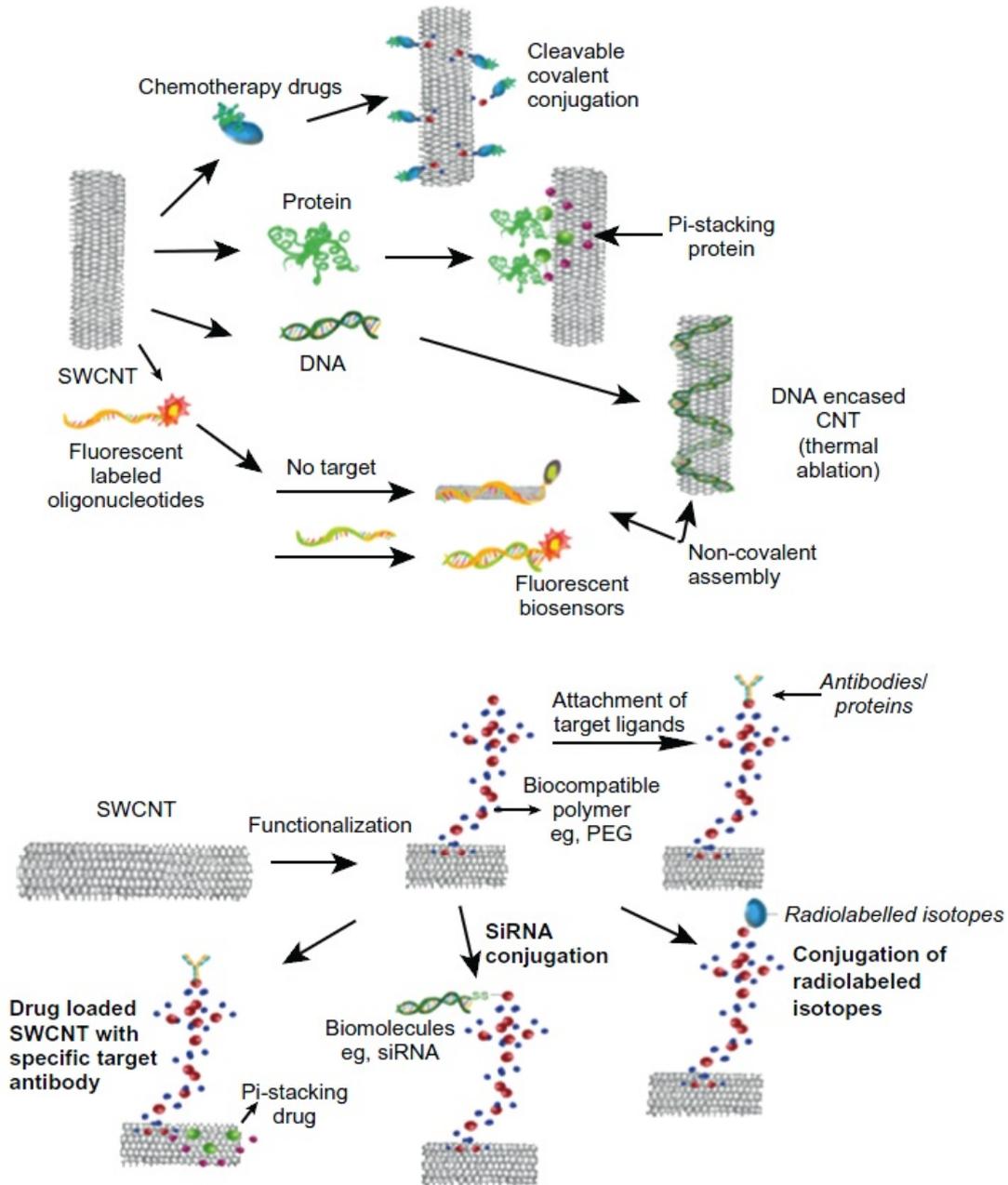


Figure 1.5 : Schéma représentant les différentes fonctionnalisations des NTCs par diverses molécules pour des applications biomédicales. [54]

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 cytoplasme) 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].

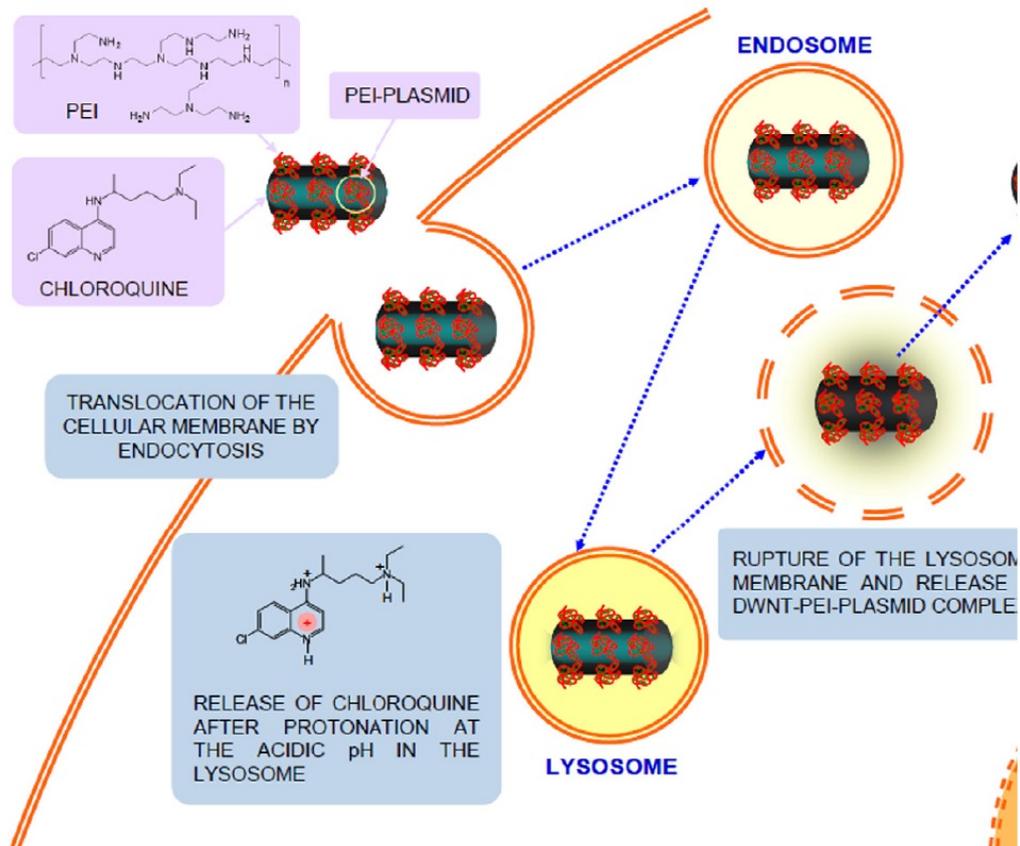


Figure 1.6 : Schéma illustrant le mode d'action des DWNTs remplis de chloroquine et recouverts par un polymère cationique (PEI) et des plasmides codant pour la luciférase. [55]

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 entraîner la formation de radicaux libres ( $\text{OH}^*$ ) 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 entraîner 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  $\text{HNO}_3$  seul, ou en mélange concentré avec  $\text{H}_2\text{SO}_4$  selon un rapport volumétrique  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 : 3).

Les traitements utilisant des solutions de  $\text{HNO}_3$  sur des SWNTs éliminent les nanoparticules métalliques provenant du catalyseur [65-66]. Haddon [67] a rapporté une évaluation sur l'utilisation de  $\text{HNO}_3$  en tant que méthode de purification sur les SWNTs : en augmentant la concentration en  $\text{HNO}_3$  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  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (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 réalisées afin de purifier les NTCs, et ce en utilisant une variété de solutions oxydantes différentes, à savoir : des solutions de  $\text{KMnO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$  [69-71], de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7/\text{H}_2\text{SO}_4$  [72], de  $\text{H}_2\text{O}_2$  [73] et de solution piranha ( $\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$ ) [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 ( $\text{SO}_3\text{H}$ ) sur des SWNTs oxydés par un mélange  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  [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  $-\text{COOH}$  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 ( $\text{NaOH}$ ) 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  $\text{-COO}^-$  [75]. Cependant, Haddon et ses collègues [79] ont montré de leur côté que des échantillons oxydés par  $\text{HNO}_3$  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.1.2. 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 :  $\text{H}_2\text{O} + \text{C} = \text{CO} + \text{H}_2$ , l'équilibre  $2 \text{NaOH} = \text{Na}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$  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 ( $\text{O}_2$ ) vont attaquer plus facilement sous l'effet de la chaleur les sites portant les carbones les plus réactifs ( $\text{C sp}^3$ ) 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.

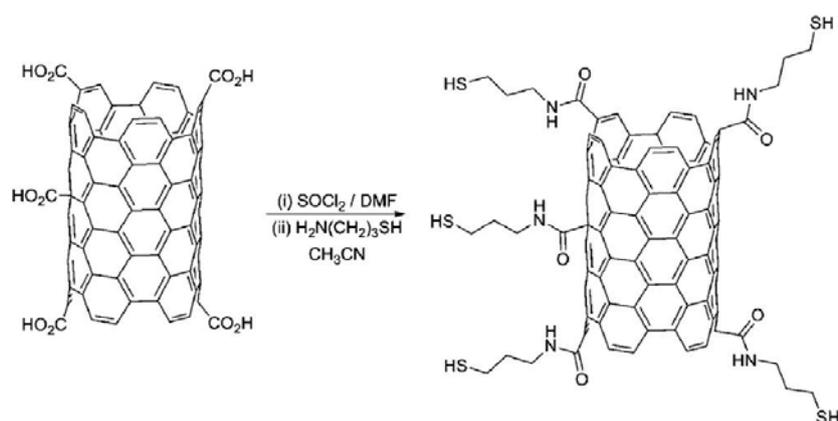


Figure 1.7 : Exemple de fonctionnalisation des SWNTs par amidation. [95]

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 utilisant le couplage par un carbodiimide tel que le N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou le 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) 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. Halogénéation***

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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> à 200°C [109] ; par du BrF<sub>3</sub> gazeux (formé à partir d'un mélange liquide de BrF<sub>3</sub> et Br<sub>2</sub>) à température ambiante [109-110] ; et par un plasma de CF<sub>4</sub> [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'azométhines. 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 chaîne 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.

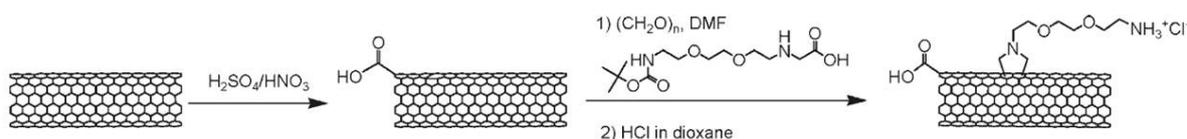


Figure 1.8 : Fonctionnalisation de NTCs par une chaîne diamino triéthylène glycol par cycloaddition 1,3-dipolaire. [112]

La même équipe a également réussi, par cette réaction, à greffer des molécules anticancéreuse 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).

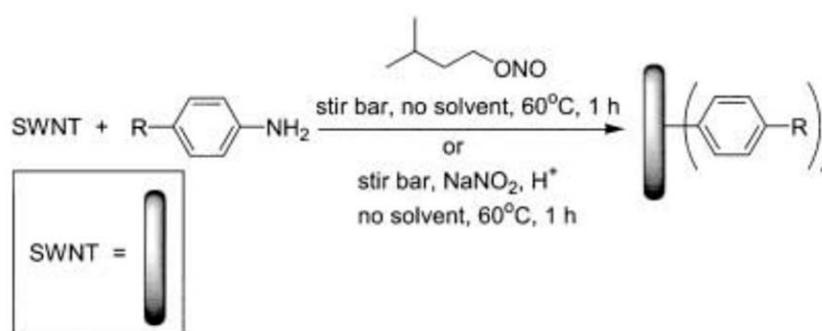


Figure 1.9 : Fonctionnalisation de NTCs par des sels d'aryldiazonium. R correspond à des groupements Cl, Br,  $NO_2$ ,  $CO_2CH_3$ , alkyl, OH, alkylhydroxy, etc... [119]

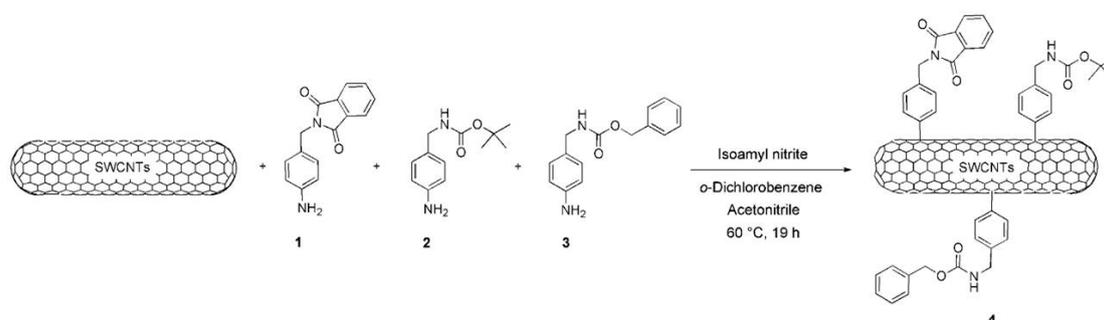


Figure 1.10 : Fonctionnalisation simultanée de NTCs par trois différents sels d'aryldiazonium. [121]

**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].

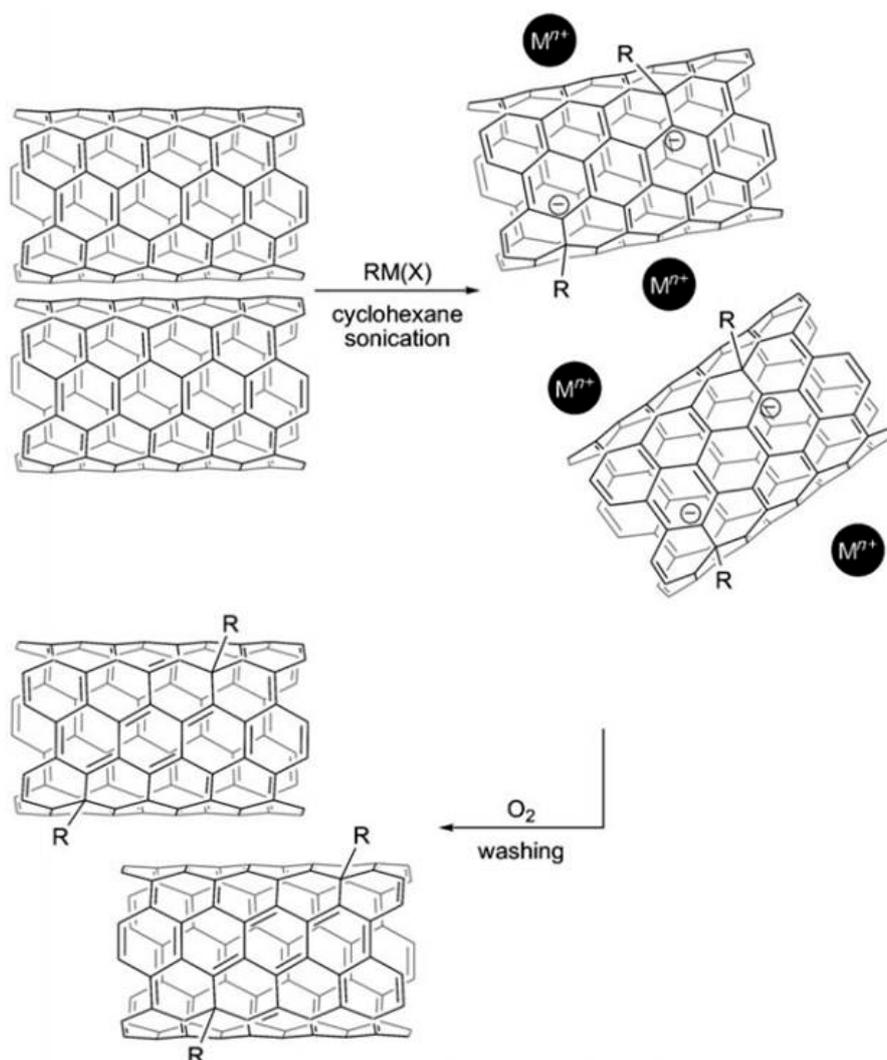


Figure 1.11 : Alkylation de SWNTs par addition nucléophile de composé organométallique  $RM(X)$ , suivie d'une réoxydation.  $R = nBu, tBu, Et$  ou  $nHex$  ;  $M = Li$  ou  $Mg$  ;  $X = Cl$  (pour  $M = Mg$ ). [123]

## **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 cetyltriméthyl 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 désoycholate 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.

