

Etude de matériaux organiques et de biomatériaux par microscopie à effet tunnel à balayage (STM) et microscopie à force atomique (AFM)

DISSERTATION

présentée publiquement le 12 décembre 2005

en vue de l'obtention du

grade de Docteur en Sciences

(spécialité Physique)

par

Cédric VOLCKE

Composition du jury

Rapporteurs :

1. M. Raes
2. Z. Mekhalif
3. G. Tourillon
4. J.J. Pireaux
5. P.A. Thiry

Mis en page avec la classe thloria.

Remerciements

Ces quatre années de recherche, riches scientifiquement et socialement, ont donc abouti à la rédaction de cette thèse de doctorat. Ces quelques lignes marquent ma reconnaissance envers les personnes ayant joué un rôle durant toute cette période. Mais avant tout, je tiens à témoigner de ma reconnaissance à l'égard des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix et du Fond pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (F.R.I.A.) pour leur soutien logistique et financier.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Spectroscopie Moléculaire de Surface (L.A.S.M.O.S.). J'en remercie le directeur, le Pr *Paul A. THIRY*, de m'avoir permis d'intégrer son unité de recherche. Malgré ses nombreuses responsabilités, il a toujours su répondre présent à mes sollicitations. Je lui exprime donc ma sincère reconnaissance, lui qui a su me guider et me conseiller tout au long de ce travail, aussi bien au niveau théorique que pour l'interprétation des résultats.

Durant cette thèse, de nombreuses collaborations "interlaboratoires" ont vu le jour et se sont développées. Je tiens donc à remercier très sincèrement les directeurs de ces laboratoires pour avoir permis et soutenu ces recherches partagées. Plus particulièrement, je tiens à citer (par ordre alphabétique) : le Pr *Philippe Dubois* (L.P.C.M.), le Pr *François Durant* (C.B.S.), le Pr *Christian Grandfils* (C.E.I.B.), le Pr *Philippe Lambin* (L.P.S.), les Pr *Zineb Mekhalif* et *Joseph Delhalle* (C.E.S.), le Pr *Jean-Jacques Pireaux* (L.I.S.E.), le Pr *Martine Raes* (U.R.B.C.) et le Pr *Gérard Tourillon* (I.R.C.). Je garde également une amitié et une gratitude sincère envers toutes ces personnes qui ont réellement rendu possible ces collaborations et qui ont parfois même subi l'épreuve (souvent très "soporifique") d'expériences S.T.M. ou A.F.M. à mes côtés. Tout particulièrement, je tiens à citer (par ordre alphabétique) : *Danielle Aubry*, Dr *Christine Culot*, Dr *Laurent Dreesen*, *Alexandre Felten*, Dr *Christophe Humbert*, Dr *Sabine Piroton*, *Laurence Vast* et Dr *Isabelle Ydens*.

Peu de théoriciens ont pris le risque de s'aventurer à mes côtés dans le monde du S.T.M. Le Pr *Philippe Lambin* en est l'exception. Pour sa disponibilité et l'efficacité avec laquelle il répondait à toutes mes questions, je lui envoie tout particulièrement mon respect, ma gratitude et mon amitié. J'espère avoir été à la hauteur de la confiance qu'il m'a accordée.

J'associe également à ces remerciements tous les membres de l'équipe du L.A.S.M.O.S. pour leur accueil, leur sympathie, leur soutien et leur aide, quelles que soient les circonstances. Merci à tous mes collègues

et amis du “paysager” pour leur aide, leur collaboration, leur sympathie et amitié. Je citerai tout particulièrement mes “mentors” et amis, Dr *Laurent Dreesen*, Dr *Christophe Humbert* et *Yannick Sartenæer*, qui m’ont permis de faire avancer la science, toujours avec un grand professionnalisme, mais en gardant ce petit trait d’autodérision qui nous a permis de poursuivre notre travail dans une ambiance chaleureuse. Plus particulièrement, je ne sais quels mots utiliser afin d’exprimer au mieux toute la gratitude et l’affection que je porte envers le Dr *Priscilla Simonis*, elle qui m’a appris ce que je sais sur le S.T.M. et l’A.F.M. Elle a également toujours su trouver les mots afin de me redonner courage, car elle est la seule comprendre réellement les difficultés inhérentes aux microscopies à sonde locale. Elle m’a également toujours été d’un grand secours et d’une ingéniosité innovante lors des nombreuses fois où je me suis heurté à des problèmes théoriques, expérimentaux ou d’interprétation.

Pour terminer, il me reste à rendre un hommage à toutes ces personnes qui font que la vie sociale (en dehors du travail) vaut la peine d’être vécue. Plus particulièrement, je tiens à les en remercier en toute amitié (par ordre alphabétique) : *Alexandra*, *Aline*, *Amandine* et *Jean-François*, *Anne-Sophie*, *Cécile* et *Alexis*, *Claudie* et *Jacques*, *Grégory*, *Isabelle*, *Mini*, *Priscilla*, *Vivien*,...

Table des matières

Introduction Générale	1
Partie I Méthodes expérimentales	
Les microscopes à sonde locale	11
Chapitre 1 La microscopie à effet tunnel	13
1.1 Introduction	14
1.2 Concepts théoriques	15
1.2.1 Principe de base	15
1.2.2 Approche de <i>Bardeen</i>	19
1.2.3 Modèle de <i>Tersoff</i> et <i>Hamann</i>	22
1.2.4 Courant tunnel	23
1.2.5 Extension de <i>Chen</i> au modèle de <i>Tersoff</i> et <i>Hamann</i>	24

1.3	Le microscope	25
1.3.1	Le système d'approche	26
1.3.2	Le circuit de contre-réaction	28
1.3.3	L'isolation	29
1.3.4	Les pointes	29
1.3.5	Les modes d'utilisation	30
1.3.6	L'appareillage	32
1.3.7	Les artefacts	33
1.4	Les substrats	36
1.4.1	Le graphite H.O.P.G.	37
1.4.2	L'or : Au(111)	40
1.4.3	Le platine : Pt(111)	42
Chapitre 2 La microscopie à force atomique		45
2.1	Introduction	46
2.2	Principe de fonctionnement	47
2.3	Le mode contact	50
2.3.1	Principe	50
2.3.2	Théorie de la déflexion	50
2.3.3	Théories du contact	52
2.3.4	Imagerie	56
2.3.5	Artefacts	56
2.4	Le mode à contact intermittent	57
2.4.1	Principe	57
2.4.2	Théorie	57
2.4.3	Imagerie	59
2.5	L'imagerie de phase	59
2.5.1	Principe et imagerie	60
2.5.2	Théorie	62
2.6	La spectroscopie de force	63
2.6.1	Principe	63
2.7	Les autres modes	65
2.7.1	Le mode friction	65

2.7.2	Le mode non-contact	67
2.8	Les pointes et leviers	68
2.9	Les substrats	68
2.9.1	Mica	68
2.9.2	Le difluorure de calcium	69
2.9.3	Le tantale	70

Partie II	Résultats expérimentaux	71
------------------	--------------------------------	-----------

Chapitre 3	Les monocouches auto-assemblées	73
-------------------	--	-----------

3.1	Les esters	74
3.1.1	Organisation bidimensionnelle	76
3.1.2	Position du groupement ester	77
3.1.3	Dynamique moléculaire	82
3.1.4	Résumé	85
3.2	Les acides gras	86
3.2.1	Organisation bidimensionnelle	87
3.2.2	Position du groupement carboxylique	89
3.2.3	Résumé	91
3.3	Les alcanethiols	92
3.3.1	Le processus d'auto-assemblage	93
3.3.2	Energétique et cinétique	94
3.3.3	Organisation bidimensionnelle	94
3.3.4	Résumé	97
3.4	Les thiocyanates	98
3.4.1	DTCN sur Au(111)	99
3.4.2	Résumé	100

Chapitre 4 L'acide désoxyribonucléique	101
4.1 Historique	102
4.2 La structure de l'A.D.N.	104
4.2.1 Nucléotides et bases azotées	104
4.2.2 La double hélice	105
4.3 Les rôles de l'A.D.N.	107
4.4 La condensation de l'ADN	108
4.4.1 L'A.D.N. non-condensé	110
4.4.2 Complexes à base de méthacrylate	111
4.4.3 Complexes à base de SuperFect	117
4.4.4 Résumé	118
Chapitre 5 Les implants métalliques	121
5.1 Introduction	122
5.2 L'apatite	124
5.3 Les implants métalliques	125
5.3.1 Oxyde de tantale	126
5.3.2 Organosilanes et modifications	127
5.3.3 Formation d'apatite	130
5.3.4 Résumé	134
Chapitre 6 Les biomolécules et interactions biomoléculaires	137
6.1 Les porphyrines	138
6.1.1 Recouvrement et conformation	139
6.1.2 Résumé	141
6.2 La protéine fluorescente verte (GFP)	142
6.2.1 Structure et propriétés	142
6.2.2 Organisation	145
6.2.3 Résumé	147
6.3 Les interactions biomoléculaires	149
6.3.1 La biotine et l'avidine	150
6.3.2 Adsorption	151

6.3.3	Mesure de force	152
6.3.4	Résumé	155

Conclusion Générale		157
----------------------------	--	------------

Annexes		165
Annexe A	Caractéristiques des leviers A.F.M.	165
Annexe B	Caractérisation des composés chimiques uti-	
	lisés	167
B.1	Chapitre 1	167
B.2	Chapitre 2	167
B.3	Chapitre 3	168
B.4	Chapitre 4	168
B.5	Chapitre 5	168
B.6	Chapitre 6	169
Bibliographie		171
Publications		193

Introduction Générale

Il y aura maintenant bientôt 25 ans que *Gerd Binnig* et *Heinrich Rohrer* ont inventé le microscope à effet tunnel à balayage (S.T.M. : *Scanning Tunneling Microscope*)¹ [1, 2]. Il est en réalité plus adéquat de parler de “nanoscope” puisqu’il rend possible l’observation d’atomes et de molécules individuels, dont les dimensions caractéristiques sont le nanomètre. Il permet alors d’accéder à la résolution atomique de surfaces conductrices. A l’époque, l’organisation des surfaces et leurs reconstructions étaient des sujets de première importance, comme par exemple, la reconstruction 7 par 7 de la surface de silicium (111) [3].

Le S.T.M. présentait cependant le grand désavantage d’être limité à l’observation d’échantillons suffisamment conducteurs d’électricité, excluant de ce fait un grand nombre de matériaux. C’est la raison pour laquelle, dans la foulée de l’invention du S.T.M., *Gerd Binnig*, *Cal Quate* et *Christoph Gerber* ont mis au point, en 1986, le microscope à force atomique (A.F.M. : *Atomic Force Microscope*) [4]. Son atout principal réside dans son vaste champ d’application, incluant les matériaux isolants. Des surfaces de verre spécialement préparées, aux molécules d’acide désoxyribonucléique, en passant par l’étude de fossiles ou de denrées alimentaires, ses capacités semblent illimitées [5, 6, 7].

Ces microscopies à sonde locale (S.P.M. : *Scanning Probe Microscopy*) ont ouvert de nouvelles perspectives à l’analyse des surfaces, notamment dans le domaine très prometteur des nanotechnologies (nanoélectronique, nanomécanique,...). Ces instruments se sont également avérés très utiles dans de nombreuses recherches en chimie, mais aussi en biologie [8, 9, 10, 11, 12], propulsant les biotechnologies au coeur de toutes les préoccupations scientifiques (thérapie génique, capteurs biologiques,...). Dans ce contexte, les S.P.M. sont susceptibles d’apporter des informations complémentaires aux techniques de microscopie électronique ou de spectroscopie généralement employées par les biologistes.

Bien que de nombreuses recherches aient abouti et que des résultats importants aient été obtenus, l’application de l’A.F.M. et lorsque c’est possible, du S.T.M., aux composés organiques est cependant loin d’être triviale. Un effort de recherche concerté entre scientifiques de tous les domaines est aujourd’hui plus que jamais indispensable, afin que ces techniques puissent révéler toute l’étendue de leurs capacités, aussi bien dans les laboratoires de chimie, de biologie, de biochimie ou pharmacie. Les avancées scientifiques et technologiques en seront d’autant plus rapides et fructueuses. Il nous est dès lors apparu comme évident de centrer notre travail de recherche autour de **l’interdisciplinarité** et de collaborer activement aussi bien avec les

¹Invention pour laquelle le prix Nobel de physique leur fut attribué en 1986.

physiciens (*L.A.S.M.O.S.*, *L.P.S.*, *L.I.S.E.*, *L.A.R.N.*, *L.P.M.E.*) que les chimistes (*C.B.S.*, *C.E.S.*, *C.M.I.*, *R.M.N.*, *L.P.C.M.*) et/ou les biologistes (*U.R.B.M.*, *U.R.B.C.*, *C.E.I.B.*, *C.I.P.*), que ce soit avec des membres internes aux F.U.N.D.P. ou appartenant à d'autres universités belges. Nos études visent donc à améliorer nos connaissances sur des systèmes bio- et nano-technologiques, grâce à l'utilisation des microscopies à effet tunnel à balayage et à force atomique.

Cependant, avant même de débiter toute recherche, plusieurs difficultés doivent être surmontées. Il est en effet difficile de se rendre compte des difficultés inhérentes à ces techniques S.T.M. et A.F.M. sans les avoir expérimentées par soi-même. Il s'agit d'abord d'instruments de mesures nécessitant un ajustement permanent des paramètres de contrôle, requérant à tout instant la présence de l'expérimentateur au chevet du microscope, ainsi que toute son attention. Déjà dans le cas hypothétique d'un échantillon parfaitement adapté à cette technique, il est important de réaliser que ce type de mesure nécessite un investissement en temps plus que conséquent. La réalisation d'analyses S.T.M. / A.F.M. subit en plus d'autres contraintes. Les échantillons doivent d'abord être immobilisés sur un substrat, de préférence, atomiquement plat. Son identification, fonction de ses propriétés structurales et électroniques, est donc d'une importance capitale. Pour chaque étude, il faudra dès lors identifier le substrat adéquat : graphite, film d'or, platine, mica, fluorure de calcium, tantale,... Il est ensuite nécessaire de mettre au point le mode de dépôt de l'échantillon sur le substrat et de déterminer l'environnement idéal pour les mesures : solution aqueuse, air,... Nombre de couches moléculaires, par exemple, s'adsorbent sur des substrats de manière ordonnée en milieu liquide. Ces couches auto-assemblées constituent des systèmes idéaux pour la compréhension de l'organisation bidimensionnelle de molécules organiques physisorbées. Elles représentent également des modèles dans l'étude des interactions molécules-substrats et molécules-molécules [13]. Ces films physisorbés sont aussi au centre de nombreuses applications technologiques traitant, par exemple, de l'adhérence, la lubrification ou de la mécanique moléculaire. L'imagerie S.T.M. permet de plus d'en étudier la chiralité, la réactivité et certains phénomènes dynamiques se produisant en leur sein [14, 15].

Dans le cadre d'études de composés organiques ou de biomatériaux, un autre problème réside dans la préparation des échantillons. En tant que physicien, notre expérience en matière de préparation d'échantillons chimiques ou biologiques reste limitée. Nos collaborateurs ne sont pas non plus toujours conscients des exigences spécifiques de nos instruments. Ces analyses nanoscopiques requièrent une immobilisation sur

un substrat, sans que la liaison ne déforme trop les molécules. Cette liaison nécessite souvent l'utilisation d'une couche d'accrochage. La plupart des capteurs biologiques étudiés à l'heure actuelle ont notamment recours à l'utilisation de couches d'alcanethiols ou d'organosilanes, par exemple. Une connaissance approfondie de leur structure et propriétés est dès lors primordiale pour la conception de dispositifs efficaces. L'importance à l'échelle moléculaire que représentent ces couches auto-assemblées (aussi bien physisorbées que chimisorbées) est indiscutable. C'est la raison pour laquelle une partie des recherches réalisées au cours de ce travail leur est consacrée. Les autres thèmes de recherche étudiés concernent des biomolécules et des biomatériaux.

Le choix du composé biologique à étudier s'est imposé de lui-même. Quelle molécule est plus représentative du vivant que l'acide désoxyribonucléique (l'A.D.N.) ? Nous nous sommes ainsi engouffré dans le monde mystérieux de la génétique, guidé par nos collègues biologistes (U.R.B.C.). L'importance fondamentale de cette molécule, ainsi que l'espoir énorme qu'engendre sa manipulation, ont rapidement attisé notre curiosité. C'est plus précisément dans le cadre de la transfection cellulaire et à plus long terme de la thérapie génique que nous avons pu mettre nos dispositifs à la disposition de la biologie.

Les biomatériaux retiennent depuis quelques années l'attention du monde médical et scientifique. L'orthopédie, par exemple, est une des disciplines nécessitant de manière routinière de tels matériaux afin de remplacer des os, dans ce cas précis. Des implants métalliques sont en effet couramment utilisés pour remplacer ou supporter des parties de corps perdues ou dégradées. Leur utilisation, quoique déjà répandue, pose encore de nombreux problèmes, notamment de résistance à long terme et d'intégration dans les tissus. Contre toute attente, les techniques de microscopie à sonde locale semblent très bien adaptées à la caractérisation de tels systèmes, comme le prouveront les résultats obtenus.

Nous nous sommes également attardé sur des molécules se révélant intéressantes aussi bien du point de vue structural qu'électronique, en vue de leurs applications en électronique moléculaire. En effet, nombre de molécules biologiques sont pressenties comme composants principaux d'applications technologiques telles que des capteurs solaires, des puces ou des capteurs biologiques,... Parmi le nombre incalculable de composés intéressants, les porphyrines jouent un rôle tout particulier. Elles ont en effet prouvé leur grande efficacité de conversion de l'énergie solaire. La réalisation de capteurs nécessite leur adsorption sur des substrats métalliques. C'est pourquoi nous nous y sommes intéressé de plus près.

La construction de dispositifs électroniques biomoléculaires peut

également être réalisée grâce à la formation de couches de protéines sur des substrats [16]. Une connaissance précise de leur adsorption et de leur degré d'assemblage sur des substrats métalliques est indispensable à la réalisation de capteurs biologiques efficaces. Dans ce contexte, la combinaison de plusieurs techniques expérimentales complémentaires est nécessaire à leur caractérisation. Parmi celles-ci, les microscopies à sonde locale se sont révélées, une fois encore, essentielles à la détermination de l'ordre à l'échelle moléculaire. La déduction de l'épaisseur des couches moléculaires adsorbées, difficile à obtenir par les techniques usuelles, constitue l'information majeure déduite avec notre appareillage.

Finalement, le problème de la reconnaissance moléculaire, et plus particulièrement de l'interaction ligand-récepteur, a retenu notre attention. Cette reconnaissance spécifique entre un ligand et son récepteur régule le déroulement et l'organisation des principaux systèmes biologiques. C'est la raison pour laquelle ils sont actuellement largement étudiés. Leur possible application dans toute une série de capteurs biologiques, par exemple, est également à la base de leur succès. Dans ce cadre, nous montrerons que des mesures de force permettent de sonder l'interaction entre ces molécules.

Au cours de ces quatre années de recherche nous avons avant tout collaboré avec de nombreux laboratoires, en relevant d'énormes défis scientifiques et techniques. Pour cela, nous devons tout d'abord acquérir une connaissance et une maîtrise approfondie des techniques utilisées (S.T.M. / A.F.M.). La première partie de cette thèse rend compte de ce savoir et savoir-faire. Nous y décrirons chaque type de microscope utilisé et la manière de s'en servir. Elle servira à l'interprétation des résultats et pourra constituer une référence pour toute personne désireuse et/ou susceptible d'utiliser un microscope à sonde locale. Le S.T.M. étant le plus ancien microscope à sonde locale, il est détaillé en premier lieu, tout au long du chapitre 1. Après en avoir brièvement exposé les principes de base, les concepts théoriques nécessaires à la bonne compréhension de son fonctionnement, sont détaillés. L'interprétation adéquate à donner aux résultats obtenus sera alors abordée. Les divers éléments constitutifs de ce "nanoscope" sont également discutés d'un point de vue plus pratique. Le microscope à force atomique est l'objet du second chapitre. Ses différents modes de fonctionnement, ainsi que les principaux modèles théoriques associés, y sont développés. Les caractéristiques des substrats utilisés seront finalement présentées pour chacune de ces techniques.

Les résultats expérimentaux sont présentés dans la seconde partie de cette thèse. Elle est divisée en quatre chapitres. Dans le premier, nous analysons des monocouches auto-assemblées (S.A.M.s). Ces couches moléculaires s'organisent de manière spontanée sur des sub-

strats. Ces dépôts peuvent être classés en deux catégories : les monocouches simplement physisorbées et les chimisorbées. Toutes deux ont été soumises à investigation. Les S.P.M. utilisés ont ainsi pu révéler leur structure à l'échelle moléculaire, voire atomique. Dans ce contexte, la technique totalement révolutionnaire des pointes S.T.M. fonctionnalisées a grandement facilité notre travail de recherche, nous permettant même d'identifier la position de groupements fonctionnels particuliers au sein de molécules. Des couches physisorbées en milieu liquide d'esters et d'acides gras sont analysées dans les deux premières sections [17, 18, 19]. Les deux dernières traitent de couches moléculaires chimisorbées (composées d'alcanethiols ou de thiocyanates) [20].

Le second chapitre présente une étude A.F.M., centrée autour de l'A.D.N., réalisée en collaboration avec des biologistes (Dr *S. Pirotton*, U.R.B.C.) et des chimistes (Pr *Ph. Dubois*, L.P.C.M.) [21]. L'importance capitale de cette molécule n'est plus à démontrer. Elle possède notamment la propriété de se dupliquer et d'être transmise aux descendants, lors de la reproduction des organismes. De temps en temps, elle peut subir des dégradations ou altérations, ou encore des modifications minimales à la base de maladies génétiques. De nouvelles perspectives de guérison sont actuellement possibles. Le décryptage du génome humain en constitue un premier pas. L'étape suivante réside dans l'élaboration de vecteurs d'acides nucléiques permettant leur internalisation dans une cellule. On peut alors transfecter la cellule, avec un gène fonctionnel, pour remplacer le gène déficient. C'est dans ce contexte que se sont déroulées nos expériences. En effet, des chercheurs ont récemment mis au point un nouveau procédé de condensation de l'A.D.N. Celui-ci permet la formation de complexes à l'aide d'A.D.N. et d'un ou plusieurs polymères cationiques. Les complexes ainsi formés possèdent la propriété de pénétrer rapidement à l'intérieur des cellules et du noyau. Nos expériences démontrent une approche originale, basée sur l'observation directe, qui révèle l'effet de facteurs structuraux des complexes sur certains facteurs fonctionnels (la bonne expression du gène codé par l'A.D.N. condensé et inséré, mécanisme appelé transfection). Nous avons alors pu déterminer si les propriétés physiques des condensats formés jouaient un rôle dans ce mécanisme de transfection.

Le troisième chapitre traite des implants métalliques, étudiés en collaboration avec un laboratoire de chimie (*D. Aubry* et Pr *Z. Mekhalif*, C.E.S.) [22, 23]. Récemment, de nouvelles techniques ont été mises en oeuvre afin d'améliorer leur intégration dans les os et leur résistance à long terme. Parmi celles-ci figure la formation d'une couche d'apatite à la surface de l'implant. La partie minérale de l'os présente en effet de grandes similitudes structurelles et fonctionnelles avec cette couche d'apatite. Cette couche favorise alors l'intégration de l'implant dans les

os. Nous nous sommes donc aidé des microscopies A.F.M. pour caractériser la croissance de cette apatite sur de l'oxyde de tantale. Celle-ci a été réalisée à l'aide d'une monocouche intermédiaire entre l'oxyde de tantale et l'apatite même. Quatre couches intermédiaires (différentes par leur groupement terminal) ont été étudiées, ainsi que leur influence sur les vitesses de croissance de l'apatite. Les différents stades de préparation, de caractérisation et d'interprétation sont regroupés en sections par étape, après de brèves introductions aux implants et à l'apatite. Ces analyses A.F.M. ont alors pu être confrontées notamment aux résultats obtenus par microscopie électronique à balayage et spectroscopie de photoélectrons X. Nos mesures ont ainsi confirmé les données déjà recueillies et ont permis une visualisation tridimensionnelle des surfaces.

Le dernier chapitre est dévolu aux applications technologiques. Différentes molécules ont ainsi été sélectionnées pour leur utilisation potentielle au sein de capteurs solaires et/ou biologiques. De nombreuses molécules s'offraient à nous, mais les porphyrines ont retenu notre attention. En effet, leurs propriétés chimiques et physiques leur promettent un rôle important dans les architectures et l'ingénierie biomoléculaire à venir. Une section leur est consacrée. Nous y décrivons l'assemblage de trois espèces de porphyrines différentes, adsorbées sur du platine (111). La conformation géométrique de ces trois porphyrines est sondée par microscopie à effet tunnel à balayage. Ces mesures sont discutées en fonction de résultats de spectroscopie non-linéaire obtenus au laboratoire L.A.S.M.O.S. [24, 25].

Une seconde section de ce chapitre étudie l'adsorption d'une protéine, la protéine fluorescente verte (G.F.P. : *Green Fluorescent Protein*), sur un substrat de platine. Une connaissance précise de l'adsorption de protéines (et de la G.F.P. en particulier) sur des substrats métalliques est indispensable à la réalisation de capteurs biologiques puissants. L'A.F.M. permet, dans ce cadre, la caractérisation de ces assemblages. La connaissance de l'épaisseur des couches moléculaires adsorbées a constitué l'apport majeur de cet appareillage dans ce type d'analyse [26]. La structure de cette G.F.P., et les propriétés qui en découlent, y sont également résumées.

Pour terminer, nous nous sommes intéressé à la reconnaissance moléculaire spécifique entre deux biomolécules. Le système étudié est le complexe biotine (ou plus précisément la biocytine) - avidine, qui fait office de modèle en ce domaine. La forte affinité entre les molécules constituant ce complexe en fait d'excellents outils dans de nombreuses recherches, telles que dans les études impliquant les capteurs biologiques [27]. Au cours de nos expériences, nous avons d'abord voulu vérifier, par microscopie de force, l'adsorption d'une couche de biocytine à la surface d'un substrat, le fluorure de calcium. La spectroscopie

de force, réalisée à l'aide de pointes A.F.M. fonctionnalisées par de l'avidine, a de plus permis la quantification de l'interaction entre la biocytine et l'avidine.

Avant de terminer cette introduction, soulignons le fait que toutes les mesures microscopiques présentées dans cette thèse ont été obtenues à pression atmosphérique et à température ambiante (à l'air ou en phase liquide). La qualité des images obtenues dans ces conditions constitue déjà, en soi, une véritable prouesse technique et scientifique. En effet, beaucoup d'images S.T.M. et A.F.M. sont présentes dans la littérature mais relèvent d'expériences réalisées sous ultra-haut vide (et bien souvent à basse température), évitant nombres de perturbations extérieures éventuelles. Nous avons dès lors, à température et pression ambiante, dû trouver des alternatives permettant d'améliorer la qualité des résultats. Ce fut notamment réalisé par l'application de la technique des pointes fonctionnalisées et de l'amélioration de la préparation des substrats.

Finalement, la dernière partie de cette thèse résume l'ensemble des résultats et des conclusions à tirer de nos recherches, ainsi que l'apport indiscutable des "nanoscopies" dans l'étude de la matière molle. Cet apport en conditions réalistes de température et de pression constitue véritablement l'aspect novateur de cette thèse. Ce petit coup de pouce à l'avancement de la science est renforcé par deux résultats de premier plan concernant la fonctionnalisation des pointes. Dans un premier temps, il s'agit des pointes S.T.M. Leur modification permet la distinction de groupements chimiques et de leur orientation. Dans un second temps, il s'agit de pointes A.F.M. Leur fonctionnalisation autorise la mesure de la force d'interaction entre deux molécules biologiques lors de leur reconnaissance.

Première partie

Méthodes expérimentales Les microscopes à sonde locale

Chapitre 1

La microscopie à effet tunnel

Résumé

Le microscope à effet tunnel à balayage est le plus ancien microscope à sonde locale, ayant permis une imagerie à l'échelle nanométrique. Il est à l'origine d'avancées considérables en science des surfaces. Cette technique performante constitue l'un des principaux appareillages utilisés lors de la réalisation de ce travail. Ce chapitre lui est entièrement consacré. Après en avoir brièvement exposé les principes de base, la seconde partie de ce chapitre sera dédiée aux concepts théoriques, nécessaires à la bonne compréhension du fonctionnement de ce dispositif. Nous aborderons alors l'interprétation adéquate à donner aux résultats obtenus. La section suivante détaille les éléments constitutifs de ce "nanoscope" d'un point de vue plus pratique. Enfin, seront présentées les caractéristiques des substrats utilisés lors de nos nombreuses recherches à l'aide de ce dispositif.

1.1 Introduction

Comprendre la structure atomique des matériaux, le comportement des atomes en surface, la nature et les propriétés électroniques à l'échelle atomique, a été un des chevaux de bataille des recherches théoriques et appliquées depuis de nombreuses décennies. Jusqu'il y a peu, notre imagination et notre intuition de la physique à l'échelle atomique n'étaient vérifiées que par quelques techniques expérimentales, difficiles à manier et ne fournissant qu'un aperçu indirect ou incomplet de la structure atomique des surfaces.

Le développement rapide de la microscopie à effet tunnel à balayage (S.T.M. : *Scanning Tunneling Microscopy*) [1, 2, 28, 29], dans les années 80, a complètement révolutionné notre approche des recherches des propriétés de la matière à l'échelle atomique. Ce microscope à effet tunnel à balayage est l'ancêtre de tous les microscopes à champ proche, ou, de manière plus générale, microscopes à sonde locale (S.P.M. : *Scanning Probe Microscopes*). Il s'agit d'un ensemble de microscopes dont font aussi partie le microscope à force atomique (A.F.M. : *Atomic Force Microscope*) [4, 30, 31], le microscope à force électrostatique (E.F.M. : *Electrostatic Force Microscope*), le microscope à force magnétique (M.F.M. : *Magnetic Force Microscope*),... Ces instruments sont tous caractérisés par un balayage, point par point, d'une sonde locale placée à quelques distances atomiques de la surface. L'image obtenue représente alors une cartographie d'une grandeur physique, caractéristique de l'objet sondé.

C'est la réalisation, en 1982, d'une expérience, décrite dès la fin des années 1920 comme une conséquence de la mécanique quantique, qui est à l'origine de la microscopie à effet tunnel. *Gerd Binnig*, *Heinrich Rohrer*, *Christoph Gerber* et *Edmund Weibel*, chercheurs au laboratoire *I.B.M.* de *Zürich* mesurent en effet un courant d'électrons entre deux électrodes métalliques séparées de quelques nanomètres dans le vide [1, 2, 28, 29]. Ils constatent également la dépendance exponentielle de ce courant, appelé "courant tunnel", en fonction de la distance séparant les deux électrodes. Cette découverte marque le démarrage d'une technique de pointe dans l'étude de matériaux conducteurs ou semiconducteurs : la S.T.M. Son essor fut ensuite grandement facilité par les connaissances théoriques déjà acquises aussi bien en mécanique quantique qu'en physique des surfaces. En quelques années à peine, cette microscopie a ouvert la voie à une vision nouvelle des surfaces (métalliques), répondant ainsi à la quête des physiciens, métallurgistes et chimistes et suscitant l'intérêt des biologistes.

Depuis lors, de nombreux progrès ont rendu cette technique incon-

tournable pour l'analyse directe de surfaces et interfaces à l'échelle atomique. L'intense activité autour de cet instrument est de plus en plus motivée par ses applications éventuelles dans le domaine des nanotechnologies, ainsi que par sa capacité à imager et à manipuler des atomes dans des environnements divers (que ce soit à l'air, sous une atmosphère de gaz inerte, en milieu liquide ou sous ultra-haut vide) et à des températures allant de 4K à 1500K. La reconnaissance de l'avancée technologique et des potentiels incroyables que constitue cette technique fut avérée en 1986 lorsque ses inventeurs *G. Binnig* et *H. Röhrer* se virent décerner le prix *Nobel* de physique², conjointement avec *E. Ruska* (pour sa construction du premier microscope électronique).

1.2 Concepts théoriques

1.2.1 Principe de base

Le principe de base du S.T.M. est assez simple. Une fine pointe métallique est amenée suffisamment près de la surface de l'échantillon pour qu'un courant d'électrons, fini et mesurable, puisse circuler par effet tunnel entre la pointe et l'échantillon. Ce courant d'électrons, appelé *courant tunnel*, dépend fortement, comme nous le verrons plus loin, de la distance pointe-échantillon mais également de la densité électronique locale de la surface de l'échantillon. Il sera élevé aux endroits de forte densité et moindre aux endroits de faible densité électronique. En balayant, point par point, la surface de l'échantillon, nous pouvons ainsi cartographier les lieux de forte densité électronique locale (sous formes de points clairs), qui nous donnent, en première approximation et sous certaines conditions, une indication sur la position des atomes. Mais avant d'entrer dans les détails techniques, il est primordial de comprendre ce qu'est l'effet tunnel.

L'effet tunnel

L'effet tunnel est un processus purement quantique. De manière générale, il survient lorsqu'une particule est capable de traverser une barrière de potentiel (ni trop haute, ni trop large) qui lui est classiquement interdite [33]. Ce processus est à l'origine de nombreux phénomènes tels que le rayonnement α (i.e. émission de noyaux d'hélium

²“The Royal Swedish Academy of Sciences has decided to award the 1986 Nobel Prize in Physics by one half to Dr Gerd Binnig and Dr Heinrich Rohrer, IBM Research Laboratory, Zurich, Switzerland, for their design of the scanning tunnelling microscope” [32].

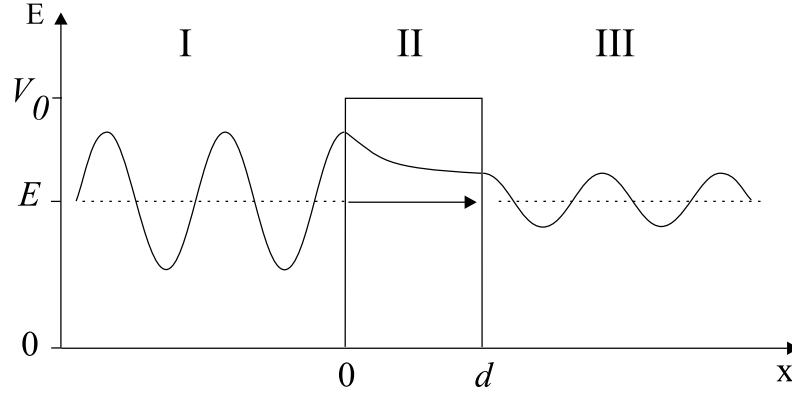


FIG. 1.1 – Schéma de la fonction d'onde d'un électron traversant une barrière de potentiel à une dimension de forme rectangulaire, de largeur d et de hauteur V_0 [34].

au travers du potentiel généré par l'interaction nucléaire attractive) ou l'ionisation de l'atome d'hydrogène soumis à un champ électrique (i.e. passage des électrons liés au noyau au-delà du potentiel créé par la superposition du potentiel atomique coulombien et du potentiel dû au champ électrique appliqué) [33]. C'est également, comme son nom l'indique, le phénomène physique à la base de notre microscope à effet tunnel à balayage.

Théorie simplifiée

Examinons les solutions de l'équation de *Schrödinger* pour une barrière de potentiel simple, afin de déterminer les propriétés essentielles de l'effet tunnel [33]. Intéressons-nous au schéma de la figure 1.1. Soit donc, une particule de masse m (un électron dans notre cas) possédant une énergie E et se propageant dans le sens positif suivant l'axe des x . Cet électron se trouve en présence d'une barrière de potentiel de largeur d et de hauteur $V_0 > 0$. Le problème consiste donc à trouver une expression du “courant tunnel”, c'est-à-dire du courant d'électrons passant par effet tunnel entre les régions I et III, au travers de la barrière de potentiel que constitue la région II. Il nous faut donc calculer la probabilité de trouver la particule quantique de l'autre côté de la barrière de potentiel, région classiquement interdite ($V_0 > E$). Pour chacune des trois régions (I, II et III), les solutions des équations de

Schrödinger peuvent s'écrire

$$\begin{cases} \phi_1(x) = Ae^{ikx} + Be^{-ikx} & \text{pour } x < 0 \\ \phi_2(x) = Ce^{\kappa x} + De^{-\kappa x} & \text{pour } 0 \leq x \leq d \\ \phi_3(x) = Fe^{ikx} + Ge^{-ikx} & \text{pour } x > d \end{cases}$$

où nous disposons de 6 constantes d'intégration (A, B, C, D, F, G) et où on a posé

$$k^2 = \frac{2mE}{\hbar^2} \quad \text{et} \quad \kappa^2 = \frac{2m(V_0 - E)}{\hbar^2} \quad (1.1)$$

En appliquant des conditions aux limites sur les fonctions d'onde ϕ_i et leur dérivée première $d\phi_i/dx$ en $x = 0$ et $x = d$ ³, en normalisant la densité de probabilité et en supposant qu'aucune particule n'arrive sur la barrière à partir de la droite (c'est-à-dire en posant $G = 0$), nous nous retrouvons en présence d'un système de quatre équations à cinq inconnues. Nous pouvons dès lors obtenir une expression du coefficient de transmission (qui ne dépend que du rapport F/A) de sorte que

$$T(E) = \frac{F}{A} = \frac{4E(E - V_0)}{4E(E - V_0) + V_0^2 \sin^2 \frac{d}{\hbar} \sqrt{2m(E - V_0)}} \quad (1.2)$$

Le graphe de ce coefficient de transmission en fonction de l'énergie E de l'électron incident est présenté à la figure 1.2. Le cas classique y est représenté par la courbe orange : le coefficient de transmission y est nul tant que l'énergie de l'électron E est inférieure à la hauteur V_0 de la barrière et de 100% lorsque $E > V_0$. Le cas quantique (celui qui nous intéresse) est représenté par les courbes rouge, verte et bleue, où l'on peut voir que le coefficient de transmission n'est pas nul dans la région classiquement interdite ($E < V_0$) : c'est l'effet tunnel. Dans le cas de barrières épaisses (lorsque $\kappa d \gg 1$), l'équation 1.2 peut se réduire aisément à :

$$T(E) \simeq 16 \frac{k^2 \kappa^2}{(k^2 + \kappa^2)^2} e^{-2\kappa d} \quad (1.3)$$

Cette vision unidimensionnelle du S.T.M. n'est qu'approximative mais présente clairement la dépendance exponentielle du coefficient de transmission avec la largeur de la barrière de potentiel, d (équation 1.3). Cette dépendance est à la base de l'excellente résolution verticale du

³Les conditions aux limites se résument dans les quatre équations suivantes :
 $\phi_1(0) = \phi_2(0)$ et $\phi_2(d) = \phi_3(d)$
 $d\phi_1/dx = d\phi_2/dx$ en $x=0$ et $d\phi_2/dx = d\phi_3/dx$ en $x=d$

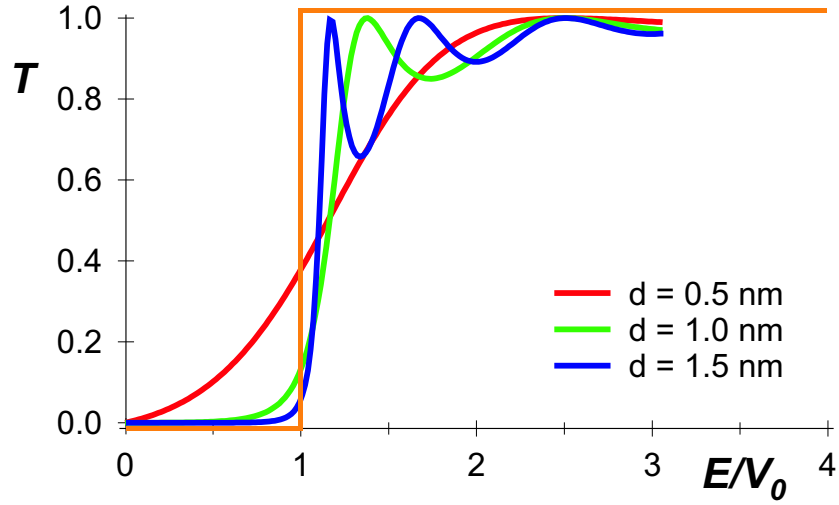


FIG. 1.2 – Graphe présentant le coefficient de transmission à travers une barrière de potentiel, d'un électron en fonction de l'énergie E de l'électron et de la largeur d de cette barrière de potentiel. La courbe orange représente le cas classique.

S.T.M. En effet, il est facile de montrer, à partir de l'équation ci-dessus, qu'un changement de seulement 1 Å dans la largeur de la barrière (d) modifie le coefficient de transmission d'un ordre de grandeur.

Les modèles unidimensionnels de l'effet tunnel d'un électron entre deux électrodes métalliques, séparées par un isolant, sont ceux sur lesquels se sont basés *Binnig, Röhrer* et al. pour interpréter leurs premières images S.T.M. [2]. Cependant, l'effet tunnel électronique est un problème complexe pouvant mettre en jeu plusieurs électrons simultanément. Une approche théorique rigoureuse devrait décrire le passage par effet tunnel d'un électron par la probabilité $P_{\mu,\nu}$ du système modifiant son état d'un certain état initial ψ_μ en un état final χ_ν , en tenant compte du caractère multiélectronique de ces états. Dans ce cas de figure, ψ_μ et χ_ν décrivent deux états qui diffèrent par leur distribution de charges dans l'échantillon et la pointe [35]. La théorie quantique élémentaire nous apprend alors que la probabilité recherchée $P_{\mu,\nu}$ s'exprime sous la forme $P_{\mu,\nu} = | \langle \psi_\mu | \chi_\nu \rangle |^2$ [36]. Dès lors, cette approche rigoureuse rend nécessaire le calcul des fonctions d'onde (à plusieurs particules) dépendantes du temps, du système entier. C'est une tâche extrêmement difficile, qui ne peut être résolue en général. Nous devons donc avoir recours à des approximations.

Un modèle à un électron peut constituer une première bonne approximation. Cette simplification permet en effet l'utilisation de fonc-

tions d'onde de particules. Etant donné les faibles valeurs du courant tunnel dans une expérience S.T.M., nous nous attendons à ce que les effets survenant suite au passage de plusieurs électrons soient d'une importance mineure [35]. Comme nous venons de le signaler ci-dessus, le passage par effet tunnel est dû aux transitions dans lesquelles des états ayant différentes distributions de charge sont impliqués. Dans le système à une particule (i.e. à un électron), le passage par effet tunnel peut être envisagé comme un passage d'un électron suite à des transitions d'états localisés d'un côté de la barrière de potentiel vers des états localisés de l'autre côté. Pour modéliser ces transitions, i.e. ce courant tunnel, l'approche par perturbation est la plus appropriée. Elle fut développée par *Bardeen*. Cette théorie est d'une importance capitale pour tous les utilisateurs de microscopes à effet tunnel. Elle est explicitée dans la section suivante.

1.2.2 Approche de *Bardeen*

Dans son approche, *Bardeen* considère le système comme constitué de deux sous-systèmes indépendants : un pour la pointe et un pour l'échantillon. Les états électroniques de ces deux sous-systèmes sont obtenus en résolvant les équations de *Schrödinger* indépendantes du temps. Le taux de transfert d'un électron d'une électrode à l'autre a pu être calculé. Pour cela, *Bardeen* utilise la théorie des perturbations. Elle présente l'avantage de permettre une modélisation, relativement simple, du comportement du S.T.M. pour différents types de pointes et de surfaces. Elle permet surtout d'éviter de modéliser le comportement du courant tunnel dans la barrière. Finalement, cette théorie déduit que le transfert des électrons, ou les éléments de la matrice tunnel M , est déterminé par le recouvrement des fonctions d'onde de surface des deux sous-systèmes à une surface de séparation située entre les deux électrodes. En d'autres termes, le courant tunnel est vu comme le recouvrement de fonctions d'onde non-perturbées de la pointe et de l'échantillon. Cela constitue la plus importante des approximations de *Bardeen*. Il envisage en effet que les fonctions d'onde des deux électrodes ne sont pas mutuellement perturbées. Cette théorie n'est donc applicable que lorsque le couplage pointe-échantillon est faible.

Hamiltonien de transfert de *Bardeen*

Tout comme *Bardeen*, utilisons la théorie des perturbations et traçons une surface de séparation Σ entre la pointe et l'échantillon⁴. Dé-

⁴Comme nous le montrerons plus loin, la position exacte de cette surface de séparation n'est pas importante.

finissons ensuite deux sous-systèmes ayant des potentiels de surface U_S et U_T , pour l'échantillon et la pointe respectivement. Définissons également ces énergies potentielles pour qu'elles satisfassent aux conditions suivantes [37] :

- La somme des deux énergies potentielles des deux systèmes individuels égale le potentiel du système combiné, c'est-à-dire :

$$U_S + U_T = U \quad (1.4)$$

- Le produit des deux potentiels vaut zéro dans l'espace tout entier :

$$U_S \cdot U_T = 0 \quad (1.5)$$

Supposons également que la pointe et l'échantillon soient infiniment éloignés l'un de l'autre pour tous les temps $t < 0$ [37]. La séparation totale du système de pointe et d'échantillon conduit à deux équations de *Schrödinger* indépendantes pour les deux systèmes telles que [35, 37]

$$\begin{cases} (T + U_S)\psi_\mu = E_\mu\psi_\mu \\ (T + U_T)\chi_\nu = E_\nu\chi_\nu \end{cases} \quad \text{avec} \quad T = -\frac{\hbar^2}{2m}\nabla^2 \quad (1.6)$$

dans lesquelles T indique l'opérateur énergie cinétique d'un électron, U_T et U_S respectivement les énergies potentielles des systèmes de pointe et d'échantillon. χ_ν et ψ_μ constituent quant à elles les fonctions d'onde de pointe et d'échantillon, respectivement.

Appliquons maintenant la théorie des perturbations dépendant du temps au système physique que constitue notre échantillon, afin de décrire le passage par effet tunnel d'un électron de l'échantillon vers la pointe⁵. A l'instant $t = 0$, une perturbation est donc appliquée au système physique. Cette perturbation, dans le cadre de notre problème, correspond à la modification du potentiel dans la région de la barrière, suite au rapprochement effectué entre la pointe et l'échantillon. L'état de l'échantillon commence alors à évoluer selon *l'équation de Schrödinger dépendant du temps*,

$$i\hbar\frac{\partial}{\partial t}\psi(t) = (T + U_S + U_T)\psi(t), \quad (1.7)$$

$(T + U_S + U_T)$ représentant l'hamiltonien du système perturbé.

Nous nous proposons de déterminer la probabilité $\mathcal{P}_{\mu,\nu}$ de transition d'un électron passant d'un état occupé de l'échantillon ψ_μ (d'énergie

⁵Le cas du passage d'un électron de la pointe vers l'échantillon peut être traité de manière tout à fait similaire [35].

E_μ) vers un état vide de la pointe χ_ν (d'énergie E_ν). Il s'agit en fait d'étudier les transitions qui peuvent être induites par la perturbation entre les états stationnaires du système non-perturbé (équation 1.6).

La probabilité de transition d'un électron de l'état ψ_μ de l'échantillon vers un état χ_ν de la pointe, limitée au premier ordre, est donnée par la règle d'or de Fermi :

$$\mathcal{P}_{\mu,\nu} = \frac{2\pi}{\hbar} |M_{\mu,\nu}|^2 \delta(E_\mu - E_\nu) \quad (1.8)$$

La vitesse de remplissage des états ν (i.e. la probabilité de transition) est en effet proportionnelle aux éléments de matrice $|M_{\mu,\nu}|^2 = |\langle \chi_\nu | U_T | \psi_\mu \rangle|^2$. Ces éléments sont appelés **éléments de la matrice tunnel** ou **éléments de la matrice de Bardeen** et notés $|M_{\mu,\nu}|$. Pour calculer le courant tunnel circulant entre l'échantillon et la pointe, il faut sommer ces probabilités de transition pour chaque énergie. On obtient alors

$$I = \frac{2\pi}{\hbar} e \sum_{\mu,\nu} |M_{\mu,\nu}|^2 \delta(E_\mu - E_\nu) f(E_\mu) [1 - f(E_\nu + eV)] \quad (1.9)$$

Dans cette somme, la charge de l'électron a été rajoutée. En effet, $\mathcal{P}_{\mu,\nu}$ est une probabilité de transition. Or, nous recherchons un courant de charges. Il s'agit, de plus, d'une double somme sur tous les états de l'échantillon et de la pointe. La fonction $f(E)$ est la fonction de distribution de *Fermi-Dirac*. $f(E_\mu)$ représente la probabilité d'avoir un état initial de l'échantillon occupé et $[1 - f(E_\nu + eV)]$ celle d'avoir un état final inoccupé de la pointe.

Il nous reste maintenant à déterminer une forme explicite des éléments de la matrice de *Bardeen*, $|M_{\mu,\nu}|^2$. Ces derniers peuvent être exprimés par une *intégrale de surface de Bardeen modifiée*, évaluée à partir des fonctions d'onde de pointe et d'échantillon sur la surface de séparation Σ . Etant donné que U_T , potentiel perturbateur, est nul partout sauf dans la pointe, l'élément de matrice $M_{\mu,\nu}$ n'est évalué que dans le volume de la pointe, noté Ω_T . Il peut dès lors s'exprimer sous la forme

$$\begin{aligned} M_{\mu,\nu} &= \langle \chi_\nu | U_T | \psi_\mu \rangle \\ &= \frac{\hbar^2}{2m} \int_{\Sigma} [\psi_\mu(r) \vec{\nabla} \chi_\nu^*(r) - \chi_\nu^*(r) \vec{\nabla} \psi_\mu(r)] \bullet \vec{n} dS \end{aligned} \quad (1.10)$$

où, rappelons-le, ψ_μ est la fonction d'onde de l'échantillon et χ_ν celle de la pointe. L'intégrale est calculée sur une surface Σ se trouvant entièrement dans la région du vide (c'est-à-dire dans la barrière) séparant

les deux électrodes. Remarquons, par cette équation, qu'il n'est utile que de connaître les valeurs de ces fonctions d'onde à la surface de séparation Σ . L'élément entre crochets n'est rien d'autre que l'opérateur courant. Nous allons maintenant montrer comment ces éléments de matrice peuvent être calculés analytiquement, en faisant des hypothèses supplémentaires sur les orbitales de pointe.

1.2.3 Modèle de Tersoff et Hamann

La tâche consistant à calculer les éléments de la matrice de *Bardeen* peut se révéler extrêmement simplifiée si l'on fait certaines hypothèses supplémentaires sur la pointe. Cette idée a été suggérée par *Tersoff* et *Hamann* et est certainement l'approche la plus largement utilisée dans l'interprétation des images S.T.M. C'est en tout cas à ce modèle qu'on doit les premiers calculs d'image tunnel sur des surfaces, à partir de considérations simples sur la géométrie de la pointe et la forme de ses fonctions d'onde électroniques [38, 39, 40].

Tersoff et *Hamann* ont en effet suggéré de remplacer la structure électronique inconnue de la pointe par un système modèle simple. Dans ce système, la fonction d'onde de l'atome à l'extrémité de la pointe est supposé être une fonction d'onde-s. Etant donné que le courant tunnel dépend du recouvrement des fonctions d'onde de pointe et d'échantillon (cfr équation 1.10) et que la fonction d'onde décroît exponentiellement dans le vide, seules les orbitales localisées sur cet atome à l'extrémité de la pointe joueront un rôle prépondérant dans le processus tunnel. Les fonctions d'onde de pointe en ondes-s sont du type

$$\chi_\nu(\vec{r} - \vec{r}_0) = C \frac{1}{\kappa |\vec{r} - \vec{r}_0|} e^{-\kappa |\vec{r} - \vec{r}_0|} \quad (1.11)$$

Cette expression représente la forme générale d'une orbitale atomique de type s, avec une constante de décroissance κ .