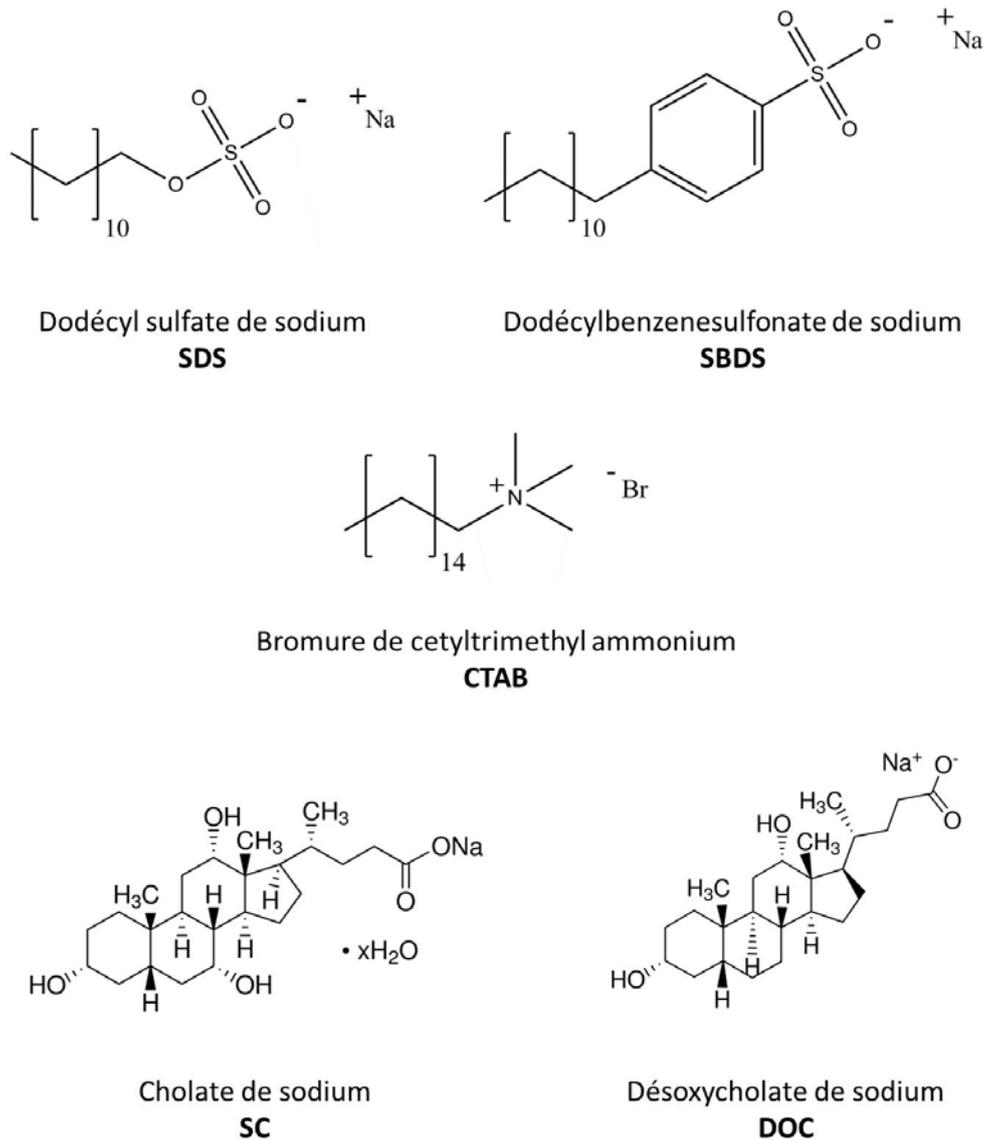


Figure 1.12 : Structures moléculaires de plusieurs tensio-actifs utilisés pour la dispersion des NTCs.

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 chaîne 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 ( $\approx 65000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). 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*.

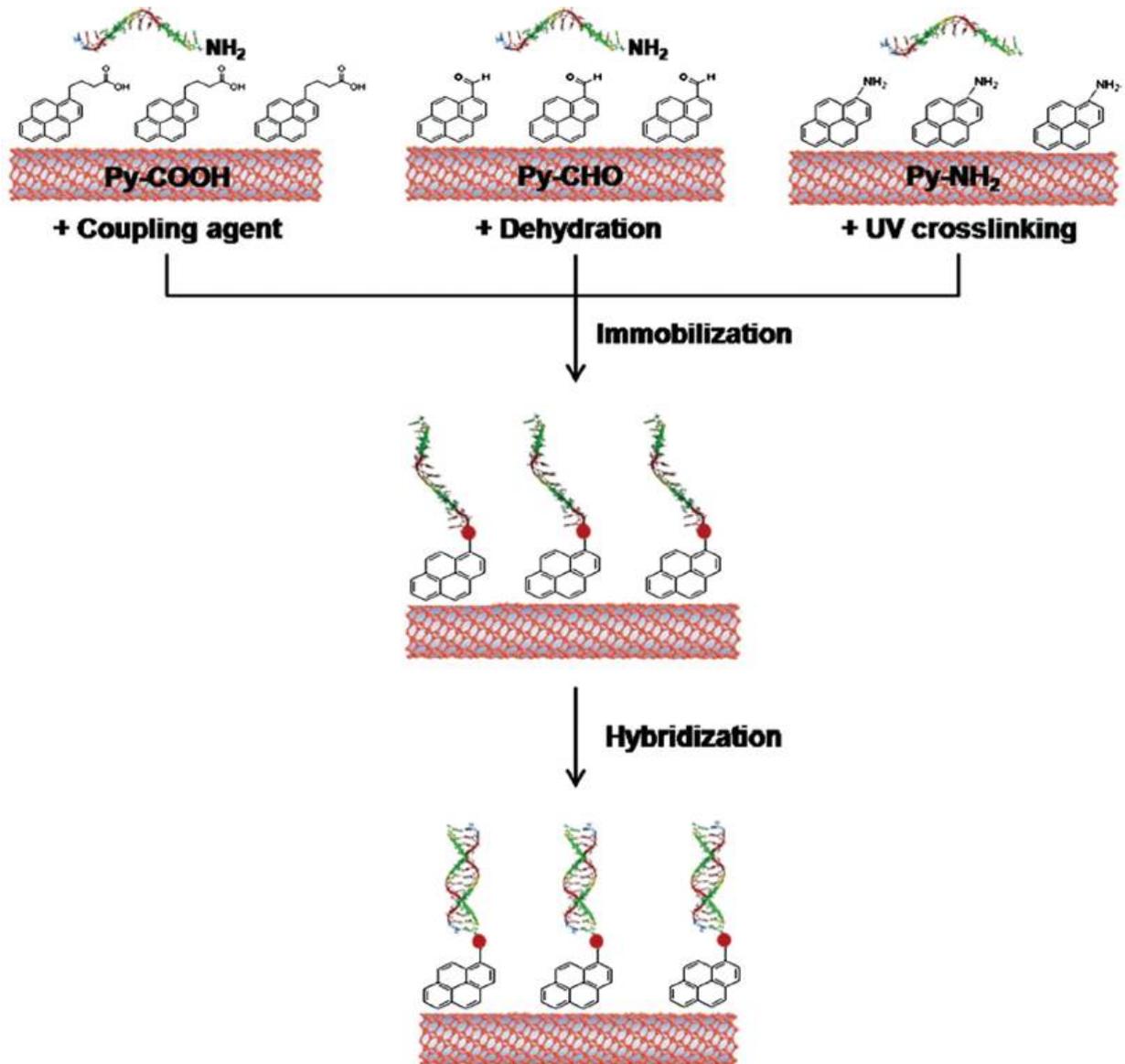


Figure 1.13 : Illustration de l'utilisation de dérivés de pyrène adsorbés sur des SWNTs afin d'y fixer des molécules d'ADN. [41]

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 liée au squelette des molécules et à leurs groupements hydrophiles.

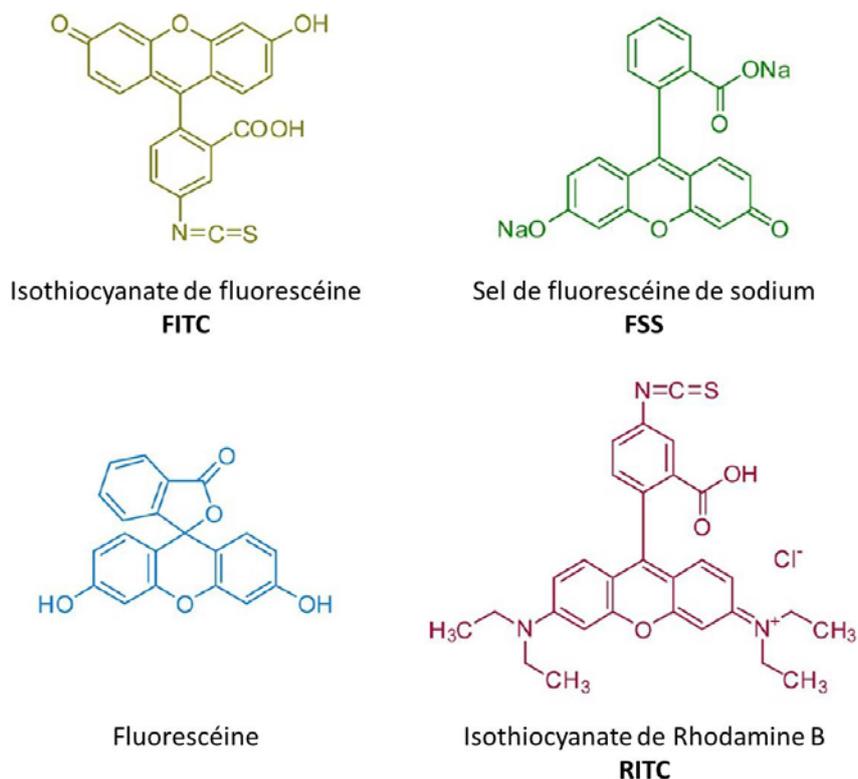


Figure 1.14 : Structures moléculaires de fluorophores utilisés pour la dispersion de SWNTs. [145]

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 xéno greffé 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  $\pi$ - $\pi$  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].

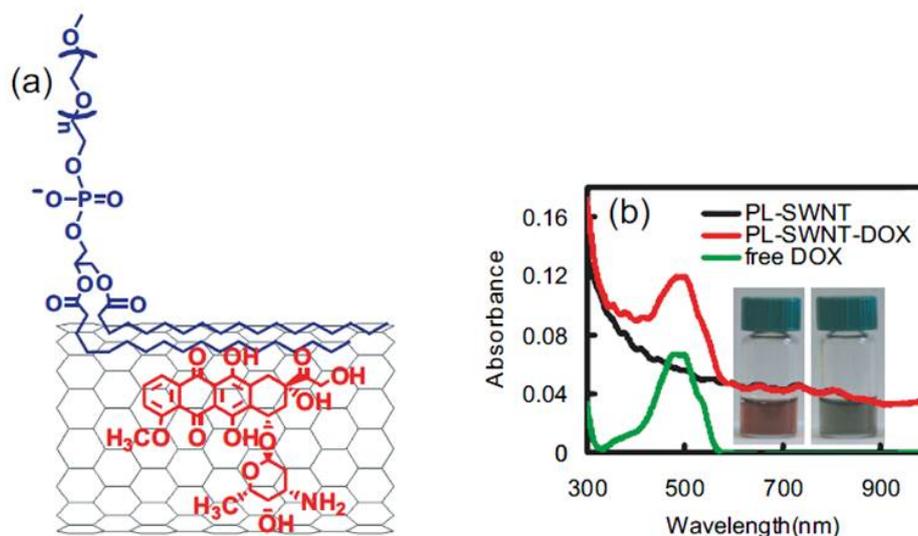


Figure 1.15 : (a) Représentation de l'assemblage supramoléculaire des SWNTs fonctionnalisés de façon non-covalente par le PL-PEG et la doxorubicine (DOX) ; (b) Spectres d'absorbance UV-Vis-IR de solutions de DOX seule (vert), de PL-SWNT (noir) et de PL-SWNT-DOX (rouge). [58,146]

### 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 étherifié 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<sub>60</sub>. 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 tellure de mercure (HgTe) ou encore de iodure de plomb (PbI<sub>2</sub>) [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].

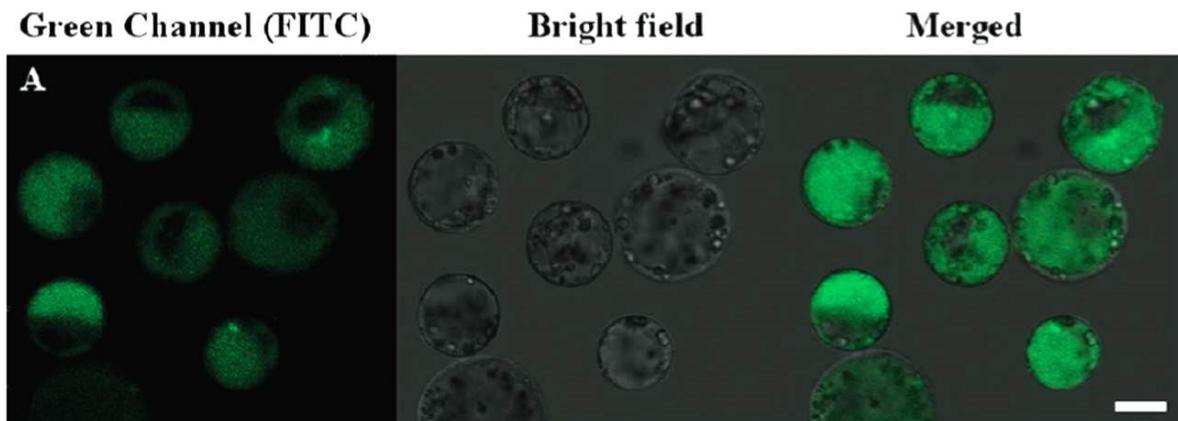


Figure 1.16 : Images de microscopie confocale de fluorescence de protoplastes incubés avec des MWNTs fonctionnalisés de façon covalente par le FITC. [174]

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.

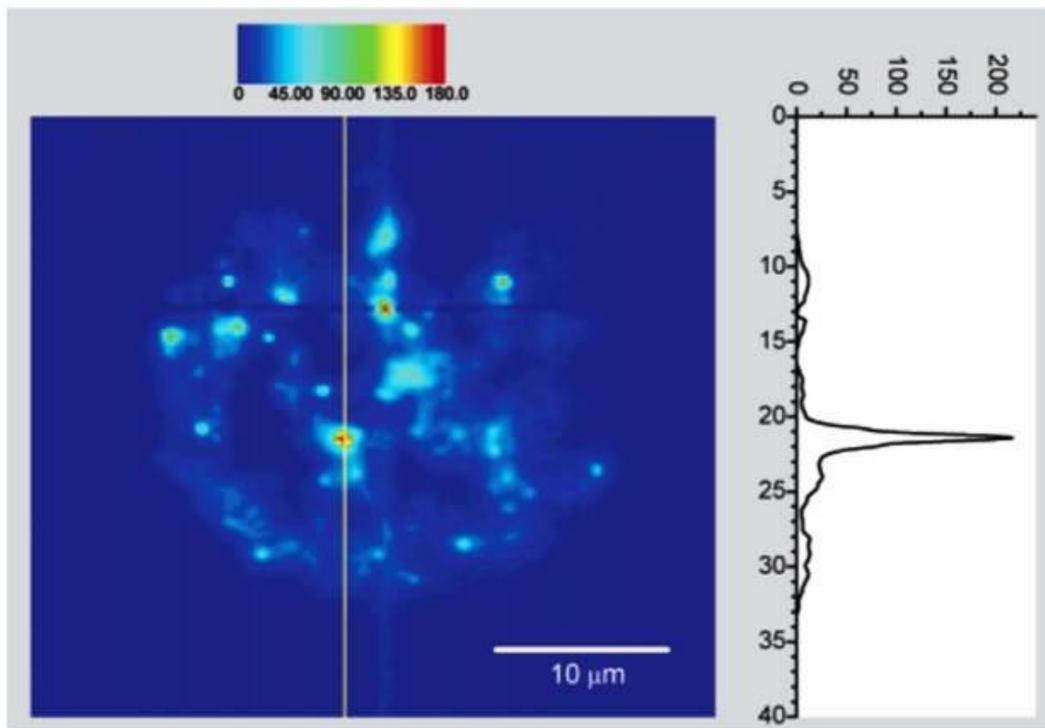


Figure 1.17 : Image en fluorescence d'un macrophage incubés avec des SWNTs. [175]

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**).

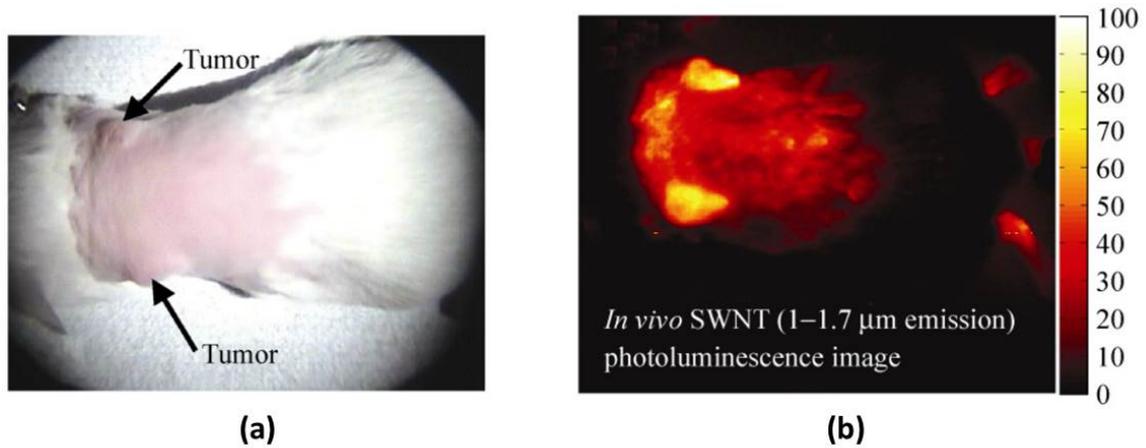


Figure 1.18 : Images montrant en (a) une souris comportant deux tumeurs signalées par les flèches noires et (b) en photoluminescence IR la même zone 48h après injection de la suspension de SWNTs. [177]

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 par 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  $\text{cm}^{-1}$  ; la bande D vers 1350  $\text{cm}^{-1}$  ; la bande G vers 1580  $\text{cm}^{-1}$  ; la bande G' vers 2630  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\text{cm}^{-1}$  (**Figure 1.19**). Ainsi il s'est

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

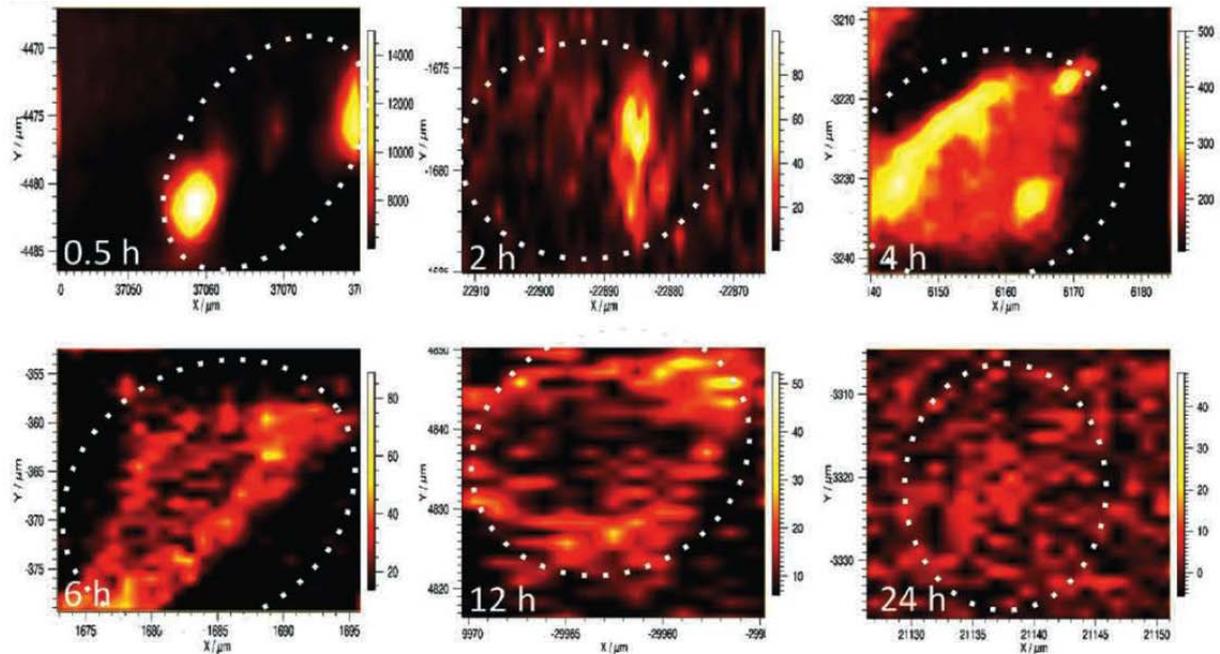
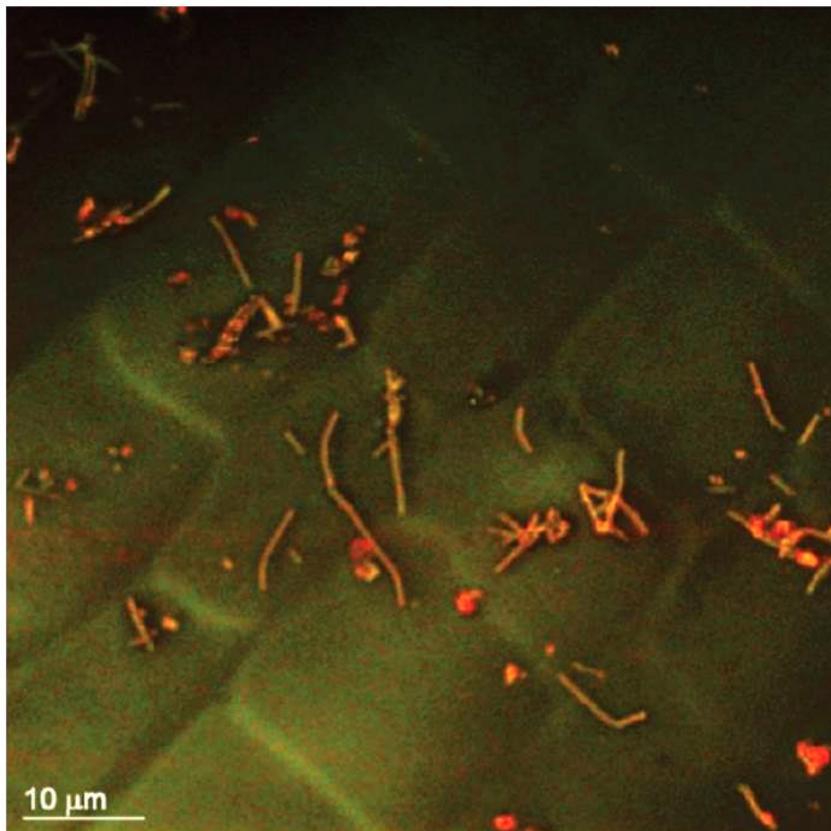


Figure 1.19 : Cartographie par microscopie Raman d'une seule cellule HeLa pendant 24h à  $\lambda = 785 \text{ nm}$ . Le signal Raman des DWNTs sélectionné pour réaliser la cartographie est une bande RBM autour de  $260 \text{ cm}^{-1}$ . La ligne en pointillé correspond quant à elle au contour de la 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<sub>60</sub> 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, Rummeli 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<sub>3</sub> 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, Tomblor 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 C<sub>60</sub>: 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 detection 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<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles*. *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 mediated 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 polyethyleneimine-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] Monthieux 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**, 46, 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, Kukovec 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**, 49, 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, Pederzoli 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. Part I. CO<sub>2</sub> 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 functionalization 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<sub>60</sub>-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 nanoelectrode 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 fluoroinated 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 nanocomposite 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, Röhr 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 functionalization of metallic and small-diameter single-walled carbon nanotubes 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 single-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 and 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, Kavooosi 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, Deviliers 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, 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.
- [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, Kulkarni 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, Stiuftuc 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 albumin*. 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 purification 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, Luangsilavay 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, Tsybouski 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  $\mu\text{m}$ ) imaging and photothermal cancer therapy with carbon nanotubes*. *Nano Res*, **2010**, 3, 779-793.

[178] Neves V, Hister E, Costa S, Tilmaciu 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 cristalliseur 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 rouges. 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  $550^{\circ}\text{C}$ .

### 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  $450^{\circ}\text{C}$  pendant 1h et sous flux d’air. La poudre de catalyseur obtenue dans cette dernière étape est homogène et de couleur écru. 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 $\text{Mg}_{0,99}\text{Co}_{0,0075}\text{Mo}_{0,0025}\text{O}$

Entre 4 et 5 g de poudre de catalyseur  $\text{Mg}_{0,99}\text{Co}_{0,0075}\text{Mo}_{0,0025}\text{O}$  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**).

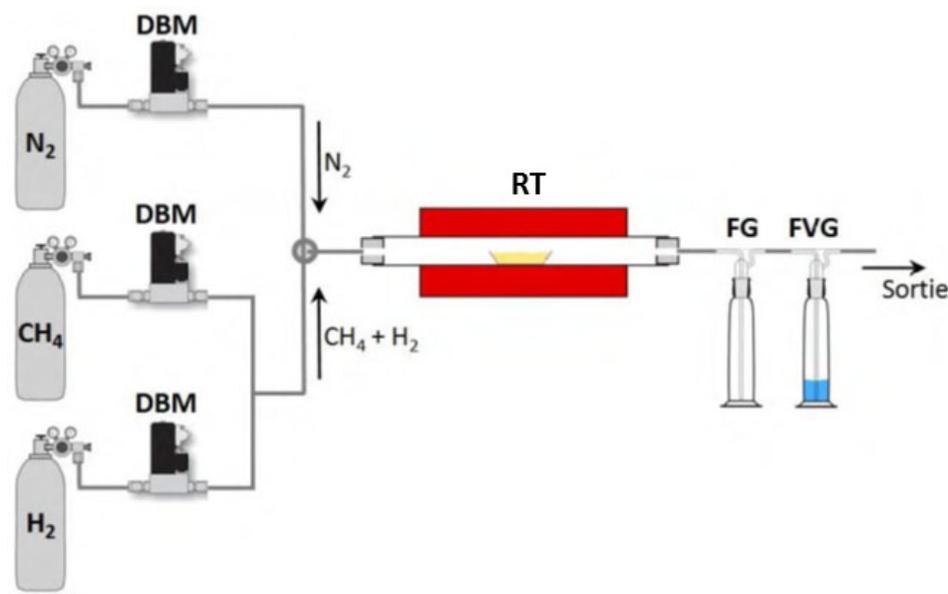


Figure 2.2 : Schéma du montage utilisé pour effectuer la synthèse par CCVD des DWNT à partir de  $\text{CH}_4$ . Un réacteur tubulaire (RT), où est introduite la nacelle contenant la poudre de catalyseur, est alimenté en azote ( $\text{N}_2$ ) ou en méthane et hydrogène ( $\text{CH}_4 + \text{H}_2$ ). 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  $1000^\circ\text{C}$ , à une vitesse de  $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sous atmosphère de dihydrogène et de méthane (18%  $\text{CH}_4$ ) à un débit de  $15 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Sous le flux de  $\text{H}_2$ , 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  $120^\circ\text{C}$ , à une vitesse de  $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sous la même atmosphère de  $\text{H}_2$  et  $\text{CH}_4$  à un débit de  $15 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ . Au cours de cette phase va se poursuivre la croissance des DWNTs.
- 3) Purge sous atmosphère d'azote ( $\text{N}_2$ ) jusqu'à température ambiante pendant 20 min. Cette dernière étape permet d'éliminer toute trace de  $\text{H}_2$  et de  $\text{CH}_4$ , 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%<sub>m</sub> de NTCs (dont 80% de DWNTs), les 88%<sub>m</sub> 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.

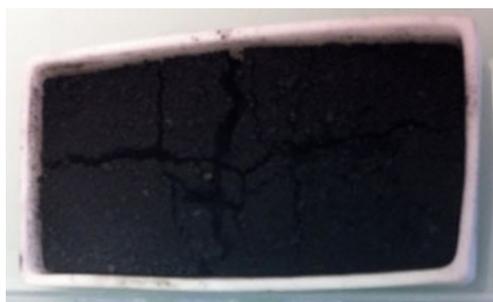


Figure 2.3 : Photos de la poudre nanocomposite obtenue à la fin de la CCVD.

### 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  $\mu\text{m}$ ), le 1<sup>er</sup> 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  $\text{HNO}_3$  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  $130^\circ\text{C}$  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,  $0,45\ \mu\text{m}$ ). 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 $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (1 : 3) à $70^\circ\text{C}$ (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  $\text{HNO}_3$  65% /  $\text{H}_2\text{SO}_4$  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  $70^\circ\text{C}$  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,  $0,45\ \mu\text{m}$ ). 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 $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ (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  $\text{N}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{CO}_2$  [4].

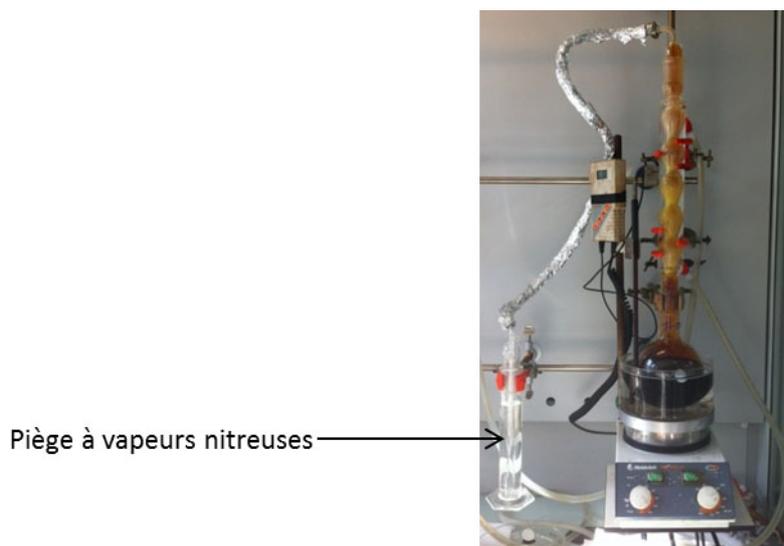


Figure 2.4 : Photo du montage à reflux monté d'un piège à vapeurs nitreuses pour l'oxydation des DWNTs par la Méthode 3.

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  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (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  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (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  $\mu\text{m}$ ). 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  $\text{HNO}_3$  3M (voir B.I.)
- 2) Reflux à 70°C pendant 5h des DWNTs obtenus dans 200 mL d'un mélange  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 : 3) (voir B.II.1.)

Il faut noter qu'aux 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> 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  $\mu\text{m}$ ) 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 chlorure 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'hydrogencarbonate de sodium par exemple) avant d'être jeté car il pourrait réagir très violemment avec les déchets acides [5].

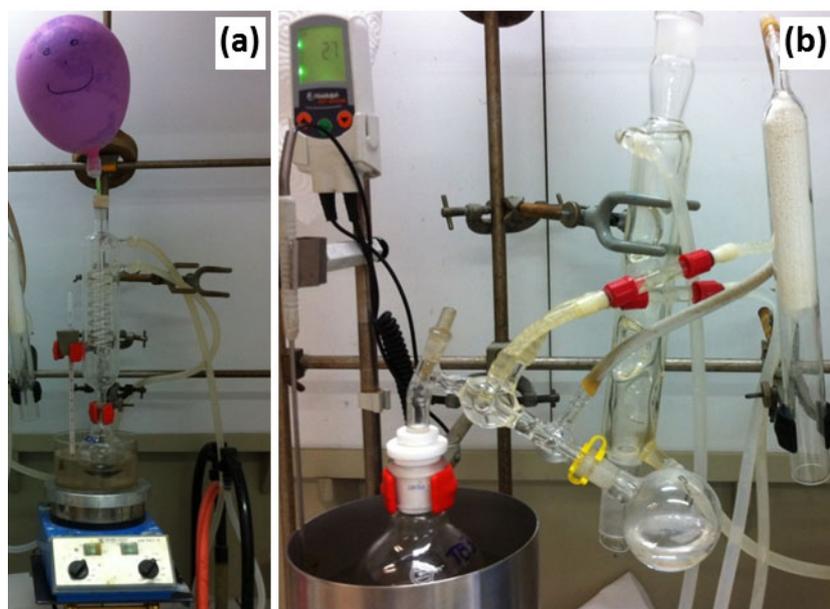


Figure 2.6 : Photo du (a) montage à reflux pour l'activation des DWNTs oxydés par le chlorure d'oxalyle sous atmosphère d'argon et (b) montage de distillation du chlorure d'oxalyle.