Revenons maintenant à l'expression des éléments de la matrice de *Bardeen*. En utilisant l'expression ci-dessus des fonctions d'onde de pointe et en se rappelant qu'elles sont réelles ($\chi_\nu = \chi_\nu^*$), nous pouvons déterminer une nouvelle expression des éléments de la matrice tunnel :

$$M_{\lambda,\mu} = \frac{-2\pi C \hbar^2}{\kappa m} \psi_\mu(\vec{r}_0) \quad (1.12)$$

Dans cette formulation, C est une constante. On voit donc finalement que la probabilité de transition, c'est-à-dire **le courant tunnel, ne dépend, en première approximation, que des fonctions d'onde de l'échantillon, ψ_μ , et pas des fonctions d'onde de pointe, χ_ν .**

1.2.4 Courant tunnel

Il nous reste simplement à revenir à l'expression du courant tunnel. Cependant, nous devons garder en tête que les électrons peuvent passer par effet tunnel aussi bien de la pointe vers l'échantillon que dans le sens inverse. Dès lors,

$$\begin{aligned} I &= I^{S \rightarrow T} - I^{T \rightarrow S} \\ &= \frac{2\pi}{\hbar} e \sum_{\mu, \nu} |M_{\mu, \nu}|^2 \delta(E_\mu - E_\nu) [f(E_\mu) - f(E_\nu + eV)] \end{aligned} \quad (1.13)$$

Dans le cas des basses tensions ($eV \ll$) et des basses températures ($T \simeq 0$), la distribution de *Fermi-Dirac* peut être approximée et le courant tunnel s'exprimer par

$$I = \frac{2\pi e^2 V}{\hbar} \sum_{\mu, \nu} |M_{\mu, \nu}|^2 \delta(E_\mu - E_F) \delta(E_\nu - E_F) \quad (1.14)$$

Une quantité fréquemment utilisée pour présenter l'information obtenue est la densité d'états locale (L.D.O.S. : *Local Density Of States*) à chaque valeur d'énergie en-dessous du niveau de *Fermi* à 0K. Parce que chaque état possède une valeur propre en énergie, l'information contenant les distributions spatiales et énergétiques est importante pour beaucoup d'expériences impliquant l'information énergie. La densité d'états locale $\rho(\vec{r}, E)$ au point $\vec{r}$ au niveau d'énergie E est définie comme

$$\begin{aligned} \rho(\vec{r}, E) &= \lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{1}{\varepsilon} \sum_{E_\mu = E}^{E+\varepsilon} |\psi_\mu(\vec{r})|^2 \\ &= \sum_{\mu} |\psi_\mu(\vec{r})|^2 \delta(E_\mu - E) \end{aligned} \quad (1.15)$$

où E_μ représente la valeur propre de l'énergie de l'état $\psi_\mu(\vec{r})$. En remplaçant les éléments de la matrice de *Bardeen*, $M_{\mu, \nu}$, par leur valeur dans l'équation ci-dessus, nous obtenons

$$I \propto eV D_T(e_F) \rho(\vec{r}_0, E_F) \quad (1.16)$$

avec $D_T(e_F)$ la densité d'états par unité de volume de la pointe et $\rho(\vec{r}_0, E_F)$ la densité d'états locale au niveau de *Fermi* de l'échantillon au point $\vec{r}_0$. Cette expression du courant tunnel fournit un outil simple pour l'interprétation des images S.T.M. Dans ce modèle, la quantité de base, imagée par le S.T.M., est donc **la densité d'états locale des états au niveau de *Fermi* de l'échantillon** évaluée au point

$\vec{r}_0$. De plus, dans ces conditions, la densité d'états de la pointe devient une simple constante. Finalement, nous voyons que le courant tunnel est proportionnel à la tension appliquée. Pour une tension V fixée, le courant est aussi proportionnel à la densité d'états locale de surface au niveau de *Fermi* au centre du rayon de courbure de la pointe $\vec{r}_0$. Dans ce cas, le parcours de la pointe représente une carte de contour de densité d'états locale de surface constante. En d'autres termes, dans le modèle en ondes-s de *Tersoff* et *Hamann*, les propriétés de la pointe peuvent être écartées du problème et l'image S.T.M. reflète uniquement une propriété de l'échantillon, plutôt qu'une propriété du système commun pointe-échantillon. Ces résultats peuvent être étendus à une pointe de forme arbitraire, aussi longtemps que les fonctions d'onde de pointe au niveau de *Fermi* peuvent être approximées adéquatement par une fonction d'onde-s.

1.2.5 Extension de *Chen* au modèle de *Tersoff* et *Hamann*

Bien que le modèle de *Tersoff* et *Hamann* soit satisfaisant pour interpréter la plupart des images S.T.M., il semble ne pas être suffisant dans certains cas. Il est avéré que la rugosité⁶ de surfaces métalliques, prédite par ce modèle, est trop faible pour expliquer les rugosités atomiques mesurées expérimentalement. *Chen* supposa que ce phénomène était partiellement dû à la restriction de ce modèle à des orbitales de type-s [37].

Il est en effet assez intuitif de supposer qu'une orbitale (de pointe) plus directionnelle, telle qu'une orbitale d_{z^2} (dans une représentation tridimensionnelle, z est l'axe entre la pointe et l'échantillon), pointant vers l'échantillon puisse conduire à des rugosités plus importantes. *Chen* a donc utilisé cette idée pour élargir le modèle de *Tersoff* et *Hamann* à d'autres types d'orbitales [37]. Son formalisme a abouti à l'élaboration des **règles de dérivation de *Chen***, qui donnent une dépendance simple des éléments de la matrice tunnel ($M_{\mu,\nu}$) avec l'orbitale atomique de la pointe. Inclure les orbitales dirigées vers l'échantillon (comme une orbitale d_{z^2} ou $d_{z^2-r^2/3}$) nous conduira à des éléments de la matrice de *Bardeen* qui sont toujours proportionnels aux fonctions d'onde de l'échantillon au point $\vec{r}_0$. Cependant, un facteur multiplicatif est introduit, conduisant à un courant tunnel plus important [37].

⁶La rugosité est définie comme la différence de hauteur entre l'endroit où la densité d'états perçue est la plus grande et l'endroit où elle est la plus petite.

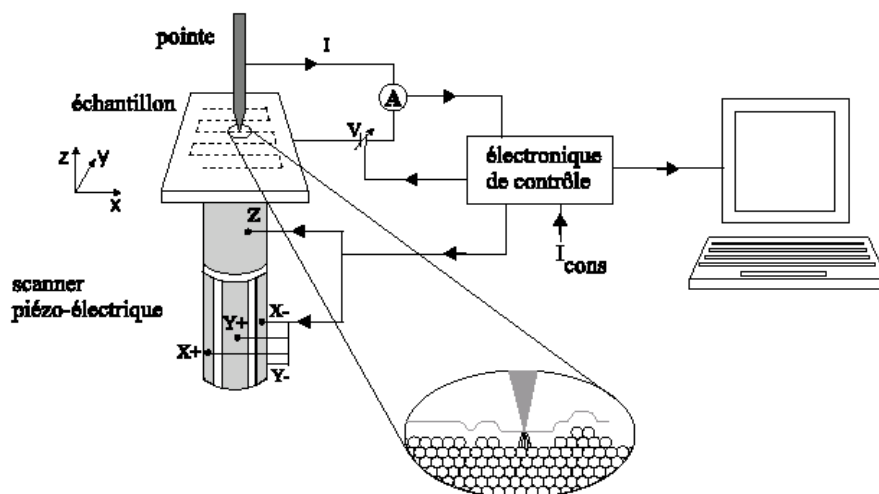


FIG. 1.3 – Représentation schématique générale d'un microscope à effet tunnel à balayage [34].

1.3 Le microscope

En bref, d'un point de vue théorique, un microscope à effet tunnel fonctionne comme suit : une fine pointe métallique se déplace, point par point, au-dessus de la surface d'un échantillon. Ces deux électrodes sont positionnées suffisamment proches l'une de l'autre pour que des électrons puissent passer par effet tunnel lorsqu'on leur applique une différence de potentiel (pouvant aller de quelques dizaines de millivolts à plusieurs volts). Un courant se met alors à circuler et peut ainsi être mesuré (s'échelonnant de quelques picoampères à plusieurs nanoampères). Ce courant dépend principalement, dans le cadre de la théorie de *Bardeen* et du modèle de *Tersoff* et *Hamann*, de la densité d'états locale au niveau de *Fermi* de l'échantillon évaluée à la position $\vec{r}_0$ de la pointe. Nous pouvons ainsi récolter des images mettant en évidence les fortes densités d'états locales, généralement liées, en première approximation, à la présence d'atomes.

Intéressons-nous maintenant aux aspects plus techniques de cette instrumentation. En effet, les dimensions relatives à cette "nanoscopie" ainsi que les valeurs de courant tunnel extrêmement faibles mesurées lors de ce type d'expérience nécessitent des dispositifs de haute technologie et d'une grande précision. Détaillons-en les éléments constitutifs dans les sections suivantes. De manière générale, la réalisation d'un S.T.M. tel que schématisée à la figure 1.3 nécessite les éléments sui-

vants :

un dispositif d'approche de la pointe, composé d'un scanner piézoélectrique ;

une boucle de contre-réaction, dispositif permettant de maintenir la pointe à une position fixée par rapport à l'échantillon (ou de contrôler le courant tunnel) ;

un système antivibratoire filtrant et amortissant les vibrations parasites de l'environnement ambiant ;

un pointe effilée, composant essentiel à l'acquisition de données. En effet, la géométrie et l'identité chimique de celle-ci influencent tant les mesures topographiques que spectroscopiques.

Détaillons les différents éléments constitutifs de cet appareil. Par la suite, nous nous attarderons sur ses différents modes de fonctionnement.

1.3.1 Le système d'approche

Le déplacement macroscopique de l'échantillon est assuré par un moteur pas à pas. Le système qui permet le balayage au-dessus de la surface de l'échantillon est constitué d'un élément piézoélectrique. Lors de ce balayage, c'est en réalité l'échantillon qui se déplace sous l'effet des mouvements du *scanner piézoélectrique*, eux-mêmes dépendant de la boucle de contre-réaction.

Le scanner piézoélectrique

La forte dépendance (exponentielle) du courant tunnel avec la distance pointe-échantillon rend possible l'utilisation de ce courant dans une boucle de contre-réaction contrôlant un dispositif de déplacement (de l'échantillon) de précision, i.e., le scanner piézoélectrique. Les scanners des microscopes à sonde locale sont construits à partir de matériaux piézoélectriques, c'est-à-dire des matériaux qui se dilatent et se contractent de manière proportionnelle à une tension appliquée. La polarité de cette tension aura comme conséquence une elongation ou une contraction du matériau [41]. De manière générale, un élément piézoélectrique s'allonge ou s'étire de 4 à 6 Å par volt appliqué à ses bornes [34].

Il existe différents types de scanners piézoélectriques ; les scanners *tripodes* dont les déplacements le long des axes X , Y et Z sont contrôlés par trois éléments P.Z.T. (*lead Zirconate Titanate Piezoelectric ceramics*) indépendants, les scanners *bimorphes* pour lesquels deux minces

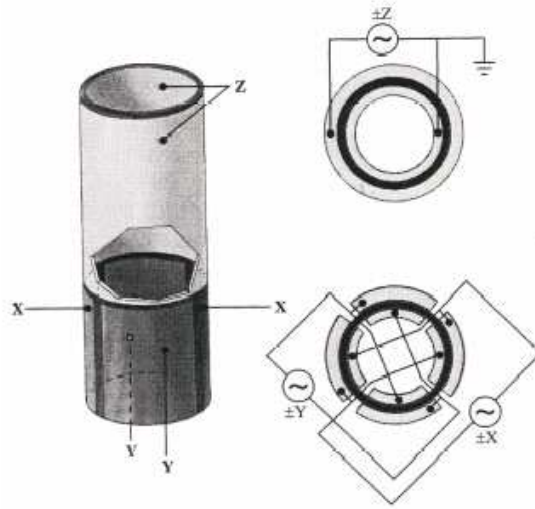


FIG. 1.4 – Image du scanner piézoélectrique tubulaire. [34]

plaques d'un matériau piézoélectrique sont collées ensemble (en appliquant une tension, une plaque se dilate, l'autre se contracte et l'ensemble se plie) et les scanners *en forme de tube* [37]. Dans notre cas, nous disposons, pour le balayage de la surface, d'un système tubulaire de céramique piézoélectrique. Ce scanner piézoélectrique en tube est composé de deux parties, comme indiqué à la figure 1.4.

Sur sa section supérieure, il est entièrement recouvert, à l'extérieur comme à l'intérieur, d'un mince film métallique. Cette partie provoque l'élongation ou la contraction du cylindre piézoélectrique lorsqu'on lui applique une différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur. Ce mouvement vertical est le seul utilisé lors de l'approche et sert aussi à maintenir la pointe à hauteur constante par rapport à l'échantillon lors du balayage.

Sa section inférieure est recouverte à l'intérieur comme à l'extérieur de quatre quadrants métalliques. En appliquant une différence de potentiel entre deux quadrants opposés (par exemple $+x$ et $-x$), on provoque la déflexion du scanner dans cette direction. Ce mouvement selon l'axe X ou Y permet un positionnement très précis de la pointe ainsi que le balayage de la surface de l'échantillon. Lors du balayage, le scanner va se déformer selon une direction (X) déterminée par l'expérimentateur. En cours de chemin, il s'arrêtera un certain nombre de fois pour prendre les mesures souhaitées, c'est-à-dire le courant dû aux "électrons tunnels" pour chaque point. Une image consiste alors en une

succession de lignes entre lesquelles le scanner s'est faiblement déplacé selon Y .

Malheureusement, la dépendance des déplacements de l'élément piézo-électrique avec la tension appliquée subit une hystérèse non-linéaire. Afin de pallier ces inconvénients, des corrections sont apportées électroniquement à la tension appliquée au scanner. Par ailleurs, les mouvements du scanner sont affectés par la température. Si, au cours du balayage, la température du scanner n'est pas constante, une certaine dérive, dite thermique, peut apparaître. Ces phénomènes, et bien d'autres (la liste n'est pas exhaustive), sont à l'origine de nombreux artefacts dans les images obtenues (voir § 1.8). Il convient donc de bien les identifier et d'en tenir compte lors de l'interprétation des résultats recueillis.

1.3.2 Le circuit de contre-réaction

Ce paragraphe décrit succinctement le circuit de contre-réaction. Nous n'entrerons pas dans les détails des circuits car ceux-ci deviennent rapidement très techniques ; cela n'est pas notre objectif. Pour les personnes intéressées, nous conseillons de consulter les références [37] et [42].

Le circuit de contre-réaction a pour fonction de faire suivre par la pointe un contour de courant tunnel constant, le plus rapidement possible, avec un maximum de précision, lorsqu'on travaille en mode à courant constant (voir § 1.3.5). D'une manière qualitative, le courant tunnel mesuré et amplifié, est transformé en tension par l'intermédiaire d'un convertisseur courant-tension. Dans notre cas, le microprocesseur de la centrale d'acquisition sert d'électronique de régulation. Il compare la valeur de cette tension avec un courant de référence (lui aussi converti en tension) et fixé par l'expérimentateur. La différence entre ces deux signaux correspond au signal d'erreur. C'est cette différence qui est renvoyée au scanner piézoélectrique sous forme de tension, permettant alors la régulation de la hauteur de la pointe. Ainsi, à chaque instant, la hauteur de la pointe est réajustée de manière à toujours être à la même distance de la surface de l'échantillon. En pratique, si le courant tunnel est plus élevé que le courant programmé, la tension appliquée au piézoélectrique en z a alors tendance à éloigner la pointe de la surface de l'échantillon, et vice versa [43]. Deux gains sont utilisés pour régir la manière dont va agir la boucle de contre-réaction proprement dite. Il s'agit d'un gain intégral et d'un gain proportionnel. Ceux-ci vont permettre de modifier la réponse de la pointe en fonction de l'échantillon analysé, en agissant sur l'intensité et la rapidité de la

réaction du scanner piézoélectrique.

1.3.3 L'isolation

Considérant la résolution et la sensibilité du S.T.M., le problème d'isoler cet instrument de toutes vibrations parasites extérieures est primordial. Différents systèmes isolants sont employés afin de minimiser toutes les vibrations, qu'elles soient d'origine électrique ou électronique, acoustique ou mécanique. Pour cela, le microscope est placé sur une table antivibrations. Il s'agit d'un socle composé de marbre, de béton et de ressorts, totalement désolidarisé du reste du bâtiment. Il a pour but d'atténuer certaines vibrations mécaniques provenant de ce dernier. Ensuite, un cylindre métallique entourant le microscope tient lieu de cage de *Faraday*. De plus, un capuchon en néoprène entourant tout le système permet de l'isoler des vibrations acoustiques. Enfin, une électronique sophistiquée isole le système de mesure des perturbations électriques et électroniques pouvant provenir de l'électronique de contrôle et du réseau électrique.

1.3.4 Les pointes

La pointe est un composant essentiel en microscopie à effet tunnel. Il est en effet nécessaire d'avoir une pointe très effilée car, dans ce cas, le courant tunnel proviendra principalement de l'atome situé à l'apex de celle-ci. De plus, sa nature, sa forme, sa technique d'affinage, la disposition des atomes à son extrémité, ses propriétés électroniques,... affectent de manière décisive les images S.T.M. Il est donc important d'utiliser des pointes propres, aiguës et stables. Diverses techniques ont été mises au point afin de produire les pointes les plus effilées possibles. La découpe des pointes S.T.M. est réalisée de manière mécanique. Une simple paire de ciseaux est en fait utilisée afin de sectionner un fin fil métallique. L'extrémité de ce fil découpé servira alors de pointe. Il existe cependant beaucoup d'autres méthodes de préparation de pointes que celles exposées dans ce travail [37, 42].

Le matériel choisi pour la pointe peut lui aussi influencer les images. Par exemple, l'or est inerte mais déformable, le tungstène est dur mais couvert d'une mince couche d'oxyde non conductrice, le nickel est relativement inerte et relativement dur,... De plus, le type de pointe varie en fonction de l'échantillon à analyser, ainsi que de l'environnement (milieu liquide, air,...). Il est donc intéressant de voir, en fonction de l'échantillon étudié, quelle pointe procure la meilleure résolution. Pour cela, nous avons testé différents types de pointes. Les pointes standards, les

plus couramment utilisées sont réalisées en un alliage de platine-iridium. Avant découpe, elles sont préalablement nettoyées à l’isopropanol.

Au cours de cette thèse, nous avons également employé une nouvelle technique nécessitant la modification chimiques des pointes. Dans ce cas, des molécules sont accrochées à la pointe (voir § 3.1 et § 3.2). En pratique, des pointes en or sont chimiquement modifiées avec de l’acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA) et du 4-mercaptotoluène (4-MT). Leur préparation est décrite ci-dessous.

Méthode de préparation. Les pointes S.T.M. ont été préparées à partir d’un fil d’or ($\varnothing=0.20\text{mm}$, *Goodfellow*, 99.99%) par découpe mécanique. Avant cela, les fils ont été nettoyés par ultrasons dans de l’éthanol, et davantage, par immersion dans une solution piranha (70% H_2SO_4 : 30% H_2O_2). Les pointes ont, par la suite, été rincées dans de l’éthanol. Pour la formation des monocouches auto-assemblées sur les pointes, nous avons immergé ces dernières, pendant 12 heures, dans une solution saturée d’acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA, Aldrich, 97%) ou de 4-mercaptotoluène (4-MT) dans de l’éthanol. Les pointes ont ensuite été, une dernière fois, rincées à l’éthanol et séchées sous flux d’azote.

Finalement, il est également important de rappeler que les images S.T.M. ne révèlent pas immédiatement la structure géométrique de la surface, mais dépendent de la densité d’états électroniques de la surface. Il n’est également pas toujours possible de se limiter au modèle simple de *Tersoff* et *Hamann*. Souvent, la densité d’états électroniques de la pointe entre aussi en jeu.

1.3.5 Les modes d’utilisation

Nous avons pu, dans les paragraphes précédents, comprendre les bases théoriques et expérimentales du microscope à effet tunnel à balayage. Cependant, cela ne nous permet pas de comprendre comment ce dispositif acquiert les données caractéristiques de l’objet d’analyse. La section suivante comble ce manque en présentant un aperçu des différents modes d’imagerie.

Le S.T.M. peut être configuré pour balayer l’échantillon selon deux modes possibles : **le mode à courant constant et le mode à hauteur constante**, détaillés dans les paragraphes suivants.

Le mode à courant constant

Historiquement, ce fut le premier mode à être utilisé et, actuellement encore, le plus courant [29]. Il s’agit du mode utilisé tout au long de

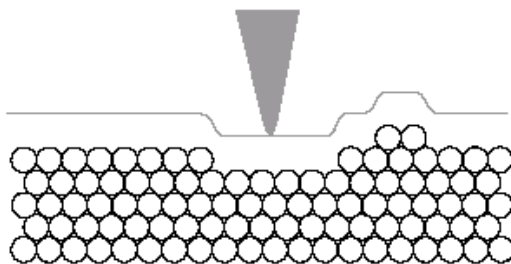


FIG. 1.5 – Mode à courant constant [34]. La ligne grise matérialise le trajet de la pointe.

cette thèse. En pratique, il se réduit à une topographie classique et peut être utilisé pour imager des surfaces relativement irrégulières.

Dans ce mode de balayage, le S.T.M. utilise le circuit de contre-réaction afin de garder le courant tunnel I constant et ceci en ajustant la distance pointe-échantillon (à l'aide des déplacements du scanner piézoélectrique) en chaque point de mesure. Dans ces conditions, l'image obtenue matérialise le mouvement du scanner, i.e. le mouvement $z(x, y)$ de la pointe pendant un balayage à courant I constant. Pour obtenir $z(x, y)$, on utilise les propriétés de linéarité du système de déplacement (i.e. des transducteurs piézoélectriques) vis-à-vis des tensions de commande. On enregistre la tension de commande du déplacement selon z en fonction des tensions qui assurent le mouvement de balayage en x et y . Par exemple, lorsque le système détecte une augmentation du courant tunnel, il ajuste la tension appliquée en z de telle sorte que la pointe s'écarte de la surface de l'échantillon [37, 44], comme visualisé à la figure 1.5. L'image obtenue représente alors, en première approximation, “le relief de la surface”, puisque “à courant constant” signifie que la distance entre la pointe et la surface est constante. La finesse des détails peut être appréciée à l'échelle atomique, et cette capacité “de voir les atomes” est à l'origine du succès du S.T.M.

Le mode à hauteur constante

Dans le mode à hauteur constante, la pointe balaye la surface de l'échantillon en restant sur un plan horizontal. Le courant tunnel varie alors en fonction de la distance pointe-échantillon, i.e. de la topographie de l'échantillon, et des propriétés électroniques de la surface, comme indiqué à la figure 1.6. Les courants tunnels mesurés en chaque point

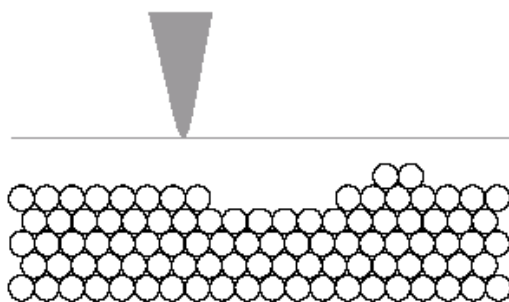


FIG. 1.6 – *Mode à hauteur constante [34]. La ligne grise matérialise le trajet de la pointe.*

de cette surface constituent la série de données.

Ce mode est plus rapide que le mode à courant constant car le système ne doit pas déplacer la pointe verticalement afin de maintenir la distance pointe-échantillon constante en fonction de la rugosité de la surface. La microscopie à hauteur constante ne peut cependant être utilisée que pour des surfaces relativement planes.

1.3.6 L'appareillage

D'un point de vue plus pratique, le microscope à effet tunnel utilisé est un microscope commercial. Il a été fourni par *Digital Instrument*. Il s'agit d'un microscope à sonde locale multimode "Nanoscope IIIA" (figure 1.7). Il peut être utilisé soit en mode S.T.M., soit en mode A.F.M. Seule la partie supérieure du microscope, appelée la tête (S.T.M. ou A.F.M.), est à modifier lors du passage d'une configuration à l'autre. Plusieurs têtes ont donc été utilisées :

Une tête S.T.M. standard. Ce système permet des mesures de courant allant de 100 pA à 10 nA. Le microscope, muni d'une tête S.T.M. standard, est présenté à la figure 1.7A.

Une tête S.T.M. à faible courant. Il s'agit d'un système permettant de mesurer des courants de l'ordre du picoampère. Typiquement, sa gamme de fonctionnement s'étend de ~ 1 -2 pA jusqu'à 1 nA.

Une tête A.F.M. Cette tête permet de réaliser des expériences de microscopie à force atomique (figure 1.7B).

Ce système peut également être muni de deux scanners piézoélectriques différents :



FIG. 1.7 – Photographies d’un microscope multimode à sonde locale (A) muni d’une tête S.T.M. [34] et (B) muni d’une tête A.F.M. [34].

Scanner E. Ce scanner permet des tailles d’images allant jusqu’à $10\ \mu\text{m}$ et une hauteur verticale de $\approx 2.5\ \mu\text{m}$.

Scanner J. Ce scanner peut réaliser des images allant jusqu’à $125\ \mu\text{m}$ avec une hauteur verticale maximale de $\approx 5.0\ \mu\text{m}$.

1.3.7 Les artefacts

Par artefacts, il faut entendre toutes caractéristiques présentes dans les images recueillies mais n’existant pas réellement, et n’étant dès lors pas dues à la structure de la surface. Ces artefacts peuvent avoir diverses origines liées aux différents éléments constitutifs du microscope.

Artefacts dus à la pointe

La plupart des artefacts visionnés dans une image S.T.M. émanent d’un phénomène connu sous le nom de “**convolution géométrique de la pointe**”. La définition même de la microscopie à effet tunnel fait qu’en chaque point de la surface, nous avons une convolution géométrique avec la forme de la pointe et une convolution électronique avec ses états d’énergie. Chaque point de mesure dans une image représente la convolution spatiale (au sens général du terme) de la forme de la pointe avec la forme de l’objet imagé. Aussi longtemps que la pointe

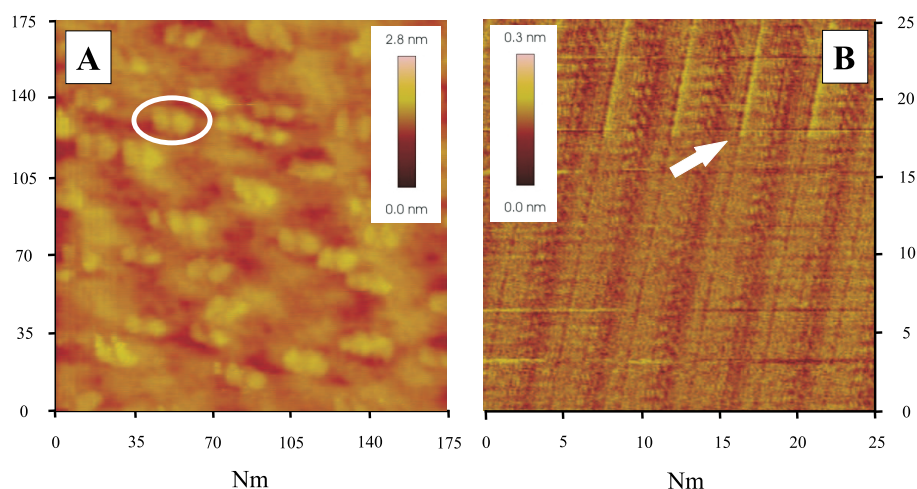


FIG. 1.8 – (A) Image S.T.M. de molécules de méthoxybenzénethiol sur Au(111), imagé à l'aide d'une pointe multiple. Le cercle met en évidence une structure appartenant à la surface mais imagée deux fois. (175 nm x 175 nm, 300 pA, 400 mV). (B) Image S.T.M. d'une couche auto-assemblée d'acide palmitoléique à l'interface phényloctane/graphite. La flèche indique l'endroit d'une modification de structure de l'extrémité de la pointe (25 nm x 25 nm, 410 pA, -610 mV).

est plus effilée que l'objet à mesurer, le véritable profil de la caractéristique est représenté. Cependant, dans le cas contraire, l'image sera dominée par la forme de la pointe [45].

La partie de la pointe qui image la surface est formée idéalement d'un atome ou d'une série d'atomes, disposés à l'extrémité d'un long fil. Une telle pointe produira sans aucune difficulté une résolution atomique. Supposons maintenant que la pointe soit composée de deux micropointes. On parle alors d'une **pointe multiple**. Dans ce cas, le courant tunnel passera dans un premier temps par la micropointe 1 et, dans un second temps, par la micropointe 2. Le résultat consistera en un objet visionné deux fois par la sonde locale (notamment les marches), i.e. une image double, comme nous pouvons le voir à la figure 1.8A. Une surface d'or recouverte de molécules (méthoxybenzénethiols) formant de petits agrégats est imagée par une pointe double. Chaque agrégat de molécules est présent deux fois dans l'image, comme l'indiquent, par exemple, les molécules entourées d'un cercle.

L'accumulation de débris à l'extrémité de la pointe peut aussi produire une distorsion de l'image. Au fur et à mesure que la pointe balaye la surface, des débris se trouvant initialement en surface peuvent venir s'agglutiner à l'apex de la pointe. Il en résulte un changement

de structure de l'apex et donc une distorsion de l'image S.T.M. Cette accumulation de débris peut être ôtée par l'application d'une impulsion de tension à la pointe, ayant pour effet de rejeter violemment les débris sur la surface [45].

Obtenir une très bonne résolution en S.T.M. à l'air n'est pas toujours chose aisée, la maintenir est une chose encore plus difficile à réaliser. La résolution que l'on obtient avec une pointe S.T.M. peut en effet varier au cours du temps, en fonction des **modifications de structure** de l'apex de la pointe. De manière plus précise, au cours d'un balayage, la pointe subit de fréquents changements, pouvant altérer de manière dramatique la résolution de l'image. Nous avons pu l'observer notamment sur des couches auto-assemblées de molécules (acide palmitoléique à l'interface phényloctane/graphite présenté à la figure 1.8B). L'endroit indiqué par une flèche illustre ce phénomène et la perte de résolution qui en découle.

Si l'atome à l'extrémité de la pointe n'est pas métallique ou si la surface est couverte d'une mince couche isolante (une couche trop épaisse ne nous permettrait pas de détecter un courant tunnel), l'image S.T.M. ne représentera pas la véritable structure électronique de la surface de l'échantillon mais celle-ci sera atténuée et l'image sera moins nette.

Artefacts dus au scanner piézoélectrique

Les scanners piézoélectriques en tube sont couramment utilisés en microscopie à sonde locale. En fonction du type de matériau piézoélectrique, de la taille et de la configuration du scanner, les surfaces maximales sondables peuvent varier de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres. Les matériaux piézoélectriques peuvent réaliser des mouvements plus faibles que les dimensions relatives au diamètre atomique mais ils souffrent de plusieurs problèmes majeurs, principalement liés à la non-linéarité [46, 47].

En théorie, en première approximation, la contrainte⁷ dans un scanner piézoélectrique varie linéairement avec la tension appliquée. En pratique, le comportement des scanners piézoélectriques n'est pas aussi simple. La relation tension-contrainte diverge du comportement linéaire idéal. Ces divergences sont explicitées dans les paragraphes suivants (leur liste n'est cependant pas exhaustive).

La non-linéarité intrinsèque. Considérons un scanner piézoélectrique en tube. Supposons que la tension appliquée ait une valeur initiale nulle et soit progressivement augmentée jusqu'à une certaine

⁷La contrainte est ici définie comme la modification de longueur divisée par la longueur originelle, c'est-à-dire $\Delta l/l$ [47].

valeur finie. Si l'on trace l'allongement du scanner en fonction de la tension appliquée, le graphe ne représentera pas une ligne droite mais une courbe en forme de S . Par définition, on appelle donc la non-linéarité intrinsèque d'un matériau piézoélectrique, le rapport entre la déviation maximale au comportement linéaire, Δy , sur l'extension linéaire, y à cette tension. En d'autres mots, la non-linéarité est $\Delta y/y$ et exprime un pourcentage. Elle s'échelonne habituellement entre 2 et 25 % dans les piézoélectriques utilisés en S.P.M. En pratique, cette non-linéarité se marquera dans les images S.T.M. par une distorsion. En conséquence, l'image S.T.M. d'une structure périodique présentera des espacements différents et une courbure des structures linéaires [47].

L'hystérèse. Supposons à nouveau que la tension appliquée au scanner ait une valeur initiale nulle et soit progressivement augmentée jusqu'à une certaine valeur finie, et par la suite réduite jusqu'à zéro. En traçant l'extension du scanner en fonction de la tension appliquée, nous remarquerons que les deux courbes suivent des chemins différents. L'hystérèse d'un scanner piézoélectrique est dès lors définie comme le rapport de l'écart maximum entre les deux courbes sur l'allongement maximal qu'une tension peut créer dans le scanner, i.e. $\Delta Y/Y_{max}$ [47]. Pour cette raison, bien que la plupart des scanners commerciaux autorisent l'acquisition des données lors des deux trajets, ils ne sont normalement pas intégrés en une seule image.

L'effet de vieillissement. La réponse d'un matériau piézoélectrique se modifie exponentiellement avec le temps et l'utilisation. En effet, lorsqu'un scanner n'est pas utilisé, la déflexion réalisée pour une tension donnée diminue progressivement.

1.4 Les substrats

Le choix du substrat est également fondamental lors d'expériences en microscopie à effet tunnel à balayage. Plusieurs conditions sont en effet requises afin d'obtenir les résultats les plus intéressants possibles. Nous en dressons ci-dessous une liste non-exhaustive :

- La condition *sine qua non* au déroulement d'expériences S.T.M. sur un substrat donné est que ce dernier soit conducteur (ou semi-conducteur). Dans le cas contraire, aucun courant tunnel ne peut alors circuler entre la pointe et la surface de l'échantillon.
- Dans la même optique que ci-dessus, lors de travaux réalisés à l'air libre, il est fortement conseillé d'utiliser un substrat qui ne s'oxyde pas ou très peu.

- Pour l'étude de matériaux de dimensions nanométriques, avec l'espoir d'obtenir une résolution atomique (ce qui est notre cas), il est nécessaire d'avoir un substrat atomiquement plat sur de grandes distances (sous forme de marches ou terrasses).
- Le substrat requiert une certaine inertie chimique et thermique, afin de ne pas se détériorer ou se déformer suite à une réaction chimique ou thermique lors du dépôt de l'échantillon.
- De plus, il est aussi important que les molécules à étudier soient immobilisées sur le substrat sans que cette liaison (*van der Waals* ou covalente) ne les déforme trop, mais soit suffisante pour maintenir l'échantillon fixe lors de l'imagerie.
- ...

Les métaux nobles peuvent, dans ce cadre, jouer un rôle important, dès lors qu'ils ne s'oxydent pas ou peu sous conditions ambiantes. Le platine, par exemple, est largement utilisé. De plus, l'or et l'argent constituent également des substrats adéquats, notamment pour l'étude de monocouches moléculaires par S.T.M. Ces derniers nécessitent cependant une préparation plus contraignante (polissage, recuit,...). Une autre alternative pour obtenir des surfaces conductrices suffisamment planes est de cliver des conducteurs ayant une structure en couches ou en feuillets, comme par exemple, le graphite pyrolytique hautement orienté (H.O.P.G.). Celui-ci est couramment utilisé en microscopie à effet tunnel à balayage.

Notre attention se portera dans les paragraphes suivants, sur les substrats utilisés pour nos expériences. Nous détaillerons en effet certaines caractéristiques du graphite pyrolytique hautement orienté (H.O.P.G.), de l'or (la surface (111)) et du platine (la surface (111)).

1.4.1 Le graphite H.O.P.G.

Le carbone est un matériau important, utilisé dans de nombreuses applications. On le retrouve aussi bien dans les mines de nos crayons (sous sa forme naturelle), que dans le charbon ou sous forme de fibres, fullerènes ou nanotubes [48]. Le carbone graphite est noir et a une structure en couches. D'un point de vue cristallographique, il appartient aux matériaux lamellaires et consiste en un empilement ABAB de plans identiques. Chaque plan de graphène présente une symétrie hexagonale, à l'intérieur de laquelle deux atomes adjacents sont séparés d'une distance équivalente à 0.142 nm. La distance entre plans est, quant à elle, égale à 0.335 nm. Les atomes de carbone interagissent donc de manière beaucoup plus importante avec ceux appartenant au même plan, qu'avec ceux appartenant à des plans adjacents, ce qui explique

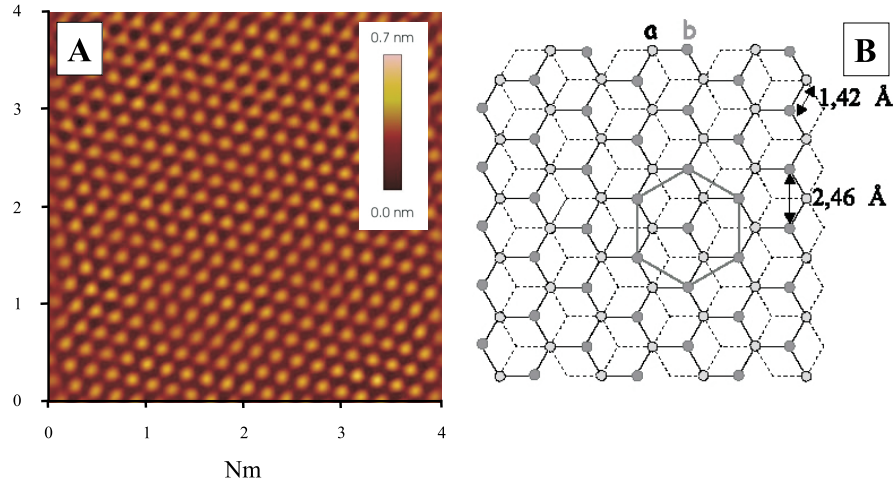


FIG. 1.9 – (A) Image S.T.M. à résolution atomique de la surface de H.O.P.G. (pointe en Pt/Ir). Les protubérances forment une structure hexagonale centrée de 0.25 nm de côté (4 nm x 4 nm, 1 nA, 35 mV). (B) Dessin d'une bicouche AB de graphite. Les sites a et b correspondent respectivement aux atomes de carbone ayant un atome juste en-dessous d'eux dans l'autre couche et situés juste au-dessus du centre d'un hexagone de l'autre couche [34].

le comportement lamellaire du graphite.

Image S.T.M. à résolution atomique

Comparons les données expérimentales (présentées à la figure 1.9A) à la structure et aux données théoriques relatives au H.O.P.G. (présentées à la figure 1.9B). On y note plusieurs différences flagrantes : la position des atomes de carbone dans le H.O.P.G. forme une structure hexagonale, dans laquelle la distance entre atomes adjacents est de 0.142 nm. Or, l'expérience nous montre une structure hexagonale centrée et une distance entre protubérances de 0.25 nm. Ces dernières ne correspondent donc pas aux atomes de carbone. Les nombreuses études réalisées par S.T.M. sur le H.O.P.G. ont abouti actuellement à la conclusion que seul un atome de carbone sur deux était visible dans l'image S.T.M. [12]. Cette hypothèse est tout à fait cohérente avec la présence de deux sites atomiques distincts dans chaque feuillet de graphène (appartenant à un cristal en configuration AB), notés a et b. D'importantes recherches ont été menées pour aboutir à la conclusion que les protubérances visibles correspondent aux atomes positionnés en site b. Nous renvoyons vers la littérature les personnes désireuses d'en

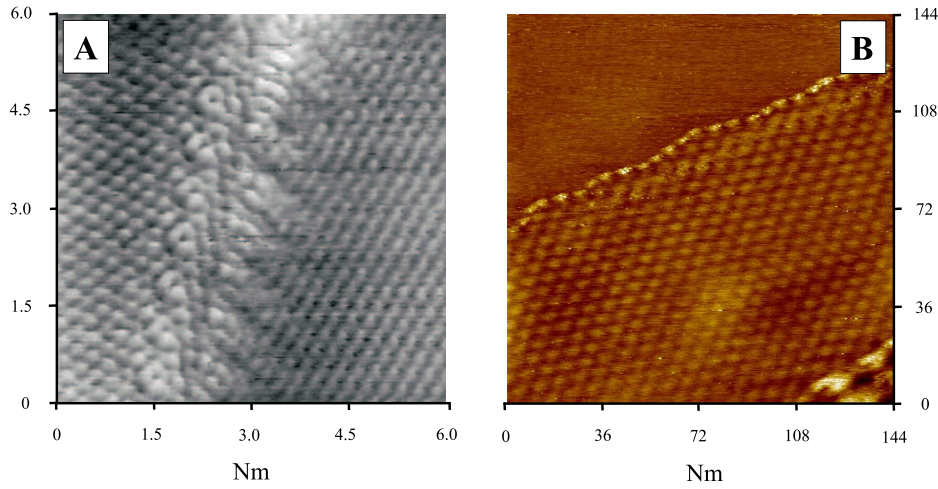


FIG. 1.10 – (A) *Joint de grain à la surface du graphite H.O.P.G.* (5 nm x 5 nm, 1 nA, 100 mV) [34]. (B) *Figure de Moiré sur du graphite H.O.P.G.* (144 nm x 144 nm, 166 pA, 305 mV).

connaître davantage [34, 49].

Le H.O.P.G. est un semi-métal qui a été imagé, ces dernières années, sous différentes conditions : sous ultra-haut vide [50], à différentes interfaces liquide/solide, à l'air libre,... [11, 12, 51, 52, 53]. Il se présente sous la forme de cristaux, atomiquement plats et parfaits, de l'ordre du micron. Ses défauts caractéristiques, incluant des joints de grains (figure 1.10A), des superstructures et des figures de Moiré (figure 1.10B), ont déjà largement été étudiés dans la littérature. Le lecteur intéressé pourra consulter la littérature [4].

Préparation

La structure lamellaire du graphite H.O.P.G. facilite grandement son clivage qui se fera préférentiellement de manière parallèle aux plans. En effet, la distance entre atomes appartenant à deux plans voisins est beaucoup plus grande que la distance séparant deux atomes adjacents dans un même plan. En pratique, il nous suffit simplement d'arracher au substrat de H.O.P.G. les quelques plans supérieurs à l'aide d'un morceau d'adhésif, préalablement collé à sa surface. Nous obtenons alors une nouvelle surface plane et propre. Les substrats de H.O.P.G. utilisés (grade ZYH) sont fournis par la société *Advanced Ceramics Corp.*

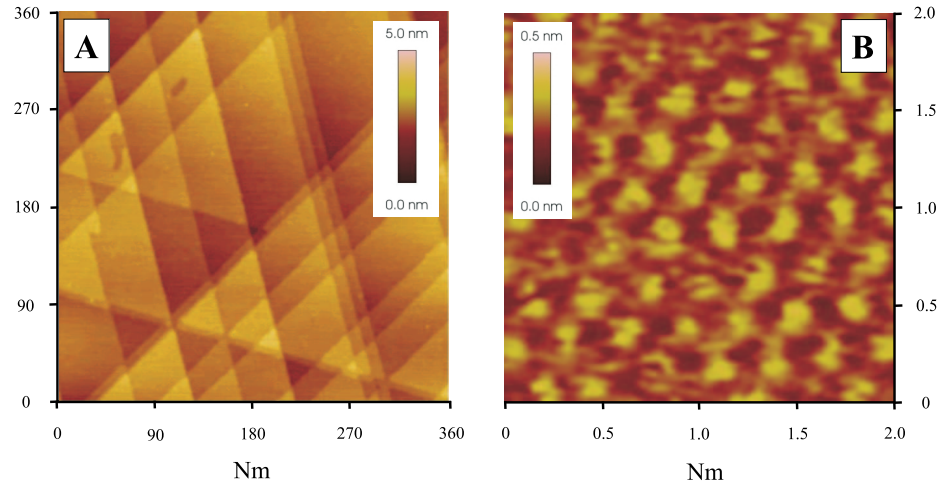


FIG. 1.11 – (A) Image S.T.M. à grande échelle de la surface d'Au(111). Cette surface est caractérisée par des plateaux de formes triangulaires typiques (pointe en Pt/Ir) (360 nm x 360 nm, 5 nA, 500 mV). (B) Image S.T.M. à résolution atomique de la surface d'Au(111). Les protubérances forment une structure hexagonale centrée de 0.28 nm de côté (pointe en Pt/Ir) (2 nm x 2 nm, 50 nA, 100 mV) [55].

1.4.2 L'or : Au(111)

L'or est un métal relativement mou. Le cristal d'or présente une structure cubique à faces centrées. Il possède l'avantage d'être peu réactif à l'air libre, le rendant idéal comme substrat dans des expériences de microscopie à effet tunnel. De plus, il semble interagir plus fortement que le graphite avec la plupart des spécimens biologiques [54]. Des liaisons chimiques peuvent aussi être réalisées en présence de groupements sulfurés. Les couches ou monocristaux utilisés dans cette étude présentent tous la face (111). Dès lors, les images S.T.M. à résolution atomique de cette surface ont une structure hexagonale centrée, la distance entre proches voisins étant de 0.288 nm.

Image S.T.M. à résolution atomique

A grande échelle, la surface d'or (111) est repérée par des formes triangulaires typiques de cette reconstruction, telles que présentées à la figure 1.11A. Ces triangles constituent autant de sites d'analyse atomiquement plats et de taille suffisamment grande. La figure 1.11B représente quant à elle une image à l'échelle atomique de la structure hexagonale centrée de la surface (111) de l'or. Cette haute résolution est plus difficile à obtenir dans ce cas que pour le graphite H.O.P.G. En

effet, la densité d'états électroniques de l'or est plus étalée en surface que celle du graphite. Les électrons y sont plus mobiles. Il en découle une rugosité plus faible pour l'or⁸. Une rugosité élevée facilite donc l'obtention d'une résolution atomique. La distance séparant deux protubérances proches voisines est en moyenne de 0.28 nm, ce qui correspond assez bien à la distance interatomique de la surface (111) de l'or (0.28 nm).

Cependant, lors de nos expériences, nous nous sommes vite rendu compte des désavantages que présente ce substrat par rapport au graphite. En effet, sa préparation nécessite des techniques plus élaborées, dépendant de la provenance du substrat d'or utilisé. Nous avons à notre disposition deux types de substrats : des dépôts d'or sur une plaque de verre produits par la société *Arrandee*TM (que nous appellerons par la suite "substrats *Arrandee*") et des monocristaux d'or produits par la société *Goodfellow* (que nous appellerons dorénavant "monocristaux").

Préparation des substrats *Arrandee*

Les substrats *Arrandee* sont des substrats de verre borosilicaté sur lesquels est évaporée une couche de 200 à 300 nm d'or. Une couche intermédiaire de chrome (1 à 4 nm d'épaisseur) est insérée pour assurer une adhérence optimale de la couche d'or sur le verre. Avant toute autre manipulation de la surface, il est indispensable de la nettoyer correctement de tout contaminant (organique ou pas). Dans ce but, nous la trempions dans un bain à ultrasons dans de l'éthanol (ou du méthanol) durant plusieurs minutes. Nous immergeons ensuite les substrats dans une solution piranha (70% H_2SO_4 : 30% H_2O_2) et les rinçons à l'éthanol. L'obtention d'une surface (111) nécessite quant à elle un recuit, favorisant la formation de terrasses. Ce recuit est réalisé à l'aide d'un chalumeau butane/propane. Le substrat est chauffé au rouge, puis ensuite refroidi. Cette opération est reproduite plusieurs fois. La qualité de la surface obtenue est vérifiée par A.F.M. et la procédure est à nouveau reproduite si le résultat n'est pas satisfaisant.

Préparation des monocristaux

Les monocristaux utilisés sont également pré-traités à la solution piranha (70% H_2SO_4 : 30% H_2O_2) et rincés à l'éthanol. Ils sont ensuite polis à l'aide de différentes pâtes diamantées de taille dégressives, afin d'éliminer toute trace des précédents dépôts et de redonner à la surface

⁸La rugosité est définie comme la différence de hauteur entre l'endroit où la densité d'états perçue est la plus grande et l'endroit où elle est la plus petite.

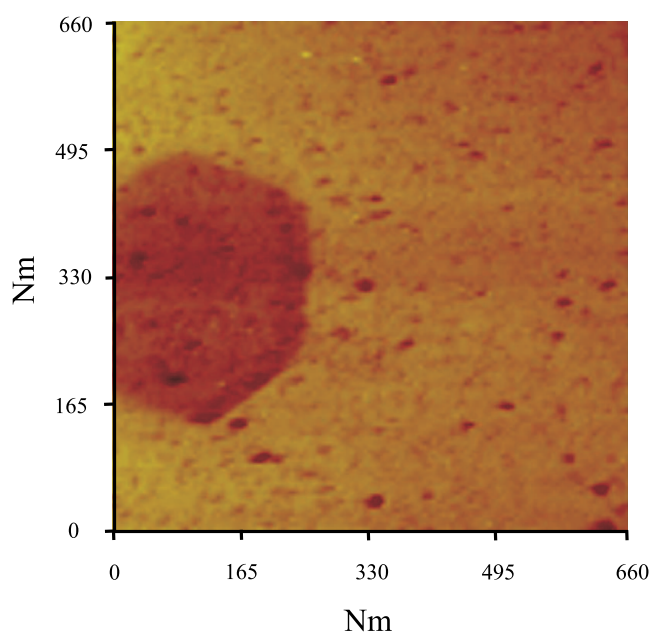


FIG. 1.12 – *Image S.T.M. de la surface de Pt(111).* (660 nm x 660 nm, 407 pA, 712 mV) (pointe en Pt/Ir).

son caractère “plat”. Ces monocristaux subissent ensuite un recuit au chalumeau butane/propane, améliorant de ce fait la qualité de la surface par réorganisation thermique.

1.4.3 Le platine : Pt(111)

Le platine est un métal malléable et ductile. Il n’est pas affecté par l’oxygène ou par l’eau. Les applications du platine sont nombreuses et variées. Il est utilisé, par exemple, pour la réalisation des standards de poids et mesures. Il sert également dans l’électronique pour la fabrication de contacts électriques soumis à des températures élevées et est utilisé pour la fabrication d’électrodes soumises à une attaque chimique. Nous avons couramment utilisé le platine (111) comme substrat afin de pouvoir comparer les données S.T.M. recueillies à celles obtenues par spectroscopie non linéaire. En effet, la spectroscopie par génération de fréquence-somme (S.F.G. : *Sum-Frequency Generation*) nécessite des substrats présentant une réponse non-linéaire négligeable, comme c’est le cas pour le platine.

Image S.T.M. de la surface de Pt(111)

A grande échelle, la surface du Pt(111) se présente comme montré à la figure 1.12. La surface se compose de larges terrasses qui constituent autant de sites d'analyses. La rugosité de la surface est inférieure à 0.3 nm. Ces substrats de platine utilisés sont des monocristaux (fournis par la société *Goodfellow*), similaires à ceux d'or décrits dans le paragraphe précédent. Ils nécessitent cependant une préparation plus importante que pour le graphite H.O.P.G. Celle-ci est détaillée ci-dessous.

Préparation des monocristaux

Les monocristaux utilisés sont pré-traités de la même manière que les monocristaux d'or. La seule différence dans la méthode de préparation réside dans le recuit effectué au chalumeau. Il est désormais réalisé à l'aide d'un chalumeau propane/oxygène.

Chapitre 2

La microscopie à force atomique

Résumé

Le microscope à force atomique fait partie intégrante de la famille des microscopes à sonde locale. Bien qu'il soit apparu peu après le microscope à effet tunnel à balayage (développé au chapitre précédent), il s'est rapidement imposé en tant que technique essentielle à la caractérisation physico-chimique des surfaces. Ce microscope, n'étant pas limité aux matériaux conducteurs, a de plus particulièrement attiré l'attention des biochimistes, biologistes et récemment des pharmaciens. Il fut largement utilisé dans le cadre de cette thèse et c'est pourquoi ce chapitre lui est consacré. Nous décrirons d'abord le principe de fonctionnement de cet outil avant d'en détailler (aussi bien théoriquement qu'expérimentalement) les différents modes de fonctionnements utilisés.

2.1 Introduction

Quelques années après le création du premier microscope à effet tunnel à balayage, *Binnig*, *Quate* et *Gerber* inventent un autre microscope, qu'ils surnomment le microscope à force atomique [4]. Cette technique, aussi appelée microscopie de force (S.F.M. : *Scanning Force Microscopy*) dans la littérature, constitue, à l'heure actuelle, avec la microscopie à effet tunnel, l'une des microscopies à sonde locale la plus utilisée dans les laboratoires de recherche. Sa capacité à analyser, jusqu'à l'échelle atomique, des surfaces isolantes, sous diverses conditions expérimentales (sous ultra-haut vide ou atmosphère contrôlée, à l'air ou en milieu liquide), ainsi que la préparation relativement minime des échantillons qu'elle nécessite sont à l'origine de son essor rapide au sein de la communauté scientifique. Ce microscope est alors progressivement devenu indispensable dans de nombreuses études de surfaces, venant ainsi compléter, par des images tridimensionnelles, les caractérisations obtenues par d'autres techniques de surface.

Dans un microscope à force atomique, la pointe est montée sur un levier extrêmement sensible, qui balaye la surface de l'échantillon. La force agissant entre la pointe et cette surface produit une torsion verticale du levier. Ces torsions, ou déflexions, sont alors détectées. Les données recueillies sont présentées sous forme d'images tridimensionnelles. Ce procédé présente l'avantage incontestable sur la S.T.M. de pouvoir imager des structures de matériaux isolants. En effet, on ne détecte plus ici un courant électrique mais des forces d'interactions entre la pointe et l'échantillon. Cela se révèle très utile dans le cadre d'études sur des matériaux biologiques (naturellement pas ou peu conducteurs d'électricité).

Plusieurs attributs supplémentaires rendent cette technique avantageuse par rapport à d'autres microscopies de haute résolution. En effet, l'A.F.M. peut fonctionner sous conditions ambiantes (incluant température ambiante et pression atmosphérique). Il peut également être appliqué en milieu physiologique, permettant, dans certains cas, l'acquisition d'images à haute résolution, obtenues en solution. Il recouvre une gamme énorme de résolutions, allant de plusieurs dizaines de micromètres jusqu'à quelques nanomètres, survolant ainsi les gammes de résolutions couvertes par les microscopies optiques et électroniques.