### 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  $\mu\text{m}$ ). 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'hydrogencarbonate 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  $1,11 \cdot 10^{-2}$  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  $\mu$ m). 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,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  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 ( $\text{PyMeNH}_2$ ). 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<sub>2</sub>, 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 ( $\approx 900 \text{ m}^2/\text{g}$ ) 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  $2,57 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  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  $1,87 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  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-<sup>3</sup>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-<sup>3</sup>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<sup>-1</sup>, 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<sub>2</sub>. 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<sup>-1</sup>). 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<sub>2</sub>.

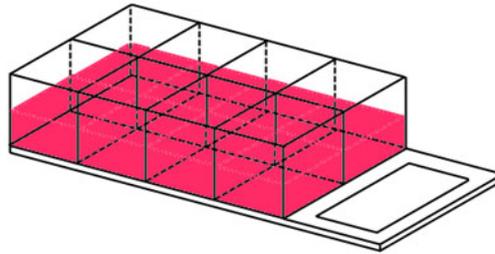


Figure 2.7 : Schéma du montage d'incubation utilisé : système de 8 puits de culture séparés, collé sur une lame en verre permettant une incubation simultanée sur une même lame de 8 milieux de culture différents.

Les suspensions de DWNTs sont préparées à la concentration de 1 mg.mL<sup>-1</sup> : 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  $\mu$ L de suspensions de DWNTs ou 50  $\mu$ L de solutions témoins de fluorophores sont introduits dans les puits pour un volume total de 550  $\mu$ L (concentration en DWNTs de  $0,18 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Les lames sont ensuite mises à incuber à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24h sous atmosphère à 5%  $\text{CO}_2$ . Une fois l'incubation terminée, le milieu de culture est aspiré, les puits sont rincés deux fois au PBS enrichi en ions  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Les cellules sont ensuite fixées au PFA à 4% pendant 15 min à température ambiante, puis lavées au PBS. 100  $\mu$ L d'une solution de 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) dans le PBS ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) sont ajoutées dans chaque puits et le milieu est mis à incuber 10 min à  $37^{\circ}\text{C}$ . Le colorant est ensuite retiré par aspiration et les puits rincés une fois au PBS enrichi en  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . 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 sontensemencées sur lamelles dans du milieu RPMI à 5% SVF à  $37^{\circ}\text{C}$  et une atmosphère de 5%  $\text{CO}_2$ . Les suspensions de DWNTs sont préparées à  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  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  $\mu$ L de suspensions ou de solutions témoins sont injectées dans chaque puits pour des volumes totaux respectivement de 1100  $\mu$ L et de 1050  $\mu$ L (concentrations en DWNTs respectivement de  $0,09 \text{ mg.mL}^{-1}$  et de  $0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$ ). Les puits sont ensuite mis à incuber pendant 24h, 48h ou 72h à  $37^{\circ}\text{C}$  sous atmosphère à 5%  $\text{CO}_2$ . Le milieu est ensuite aspiré et les lamelles sont lavées trois fois au PBS enrichi en  $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Ca}^{2+}$  (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 réfléchié 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 exciteur : 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 :

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

$\nu_d > \nu_0$      $\nu_d = \nu_0 + \nu_v$     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  $\text{cm}^{-1}$  (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  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\text{cm}^{-1}$ . Comme son nom l'indique, cette bande est proportionnelle tant en largeur qu'en intensité aux défauts présents dans la structure de carbone  $\text{sp}^2$ . Elle est donc directement reliée à la quantité de C  $\text{sp}^3$  présent dans ce réseau de carbone.
- La bande G ou bande Graphite se situe entre 1575 et 1590  $\text{cm}^{-1}$ . Elle est spécifique au réseau hexagonal de carbone  $\text{sp}^2$  donc caractéristique du graphite et des NTCs.
- La bande G' ou 2D se situe entre 2620 et 2640  $\text{cm}^{-1}$ . 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  $\lambda = 633 \text{ nm}$ ,
- Filtre de 10% (D1),
- Diamètre de trou de  $100 \mu\text{m}$ ,
- Réseau de 600 traits,
- 5 acquisitions (à des positions différentes sur l'échantillon analysé),
- 5 s d'exposition,
- 5 accumulations,
- Mode multifenêtre de  $10 \text{ à } 3000 \text{ cm}^{-1}$ .

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  $\lambda = 457 \text{ nm}$  pour la fluorescéine (ou FITC), et  $\lambda = 725 \text{ nm}$  pour la cyanine Cy\*,
- Diamètre de trou de  $200 \mu\text{m}$ ,
- 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  $\text{cm}^{-1}$  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.1.3. 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 $\lambda$ (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  $\lambda$   
(en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )
- $l$  la longueur de la cuve (en cm)
- $c$  la concentration en molécules absorbantes à la longueur d'onde  $\lambda$  (en  $mol \cdot L^{-1}$ )

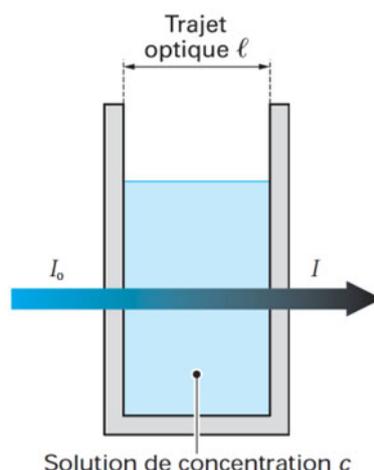


Figure 2.8 : Schéma d'une cellule d'absorption d'un spectrophotomètre UV-visible.

D'après cette loi, l'absorbance  $A_\lambda$  est ainsi proportionnelle à la concentration de l'espèce qui absorbe à la longueur d'onde  $\lambda$ . Une droite d'étalonnage peut alors être construite pour cette espèce à la longueur d'onde  $\lambda$  : 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<sub>2</sub>O 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 ( $\approx 20000$  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 ( $0 < E_g \leq 3,5$  eV) [12].

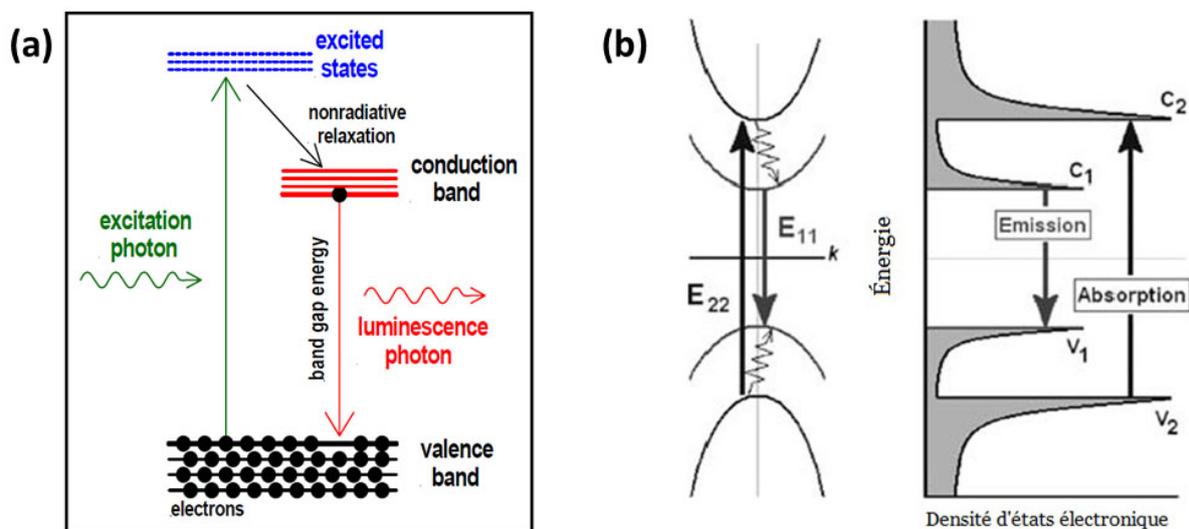


Figure 2.9 : Schémas du processus de photoluminescence dans (a) un solide semi-conducteur [13] et (b) un nanotube de carbone [14].

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 d'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.1.3).

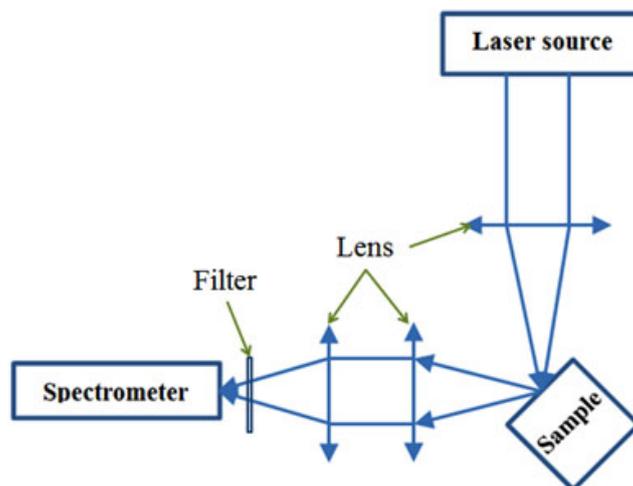


Figure 2.10 : Schéma du montage utilisé pour les mesures de photoluminescence.

### E.1.5. 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].

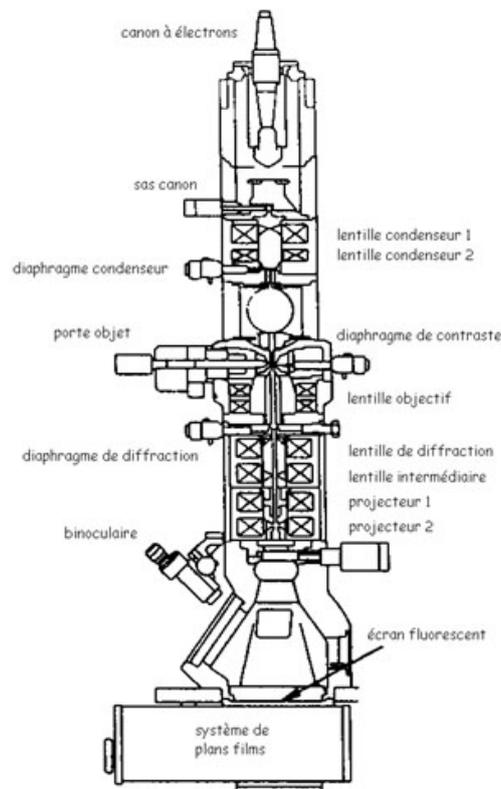


Figure 2.11 : Coupe d'une colonne de microscopie électronique à transmission [16].

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<sub>2</sub> et de l'eau issus de la combustion. Les quantités de CO<sub>2</sub> 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<sup>-1</sup> 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<sup>-1</sup> (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<sub>2</sub>, 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<sup>-1</sup> et un petit barreau aimanté sont introduits dans un tube Schlenk (sans DWNTs). La solution est saturée et en N<sub>2</sub>, 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 ( $2 \text{ OH}^- + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O}$ ). En effet, les sauts de pH correspondant aux réactions des ions  $\text{OH}^-$  et  $\text{CO}_3^{2-}$  avec  $\text{H}_3\text{O}^+$  ont lieu quasiment dans la même zone donc il est nécessaire de soustraire la participation des ions  $\text{CO}_3^{2-}$  au résultat final du dosage.

Tous les dosages de fonctions acides ont été réalisés sur un titrimètre Metrohm 808 Titrand. 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  $10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$ .

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

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

### 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 entraîné 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.

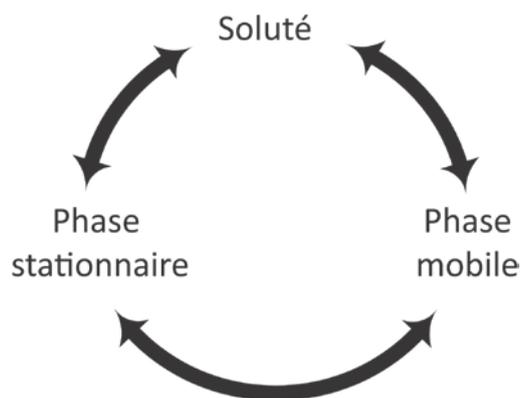


Figure 2.12 : Schéma des interactions existant en chromatographie en phase liquide.

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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , un volume d'injection de 10  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{m}$ , dimensions 2,1 x 50 mm. Elution isocratique ACN/H<sub>2</sub>O (55/45), débit 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , un volume d'injection de 2,0  $\mu\text{L}$ , durée d'analyse = 0,6 min, Température de colonne = 40°C,  $\lambda = 280 \text{ nm}$ .
- Pour la cyanine (produit de l'hémicarboxonium) : colonne Acquity BEH C18, granulométrie 1,7  $\mu\text{m}$ , dimensions 2,1 x 50 mm. Elution isocratique ACN/H<sub>2</sub>O (4g.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium) (60/40), débit 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , un volume d'injection de 2,0  $\mu\text{L}$ , durée d'analyse = 0,7 min, Température de colonne = 40°C,  $\lambda = 398 \text{ nm}$ .
- Pour le Cy5 NHS Ester : colonne Acquity BEH HILIC, granulométrie 1,7  $\mu\text{m}$ , dimensions 2,1 x 50 mm. Elution isocratique ACN/H<sub>2</sub>O (4g.L<sup>-1</sup> d'acétate d'ammonium) (80/20), débit 0,6  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ , un volume d'injection de 2,0  $\mu\text{L}$ , durée d'analyse = 0,6 min, Température de colonne = 40°C,  $\lambda = 287 \text{ nm}$ .
- Pour le 25-HC : colonne Acquity BEH C18, granulométrie 1,7  $\mu\text{m}$ , dimensions 2,1 x 50 mm. Elution isocratique ACN/H<sub>2</sub>O (80/20), débit 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , un volume d'injection de 2,0  $\mu\text{L}$ , durée d'analyse = 0,8 min, Température de colonne = 40°C,  $\lambda = 202 \text{ nm}$ .

#### 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<sub>2</sub>O

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

Solution ④ = EtOH à 60% en volume dans H<sub>2</sub>O

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  $\lambda = 570$  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  $\lambda = 570$  nm est proportionnelle à la quantité de fonctions NH<sub>2</sub> 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.

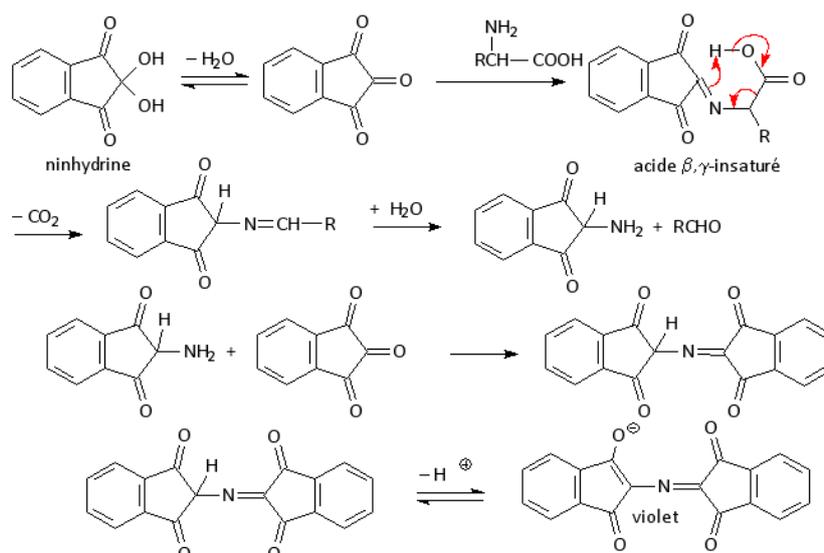


Figure 2.13 : Mécanisme de la formation du pourpre de Ruhemann [21].

Sachant que le coefficient d'extinction molaire du pourpre de Ruhemann est égal à  $\epsilon = 15000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  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 :

$$\text{Quantité de fonctions amines } (\mu\text{mol/g DWNTs}) = \frac{\text{Abs}_{\text{mesurée}} \times \text{dilution}(\text{mL}) \times 10^6}{\epsilon \times l \times \text{masse d'échantillon}(\text{mg})}$$

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<sub>2</sub>.
- 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  $\hbar\omega$  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  $\omega$ , de laquelle est déduite l'organisation spatiotemporelle des atomes de l'échantillon.