Le microscope à force atomique présente généralement plusieurs modes d'opération, que nous exposerons dans les sections suivantes. Nous survolerons bien entendu, quoiqu'assez rapidement, la théorie générale de fonctionnement relative à chacun de ces modes. Nous reviendrons ensuite sur les composantes essentielles de cette technique. Notre

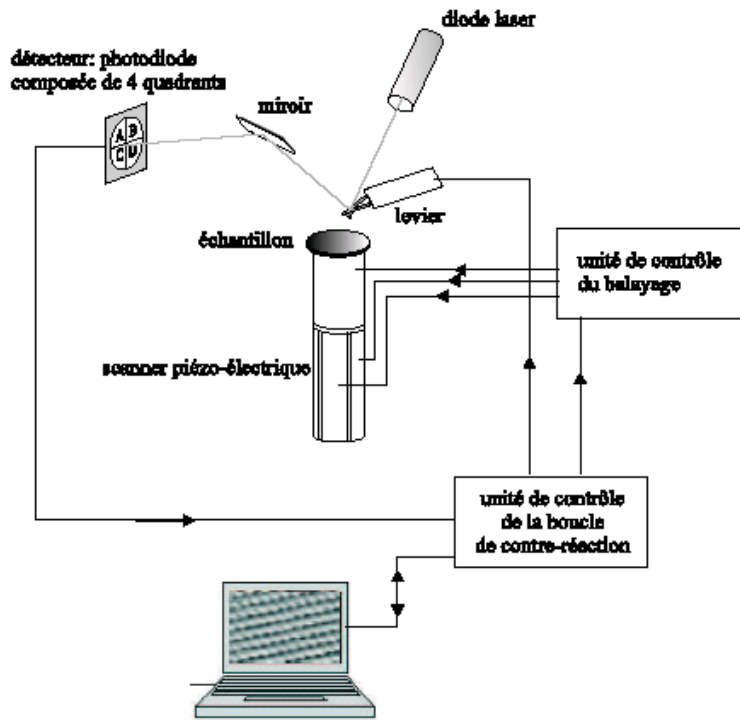


FIG. 2.1 – Schéma de principe du microscope à force atomique [34] .

description pratique de l'appareillage sera cependant réduite étant donné qu'il présente de nombreux points communs avec la microscopie à effet tunnel à balayage.

2.2 Principe de fonctionnement

Dans la configuration générale d'un microscope à force atomique, tel que schématisé à la figure 2.1, une pointe effilée est montée sur un levier, agissant comme un ressort. Cette pointe va balayer, tout comme en S.T.M., la surface de l'échantillon grâce aux mouvements induits par le scanner piezoélectrique (§ 1.3.1). L'interaction entre les atomes de la pointe et ceux de la surface de l'échantillon produira une courbure du levier. Cette courbure, ou déflexion, peut être mesurée et convertie par la suite en signal électrique, facilement traitable par l'électronique de contrôle du microscope. Dans notre cas, cette mesure de la déflexion se réalise à l'aide d'un système optique. En effet, un faisceau laser est dirigé sur un micro-miroir situé à l'arrière du levier (à l'opposé de la pointe).

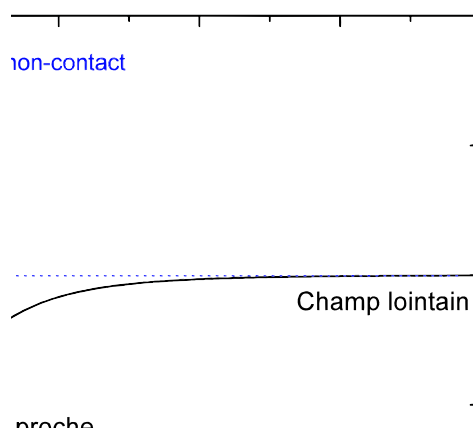


FIG. 2.2 – Graphe de l'énergie potentielle de Lennard-Jones en fonction de la distance pointe-échantillon [34].

Ce faisceau est, par la suite, réfléchi sur une photodiode. Les déviations de ce faisceau laser par rapport à une position de référence nous donnent ainsi une mesure de la déflexion du levier. Il existe d'autres techniques de détection de la déflexion du levier mais celle dont nous disposons est cependant la plus utilisée. La topographie tridimensionnelle de l'échantillon est alors sondée par la pointe, point par point, et les forces d'interaction sont enregistrées le long de la surface de l'échantillon. Sur base de ces données, une image est générée.

Les forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon, mesurées grâce à la déflexion du levier, ont un caractère attractif ou répulsif en fonction de la distance pointe-échantillon. Elles peuvent être décrites phénoménologiquement par un potentiel de *Lennard-Jones* [34]. Différents modes de fonctionnement peuvent ainsi être distingués en fonction de la force exercée sur l'échantillon. Considérons donc l'énergie potentielle de *Lennard-Jones*, en tenant compte de l'interaction de *van der Waals* à grande distance et de l'interaction répulsive de *Pauli* à faible

distance, décrite par l'équation :

$$W(r) = 4\epsilon\left[\left(\frac{\sigma}{r}\right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r}\right)^6\right] \quad (2.1)$$

où ϵ représente la profondeur du puits de potentiel et σ la distance pour laquelle l'énergie potentielle est nulle. Cette énergie potentielle est représentée graphiquement à la figure 2.2. Le puits d'énergie définit la distance d'équilibre une fois la physisorption réalisée. Ce point définit le terme “contact” en A.F.M.

A partir de ce graphe, nous pouvons distinguer les différents modes de fonctionnement de l'A.F.M. Le mode dit “**contact**” correspond aux positions pour lesquelles les forces d'interactions répulsives prédominent. Il est ainsi situé dans la partie gauche du graphe de la figure 2.2. Par ailleurs, le mode dit “**non-contact**” est lui caractérisé par la prédominance des forces attractives (i.e. lorsque la pointe est suffisamment éloignée de la surface) et est situé dans la partie droite du graphe de *Lennard-Jones* (figure 2.2). Finalement, le mode dit “**à contact intermittent**” (T.M.-A.F.M. : *Tapping Mode- A.F.M.*) constitue une sorte d'alternative entre les deux précédents. Bien que, dans chaque mode, soit mesurée la déflexion, chacun dispose d'un mécanisme de contrôle et de contre-réaction adapté. Chaque mode est dès lors approprié pour des types d'échantillons bien différents.

Le microscope à force atomique a cependant un champ d'application beaucoup plus large que la simple imagerie de structures de surfaces. En effet, il permet non seulement l'acquisition de données qualitatives mais aussi quantitatives sur les forces d'interactions entre la pointe et l'échantillon, pouvant fournir une indication sur les forces d'adhérence entre ces deux éléments, ainsi que sur la rigidité du matériau étudié. Ces données sont obtenues par ce qui est couramment appelé **la spectroscopie de force**. De plus, dans certains cas, l'A.F.M. peut s'avérer être une sonde “physico-chimique”, révélant des contrastes différents dans les images obtenues, en fonction des propriétés du matériau au-dessus duquel se situe la pointe, et ce indépendamment de la topographie. Cela peut être réalisé par de petites extensions de la technique originelle, par exemple en mesurant les forces de frottement entre la pointe et l'échantillon grâce au mode appelé **mode friction** (en A.F.M. contact) ou bien à l'aide de **l'imagerie de phase** (en A.F.M. à contact intermittent). Tous ces modes de fonctionnement sont détaillés dans les sections suivantes.

2.3 Le mode contact

2.3.1 Principe

Dans ce mode, la pointe est amenée suffisamment près de la surface de l'échantillon de sorte que l'on puisse mesurer une déflexion verticale quasi-statique du levier, d , selon la loi de *Hooke*

$$F = kd \quad (2.2)$$

où F est la force et k la constante de raideur du microlevier [56]. Le faisceau laser, focalisé sur l'extrémité du microlevier et réfléchi sur une photodiode, est alors dévié. Nous pouvons ainsi mesurer les déviations du faisceau laser induites par les forces d'interactions prédominantes dans ce cas, à savoir : des forces répulsives coulombiennes (ioniques ou de *Pauli*) ou des forces d'adhérence. On parle alors de forces de contact. La pointe balaye ensuite, point par point, venant véritablement racler la surface de l'échantillon.

Ce mode est historiquement le premier à avoir été mis en œuvre. Bien que très utile, il présente cependant le gros désavantage d'être limité à des surfaces relativement solides. En effet, le risque est grand de déformer, voire détériorer la pointe et/ou l'échantillon au cours du balayage. De plus, il reste limité aux surfaces relativement inertes. Dans le cas contraire, des liaisons chimiques peuvent se former, de la friction peut apparaître, ... [57]

2.3.2 Théorie de la déflexion

Il est important de comprendre le rôle fondamental que joue le levier (et sa déflexion) en mode contact. Pour cela, décrivons la manière dont va réagir un levier soumis à l'influence d'une force répulsive. Ce problème de la déflexion du levier peut être décrit dans le cadre de la mécanique d'une poutre encastrée.

Déflexion du levier

Considérons donc un levier rectiligne, de section rectangulaire tel que présentée à la figure 2.3, encastré (en $z = 0$) et soumis à une force F , agissant à son extrémité (en $z = l$). Ce levier, supportant la pointe, est de longueur l , de largeur w et de hauteur h . L'équilibre du levier impose que l'on ait une force de réaction $\vec{N}$ à la force $\vec{F}$, ainsi qu'un moment d'encastrement $M_E = -Fl$. L'équation de l'élasticité,

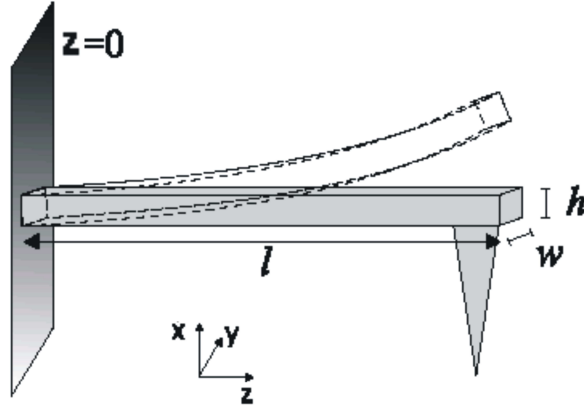


FIG. 2.3 – Schéma de la déflexion d'un levier rectangulaire attaché à une extrémité (modèle de la poutre encastrée) [34].

appliquée à notre cas, peut alors s'exprimer telle que

$$\frac{d^2 u_x}{dz^2} = \frac{F}{EI_y} (z - l) \quad (2.3)$$

où u_x est la valeur de la déflexion, I_y , le moment d'inertie de la poutre selon l'axe Y et E , le module de *Young* [58]. En appliquant les conditions aux limites qui sont que $u_x = 0$ et $du_x/dz = 0$ en $z = 0$, nous obtenons à l'extrémité libre du levier une déflexion :

$$u_x(l) = -\frac{F}{EI_y} \frac{l^3}{3} \quad (2.4)$$

Cette expression montre que **la déformation du levier est directement proportionnelle à la force appliquée**. Cette force appliquée, dans notre cas, n'est rien d'autre que la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon. Une simple mesure de la déflexion du levier est donc suffisante pour mesurer la force exercée. On peut alors définir la constante de raideur en flexion (ou raideur normale) du microlevier comme

$$k_F = -\frac{F}{u_x} = \frac{3EI_y}{l^3} \quad (2.5)$$

Fréquences propres de vibration

Nous voudrions maintenant déterminer les fréquences propres de vibration du levier. Pour cela, revenons au cas plus général d'une poutre

pour laquelle l'équation de l'élasticité s'exprime [59]

$$EI_y \frac{d^4 u_x(z, t)}{dz^4} = -\rho S \frac{d^2 u_x(z, t)}{dt^2} \quad (2.6)$$

où ρ et S désignent la masse volumique et la section transversale de la poutre, respectivement. Prenons des solutions sinusoïdales du type $u_x(z, t) = u_x(z) \cos(\omega t + \alpha)$. Les solutions générales de l'équation de l'élasticité s'expriment alors

$$u_x(z, t) = A \cos(\kappa z) + B \sin(\kappa z) + C \cosh(\kappa z) + D \sinh(\kappa z) \quad (2.7)$$

où on a posé

$$\kappa^4 = \frac{\omega^2 \rho S}{EI_y}$$

Appliquons ces solutions à notre microlevier encastré à une extrémité. Dans ce cas, les conditions aux limites sont identiques au cas précédent, c'est-à-dire $u_x = 0$ et $du_x/dx = 0$ en $z = 0$ (i.e. à l'extrémité encastrée). De plus, à l'extrémité libre (en $z = l$), les conditions sont $d^2 u_x/dz^2 = 0$ et $d^3 u_x/dz^3 = 0$. En appliquant l'algèbre de base, il nous faut alors résoudre :

$$\cos(\kappa l) \cosh(\kappa l) + 1 = 0$$

La fréquence de résonance la plus faible est déterminée en trouvant la plus petite des solutions de cette équation, qui est $\kappa l \approx 1.875$. La fréquence de résonance vaut alors [34] :

$$f = \frac{(1.875)^2}{2\pi l^2} \sqrt{\frac{EI_y}{\rho S}} \quad (2.8)$$

Cette expression démontre clairement que **la forme et le matériau du levier déterminent sa fréquence de résonance**. Théoriquement, le levier pourrait vibrer à un nombre illimité de fréquences mais l'amplitude de ces vibrations n'est non négligeable que pour la fréquence fondamentale, exprimée ci-dessus.

2.3.3 Théories du contact

Après avoir décrit la réponse d'un levier soumis à une interaction (l'interaction pointe-échantillon), revenons à l'étude de l'A.F.M. en mode contact. En effet, lorsque deux corps solides macroscopiques entrent en contact, leurs surfaces se déforment. Ce phénomène se produit également en mode contact lorsque la pointe A.F.M. applique

une force suffisante que pour provoquer une modification de la surface. Intéressons-nous à la manière dont les deux solides en contact se déformeront durant le balayage. Ce problème se résume, dans le cas le plus simple, à la description du contact élastique entre deux corps solides.

Par simplification, nous considérerons la pointe comme hémisphérique. Le type de contact que nous devons décrire est donc du type sphère-sphère ou encore sphère-plan⁹. Dans la suite de cette section, nous présenterons les principales théories décrivant le contact élastique entre deux corps considérés comme des milieux continus, à savoir : la théorie de *Hertz*, la théorie *DMT*¹⁰ et finalement la théorie *JKR*¹¹.

Théorie de *Hertz*

Le modèle de *Hertz* est l'un des plus anciens et le plus simple parmi ceux détaillés dans ce travail. En effet, dès 1881, *H. Hertz* fut le premier à proposer une théorie décrivant la géométrie d'un contact entre une sphère élastique et la surface plane et rigide d'un échantillon. Il considère un contact élastique en l'absence de toute adhérence ou frottement. Les solides en contact sont soumis à de petites contraintes (dans la limite de leur réponse élastique). La surface est supposée lisse. La force est appliquée perpendiculairement au plan de contact des objets. Sous l'effet d'une force normale $\vec{F}_{ext}$, le rayon de contact a entre une sphère de rayon R et la surface d'un échantillon plan est donné par [60] :

$$a = \left(\frac{RF_{ext}}{K} \right)^{1/3} \quad \text{avec} \quad K = \frac{4}{3} \left(\frac{1 - \nu_p^2}{E_p} + \frac{1 - \nu_e^2}{E_e} \right)^{-1} \quad (2.9)$$

où ν_p et ν_e sont les coefficients de *Poisson*, E_p et E_e , les modules de *Young*, caractérisant la pointe et l'échantillon, respectivement. La déformation élastique δ est définie comme le rapprochement des centres des deux sphères. En microscopie à force atomique, si le module élastique de la pointe est supposé grand devant celui de la surface, on parle alors d'**indentation de la pointe dans la surface**. La profondeur d'indentation élastique δ de la pointe dans le matériau vaut $\delta = a^2/R$. La relation entre la force $\vec{F}_{ext}$ et l'indentation élastique s'exprime telle que

$$F_{ext} = KR^{1/2}\delta^{3/2} \quad (2.10)$$

⁹La description du contact dans une géométrie sphère-plan se déduit simplement du contact dans le cas d'une géométrie sphère-sphère en passant à la limite pour $R_{i=1 \text{ ou } 2} \rightarrow \infty$.

¹⁰du nom de ses inventeurs *B.V. Dejarquin*, *V.M. Muller* et *Y.P. Toporov*.

¹¹du nom de ses inventeurs *K.L. Johnson*, *K. Kendall* et *A.D. Roberts*.

Cette expression a été obtenue en considérant la distribution de pression nulle en dehors du contact et ayant une valeur finie en tout point de cette aire de contact. Dans un contact hertzien, l'intensité de la force répulsive est liée, d'une part, à la déformation élastique (avec une dépendance en puissance $3/2$) et, d'autre part, au module élastique de la surface. La rupture du contact n'est pas brutale mais progressive puisque le rayon du contact tend continûment vers zéro lorsque la charge diminue jusqu'à s'annuler. A ce moment les sphères se séparent.

Cette théorie est pratiquement inutilisable en A.F.M. En effet, dans la plupart des cas, la pointe A.F.M. est plus rigide que l'échantillon et il nous faut dès lors également considérer les déformations de la surface de l'échantillon. Or, cette théorie ne permet pas de calculer la déformation d'un échantillon par un pointe rigide. De plus, elle ne tient pas compte des forces adhésives.

Théorie de *JKR*

Un important modèle du contact entre deux corps est celui développé par *K.L. Johnson*, *K. Kendall* et *A.D. Roberts*, appelé modèle *JKR* [61]. Celui-ci tient compte des forces à courte portée agissant dans l'aire de contact, à savoir les forces d'adhérence. Il considère le travail thermodynamique d'adhérence à la surface de contact entre les solides et suggère que ces solides se déforment localement pour former "un pont de connexion". Pour une sphère de rayon R , de travail thermodynamique d'adhérence W_{12} (entre les solides 1 et 2) et de force appliquée F_{ext} , le rayon de l'aire de contact, a , est défini par [62]

$$a^3 = \frac{R}{K} [F_{ext} + 3\pi RW_{12} + \sqrt{6\pi RW_{12}F_{ext} + (3\pi RW_{12})^2}] \quad (2.11)$$

Pour une même force appliquée, la théorie *JKR* prédit un rayon de contact plus grand que celui de la théorie de *Hertz*. Cette expression du rayon de contact entre deux solides élastiques présente quelques conséquences importantes. D'abord, en l'absence de force d'adhérence, l'expression se réduit au modèle de *Hertz*. Ensuite, pour une force appliquée nulle, le rayon de contact n'est pas ponctuel mais reste fini. Sous l'action d'une faible charge négative appliquée (c'est-à-dire en appliquant une force vers le haut), les solides adhèrent jusqu'à ce qu'une force critique négative soit atteinte. Dans ce cas, les corps en contact se séparent. La force de séparation, que l'on appellera par la suite force d'adhérence, est donnée par [62]

$$F_{ad} = -1.5\pi W_{12}R \quad (2.12)$$

Remarquons que la force d'adhérence dépend non seulement du travail thermodynamique d'adhérence mais aussi du rayon de courbure de la pointe. Elle est cependant indépendante du module de *Young* des deux surfaces en contact. Le travail d'adhérence W_{12} peut s'exprimer en fonction des énergies libres de surface, de la pointe (γ_1), de l'échantillon (γ_2) et de l'énergie libre interfaciale (γ_{12}), tel que [63]

$$W_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - \gamma_{12}$$

Les différentes énergies libres γ_i peuvent en principe être déterminées expérimentalement. Cette théorie a été vérifiée et s'avère être particulièrement adaptée à l'étude de solides élastiques, souples, ayant de fortes énergies d'adhérence ainsi que de grands rayons de pointe. Un inconvénient important de cette théorie est qu'elle prédit une pression infinie en bordure de l'aire de contact. Cette situation non-physique provient du fait qu'elle ne considère que les forces agissant à l'intérieur de l'aire de contact.

Théorie de *DMT*

Un autre modèle de contacts mécaniques a été développé par *B.V. Dejarquin*, *V.M. Muller* et *Y.P. Toporov*, la théorie *DMT* [64]. Dans ce cas, la sphère élastique est supposée se déformer selon la théorie hertzienne du contact, mais en tenant compte de l'adhérence¹². Cependant, contrairement à la théorie *JKR*, toutes les forces attractives à longue portée agissant entre les deux corps, en dehors de l'aire de contact, sont prises en compte. Cela élimine la singularité de pression en bordure de l'aire de contact établie dans la théorie *JKR*. Le rayon de contact est alors donné par la relation [62]

$$a^3 = \frac{R}{K}[F_{ext} + 2\pi RW_{12}] \quad (2.13)$$

Cette théorie a cependant tendance à sous-estimer l'aire de contact réelle, étant donné qu'elle ne suppose que l'existence de déformations hertziennes. Dans cette théorie *DMT*, la force d'adhérence est déterminée par

$$F_{ad} = -2\pi W_{12}R \quad (2.14)$$

Elle est particulièrement adaptée pour des matériaux rigides, de faibles forces d'adhérence et de petits rayons de pointe.

¹²La géométrie du contact est supposée ne pas être modifiée par les forces adhésives.

2.3.4 Imagerie

L'imagerie en mode contact peut se réaliser de deux manières : à force ou à hauteur constante.

Imagerie à force constante. Dans ce cas, la boucle de contre-réaction maintient la déflexion du levier constante en variant les déplacements verticaux du scanner piézoélectrique au cours du balayage. Ces déplacements sont effectués de manière à faire correspondre la valeur de déflexion fixée par l'expérimentateur (la "consigne") et la valeur mesurée par le système. Ce mode est analogue au mode à courant constant en microscopie à effet tunnel à balayage. La série de données est alors constituée par les tensions appliquées à l'élément piézoélectrique afin de maintenir la déflexion du levier constante. Les images ainsi obtenues constituent des surfaces d'équiforces.

Imagerie à hauteur constante. Ce mode agit sans la boucle de contre-réaction. La position du scanner selon l'axe des Z ne varie pas au cours du balayage. Le système détecte en fait les variations de la déflexion du levier par rapport à une référence (la "consigne"). De ce fait, il est également appelé mode "à déflexion variable". Il permet une imagerie directe de la topographie de la surface de l'échantillon. Etant donné que la boucle de contre-réaction est coupée, ce mode présente des vitesses de balayage plus importantes que le mode précédent.

2.3.5 Artefacts

L'existence d'artefacts dans les images de microscopie à sonde locale, et plus particulièrement en microscopie à force atomique, constitue un problème plutôt gênant depuis l'avènement de ces techniques.

Des artefacts sont souvent observés en surface de matériaux durs présentant des caractéristiques de surface aiguisées. En effet, si la surface d'un échantillon présente des caractéristiques structurales plus aigües que l'apex de la pointe, les rôles sont alors inversés entre la pointe et l'échantillon, de telle sorte que la forme de la pointe apparaisse dans l'image. On parle alors de **convolution géométrique avec la pointe**.

Sur des surfaces planes, des imperfections peuvent apparaître dans les images suite à des effets de **pointe multiple ou asymétrique**. Les caractéristiques de l'image associée à une pointe multiple sont matérialisées par une image "fantôme", dans laquelle la caractéristique se reproduit. Ce phénomène est similaire à celui déjà relevé pour la microscopie à effet tunnel à balayage (§ 1.8).

D'autres artefacts sont encore possible en A.F.M. en mode contact. Lors d'expériences sous conditions ambiantes, des micro-gouttelettes d'eau (provenant de l'humidité environnante) se déposent en surface de l'échantillon. Cette eau peut alors retenir la pointe A.F.M. dans son parcours suite à l'action des forces de capillarité entre la pointe et l'eau en surface. Ceci induit une "trainée" dans les images recueillies.

2.4 Le mode à contact intermittent

2.4.1 Principe

En mode à contact intermittent, la pointe oscille verticalement à une fréquence proche de sa fréquence de résonance. La pointe en vibration est amenée suffisamment près de la surface de l'échantillon pour qu'elle entre de manière intermittente en contact avec la surface, diminuant de ce fait l'amplitude de vibration. Cette diminution d'amplitude est ainsi utilisée dans la boucle de contre-réaction. Ce mode est très intéressant par sa relative facilité de mise en oeuvre et sa capacité à balayer la surface d'échantillons fragiles avec une qualité d'imagerie excellente.

De manière plus pratique, il permet de minimiser les forces latérales de friction entre la pointe et la surface au cours du balayage. De plus, le faible temps de contact entre ces deux éléments évite des déformations inélastiques de la surface. Cependant, l'interprétation rigoureuse des images obtenues reste périlleuse. En effet, le levier évolue dans un champ de forces non-linéaire. De plus, la réponse de celui-ci dépend fortement des propriétés viscoélastiques et adhésives des surfaces analysées.

2.4.2 Théorie

Dans cette section, nous allons décrire la théorie relative au mode à contact intermittent de la microscopie à force atomique. Nous nous intéresserons d'abord à la réponse mécanique du levier. Ceci nous donnera un aperçu théorique de l'effet des forces sur l'oscillation du levier. Mais avant toute chose, décrivons l'oscillation du levier.

Oscillations sans interaction

Comme nous l'avons déjà signalé, le levier est excité à une fréquence proche de sa fréquence de résonance par un élément piézoélectrique sur lequel il est posé. Le mouvement de l'élément piézoélectrique (et de

là, celui du microlevier) est piloté par une tension sinusoïdale d'amplitude a et de fréquence ω . Dans notre cas, le mouvement du levier peut être assimilé au mouvement d'un oscillateur harmonique amorti en régime forcé. En effet, notre levier vibrant subit des pertes d'énergie, principalement dues aux forces de frottement de l'air sur le levier. Ces pertes d'énergie sont décrites par une force du type $-\beta \frac{dz}{dt}$, où β est le coefficient d'amortissement de l'oscillateur harmonique. L'équation du mouvement s'exprime alors telle que :

$$m \frac{d^2 z}{dt^2} = -kz - \beta \frac{dz}{dt} + F_{ps}(z_c - z) + F_0 \sin \omega t \quad (2.15)$$

Dans cette équation, z_c est la distance moyenne pointe-surface, F_{ps} , la force résultante sur la pointe due à l'interaction avec la surface et F , la force d'excitation sinusoïdale.

Considérons d'abord le système pointe-levier sans interaction avec la surface. La solution de ce système en absence d'interaction (c'est-à-dire pour $z_c \rightarrow \infty$ et $F_{ps} \rightarrow 0$) est celle d'un simple oscillateur amorti [56]

$$\begin{aligned} z(z_c, t) &= z_c + A(\omega) \sin(\omega t - \phi) \\ A(\omega) &= \frac{A_0 \omega_0^2}{\sqrt{Q^2(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + (\omega \omega_0)^2}} \\ \phi(\omega) &= \arctan \frac{\omega \omega_0}{Q(\omega_0^2 - \omega^2)} \end{aligned} \quad (2.16)$$

où A_0 est l'amplitude de résonance et ϕ est le retard de phase des oscillations du levier par rapport au signal exciteur. Le décalage de phase à la résonance est de $\pi/2$. On utilise souvent un rapport appelé facteur de qualité, Q , qui caractérise les pertes d'énergie. Il est défini comme 2π fois l'énergie moyenne stockée par l'oscillateur divisée par l'énergie qu'il dissipe sur une oscillation. Dans l'approximation de grands facteurs de qualité et pour des fréquences proches de la fréquence de résonance, Q peut s'exprimer par

$$Q \simeq \frac{\omega_0}{2\beta} = \frac{\nu_0}{\Delta\nu}$$

La largeur en fréquence du pic de résonance à $A_0/\sqrt{2}$ vaut alors $\Delta\nu = \nu_0/Q$.