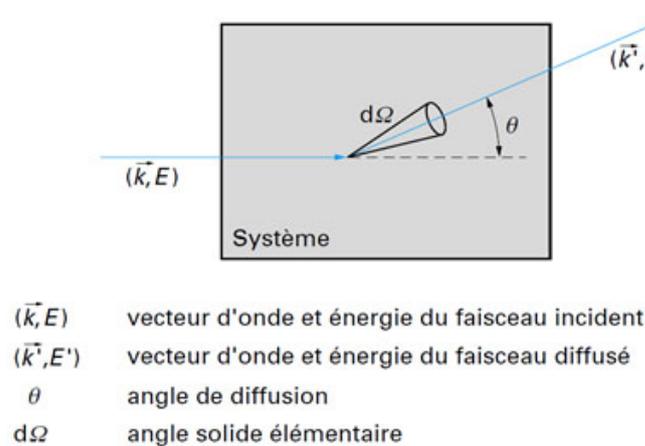


Figure 2.14 : Représentation schématique de l'interaction d'un rayonnement de neutrons sur un échantillon [24].

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-<sup>3</sup>H (**Figure 2.15**). Le tritium, isotope radioactif de l'hydrogène, a une activité spécifique de 9650 Ci.g<sup>-1</sup> et une demi-vie de 12,3 ans [27].

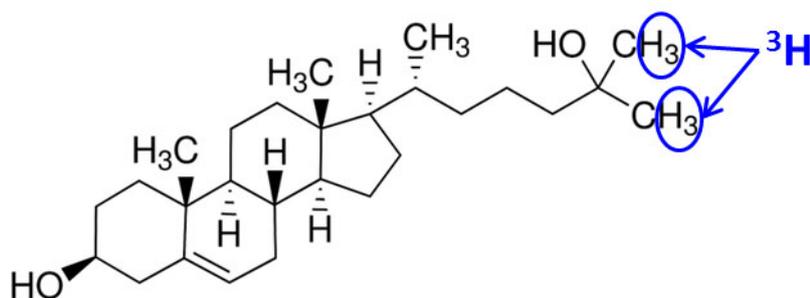


Figure 2.15 : Représentation de la molécule de 25-hydroxycholestérol tritié.

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].

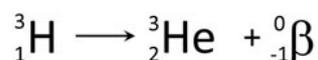


Figure 2.16 : Réaction de désintégration du tritium.

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.

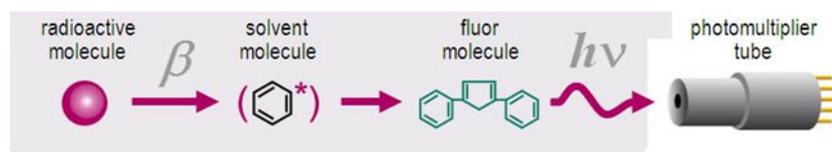


Figure 2.17 : Schéma résumant le principe de la mesure de la radioactivité par scintillation liquide.

## 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 réfléchi 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 ( $\lambda_{\text{émission}} > \lambda_{\text{excitation}}$ ). 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].

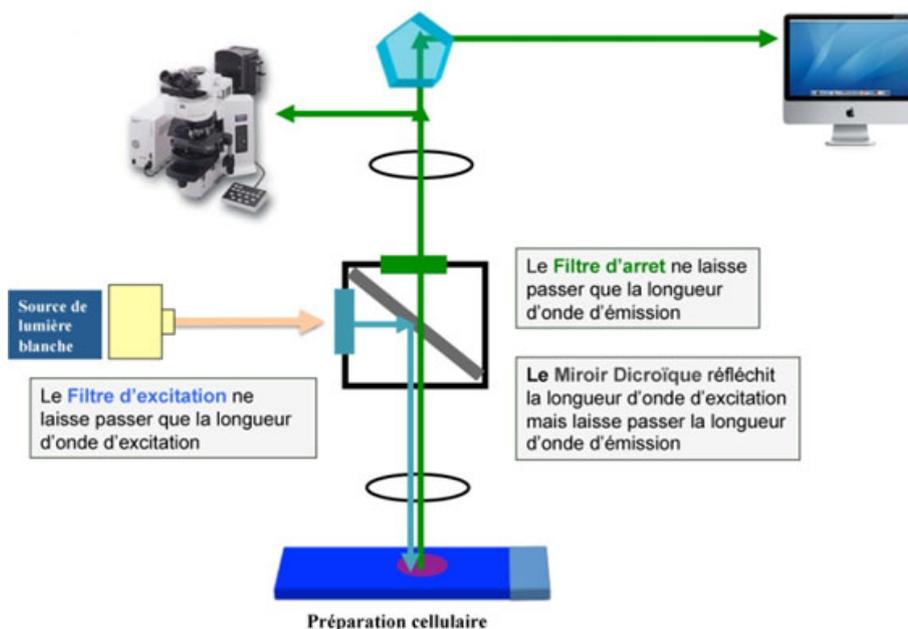


Figure 2.18 : Schéma du principe de la microscopie à épifluorescence [32].

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].

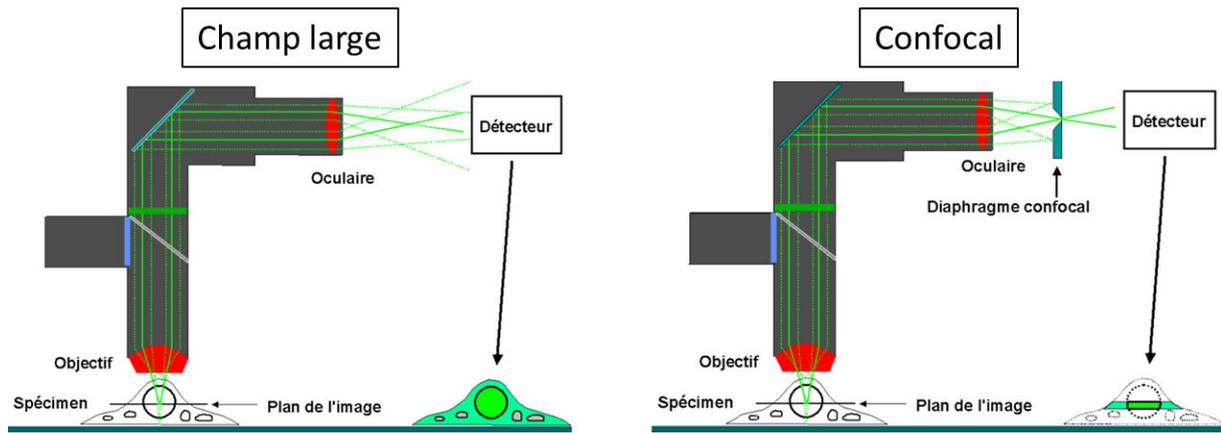


Figure 2.19 : Schéma montrant la différence d'observation entre les microscopies à champ large et confocale [33].

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  $\mu$ L, 24h). Seuls des profils en z sur des points uniques ont été enregistrés avec un pas de 5  $\mu$ m, les lasers vert ( $\lambda = 532$  nm) et rouge ( $\lambda = 633$  nm), une fente de 100  $\mu$ m, un trou de 100  $\mu$ m, 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  $\text{cm}^{-1}$ .

Par la suite, les analyses ont été effectuées sur un microscope confocal Raman Labram HR800 Horiba Yvon Jobin à une longueur d'onde de  $\lambda = 532$  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  $\mu$ m,

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

#### 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].

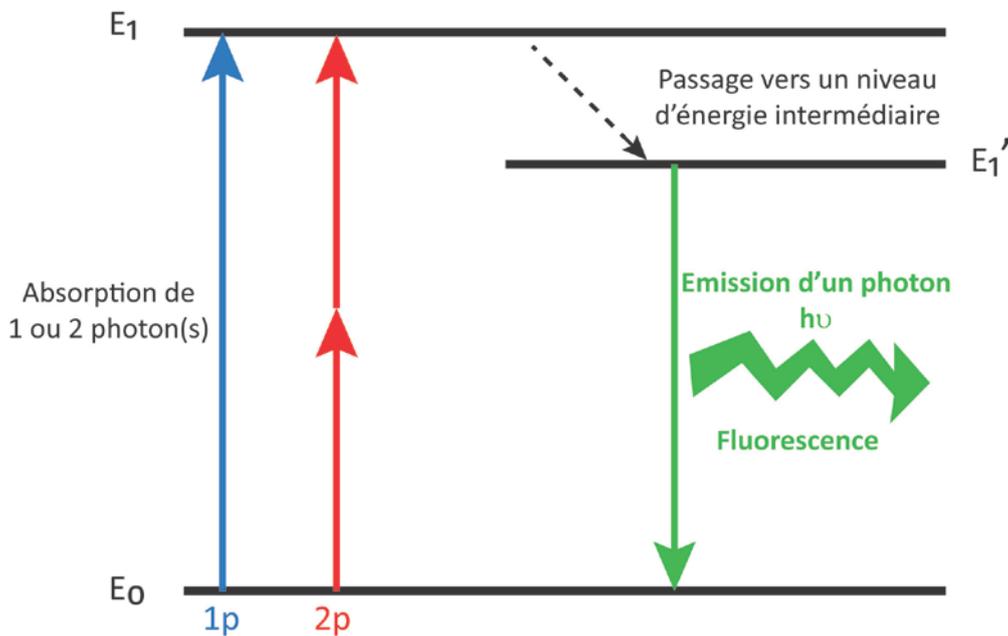


Figure 2.20 : Illustration du principe de la microscopie bi-photonique de fluorescence [36].

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 ( $10^{-16} \text{ sec}$ ) 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 Chaméleon 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, Dhamelin court 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] Garrett 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<sub>4</sub> sur le support catalytique MgO.

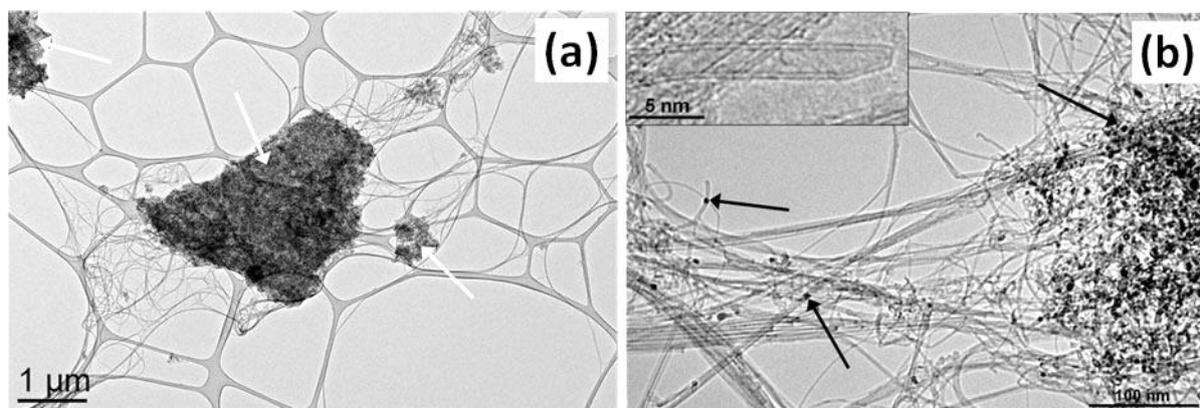


Figure 3.1 : Images MET de DWNTs bruts montrant (a) le carbone désorganisé (flèches blanches) et (b) les nanoparticules métalliques (flèches noires).

Concernant le spectre Raman des DWNTs bruts obtenu pour  $\lambda = 633$  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  $0,20 \pm 0,05$ . 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.

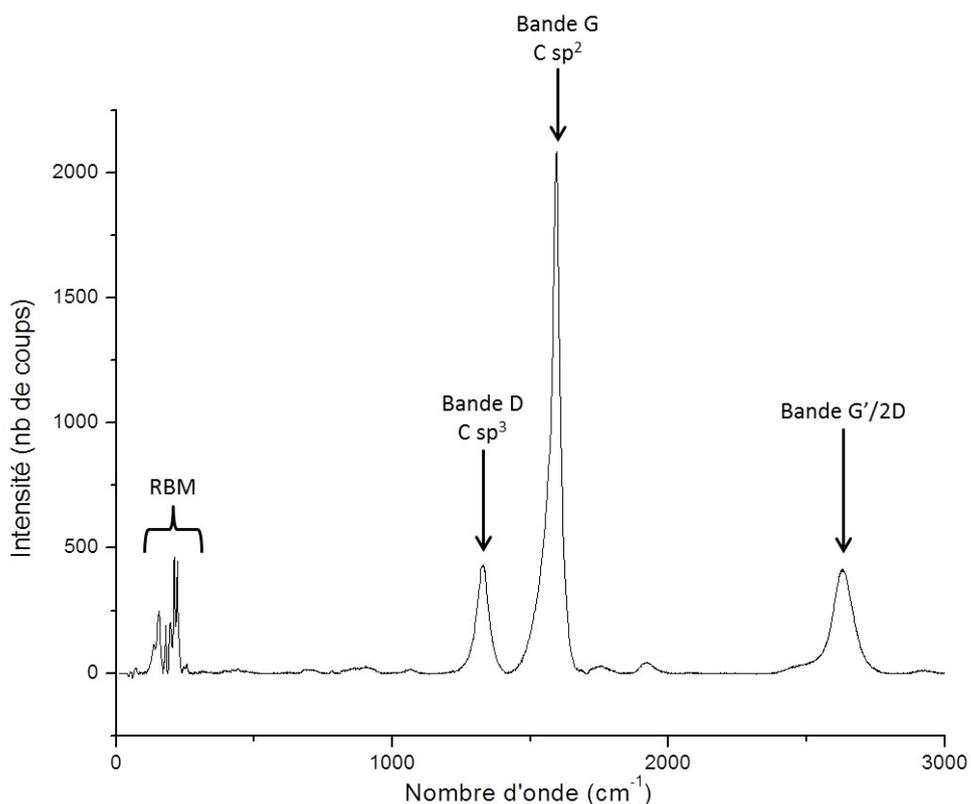


Figure 3.2 : Spectre Raman caractéristique des DWNTs bruts ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ).

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.

Élément analysé	Teneur massique (%)
<b>C</b>	91,87 ± 0,50
<b>O</b>	2,16 ± 0,30
<b>Co</b>	3,5 ± 0,1
<b>Mo</b>	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<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub>, 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<sup>-1</sup>,
- C=O conjuguée : bande à 1633 cm<sup>-1</sup>,
- C-H des carbones sp<sup>3</sup> : bandes autour 2900 cm<sup>-1</sup>,
- =C-H des carbones sp<sup>2</sup> aromatiques : bandes comprises entre 3050 et 3100 cm<sup>-1</sup>.

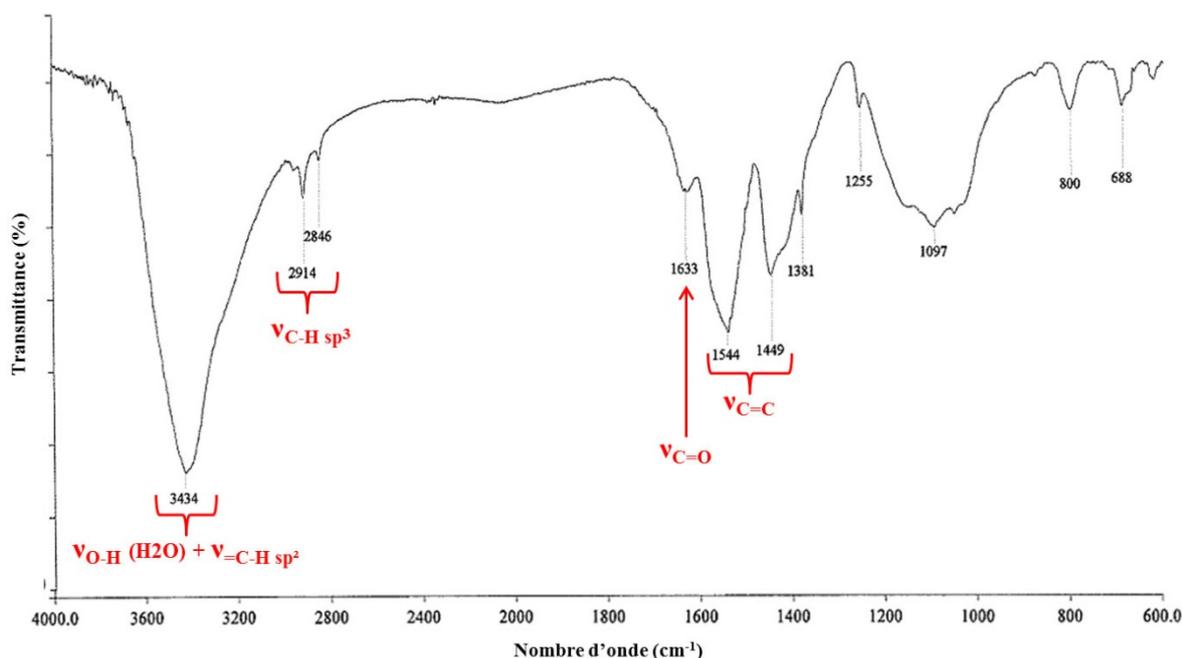


Figure 3.3 : Spectre IR caractéristique des DWNTs bruts.

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 ( $I_D/I_G = 0,20 \pm 0,05$ ) ; 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<sub>3</sub> (3M),
- **Méthode 2** = Reflux à 70°C dans HNO<sub>3</sub> conc./H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (1 : 3),
- **Méthode 3** = Reflux à 130°C dans HNO<sub>3</sub> conc./H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (1 : 3),
- **Méthode 4** = Reflux à 130°C dans HNO<sub>3</sub> conc./H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (1 : 3) utilisant les micro-ondes,
- **Méthode 5** = Reflux à 130°C dans HNO<sub>3</sub> (3M) puis à 70°C dans HNO<sub>3</sub> conc./H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 disparaît, 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.

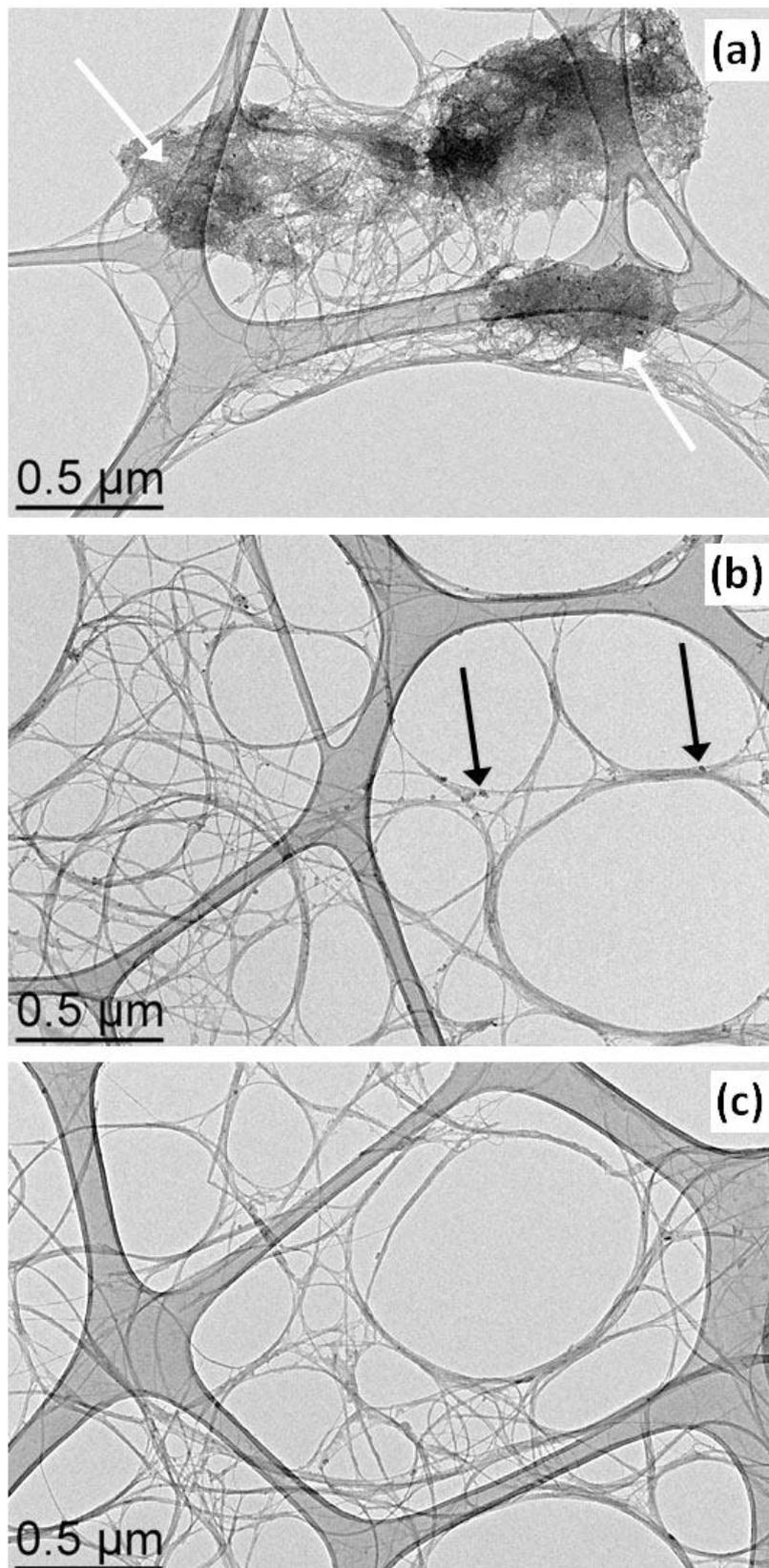


Figure 3.4 : Images MET de DWNTs traités par (a) la Méthode 1 ; (b) la Méthode 2 pendant 24h et (c) la Méthode 5. Sur ces images sont indiqués le carbone désorganisé (flèches blanches) et les nanoparticules métalliques (flèches noires).

## 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<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> conc/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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.

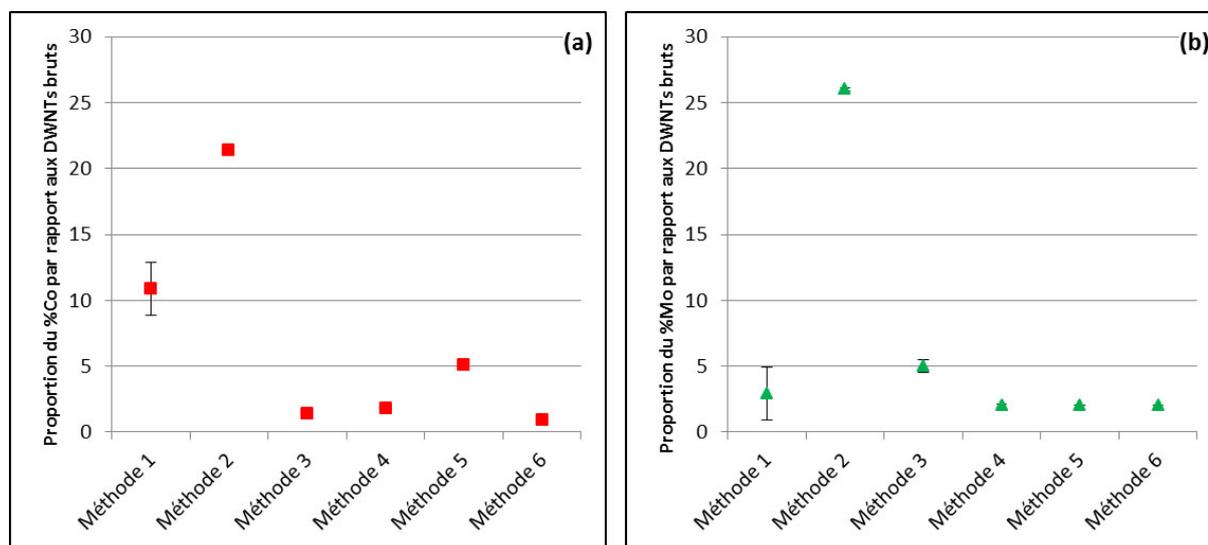


Figure 3.5 : Graphiques représentant les pourcentages par rapport à la valeur initiale en (a) Cobalt et (b) Molybdène dans les échantillons traités par les six différentes méthodes.

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  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$  (1 : 3) à 130°C (Méthode 3) et en ajoutant de surcroît 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.

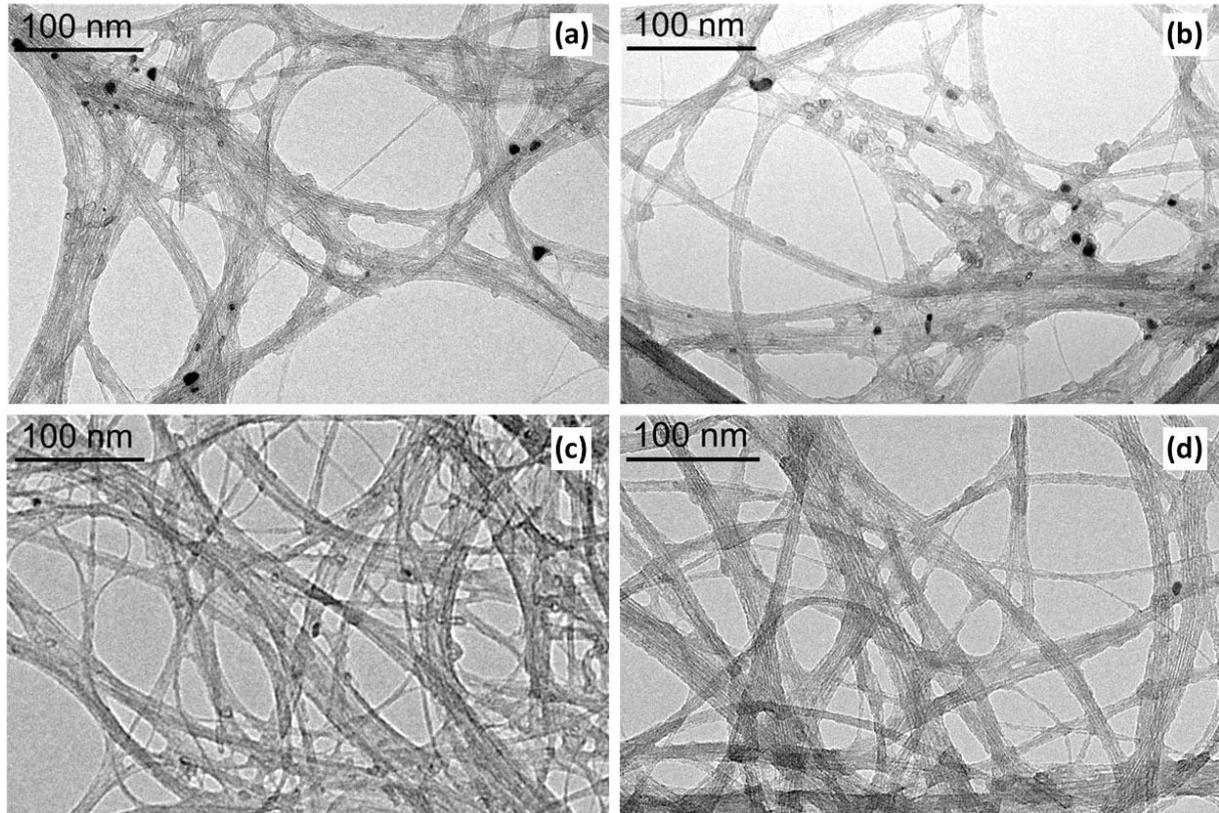


Figure 3.6 : Images MET de DWNTs traités par la Méthode 2 pendant (a) 3h ; (b) 4h ; (c) 5h et (d) 6h30.

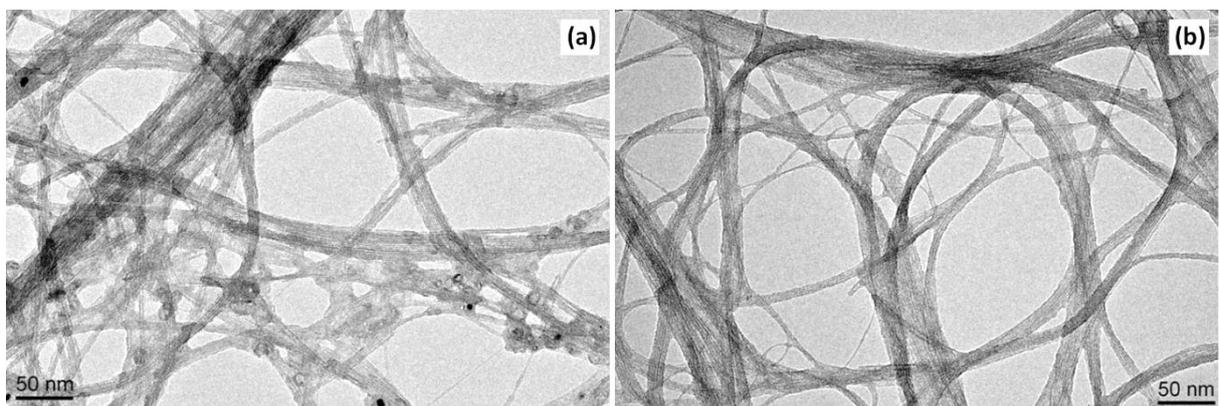


Figure 3.7 : Images MET de DWNTs traités par la Méthode 4 pendant (a) 15 min et (b) 30 min.

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 désordonnés.

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.

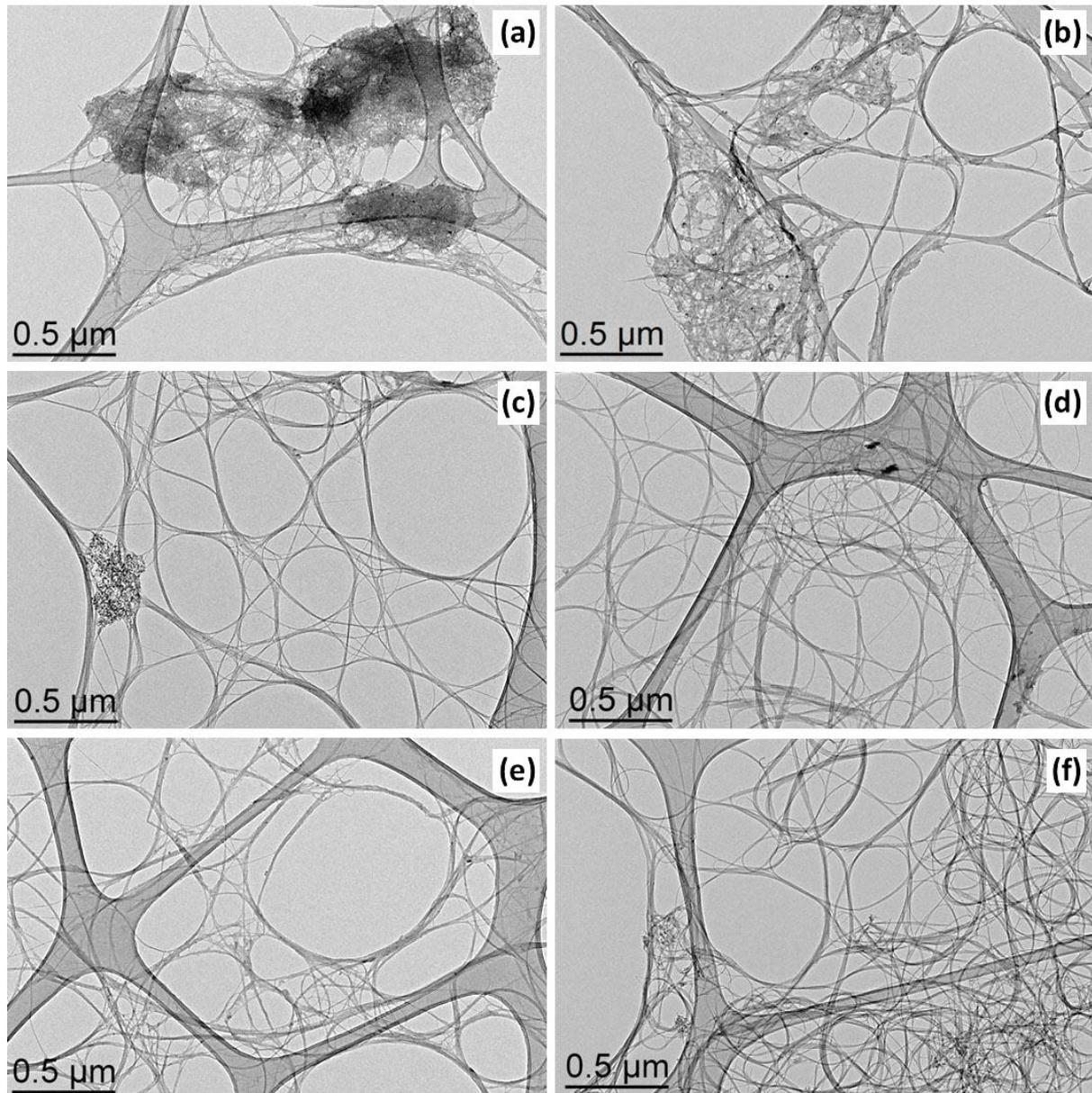


Figure 3.8 : Images MET de DWNTs traités par (a) la Méthode 1 ; (b) la Méthode 2 pendant 6h30 ; (c) la Méthode 3 ; (d) la Méthode 4 pendant 30 min ; (e) la Méthode 5 et (f) la Méthode 6.