Oscillations en interaction

Dans le cas d'oscillations du levier suffisamment faibles, le mouvement du levier en interaction avec la surface peut également être considéré,

en première approximation, comme harmonique. Dès lors, la force F_{ps} peut être développée en série de z :

$$F_{ps}(z_c - z) \simeq F_{ps}(z_c) - F'_{ps}(z_c)(z_c - z) + \dots$$

L'interaction pointe-échantillon produit alors un changement de la constante de raideur du levier et de la fréquence de résonance du levier tel que [56]

$$k' = k - F'_{ps}(z_c) \quad \text{et} \quad \omega'_0 = \sqrt{\frac{k'}{m}} = \omega_0 \sqrt{1 - \frac{F'_{ps}(z_c)}{k}} \quad (2.17)$$

A l'approche de la surface, l'interaction pointe-échantillon modifie la fréquence de résonance du levier. En réalité, c'est le gradient de force (F'_{ps}) ressenti par le levier en oscillation qui est à l'origine du décalage en fréquence de la fréquence de résonance. De plus, par l'équation 2.16, on s'aperçoit que l'amplitude de vibration est également modifiée par le gradient de force.

2.4.3 Imagerie

Ce mode A.F.M. à contact intermittent peut être utilisé afin d'obtenir différents types d'images. Celles-ci sont détaillées ci-dessous.

Imagerie en hauteur. L'imagerie en hauteur correspond à une image topographique. La pointe en oscillation vibre au-dessus de la surface de l'échantillon avec une amplitude fixée par l'expérimentateur. Cette amplitude varie suite aux interactions avec les caractéristiques et rugosités de la surface. Dans ce type d'imagerie, la boucle de contre-réaction tente de maintenir cette amplitude de vibration constante en ajustant la hauteur du scanner piézoélectrique, i.e. en approchant ou éloignant la pointe et l'échantillon. La série de données est dans ce cas constituée par les tensions appliquées en Z au scanner.

Imagerie en amplitude. L'imagerie en amplitude correspond simplement aux variations de l'amplitude de vibration de la pointe suite à l'interaction avec les caractéristiques de la surface, lorsque la boucle de contre-réaction est à l'arrêt.

2.5 L'imagerie de phase

L'imagerie topographique de surfaces d'échantillons à l'échelle nanométrique constitue déjà une prouesse technologique exceptionnelle et

une aide indéniable dans la détermination de structures de surfaces. Cependant, la connaissance simultanée de la topographie et de la composition chimique d'une surface représente un des nombreux objectifs des techniques microscopiques. Les microscopies à sonde locale n'échappent pas à cette loi. En particulier, les succès de la microscopie à force atomique à imager une large gamme de surfaces à l'échelle nanométrique ont motivé les scientifiques à tenter d'identifier par cette technique la composition chimique des matériaux étudiés.

Dans ce cadre, la microscopie de force latérale (L.F.M. : *Lateral Force Microscopy*) fut alors inventée et appliquée à l'étude de matériaux présentant divers domaines de coefficients de frottement différents. Une approche plus sélective consistant à fonctionnaliser les pointes A.F.M. afin d'être sensible à des interactions chimiques ou biologiques spécifiques fut également développée. Il s'agissait de la spectroscopie de force et de la microscopie de force chimique (C.F.M. : *Chemical Force Microscopy*). Cependant, les possibilités d'atteindre un contraste chimique se sont toujours révélées bien inférieures à leurs possibilités topographiques. Un mode dynamique de l'A.F.M. nous offre néanmoins une technique puissante de cartographie des variations de composition, de friction, de viscoélasticité et/ou d'adhérence de la surface des échantillons. Cette méthode est appelée *imagerie par contraste de phase* ou, tout simplement, *imagerie de phase*. Elle est au coeur des paragraphes qui suivent.

2.5.1 Principe et imagerie

Dans ce mode, les hétérogénéités physico-chimiques de la surface sont cartographiées en enregistrant le déphasage en fonction de la position. En effet, dans la plupart des cas, un déphasage apparaît entre le signal excitateur appliqué à l'élément piézoélectrique faisant osciller le microlevier à sa fréquence de résonance et le signal recueilli à la photodiode (voir § 2.4.2). Comme nous le détaillerons dans les paragraphes suivants, ce déphasage, ou décalage de phase, dépend fortement des interactions entre la pointe et la surface (forces attractives, adhérence, élasticité et viscosité de la surface) [65].

Principe

Le principe de fonctionnement de ce mode A.F.M. est simple conceptuellement. Tout comme en mode à contact intermittent, un élément piézoélectrique fait vibrer le microlevier à une fréquence proche de sa fréquence de résonance. Cette oscillation est induite par une tension sinusoïdale appliquée aux bornes d'un élément piézoélectrique, à la base

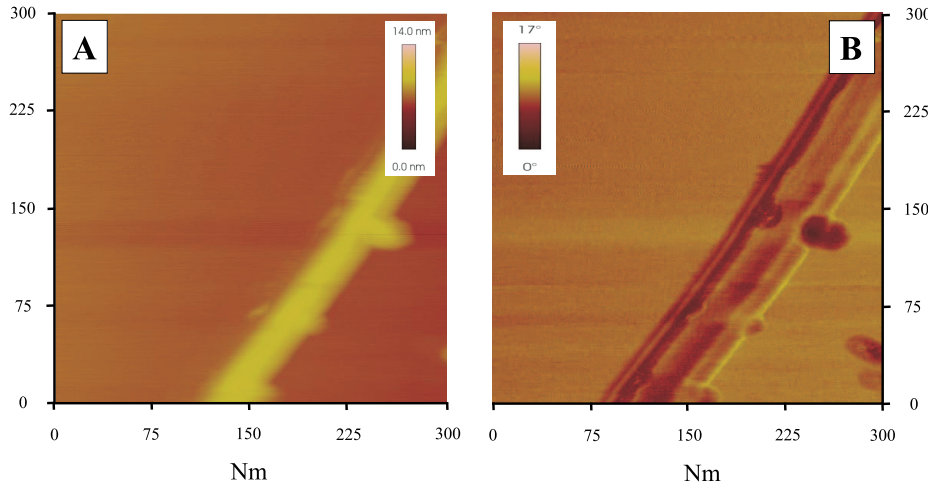


FIG. 2.4 – (A) Image A.F.M. en mode à contact intermittent de nanotubes de carbone multiparois fonctionnalisés par un polymère. (B) Image de phase du même échantillon, enregistrée en même temps que la topographie [66].

du levier. Nous disposons également d'un second signal, le signal sinusoïdal recueilli à la photodiode. Comme nous l'avons déjà cité précédemment (§ 2.4.2), le gradient de force ressenti par la pointe oscillante modifie les oscillations du levier. Il peut alors apparaître un décalage en phase et fréquence entre le signal envoyé pour faire vibrer le levier et le signal recueilli à la photodiode. Les données rassemblées forment “une image de phase”.

Imagerie

En imagerie de phase, le décalage de phase de la pointe par rapport au signal d'excitation est contrôlé et enregistré, alors que la boucle de contre-réaction maintient l'amplitude de vibration constante [67]. En enregistrant simultanément la topographie et le décalage de phase, il devient possible de cartographier les propriétés d'interaction d'un échantillon hétérogène. Ceci est illustré à la figure 2.4 où l'image de gauche représente la topographie, alors qu'à droite se trouve l'image de phase du même échantillon. Il s'agit d'un nanotube de carbone fonctionnalisé par un polymère. Deux contrastes apparaissent dans l'image de phase. Nous pouvons dès lors y associer les zones correspondantes dans l'image topographique.

2.5.2 Théorie

Rappelons les propriétés des décalages de phase d'un oscillateur amorti (§ 2.4.2). Pour une oscillation de type sinusoïdal, la relation entre le décalage de phase et la fréquence de travail est donnée par l'équation 2.16,

$$\tan \phi = (\omega\omega_0/Q)/(\omega_0^2 - \omega^2)$$

Cette équation établit qu'à la résonance, le décalage de phase est exactement de 90° .

Décalages de phase et propriétés des matériaux

Afin de pouvoir interpréter les images de phase, nous avons besoin d'une relation entre une propriété donnée du matériau et le décalage de phase qu'il produit. En fait, il s'agit là d'un problème très difficile.

Magonov et al. ont considéré une approximation harmonique pour relier les décalages de phase et la rigidité du matériau [68]. Ils postulent que l'effet des interactions pointe-échantillon sur le mouvement de la pointe pourrait être considéré en introduisant une constante de force effective, $k_{eff} = k + \sigma$, où $\sigma = \sum \partial F_i / \partial z$ est la dérivée des forces agissant sur la pointe. Ils ont ainsi pu obtenir la relation suivante :

$$\phi \approx \frac{\pi}{2} - \varepsilon a E^* \frac{Q}{k} \quad (2.18)$$

Dans cette expression, k est la constante de raideur du levier et a , le diamètre de la surface de contact. σ a été approximé par la rigidité de la surface $s = \varepsilon a E^*$. Cette expression établit bien une relation de proportionnalité entre le décalage de phase et le module de *Young* réduit de la surface (E^*). Ce modèle souffre cependant des imperfections d'un modèle harmonique et est donc limité à un nombre restreint de situations expérimentales.

Décalages de phase et dissipation d'énergie

D'autres recherches ont par ailleurs montré que le décalage de phase mesuré est lié à la dissipation d'énergie lors du balayage. En effet, *Tamayo* et *Garcia* ont montré qu'en l'absence de processus dissipatifs à l'interface pointe-échantillon, le décalage de phase, à amplitude d'oscillation constante, est indépendant du module d'élasticité de l'échantillon [69]. *Cleveland* et ses collaborateurs ont, quant à eux, déduit une expression analytique de la relation entre l'angle de déphasage lors du mouvement de la pointe et l'énergie dissipée par les forces pointe-échantillon [70, 71]. Leur modèle est basé sur l'hypothèse que, à l'équilibre, l'énergie moyenne fournie par période au levier (E_{ext}) doit être

égale à la moyenne des énergies dissipées par les interactions visqueuses hydrodynamiques avec l'environnement (E_{env}) et les interactions inélastiques à l'interface pointe-échantillon (E_{dis}). Dès lors, ils ont abouti à

$$\sin \phi = \frac{\omega}{\omega_0} \frac{A_{sp}(\omega)}{A_0} + \frac{QE_{dis}}{\pi k A_0 A_{sp}(\omega)} \quad (2.19)$$

où ω et ω_0 sont les fréquences d'excitation et propre du microlevier, respectivement. $A_{sp}(\omega)$ et A_0 sont l'amplitude de référence fixée par l'expérimentateur ("Amplitude SetPoint") et l'amplitude à la résonance, respectivement. Dès lors, **les variations du décalage de phase (i.e. les modifications de contraste dans les images de phase) ne peuvent provenir que des changements de l'énergie dissipée par les forces pointe-échantillon.**

Contributions topographiques aux décalages de phase

L'équation 2.19 suppose implicitement que le système de contrôle réponde de manière instantanée aux variations d'amplitude. Cependant, un temps de réponse fini impliquerait une amplitude d'oscillation instantanée, A_i , différente de A_{sp} . En conséquence, des changements de phase pourraient être induits par le terme élastique (A_i/A_0). Cet effet est particulièrement marqué dans les régions de changements topographiques abrupts. Il apparaît donc dans ce cas une composante topographique dans les images de phase [67]. L'enregistrement simultané de la topographie et de la phase permet d'identifier les composantes topographiques dans l'image de phase.

2.6 La spectroscopie de force

Au-delà des différentes applications microscopiques, l'A.F.M. constitue également une technique permettant l'étude de propriétés locales des surfaces, autres que structurales. La mesure des forces adhésives entre la pointe et l'échantillon en mode contact en est un exemple. Dans ce cas, la déflexion normale du levier est enregistrée en fonction du déplacement normal du scanner piézoélectrique. On parle alors de **courbe d'approche-retrait** ou de **spectroscopie de force**. Ces courbes permettent de mesurer, en un point donné, les interactions pointe-surface en fonction de la distance pointe-échantillon.

2.6.1 Principe

Afin d'expliquer simplement ce mode de fonctionnement, aidons-nous d'un exemple type de courbe spectroscopique, telle que celle pré-

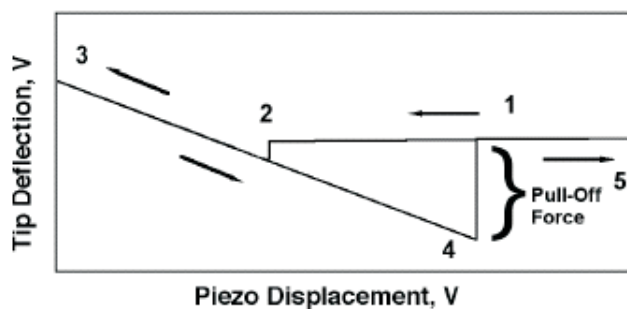


FIG. 2.5 – Courbe typique d'approche-retrait donnant la déflexion du levier en fonction de la distance pointe-échantillon [62].

sentée à la figure 2.5. Cette courbe, issue d'un cycle d'approche-retrait de la pointe, représente le déplacement du scanner piezoélectrique en fonction de la déflexion du microlevier [62]. Cette déflexion du levier est enregistrée alors que la pointe et l'échantillon sont amenés en contact et séparés par la suite.

Aussi longtemps que la pointe et l'échantillon sont suffisamment loin, le levier est libre et n'est pas défléchi. Nous nous trouvons au point 1 de la figure 2.5. Suite à l'extension en Z du scanner, la pointe approche la surface de l'échantillon. Lorsque ces derniers sont amenés suffisamment près l'un de l'autre, le levier subit une force attractive croissante, causée par les forces électrostatiques attractives et de *van der Waals* [72]. Il fléchit alors en direction de l'échantillon. Lorsque le gradient de force surpasse la constante de raideur du levier, il se produit une instabilité, un saut vers la surface. La pointe entre alors brusquement en contact avec la surface. C'est le point 2 de la courbe de force (figure 2.5). En supposant que la pointe ne pénètre pas dans la surface de l'échantillon, le levier ressent une force de répulsion et se tord vers le haut, de manière approximativement linéaire, jusqu'au point 3 de la courbe spectroscopique. Cette torsion du levier s'effectue suivant la loi de *Hooke*, pour de petites déformations.

A l'extrême gauche du diagramme, le scanner est totalement étendu et commence à se rétracter. En inversant donc le mouvement du scanner, le signal de déflexion suit environ le même chemin qu'à l'aller. Cependant, les forces d'adhérence vont garder la pointe en contact avec l'échantillon jusqu'à ce que la force élastique du levier surpasse cette adhérence. Le levier se décroche alors de la surface. C'est le point 4 de la courbe d'approche-retrait. Aussi bien la pente de la région linéaire attractive que celle de la région répulsive correspond à la sensibilité de déflexion, c'est-à-dire à la différence de tension engendrée au photo-

détecteur par unité de mouvement du scanner piezoélectrique. Avec la constante de force du levier, la sensibilité de déflexion rapporte le facteur de conversion permettant de transformer la tension recueillie à la photodiode en force appliquée. En connaissant cela, la force adhésive maximale (point 5 de la figure 2.5) peut être calculée à partir de la déflexion négative maximale au point 4.

Il faut noter que les trajets aller et retour ne se superposent pas toujours, principalement pour deux raisons. Premièrement, l'apparition de déformations plastiques peut provoquer une variation de la réponse du microlevier. Ensuite, le scanner piézoélectrique est sujet à divers problèmes comme la non-linéarité ou l'hystérèse [73].

2.7 Les autres modes

2.7.1 Le mode friction

Le frottement, ou friction, se produit lorsque deux corps solides se déplacent l'un par rapport à l'autre. La friction ainsi définie est un des phénomènes les plus communs et complexes dans la nature [74]. Il est source de problèmes lorsqu'il n'est pas pris en considération, et est exploité aussi bien dans les tâches les plus simples de la vie quotidienne, comme la marche, que dans les machines modernes. Mais qu'est-ce que la friction ? La friction est une forme de dissipation d'énergie ayant lieu lorsque deux surfaces entrent en contact et en mouvement relatif.

La première étude systématique de la friction date du $XV^{ième}$ siècle. En effet, à l'époque, *Léonard de Vinci* (1452-1519) réalise des expériences sur la friction, consistant à mesurer la force nécessaire pour faire glisser une masse M sur une surface. Il en déduit que la friction est indépendante de la surface de contact (il s'agit de la première loi du frottement). Deux siècles plus tard, *Amontons* (1663-1706) s'attela lui aussi à l'étude du frottement. Ses résultats lui ont permis d'établir une autre loi (la seconde loi du frottement) : *La force de friction est proportionnelle au poids du corps déplacé sur un plan horizontal*. Elle s'exprime telle que :

$$F_f = \mu F_{ext} \quad (2.20)$$

Il appela le facteur de proportionnalité, μ , le coefficient de friction. F_f est la force frictionnelle et F_{ext} , la force extérieure normale à la surface. *Leonhard Euler* (1707-1783) a fait la distinction entre les frottements statiques et dynamiques. Par définition, la force de frottement statique décrit la force nécessaire pour initier le frottement glissant d'un corps sur une surface. La force de frottement dynamique est, pour sa part, la force nécessaire pour garder un corps en frottement glissant. Environ

un demi siècle plus tard, *Coulomb* (1736-1806) s'est intéressé aux paramètres influençant le frottement dynamique. Il a ainsi pu mettre en évidence la troisième loi du frottement qui spécifie que le coefficient de frottement dynamique est indépendant de la vitesse de glissement et de la surface (apparente) de contact [75].

Ce phénomène extrêmement présent dans notre vie de tous les jours est bien l'un des plus complexes et cependant l'un des moins compris. Des avancées récentes ont cependant permis, ces dernières années, des mesures quantitatives des forces de friction à l'échelle atomique. Parmi celles-ci, figure la microscopie de force latérale. Elle a largement contribué à une meilleure compréhension des mécanismes microscopiques impliqués. L'amélioration croissante des techniques de caractérisation, ainsi que le développement rapide et la disponibilité de larges ressources calculatoires, ont rendu possible ces récents succès, tant au niveau expérimental que théorique.

Principe

Le microscope à force atomique peut être configuré pour l'étude des forces de friction. On parle alors de microscopie de force latérale, aussi appelée A.F.M. en mode friction. Celle-ci permet de détecter les variations des forces latérales, à l'échelle atomique, lorsqu'une pointe glisse sur une surface. Ces forces atomiques agissant lors du glissement de quelques atomes entrant en contact avec une surface peuvent ainsi fournir un aperçu très direct des origines microscopiques de la friction [76].

Son principe fut imaginé par *Mate* et al. [77]. Leur idée était de détecter, en A.F.M. en mode contact, les modes de torsion du levier, lorsque la direction de balayage rapide était perpendiculaire à l'axe du levier. Afin de comprendre comment les données de friction sont acquises par A.F.M., nous devons simplement imaginer le mouvement du faisceau laser au travers du détecteur, alors que la pointe sonde la surface de l'échantillon. Les forces latérales produisent une torsion du levier, donnant lieu à une déviation du faisceau laser suivant une horizontale, et détectées grâce à l'utilisation d'une photodiode à quatre quadrants. Ces déviations latérales sont alors recueillies et converties sous forme d'image. Généralement, une image topographique est simultanément enregistrée de sorte que les caractéristiques topographiques de l'échantillon puissent être aisément comparées aux caractéristiques tribologiques apparaissant dans l'image de friction.

N'ayant pas utilisé ce mode d'imagerie lors de ce travail, nous n'irons pas plus en profondeur dans son explication. Le lecteur intéressé pourra

consulter la littérature [78].

2.7.2 Le mode non-contact

Le mode de fonctionnement de l'A.F.M. dont nous allons parler maintenant est un mode dit “dynamique”, tout comme le mode à contact intermittent. De manière similaire, il s'agit d'un mode pour lequel on impose une vibration au levier. Ce mode non-contact a été développé afin de minimiser la déformation et/ou destruction des échantillons mous tels que les polymères ou les matériaux biologiques [65]. En effet, en mode contact, les forces appliquées peuvent être relativement élevées. La pointe peut alors venir véritablement labourer la surface de l'échantillon. De plus, les forces de friction et de capillarité induisent de nombreux artefacts dans les images, rendant leur interprétation d'autant plus difficile. Le mode non-contact tend à réduire, voire éliminer, ces inconvénients.

Principe

En pratique, dans le mode non-contact, le microlevier est excité à une fréquence proche de sa fréquence de résonance, par un élément piézoélectrique sur lequel il est monté [79]. La pointe oscille alors au-dessus de la surface de l'échantillon sans la toucher [80]. L'amplitude de l'oscillation du microlevier est maintenue suffisamment faible pour que celui-ci reste dans un régime attractif. La force attractive ressentie (F_{att}) modifie la constante de raideur effective du levier suivant la relation [81]

$$k_{eff} = k_F - \frac{\partial F_{att}}{\partial z} \quad (2.21)$$

Cette modification de la constante de raideur provoque alors une variation de la fréquence de résonance. L'asservissement de l'amplitude de vibration ou de la fréquence de résonance par la boucle de contre-réaction nous permet d'obtenir une image topographique. Notons que ce mode est en fait sensible aux variations du potentiel d'interaction pointe-échantillon, compliquant de ce fait l'interprétation à donner aux images obtenues [60].

N'ayant pas utilisé ce mode d'imagerie lors de ce travail, nous n'irons pas plus en profondeur dans son explication. Le lecteur intéressé pourra approfondir ce mode en consultant la littérature [82].

2.8 Les pointes et leviers

Auparavant, aux premiers jours de l'A.F.M., les microleviers devaient être réalisés par les chercheurs eux-même. De nos jours, leur vie est grandement facilitée par la disponibilité d'une large gamme de leviers, pointes et couches réfléchissantes, que l'on peut se procurer commercialement.

Les leviers sont généralement réalisés en silicium, nitrure ou oxyde de silicium. Ils peuvent se présenter sous forme triangulaire ou simplement celle d'une poutre rectangulaire. Chaque levier possède sa fréquence de résonance et constante de raideur propre. Ces paramètres détermineront le mode de fonctionnement de l'A.F.M. pour lequel chaque levier est le mieux adapté. A l'extrémité du levier, se situe une pointe très effilée. Cette dernière peut avoir une structure conique ou pyramidale. Les caractéristiques des pointes utilisées sont rassemblées en annexe A.

2.9 Les substrats

Bien que, à l'instar de la microscopie à effet tunnel à balayage, les substrats utilisés en microscopie à force atomique ne doivent pas nécessairement être conducteurs, d'autres conditions sont tout de même requises afin que les expériences A.F.M. se déroulent au mieux. Il semble en effet évident, étant donné la résolution de l'A.F.M., que les substrats soient atomiquement plans sur de grandes distances. Il doivent également présenter une certaine inertie thermique et chimique.

Nos mesures A.F.M. nous ont conduit à l'utilisation de trois types de substrats repris dans cette thèse : le mica, le fluorure de calcium et le tantale. Les caractéristiques propres de chacun d'entre eux sont brièvement résumées ci-dessous.

2.9.1 Mica

Le mica est l'un des substrats les plus communs en microscopie à force atomique. Il est en effet largement utilisé comme base pour l'étude de films de Langmuir-Blodgett, de monocouches auto-assemblées et d'autres molécules organiques. Son plus grand avantage est qu'il s'agit d'un matériau en feuillets. Il peut dès lors être facilement clivé, afin d'obtenir des surfaces atomiquement planes sur de larges zones, comme le montre la figure 2.6B. Ce clivage, réalisé à l'aide d'un adhésif, met alors à notre disposition des surfaces propres pour chaque échantillon, de manière simple et rapide.

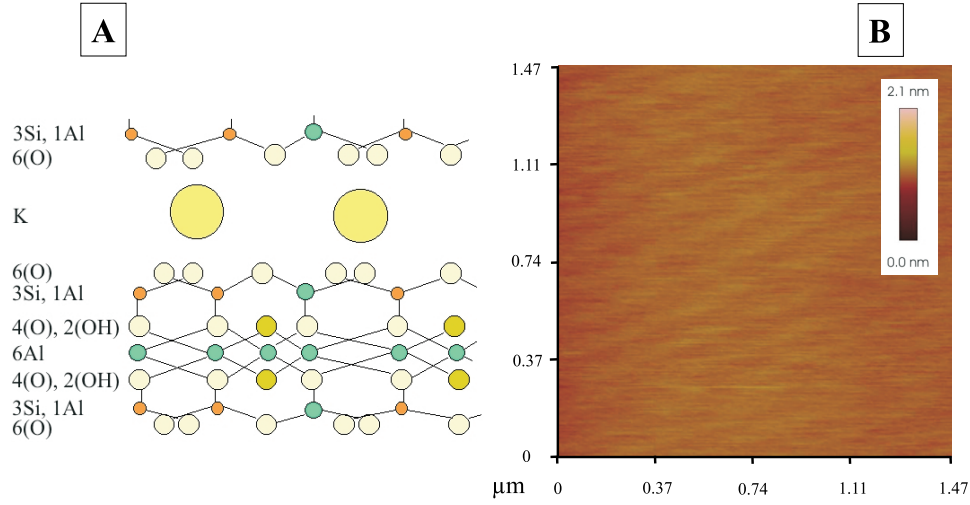


FIG. 2.6 – (A) Structure du mica. (B) Image A.F.M. de la surface de mica.

Structure cristallographique

La structure du mica est présentée à la figure 2.6A. C'est un matériau aluminosilicaté. La formule complète de sa cellule élémentaire est le $KAl_2 (Si_3AlO_{10}) (OH)_2$. Ces cellules élémentaires sont empilées en couches d'environ 10 Å d'épaisseur. Les ions K^+ sont situés en bordure de ces couches, fournissant une liaison électrostatique faible. Ils définissent dès lors le plan de clivage préférentiel. Ces plans présentent des atomes d'oxygène organisés en structure hexagonale (avec une périodicité de 5.2 Å), et formant les coins des bases des tétraèdres de SiO_4 [72]. Comme le montre la figure 2.6B, cette surface est très lisse, ce qui convient parfaitement pour des mesures S.P.M.

2.9.2 Le difluorure de calcium

Le fluorure de calcium (CaF_2) est un matériau naturel transparent. Il possède des propriétés optiques très intéressantes. En effet, il est transparent à la lumière visible et ultraviolette (de 170 nm à 7800 nm). Ce matériau a dès lors trouvé de nombreuses applications dans les composants optiques tels que les lentilles, prismes et fenêtres. Dû à son faible désaccord de maille avec le silicium, il semble également être un candidat prometteur pour des couches passivantes épitaxiales et pour la fabrication de composés tridimensionnels intégrés [83].

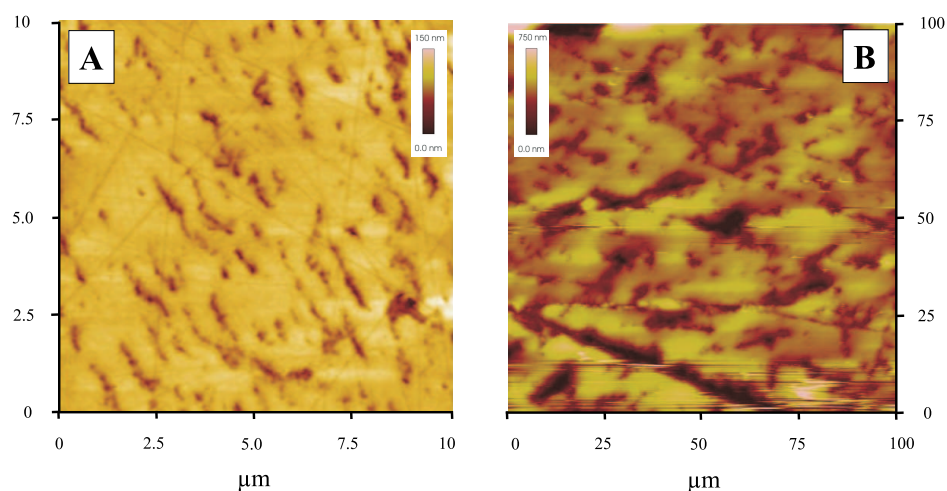


FIG. 2.7 – (A) Image A.F.M. contact de la surface du difluorure de calcium. (B) Image T.M.-A.F.M. de la surface d'oxyde de tantalum.

Structure cristallographique

Les ions Ca^{++} forment une structure cubique à faces centrées avec les ions plus petits de F^- occupant les centres des tétraèdres. Le paramètre de maille est de 536 pm. Il s'agit d'un cristal stable chimiquement et physiquement, ayant une excellente résistance chimique, thermique et à l'eau. Sa surface est relativement plane, bien que soient visibles les griffes de polissage, comme le montre la figure 2.7A.

2.9.3 Le tantale

Le tantale est un métal gris argenté, dense et très dur. Lorsqu'il est pur, il est ductile et peut être étiré en fins fils, qui peuvent être utilisés comme filaments pour l'évaporation de métaux tels que l'aluminium. Le tantale est presque totalement immunisé contre les attaques chimiques à des températures inférieures à 150°C. La principale utilisation du tantale, sous forme de poudre métallique de tantale, se situe dans la production de composants électroniques, en particulier des capacités. Il est également employé pour des instruments chirurgicaux et implants métalliques. Il ne réagit en effet pas avec les liquides physiologiques. Les substrats utilisés sont des plaquettes de tantales, qui s'oxydent à l'air ambiant. Sa surface, bien que quelque peu rugueuse (comme le montre la figure 2.7B) présente de larges terrasses, qui peuvent constituer autant de sites d'analyse.

Deuxième partie

Résultats expérimentaux

Chapitre 3

Les monocouches auto-assemblées

Résumé

Les monocouches auto-assemblées (S.A.M.s : Self-Assembled Monolayers) sont des monocouches moléculaires formant des structures organisées, de manière spontanée sur des substrats. L'utilisation de techniques microscopiques aussi performantes que la S.T.M. et l'A.F.M. ont révélé la structure, à l'échelle moléculaire, voire atomique, de telles couches. Elles ont permis des avancées scientifiques et technologiques incroyables recouvrant le domaine grandissant des bio- et nanotechnologies. Ces S.A.M.s peuvent être classées en deux catégories : les monocouches simplement physisorbées et celles chimisorbées. Elles ont été toutes deux soumises à investigation. Dans ce cadre, l'utilisation de pointes S.T.M. fonctionnalisées a grandement facilité notre travail recherche. De manière plus précise, les deux premières sections de ce chapitre considèrent des molécules physisorbées en milieu liquide (des esters et acides gras). Les sections suivantes traitent de molécules chimisorbées (alcanethiols et thiocyanates).

3.1 Les esters

L'interface entre un solide et une solution organique a considérablement attiré l'attention des chercheurs ces dernières décennies [84, 85, 86]. Les recherches sur les propriétés des monocouches organiques sont en effet d'une importance primordiale pour la compréhension des processus fondamentaux d'organisation à deux dimensions. Ces investigations sont également essentielles pour de nombreuses avancées et applications technologiques telles que celles traitant de l'adhérence, de la lubrification, ou de la fabrication de nouveaux matériaux à l'échelle moléculaire [87].

Dans ce contexte, le microscope à effet tunnel à balayage a largement démontré son efficacité lors d'études de structures de surfaces propres ou recouvertes, que ce soit à l'air, sous ultra-haut vide ou en milieu liquide [88, 89, 90]. De nombreuses études *in situ* ont en effet été plus que fructueuses dans la détermination de l'organisation moléculaire bidimensionnelle à l'interface liquide/solide. Des résolutions moléculaires, voire même parfois atomiques, ont en effet été obtenues. Ces recherches ont révélé que les couches formées possèdent un haut degré d'organisation bidimensionnelle. Par exemple, les alcanes et alcools, adsorbés sur un substrat de graphite, tendent à adopter, dans la plupart des cas, une conformation *all-trans*, avec leur axe moléculaire parallèle les uns aux autres, afin d'optimiser les interactions intermoléculaires et molécule-substrat [91, 92, 13]. L'auto-assemblage de nombreuses autres molécules telles que des alcanes substitués [93, 94], des éthers à longue chaîne [95], des acides gras [96] ou des dérivés benzéniques [97, 98, 99] a également été intensément étudié.

La microscopie à effet tunnel à balayage présente cependant un champ d'application beaucoup plus large que la simple acquisition d'images de structures de surface. En effet, cette technique permet la distinction de différents groupements fonctionnels. Cependant, alors que certains d'entre eux tels que les amines, thiols ou halogénures sont aisément différenciés du squelette moléculaire, d'autres tels que les esters ou les groupements carboxyliques ne sont pas identifiés dans les images S.T.M. [100, 101]. En se rappelant le fait que, dans la configuration du S.T.M., si la pointe et l'échantillon sont séparés de seulement quelques angströms, leurs fonctions d'onde électroniques se chevauchent. En appliquant une tension entre ces deux électrodes, un courant tunnel peut circuler. Ceci suggère qu'une modification de la pointe S.T.M. pourrait permettre la distinction d'espèces à l'aide d'une utilisation adéquate des interactions chimiques. Nous avons donc "fonctionnalisé" (c'est-à-dire modifié chimiquement) les pointes S.T.M., afin d'étudier l'effet de

cette fonctionnalisation sur le courant tunnel et les contrastes observés sur des groupements fonctionnels spécifiques. En comparant les divers contrastes (présentés par un groupement fonctionnel), obtenus avec différentes pointes modifiées, nous avons été capable d'identifier la spécificité chimique du groupement fonctionnel et de localiser, à l'échelle atomique, leur position au sein de la molécule [17].

Finalement, au-delà même de l'identification de groupements fonctionnels, la microscopie à effet tunnel à balayage présente la possibilité de fournir un aperçu de propriétés aussi diverses que la chiralité, la réactivité ou les dynamiques moléculaires aux interfaces liquide/solide [102, 103, 104, 105, 106]. Plus particulièrement, elle permet le suivi du mouvement de molécules adsorbées en surface, en fonction du temps. Malheureusement, la gamme de phénomènes dynamiques pouvant être analysés par cette technique reste limitée par la nature même des expériences S.T.M. En effet, ces dernières sont généralement réalisées sur une échelle de temps beaucoup plus large que les mouvements des molécules. Dès lors, ces déplacements moléculaires ne peuvent être suivis que si ces phénomènes se produisent à l'échelle de la milliseconde ou plus [97]. De tels processus dynamiques spontanés ont été imagés et étudiés dans des systèmes de monocouches pures à l'interface liquide/solide. Nous nous sommes donc intéressé aux mouvements moléculaires, et plus précisément aux jonctions entre domaines [17].

En pratique, nous avons comparé les images S.T.M. obtenues sur des couches d'esters de cire [le palmitate de palmitoyl (P.P.) : $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-COO-(CH}_2\text{)}_{15}\text{-CH}_3$] à l'interface phényloctane/graphite (à la limite de la saturation). Les détails concernant les produits utilisés sont exposés en annexe B. L'effet des pointes modifiées chimiquement sur le contraste des images obtenues a été étudié. Dans le cas présent, les pointes ont été fonctionnalisées par des couches auto-assemblées d'acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA) et de 4-mercaptotoluène (4-MT). Nous avons également considéré les mouvements moléculaires aux jonctions entre domaines, en décrivant leur évolution en fonction du temps.

L'utilisation de pointes en or modifiées chimiquement à l'aide de 4-MBA et de 4-MT rend plus aisée l'imagerie moléculaire à l'interface liquide/solide. De plus, la comparaison entre des images de monocouches obtenues avec des pointes en or modifiées avec du 4-MBA et du 4-MT nous a permis de révéler la position du groupement ester au sein de la molécule. Des mesures obtenues avec des pointes en or non modifiées sont exposées ci-dessous comme référence.

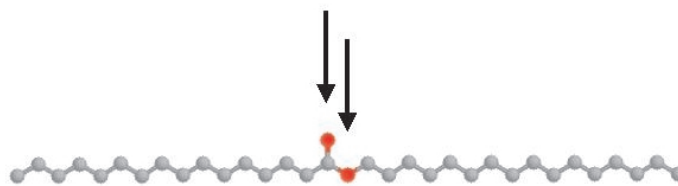


FIG. 3.1 – *Structure du Palmitate de Palmitoyl (P.P.). Les flèches indiquent la position des atomes d'oxygène. Les autres sphères représentent des groupements méthylènes.*

3.1.1 Organisation bidimensionnelle

Les molécules étudiées sont des esters symétriques, comme montré à la figure 3.1. Dans cette figure, les sphères grises représentent des groupements méthylènes, excepté celles indiquées par une flèche, qui constituent des atomes d'oxygène. Des résultats préliminaires, obtenus par diffraction de rayons X (X.R.D. : *X-Ray Diffraction*), ont permis d'établir leur structure cristalline et leurs caractéristiques moléculaires, en particulier leur longueur moléculaire (environ 4 nm) [107].

Dans ces études préliminaires, des expériences de microscopie à effet tunnel à balayage sur des assemblages d'esters de cire à l'interface liquide/solide furent aussi rapportées [107]. Leurs images S.T.M. (obtenues à l'aide de pointes en Pt/Ir) révèlent différents types d'assemblages moléculaires. Tous ces résultats ont mis en évidence l'énorme difficulté d'obtenir des images interprétables et reproductibles à l'aide de pointes en Pt/Ir. Des images à résolution submoléculaire n'ont de plus jamais été obtenues malgré un nombre important d'essais. Enfin, la position des groupements fonctionnels (i.e. des groupements esters) n'a pas été identifiée par ces données.

La figure 3.2 présente une image d'une couche d'esters de cire (P.P.), observée à l'aide d'une pointe en or non-modifiée. Un assemblage côte-à-côte de lamelles forme cette couche. Ces lamelles, séparées par des sillons (de moins de 2 angströms en profondeur) se répètent tous les 5 nm environ. Chaque lamelle apparaît ainsi être formée d'un arrangement compact de bâtonnets parallèles, orientés à environ 60° par rapport aux sillons. Ces bâtonnets sont longs d'environ 3.9 nm.

Cette structure peut être interprétée comme un arrangement bidimensionnel de molécules d'esters à l'interface liquide / solide. La distance entre atomes de carbone dans une chaîne en zigzag C-C-C d'un ester est environ la même que l'espacement de 0.246 nm entre les trous

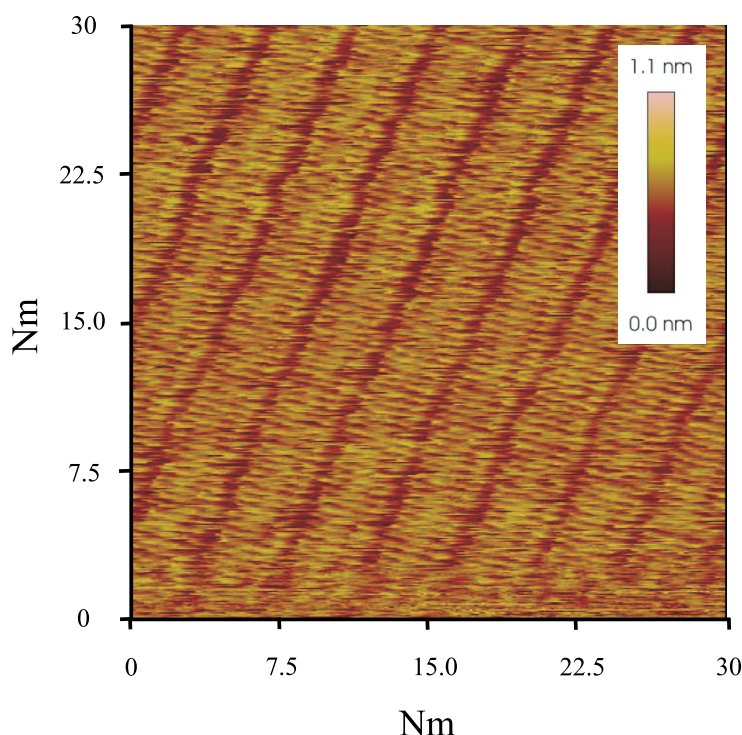


FIG. 3.2 – Image *S.T.M.* du P.P. à l'interface phényloctane/graphite, obtenue à l'aide d'une pointe en or non-modifiée. (30 nm x 30 nm, 710 pA, -480 mV)

dans le réseau graphitique (§ 1.4.1). Cet accord de réseau favorise l'adsorption et est à l'origine de l'affinité des esters pour le graphite [86]. La longueur d'une lamelle correspond de plus assez bien à la longueur des molécules d'esters, mesurée lors d'expériences de X.R.D. [107].

3.1.2 Position du groupement ester

Des pointes en or fonctionnalisées à l'aide d'acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA) ont été utilisées pour l'observation, par microscopie à effet tunnel à balayage, de couches structurées d'esters. La configuration schématique de ce système est représentée à la figure 3.3. Ce type de pointes accentue le contraste obtenu entre le groupement ester et méthylène dans les molécules d'esters. En effet, de récentes études ont montré que les pointes modifiées chimiquement peuvent être appliquées à l'identification de plusieurs groupements fonctionnels difficilement visibles par *S.T.M.* autrement [108, 109, 110, 111, 112]. Cela fut expliqué comme une conséquence de la facilitation du passage des électrons par effet tunnel au travers du recouvrement des fonctions d'ondes électro-

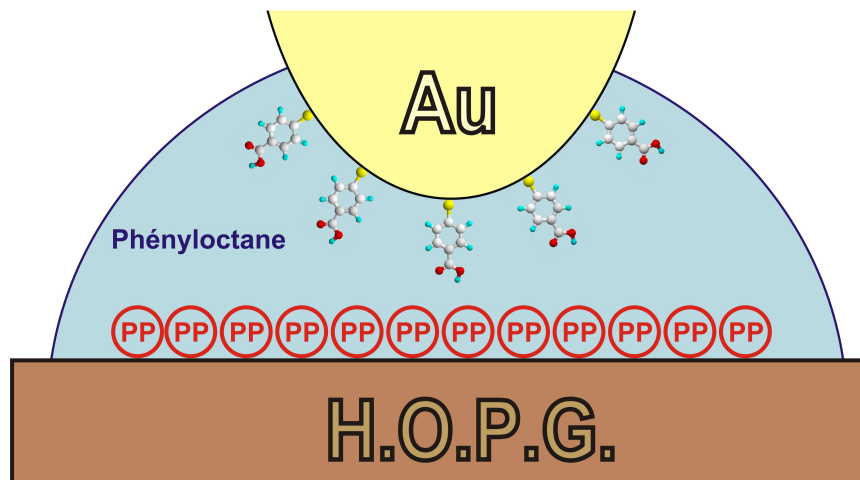


FIG. 3.3 – Représentation schématique de la configuration d'expériences S.T.M. réalisées sur du PP, à l'aide de pointes modifiées chimiquement par du 4-MBA. Le substrat est un substrat de H.O.P.G. (rectangle brun), sur lequel reposent des molécules de PP (cercles rouges) dans du phényloctane. La pointe est réalisée en or (hémisphère jaune) à laquelle sont accrochées des molécules de 4-MBA.

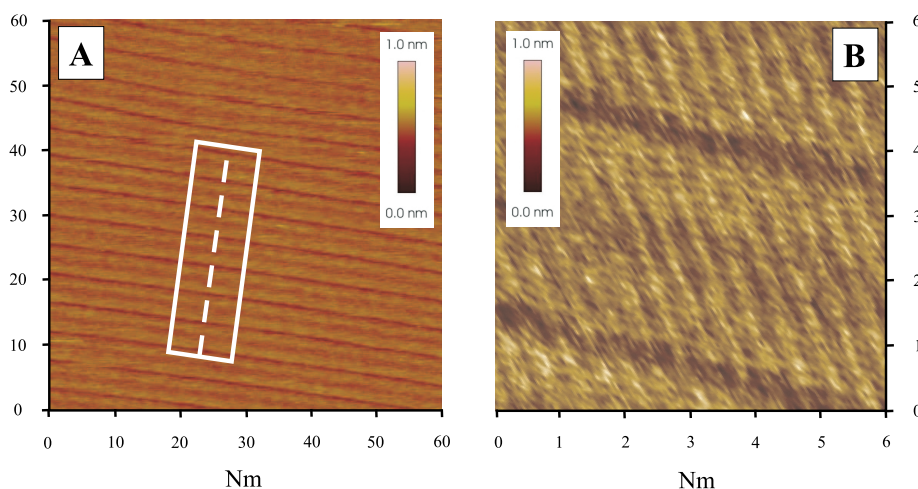


FIG. 3.4 – Images S.T.M. du P.P. à l'interface phényloctane/graphite, obtenue à l'aide d'une pointe en or modifiée par de l'acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA). (A) 60 nm x 60 nm, 740 pA, -485 mV. (B) 6 nm x 6 nm, 740 pA, -485 mV.

niques, par l'interaction entre la pointe et l'échantillon [109, 110, 111, 112].

La figure 3.4A représente une image S.T.M. typique d'une couche d'esters à l'interface phényloctane/graphite, obtenue à l'aide de pointes en or modifiées avec du 4-MBA. Les couches auto-assemblées s'organisent sous forme de lamelles. Les sillons séparant ces lamelles se répètent tous les 4.3 nm environ. De plus, celles-ci semblent formées d'un arrangement compact de bâtonnets parallèles, orientés à environ 60° par rapport aux sillons, comme présenté à la figure 3.4B. Cette figure est une image à haute résolution d'une lamelle d'esters. Dans cette lamelle, des bâtonnets individuels peuvent être distingués. Ils mesurent environ 3.9 nm de long. Il est également possible d'évaluer le nombre de points clairs constituant ces bâtonnets : entre 15 et 17. La largeur d'un sillon et l'espace entre bâtonnets adjacents peuvent aussi être évalués à 2 et 4 angströms, respectivement. La figure 3.5A représente une coupe transversale (ligne pointillée de la figure 3.4A), orientée perpendiculairement aux sillons. Cette courbe est moyennée sur toutes les coupes transversales se trouvant dans le rectangle blanc de la figure 3.4A. Les sillons sont profonds d'environ 0.8 angströms. Entre deux sillons adjacents, de petites dépressions sont clairement visibles. Elles sont profondes d'environ 0.4 - 0.5 angströms et positionnées au centre de la lamelle.

Des pointes en or modifiées avec du 4-mercaptotoluène (4-MT) (dont la configuration schématisée est représentée à la figure 3.6) nous ont permis d'observer une structure telle que celle présentée à la figure 3.7. La structure lamellaire y est similaire à celle observée précédemment. Les lamelles ont une largeur mesurée d'environ 4.3 nm. Ces structures semblent uniformément visibles sur de larges domaines à la surface de l'échantillon. La figure 3.5B dépeint une coupe transversale (ligne pointillée de la figure 3.7), orientée perpendiculairement à la direction des sillons. Cette coupe transversale est moyennée sur toutes les coupes transversales se trouvant à l'intérieur du rectangle blanc de la figure 3.7. Les sillons sont profonds d'environ 0.5 angströms. Entre chaque sillon adjacent, de petits monticules sont clairement visibles. Ils sont hauts de 0.1 - 0.2 angströms et positionnés au centre de la lamelle. Les résultats présentés avec les divers types de pointes ont été reproduits à plusieurs reprises.

Discussion

Des expériences antérieures ont déjà démontré la difficulté d'obtenir des images S.T.M. reproductibles et de bonne qualité sur des esters avec des pointes en Pt/Ir, à l'interface liquide/solide [107]. A contrario, des résultats reproductibles sur des structures périodiques sont aisément observés avec des pointes en or non-modifiées. Cependant, la position du groupement ester n'a pu être déduite de ces images (figure 3.2).

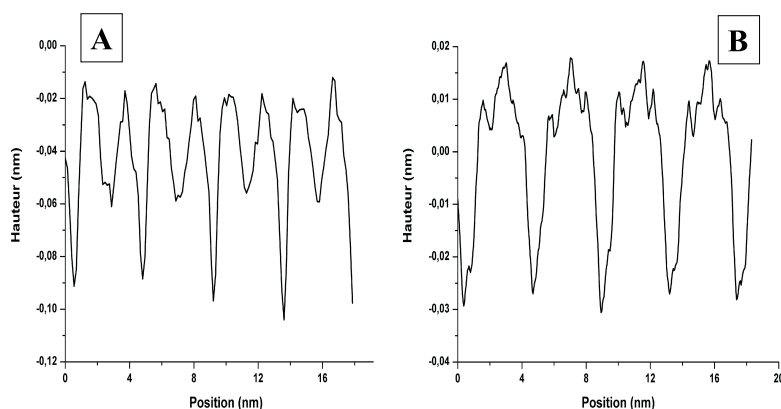


FIG. 3.5 – (A) Courbe transversale obtenue le long de la ligne en pointillé de la figure 3.4A, et moyennée sur toutes les courbes transversales du rectangle blanc. (B) Courbe transversale obtenue le long de la ligne en pointillé de la figure 3.7A, et moyennée sur toutes les courbes transversales du rectangle blanc.

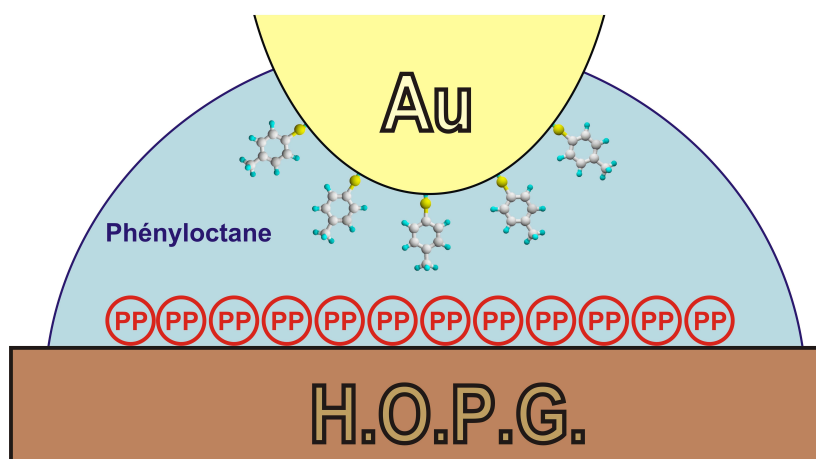


FIG. 3.6 – Représentation schématique de la configuration d'expériences S.T.M. réalisées sur du PP, à l'aide de pointes modifiées chimiquement par du 4-MT. Le substrat est un substrat de H.O.P.G. (rectangle brun), sur lequel reposent des molécules de PP (cercles rouges) dans du phényloctane. La pointe est réalisée en or (hémisphère jaune) à laquelle sont accrochées des molécules de 4-MT.

L'utilisation de pointes modifiées chimiquement révèle une organisation moléculaire identique (figures 3.4 et 3.7). De plus, un groupement chimique différent utilisé pour fonctionnaliser les pointes (4-MBA et

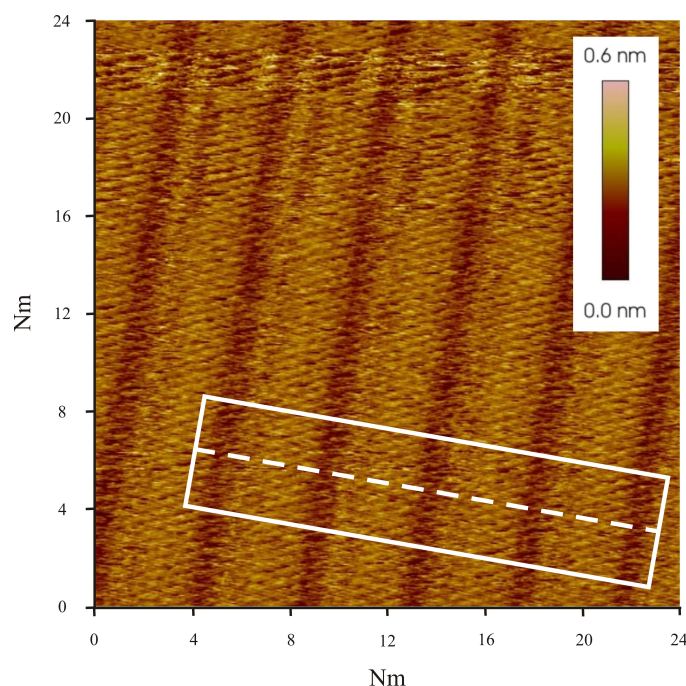


FIG. 3.7 – Image S.T.M. du P.P. à l'interface phényloctane/graphite, obtenue à l'aide d'une pointe en or modifiée par du 4-mercaptotoluène (4-MT). (23.5 nm x 23.5 nm, 490 pA, -500 mV).

4-MT) fournit différents contrastes dans les images, à la position du groupement ester (qui, rappelons-le n'est pas visible autrement). De petites dépressions avec des pointes en or modifiées avec du 4-MBA et de petits monticules avec des pointes en or modifiées avec du 4-MT ont été observés au centre des molécules d'ester. Ceci peut être expliqué comme une conséquence de la facilitation (ou non) du passage des électrons par effet tunnel au travers du recouvrement des fonctions d'ondes électroniques, par l'interaction entre la pointe et l'échantillon, comme décrit dans la littérature [109, 110, 111, 112]. En effet, il a été montré théoriquement et observé expérimentalement que l'adsorption d'atomes ou de molécules sur une pointe S.T.M. modifie la structure de la pointe et/ou les états électroniques de celle-ci, et dès lors, les images S.T.M. obtenues [113].