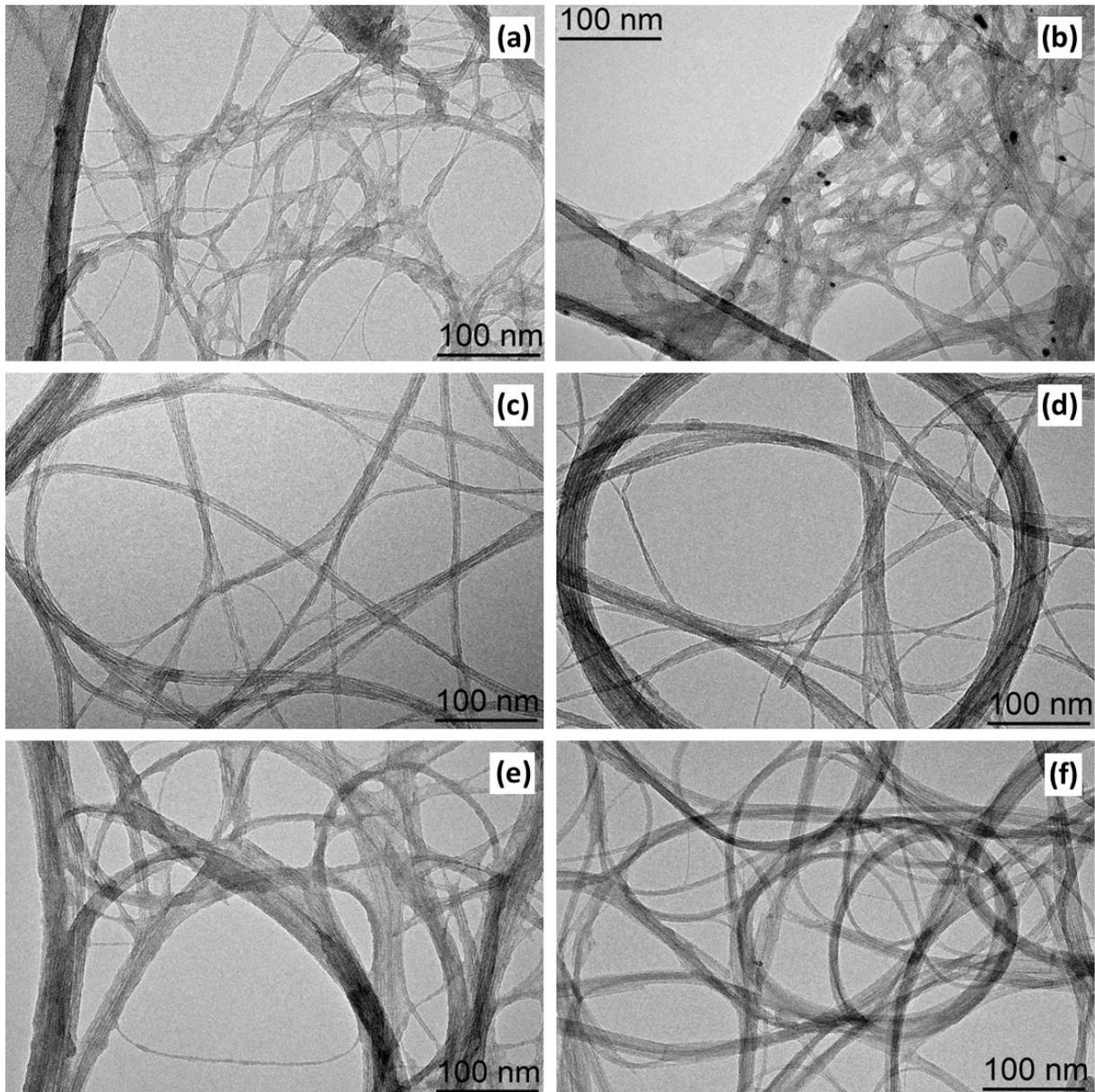


Figure 3.9 : Images MET à un plus fort grossissement de DWNTs traités par (a) la Méthode 1 ; (b) la Méthode 2 pendant 6h30 ; (c) la Méthode 3 ; (d) la Méthode 4 pendant 30 min ; (e) la Méthode 5 et (f) la Méthode 6.

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 elongations 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	$0,20 \pm 0,05$
Méthode 1 - 24h	$0,4 \pm 0,1$
Méthode 2 - 3h	$0,08 \pm 0,02$
Méthode 2 - 4h	$0,08 \pm 0,02$
Méthode 2 - 5h	$0,07 \pm 0,02$
Méthode 2 - 6,5h	$0,06 \pm 0,02$
Méthode 2 - 24h	$0,050 \pm 0,001$
Méthode 3 - 5h	$0,03 \pm 0,01$
Méthode 4 - 15 min	$0,029 \pm 0,001$
Méthode 4 - 30 min	$0,017 \pm 0,002$
Méthode 5 - 24+5h	$0,08 \pm 0,01$
Méthode 6 - 30 min	$0,020 \pm 0,001$

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 ( $0,20 \pm 0,05$ ) 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  $0,4 \pm 0,1$  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<sub>4</sub> 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**).

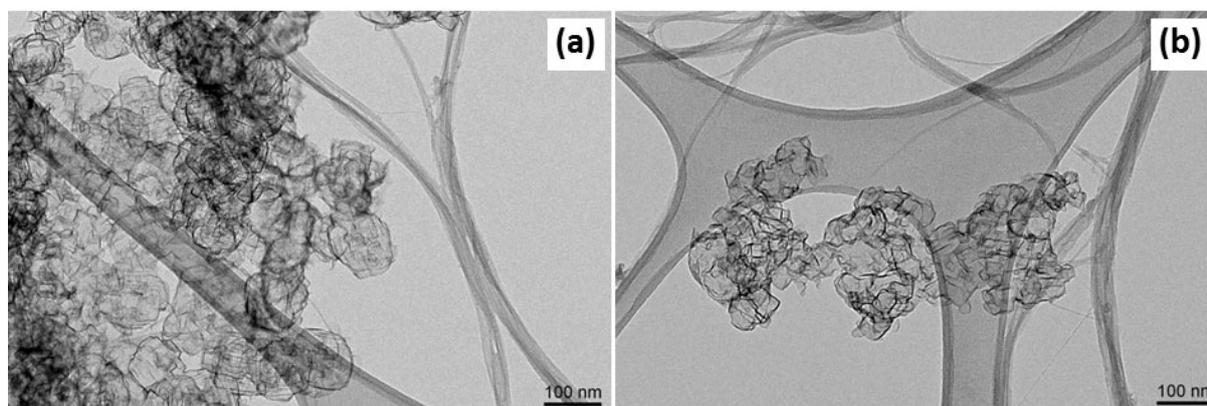


Figure 3.10 : Images MET des (a) DWNTs Meth6@Voiles bruts et (b) DWNTs Meth6@Voiles Meth1.

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	$0,020 \pm 0,001$
Voiles de carbone bruts	$1,9 \pm 0,1$
Voiles de carbone Meth1	$2,03 \pm 0,08$
DWNTs Meth6@Voiles bruts	$0,024 \pm 0,008$
DWNTs Meth6@Voiles Meth1	$0,03 \pm 0,01$

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 ( $\approx 18$  %) et un rapport  $I_D/I_G$  relativement faible ( $\approx 0,07$ ). 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  $I_D/I_G$  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 ( $-\text{COOH}$ ), 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  $1544\text{ cm}^{-1}$ ), C-H des carbones  $\text{sp}^3$  (entre  $2846$  et  $2955\text{ cm}^{-1}$ ), =C-H et O-H (vers  $3440\text{ cm}^{-1}$ ). 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  $1631\text{ cm}^{-1}$ ,
- C-O : bande entre  $1259$  et  $1384\text{ cm}^{-1}$ .

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.

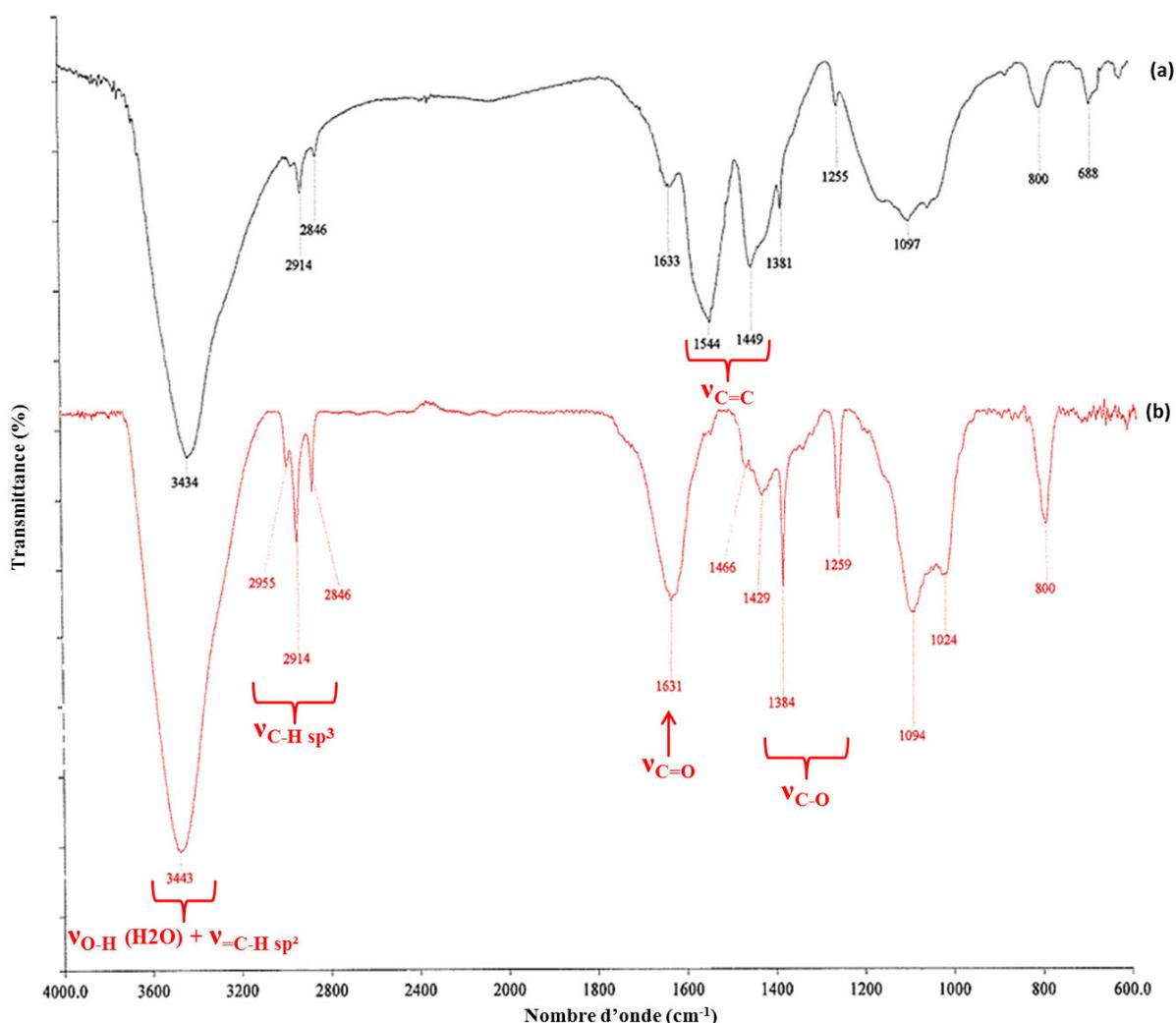


Figure 3.11 : Spectres IR caractéristiques (a) des DWNTs bruts et (b) des DWNTs oxydés par la Méthode 5.

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<sub>3</sub> 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 complètement 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 inexistant 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  $\text{-COO}^-$ , 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).

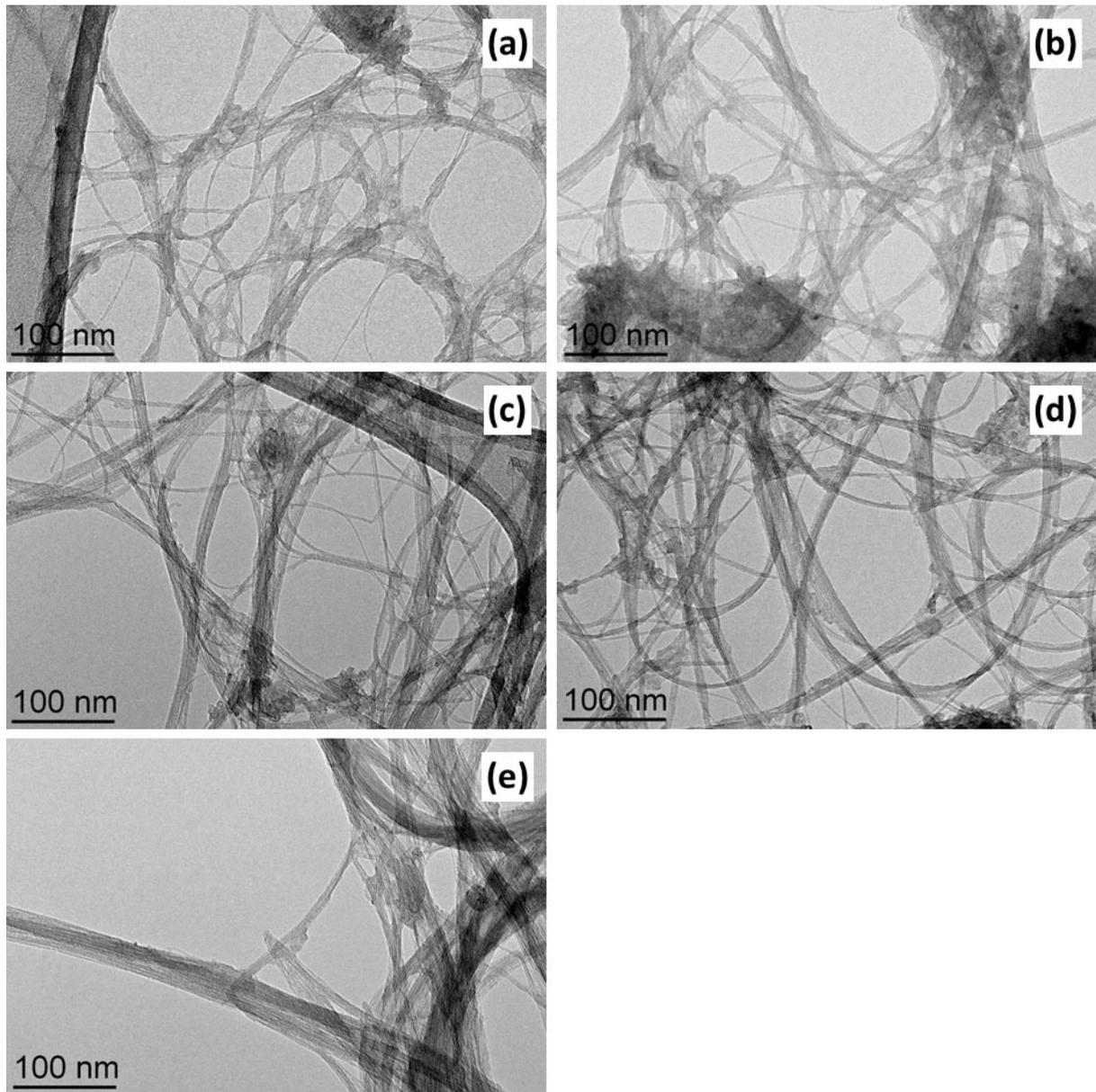


Figure 3.12 : Images MET de (a) DWNTs oxydés par la Méthode 1 ; puis lavés par (b) une solution de NaOH (4M) à reflux (**Lavage A**) ; (c) une solution de NaOH à 0,01M (**Lavage B**) ; (d) une solution de NaOH à 4M (**Lavage B**) et (e) une solution de NaOH à 10M (**Lavage B**).

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**).

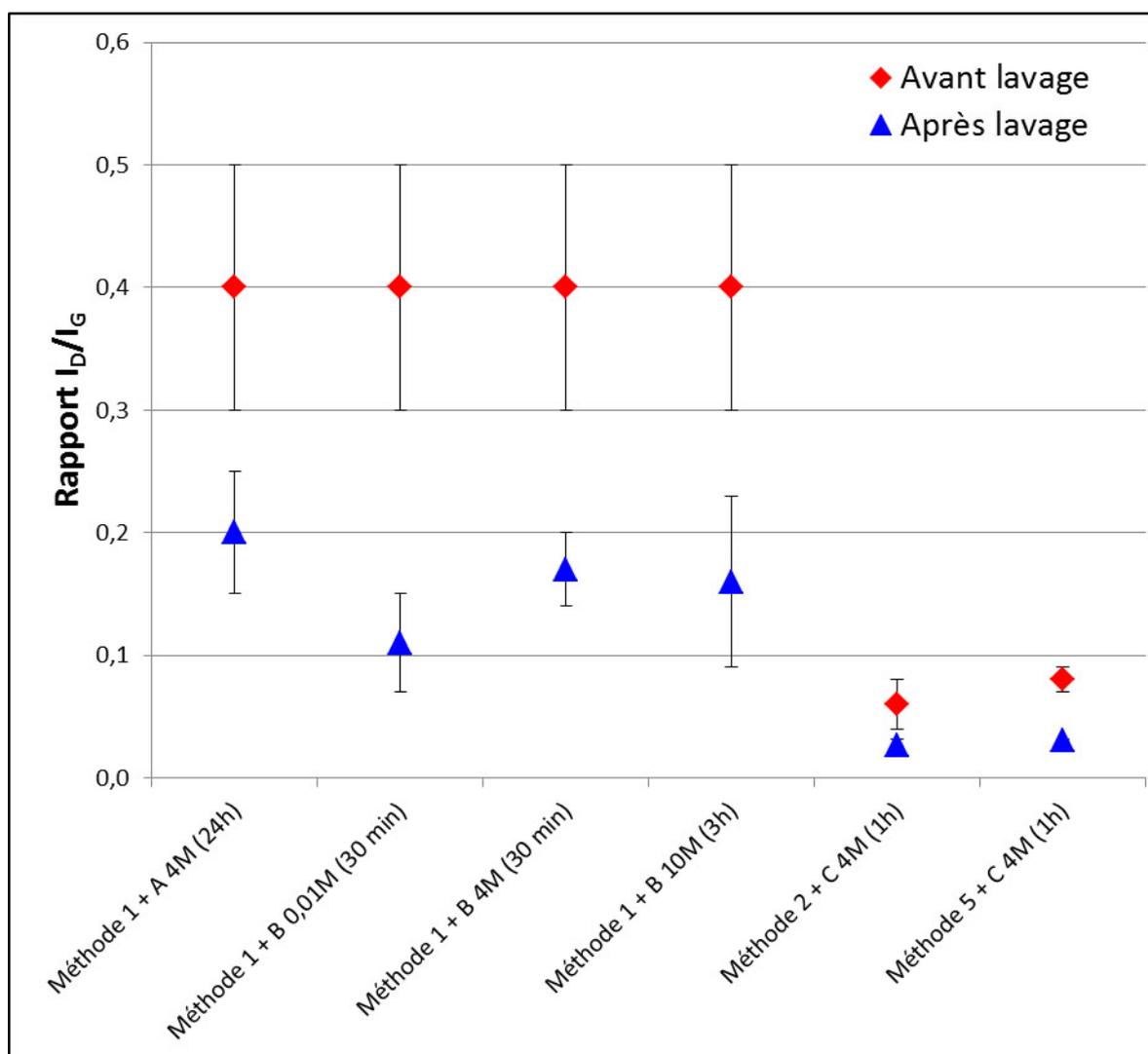


Figure 3.13 : Graphique représentant les valeurs des rapports ID/IG calculées avant et après les différents lavages à la soude, .

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.

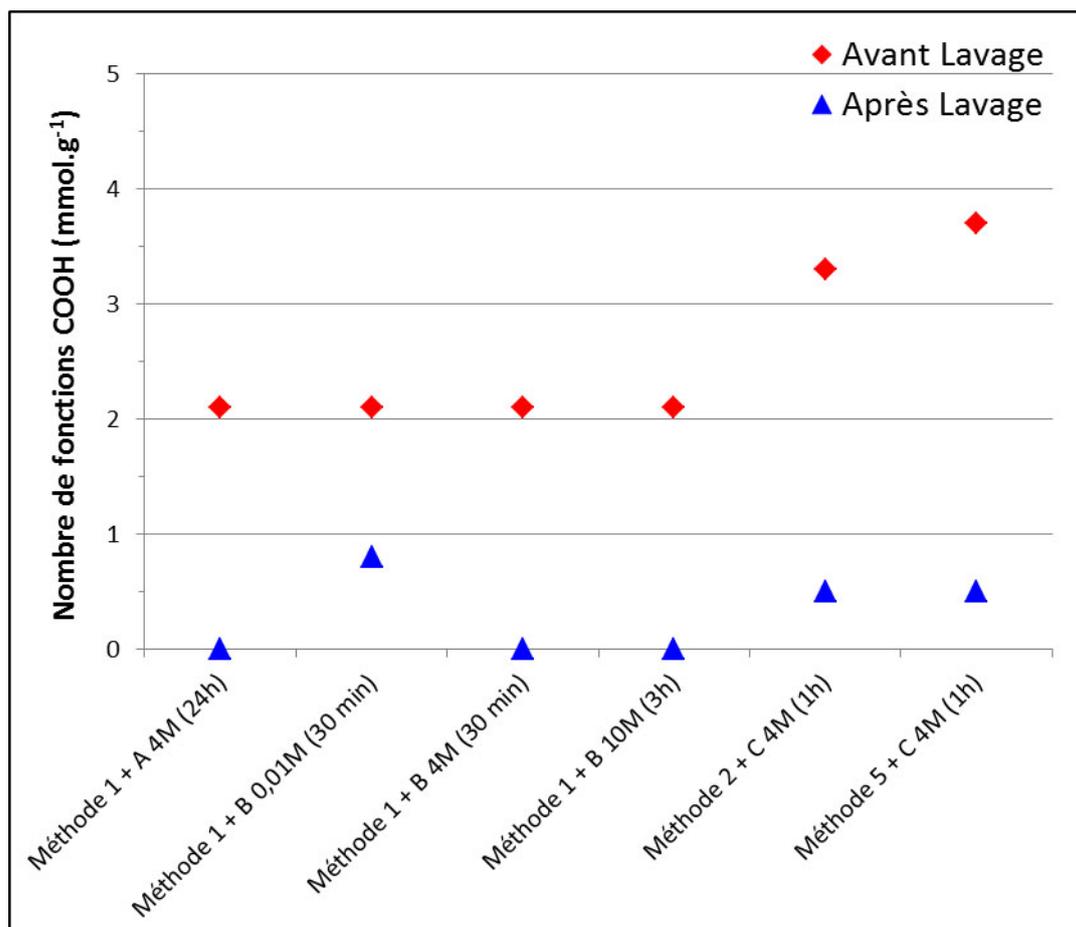


Figure 3.14 : Graphique représentant le nombre de fonctions COOH par gramme de DWNTs avant et après lavages à la soude.

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.

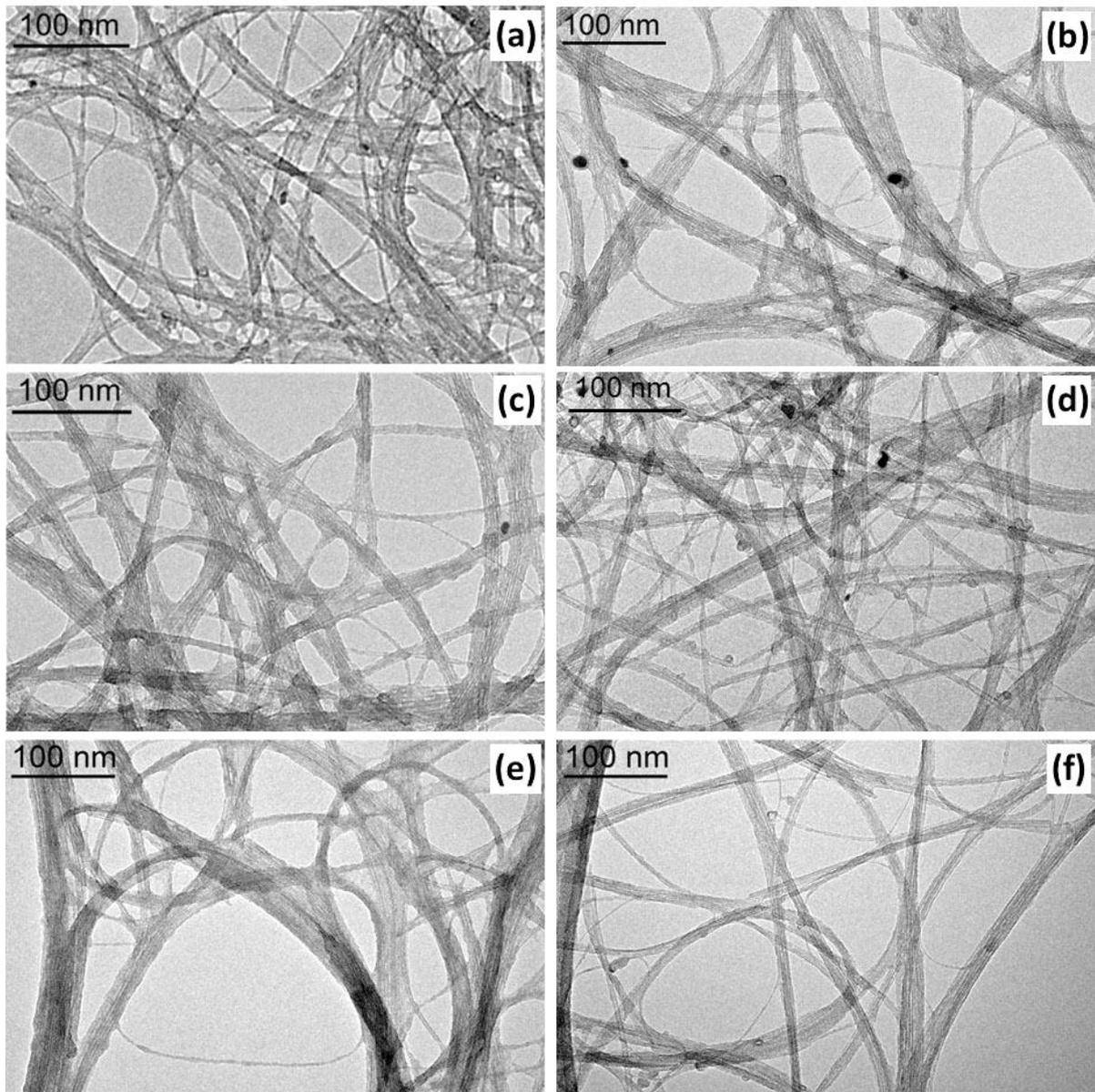


Figure 3.15 : Images MET, à gauche, de DWNTs oxydés par (a) la Méthode 2 pendant 5h puis (b) lavés par une solution de NaOH à 4M (**Lavage C**) ; (c) la Méthode 2 pendant 6,5h puis (d) lavés par une solution de NaOH à 4M (**Lavage C**) ; et (e) la Méthode 5 puis (f) lavés par une solution de NaOH à 4M (**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<sup>-</sup>) 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 <sub>D</sub> /I <sub>G</sub>
<b>DWNTs bruts</b>			0,25 ± 0,25	0,20 ± 0,05
<b>1</b>	24		2,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1
<b>1</b>	24	A	0	0,20 ± 0,05
<b>1</b>	24	B – 0,01M	0,8	0,11 ± 0,04
		B – 4M	0	0,17 ± 0,03
		B – 10M	0	0,16 ± 0,07
<b>2</b>	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
<b>2</b>	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
<b>3</b>	5		0	0,03 ± 0,01
<b>4</b>	0,25		2,8	0,029 ± 0,001
	0,5		3,1	0,017 ± 0,002
<b>5</b>	24+5		3,7	0,08 ± 0,01
	24+5	C	0,5	0,030 ± 0,001
<b>6</b>	0,5		0,4 ± 0,2	0,020 ± 0,001

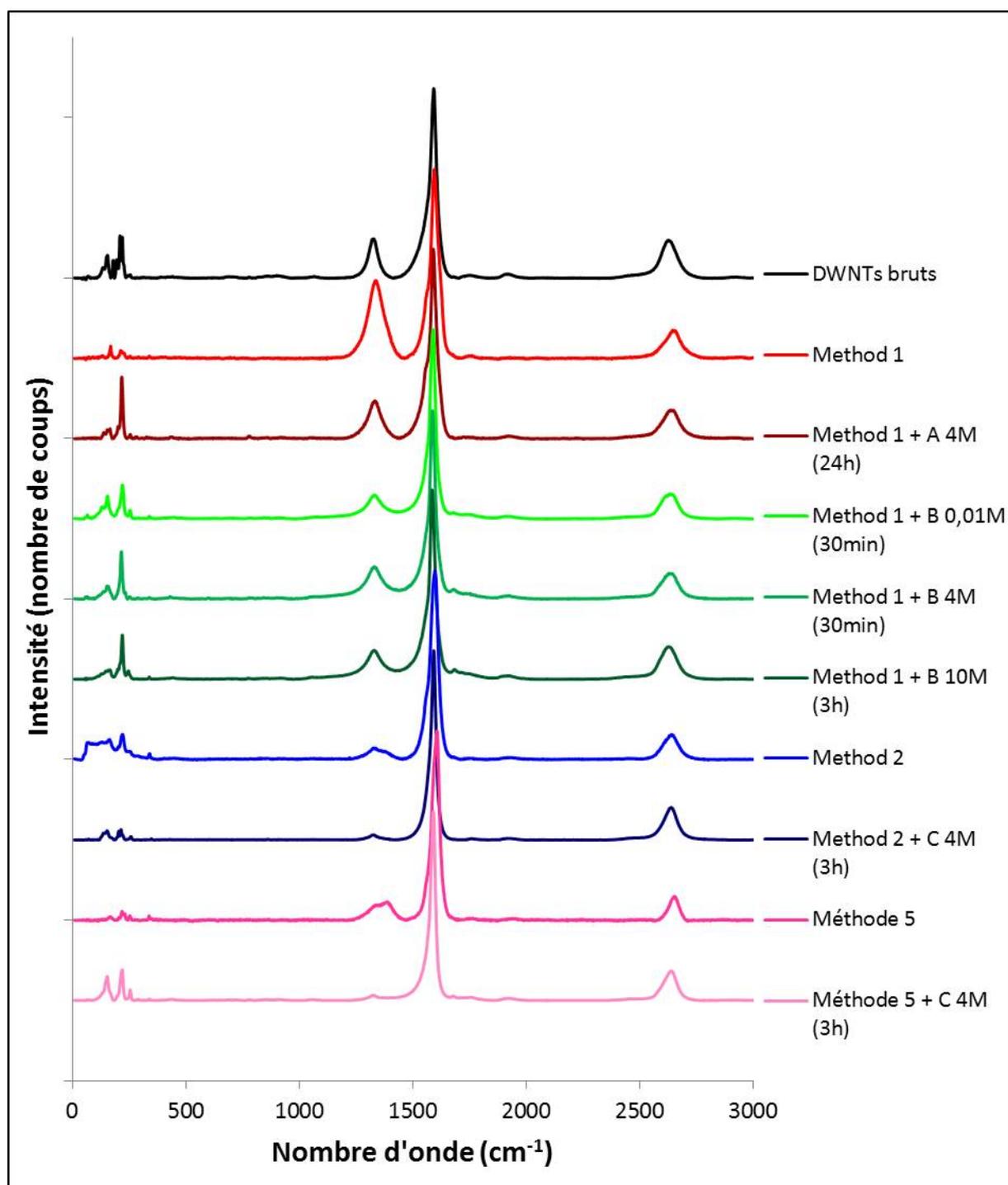


Figure 3.16 : Spectres Raman enregistrés à  $\lambda = 633 \text{ nm}$  sur les échantillons traités par les différentes méthodes d'oxydation et de lavages.

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] Monthieux 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 Rao 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.



**Lire la seconde partie de la thèse**