Par exemple, une molécule de CO adsorbée sur une pointe S.T.M. produit un contraste chimique permettant de distinguer les molécules de CO et les atomes d'oxygène adsorbés sur du Cu(111). Dans ce cas, cette imagerie chimiquement sensible est due à l'inversion des molécules de CO adsorbées sur du Cu(111) et causée par des molécules de CO à l'apex de la pointe [114, 115, 116]. Evidemment, des pointes décorées

par du CO ont un plus haut pouvoir de résolution que des pointes non-modifiées. *Umezawa et al.* ont expliqué cette modification de contraste suite à l'utilisation de pointes fonctionnalisées comme une conséquence de la formation d'une liaison hydrogène entre les groupements fonctionnels sur la pointe et l'échantillon, rendant plus aisé le passage des électrons par effet tunnel [108, 109, 117]. Ce groupe de recherche a aussi trouvé que des interactions hydrogènes plus fortes produisent un contraste accru sur les groupements fonctionnels, et la différence dans la force de l'interaction hydrogène entre la pointe et l'échantillon a permis de différencier deux groupements éthers orientés différemment [109].

Les courbes transversales des figures 3.5A et 3.5B, obtenues respectivement avec des pointes en or modifiées avec du 4-MBA et du 4-MT, indiquent clairement la position du groupement ester, qui est la seule partie réactive de la molécule. Ces deux figures indiquent également que le même groupement fonctionnel sur l'échantillon est "vu" comme une dépression et un monticule lorsque imagé avec des pointes en or modifiées respectivement avec du 4-MBA et du 4-MT. En suivant l'interprétation de *Umezawa et al.* [109, 110, 111, 112], les interactions entre le groupement ester sur l'échantillon et le groupement alkyl sur la pointe (4-MT) rendent plus aisé le passage des électrons par effet tunnel via le recouvrement de leurs fonctions d'onde électronique, ce qui n'est pas le cas entre le groupement ester sur l'échantillon et le groupement carboxyle sur la pointe (4-MBA). Ces observations s'accordent bien avec un groupement ester pointant vers la solution. En effet, cette organisation peut induire une liaison hydrogène entre la pointe et l'échantillon, conduisant à un recouvrement des fonctions d'onde électroniques de la pointe et de l'échantillon.

3.1.3 Dynamique moléculaire

Les images développées dans cette section confirment que nous pouvons observer sur les esters, avec des pointes fonctionnalisées, les processus dynamiques observés de manière routinière avec des pointes S.T.M. standard, sur différentes couches déposées à partir d'une solution. De plus, les résultats obtenus avec des pointes modifiées révèlent un contraste similaire (voir meilleur) et des images de qualité aux jonctions entre domaines.

Des pointes en or modifiées chimiquement avec du 4-MBA nous ont permis d'observer la naissance et l'évolution de jonctions entre deux domaines, comme mentionné ci-dessus. La figure 3.8A présente deux domaines orientés dans la même direction et composés de lamelles similaires. Dans cette image, des molécules de solvant sont probablement

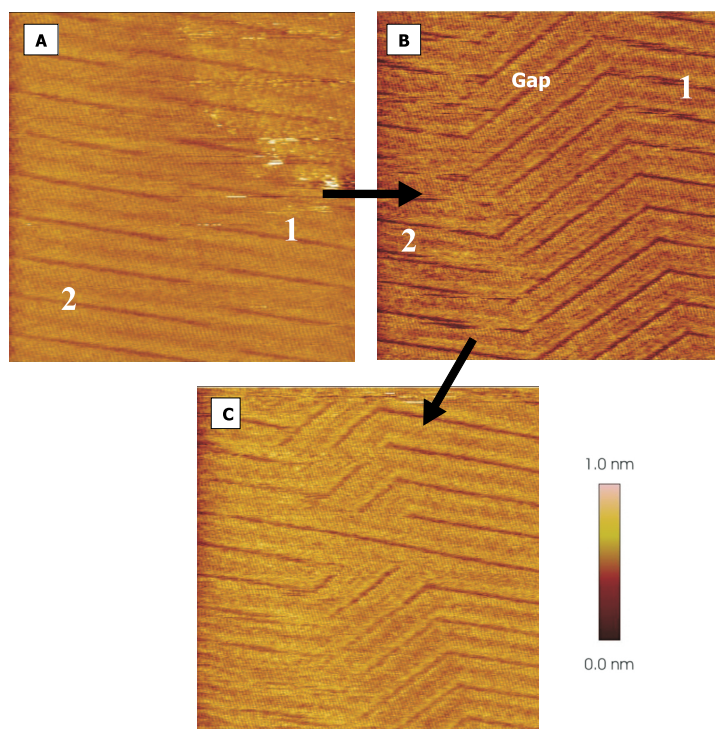


FIG. 3.8 – Images *S.T.M.* successives présentant l'évolution d'une jonction entre domaines dans des couches auto-assemblées de P.P. à l'interface phényloctane/graphite, obtenues à l'aide de pointes en or modifiées avec du 4-MBA (740 pA, -485 mV). (A) Etat initial (40 nm x 40 nm). (B) Etat intermédiaire (40 nm x 40 nm). (C) Etat final (50 nm x 50 nm).

co-adsorbées de manière non-structurée dans la bande (environ 4 nm de large) entre les domaines 1 et 2. Cette bande se structure progressivement. Des lamelles commencent à y apparaître et tendent à s'aligner sur celles des domaines 1 et 2, formant ainsi une lamelle continue, comme présenté à la figure 3.8B. Notons cependant que de petites dépressions sont toujours visibles aux centres des lamelles constituant la bande située entre les domaines 1 et 2 ("Gap"). Cela démontre que les caractéristiques observées grâce aux pointes en or fonctionnalisées sont indépendantes de la direction de balayage. L'étape finale de ce processus peut être déduite des structures de la figure 3.8C. La disparition progressive de la bande est en route, par la formation de lamelles rectilignes et continues entre les domaines 1 et 2.

Discussion

Ces images illustrent clairement les processus dynamiques (qui apparaissent aux jonctions entre domaines) au sein des couches, à l'interface liquide/solide. Ces discontinuités ont également été rapportées dans des images S.T.M. (obtenues avec des pointes en Pt/Ir par d'autres groupes de recherche) sur de nombreuses autres molécules telles que des alcanes ou acides gras (et dérivés) [118, 119]. Cependant, à notre connaissance, ces expériences rapportent la première évidence S.T.M. de l'évolution de couches d'esters au travers de processus d'adsorption-désorption entre la solution et la couche moléculaire. En effet, la couche d'esters est en équilibre avec la solution surnageante et les modifications d'images indiquent clairement qu'il y a échange de molécules. Ces processus d'échange sont importants pour la formation de structures supramoléculaires. En effet, des échanges bidimensionnels et tridimensionnels (couche bidimensionnelle - solution) fournissent un mécanisme "curatif" de réparation de défauts de structure, i.e. les jonctions entre domaines dans notre cas.

Il est également possible que le balayage de la pointe favorise la formation de ces couches structurées par l'interaction entre la pointe et les molécules désordonnées aux jonctions. En effet, les dynamiques de telles jonctions entre domaines ne devraient, en principe, coûter aucune énergie nette [120]. Elles ne requièrent qu'une énergie thermique (suffisante à température ambiante), ou l'énergie transférée de la pointe, pour permettre le déplacement coopératif de molécules impliquées dans le processus. Cependant, nous ne pouvons pas ignorer l'influence de la pointe S.T.M. dans le mouvement moléculaire. Néanmoins, il est admis que l'interaction pointe-molécule n'est pas essentielle au mouvement moléculaire. En effet, nous avons pu constater que les images S.T.M. reflétant ce processus sont observées indépendamment des conditions de fonctionnement telles que la tension appliquée, le courant tunnel, et les vitesses de balayage, comme déjà mis en évidence dans la littérature sur des molécules similaires [15, 106, 120].

Le processus observé à la figure 3.8 peut être résumé comme suit : un petit domaine (la bande entre les domaines 1 et 2) se réduit jusqu'à sa disparition, alors que les autres domaines grandissent à ses dépens (les domaines 1 et 2 ne formant plus qu'un). Dans ce cas, les dynamiques sont fortement directionnelles, résultant en une croissance des domaines plus larges. Ce processus, appelé mûrissement d'*Ostwald*, a déjà été intensivement étudié lors de travaux antérieurs [118, 119].

3.1.4 Résumé

En résumé, nous avons obtenu, à plusieurs reprises sur différents échantillons, des images de structures bidimensionnelles d'esters de cire à l'interface phényloctane/graphite, à l'aide d'un microscope à effet tunnel à balayage. Les couches moléculaires sont organisées en lamelles, séparées par des sillons interlamellaires. Chaque lamelle est composée de molécules parallèles, orientées à 60° par rapport à la direction des sillons. Des images à haute résolution, obtenues avec des pointes en or fonctionnalisées, indiquent que les molécules sont couchées sur le substrat, le plan formé par la chaîne carbonée étant perpendiculaire à la surface de graphite. De plus, la différence de contraste obtenue grâce aux pointes modifiées révèle la position et l'orientation du groupement ester, qui est la seule partie réactive de la molécule. Nous nous sommes également intéressé aux mouvements moléculaires observés aux jonctions entre domaines. Leur évolution temporelle a été suivie et analysée. Les mouvements et réarrangements moléculaires observés dans les couches ont été attribués à l'adsorption et la désorption de molécules sur le substrat de graphite.

3.2 Les acides gras

Comme nous l'avons déjà signalé, les recherches S.T.M. sur des couches ordonnées de molécules ont mis en évidence l'intérêt et la diversité considérable des phénomènes physiques, chimiques, dynamiques et électroniques se déroulant à l'échelle nanométrique [10, 15, 121]. Les découvertes des propriétés des monocouches auto-assemblées (S.A.M.s : *Self-Assembled Monolayers*) ont souligné l'utilité fondamentale des processus d'organisation bidimensionnelle pour des applications telles que l'adhérence, la lubrification, ou l'élaboration de nouveaux objets moléculaires à l'échelle nanométrique [42]. Ces phénomènes ont largement été étudiés durant la dernière décennie, permettant la détermination d'une quantité de structures. En particulier, les monocouches d'alcane-thiols sur or (voir section 3.3) ont été l'objet de recherches intensives, étant donné qu'elles représentent un système modèle dans l'étude des interactions moléculaires [122, 123]. A la surface d'Au(111), leur structure consiste en des molécules liées à l'or par l'atome de soufre. La chaîne alcane se tient dans une position verticale et forme une couche dense. Elle est inclinée d'environ 30° par rapport à la normale à la surface [124]. Les couches physisorbées en surface et aux interfaces ont également progressivement attiré l'attention.

Dans ce contexte, l'interface liquide/solide convient particulièrement pour la formation de structures organisées [86, 120, 125]. Depuis les premières expériences pionnières sur de tels systèmes, une connaissance considérable a été acquise. Les chercheurs ont révélé que les couches formées possédaient un haut degré d'organisation. Par exemple, des alcanes et alcools adsorbés sur du graphite tendent à adopter, dans la plupart des cas, une conformation all-trans au sein d'une structure lamellaire, leur axe moléculaire étant parallèle au substrat de graphite [91, 92, 13]. Les interactions intermoléculaires et molécule-substrat sont les facteurs principaux, contrôlant ce phénomène d'organisation [93].

Dans ce cadre, les techniques "nanoscopiques", telles que la S.T.M., ont permis la détermination de ces structures à l'interface liquide/solide [126, 127, 128]. De plus, en étendant la technique des pointes S.T.M. modifiées chimiquement à une variété plus large de molécules adsorbées sur substrat, nous pourrions développer un outil permettant la distinction de fonctions parmi toute une variété d'adsorbats différents [114].

Dans cette section, nous rapportons les résultats obtenus en microscopie à effet tunnel à balayage sur des couches d'acide gras (l'acide palmitique et l'acide laurique, figure 3.9A et 3.9B, respectivement) physisorbées sur une surface de graphite à partir d'une solution (phényloc-

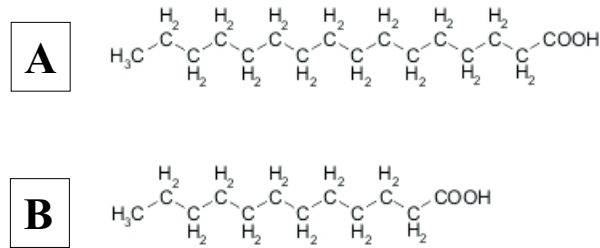


FIG. 3.9 – Structure chimique de (A) l'acide palmitique et (B) l'acide laurique.

tane, proche de la saturation), sous conditions ambiantes. Les détails concernant les produits utilisés sont exposés en annexe B. Les pointes S.T.M. en or ont été modifiées chimiquement afin d'étudier leur effet sur le courant tunnel, mais également sur le contraste observé sur le groupement fonctionnel. Ceci nous permettra également de comparer les images obtenues sur les esters et exposées à la section précédente. Plus précisément, les pointes en or sont fonctionnalisées avec une couche auto-assemblée d'acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA) et de 4-mercaptotoluène (4-MT). La comparaison des images obtenues avec ces deux types de fonctionnalisation de pointe révèle la position du groupement carboxylique au sein de la molécule. Les mesures obtenues à l'aide de pointes en Pt/Ir non modifiées sont également présentées et serviront de référence.

3.2.1 Organisation bidimensionnelle

La figure 3.10 présente une image S.T.M. typique de couches d'acide palmitique obtenue à l'aide d'une pointe en Pt/Ir. Des résultats reproductibles sur ces structures périodiques sont facilement visibles à l'aide de ce type de pointe. Les molécules adsorbées s'auto-organisent, produisant une couche structurée sur de grandes zones. Un assemblage côte-à-côte de lamelles forme cette couche. Ces lamelles se répètent tous les 2.3 nm environ, ce qui correspond assez bien à la longueur d'une molécule. Chaque lamelle semble être formée d'un arrangement compact de bâtonnets parallèles, orientés perpendiculairement par rapport aux sillons. Nos images S.T.M. mettent également en évidence que les bâtonnets sont composés de deux parties : l'une est une bande claire et l'autre est une région sombre (se situant entre deux bandes claires).

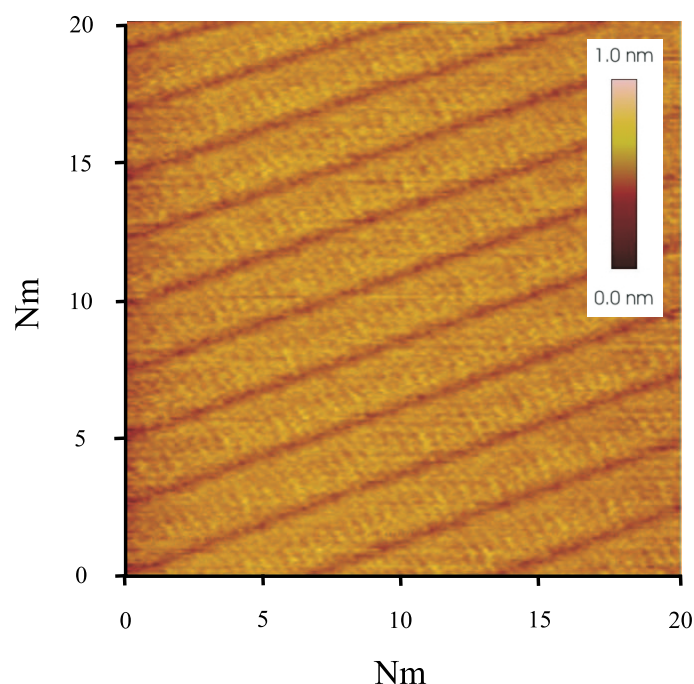


FIG. 3.10 – Image S.T.M. de l'acide palmitique à l'interface phényloctane/graphite obtenue à l'aide d'une pointe en Pt/Ir. (20 nm x 20 nm, 500 pA, -480 mV).

Discussion

De telles images d'acides gras obtenues à l'aide de pointes en Pt/Ir sont déjà présentes dans la littérature. *Hibino* et al. ont en effet rapporté des observations similaires sur des acides gras à l'interface phényloctane/graphite [129, 130]. Ils ont postulé que l'axe long des molécules se trouve couché sur le plan de graphite. Ils ont de plus déduit que la largeur de la bande claire correspond à la longueur de la chaîne alkyle de l'acide gras. Les régions sombres entre les bandes claires correspondent au groupement carboxyle. Leurs observations et déductions ont été confirmées par des expériences que nous avons réalisées sur de l'acide laurique (résultats non présentés). Sur base de ces constatations, *Hibino* et al. ont élaboré une structure modèle dessinée à la figure 3.11 [129]. Dans cette figure, la cellule élémentaire est représentée par un rectangle gris clair. Dans les images S.T.M., une paire de bâtonnets adjacents de bandes claires correspond à une chaîne alkyle en zigzag d'une molécule d'acide palmitique (chaque point clair dans le bâtonnet correspondant à un groupement CH_2 ou CH_3). Comme illustré à la figure 3.11, l'organisation des molécules d'acide gras sur le

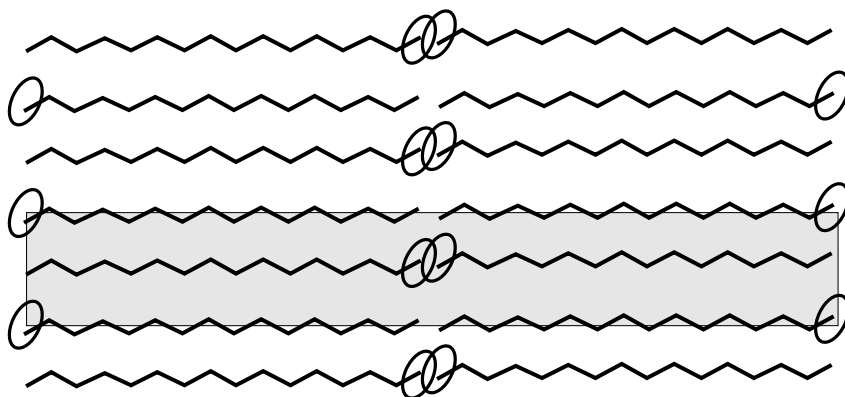


FIG. 3.11 – *Modèle d'adsorption de l'acide palmitique sur du graphite H.O.P.G. [129]. Dans ce modèle, les chaînes hydrocarbonées et les cercles creux représentent respectivement les chaînes alkyles et les groupes carboxyles.*

H.O.P.G. forme une structure interconnectée, favorisée et stabilisée par les liaisons hydrogènes entre groupements carboxyles des molécules se trouvant face-à-face. Ce modèle sera validé par les résultats obtenus à l'aide de pointes S.T.M. fonctionnalisées présentés ci-dessous.

3.2.2 Position du groupement carboxylique

Des pointes S.T.M. en or fonctionnalisées par du 4-MBA sont appliquées pour l'observation de couches structurées d'acide laurique. Pour rappel, les pointes modifiées chimiquement peuvent être employées à l'identification de groupements fonctionnels difficilement visibles autrement [17]. Ce phénomène a été expliqué comme une augmentation du nombre d'électrons passant par effet tunnel via le recouvrement des fonctions d'onde électroniques, et ceci grâce à une interaction entre la pointe et l'échantillon [110, 111, 113, 114].

La figure 3.12A montre une image S.T.M. typique de couches d'acide gras à l'interface phényloctane/graphite obtenue à l'aide d'une pointe en or modifiée avec du 4-MBA. Les couches auto-assemblées s'organisent en structures lamellaires. Les sillons séparant ces lamelles se répètent tous les 2.1 nm. De plus, les lamelles semblent être formées d'un arrangement compact de bâtonnets parallèles, orientés perpendiculairement aux sillons. Dans chaque lamelle, des bâtonnets individuels peuvent être distingués. Il est ici possible d'évaluer le nombre de points clairs formant ces bâtonnets : entre 6 et 7. Le contraste et les structures observées sont similaires à celles présentées à la figure 3.10, et

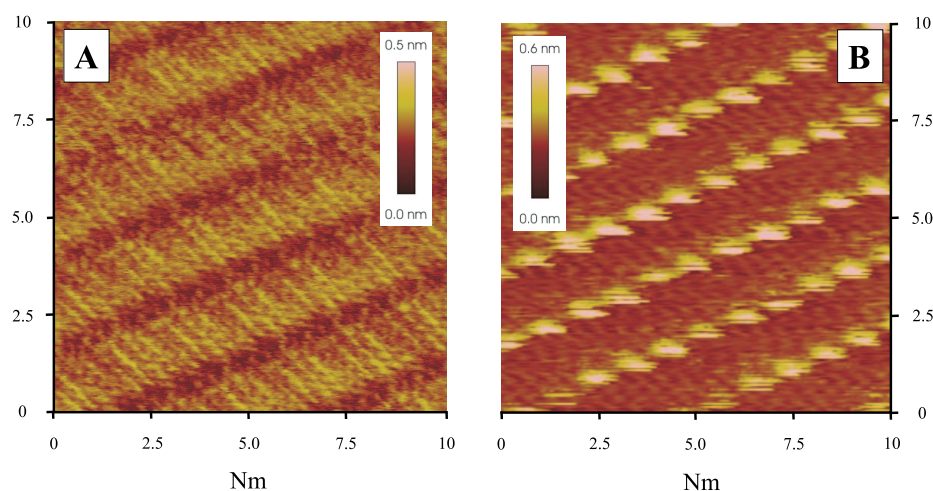


FIG. 3.12 – Image *S.T.M.* de l'acide laurique à l'interface phényloctane/graphite (A) obtenue à l'aide d'une pointe en or modifiée avec du 4-MBA (10 nm x 10 nm, 585 pA, -520 mV), (B) obtenue à l'aide d'une pointe en or modifiée avec du 4-MT. (10 nm x 10 nm, 710 pA, -765 mV)

modélisées à la figure 3.11. Bien évidemment, les pointes en or modifiées chimiquement avec du 4-MBA ont un pouvoir de résolution plus important. En effet, la rugosité semble être plus élevée avec des pointes modifiées.

Des pointes en or modifiées avec du 4-MT nous ont permis d'observer une structure telle que celle présentée à la figure 3.12B. Ces structures semblent uniformément visibles sur de larges domaines à la surface de l'échantillon. Des lamelles adjacentes forment toujours la couche moléculaire et ont une largeur mesurée de 1.9 nm. Les bâtonnets constituant ces lamelles sont orientés perpendiculairement à la direction des sillons. Cependant, un point clair apparaît dans le sillon, à la position du groupement carboxylique. Ces points clairs sont organisés en ligne dans le sillon interlamellaire. Ce contraste observé est indépendant de l'angle de balayage ou de la tension appliquée. Ils ont été reproduits à plusieurs reprises. D'autres analyses ont été effectuées sur d'autres acides gras, i.e. acide palmitique et acide palmitoléique (données non présentées). Les images obtenues sur ces molécules sont similaires à celles obtenues sur de l'acide laurique.

Discussion

Les résultats présentés aux figures 3.12A et 3.12B tendent à confirmer le modèle présenté à la figure 3.11. De plus, ces images démon-

trent qu'une molécule chimique différente utilisée pour fonctionnaliser la pointe (4-MBA ou 4-MT) fournit un contraste différent dans l'image S.T.M., à la position du groupement carboxyle. Des points sombres avec des pointes en or modifiées par du 4-MBA et des points clairs avec des pointes en or modifiées par du 4-MT sont donc observés à la position du groupement carboxyle, qui est la seule partie réactive de la molécule.

Quel phénomène pourrait expliquer cette inversion de contraste à la position du groupement carboxyle ? Des résultats expérimentaux antérieurs ont démontré que l'adsorption d'atomes ou molécules sur une pointe S.T.M. modifie la structure de la pointe et/ou les états électroniques, et dès lors, les images S.T.M. et leur contraste [113]. *Umezawa* et al. ont expliqué une telle modification de contraste comme une conséquence de la formation de liaisons hydrogènes entre le groupement fonctionnel sur la pointe et l'échantillon, rendant plus aisé le passage des électrons par effet tunnel [110, 111, 113, 114]. En suivant cette interprétation, nous pouvons considérer que les interactions entre le groupement carboxyle sur l'échantillon et alkyle "sur la pointe (4-MT)" facilite le passage des électrons par effet tunnel via le recouvrement des fonctions d'onde électroniques, ce qui n'est pas le cas pour le groupement carboxyle sur l'échantillon et carboxyle "sur la pointe (4-MBA)". Cependant, une interaction chimique entre la pointe et l'échantillon n'est probablement pas la seule cause des différences observées dans les contrastes des images. En effet, il est possible que la relaxation des atomes, due aux forces chimiques en présence, réduise la distance entre les deux électrodes, ayant pour effet secondaire d'augmenter le courant tunnel. L'effet tunnel résonnant entre le groupement fonctionnel sur la pointe et la couche moléculaire adsorbée sur le graphite peut aussi être considéré pour expliquer les variations de contraste, comme développé par *Tao* [131].

3.2.3 Résumé

En résumé, nous avons obtenu des images S.T.M. de structures bidimensionnelles d'acides gras à l'interface phényloctane/graphite à l'aide de quatre types de pointes différentes. Les structures imagées sont toutes similaires et reproductibles. Ces couches consistent en des paires de molécules couplées par liaisons hydrogènes et couchées sur le substrat de graphite. Les différentes fonctionnalisations de pointes, induisant différents contrastes en S.T.M., ont mis en évidence la position du groupement carboxylique, qui est la seule partie réactive de la molécule.

3.3 Les alcanethiols

Une méthode scientifique répandue dans les laboratoires de recherche consiste à tenter de comprendre certains phénomènes macroscopiques en étudiant les principes microscopiques à leur origine. Par exemple, l'adhérence, le frottement, la biocompatibilité, le mouillage,... font partie intégrante de cette classe de processus sujets à de telles investigations.

Ces études nécessitent l'utilisation de surfaces modèles, chimiquement et structurellement bien définies, de films minces (voire de monocouches), pour lesquels divers paramètres peuvent être systématiquement modifiés et caractérisés. De plus, la possibilité de contrôler les propriétés physico-chimiques des surfaces est d'un grand intérêt en regard des éventuelles applications, en particulier dans le cadre du développement de nouveaux capteurs biologiques. Malheureusement, rien n'est jamais simple et plusieurs difficultés apparaissent, dont la principale réside dans la disponibilité relativement limitée de telles surfaces. Des échantillons fortement organisés sont en effet difficiles à obtenir.

Dans ce cadre, les monocouches auto-assemblées (S.A.M.) constituent une alternative intéressante. De manière générale, le terme de "monocouches auto-assemblées" englobe les couches moléculaires formant, de manière spontanée, des structures organisées sur un substrat. Ceci regroupe donc les couches organisées à l'interface liquide-solide, présentées dans les sections précédentes. Ce terme reprend également d'autres types de monocouches, notamment les couches moléculaires liées chimiquement au substrat. Elles se forment spontanément lors de l'immersion d'un substrat approprié dans une solution contenant un surfactant actif dans un solvant organique, ou bien par adsorption en phase vapeur de molécules actives sur le substrat. De nombreux types de molécules peuvent être utilisés dans ce processus, incluant les organosilanes sur des surfaces d'oxyde d'aluminium ou de silicium, par exemple.

Parmi ces systèmes de monocouches auto-assemblées, les plus intensivement étudiées sont les couches d'alcanethiols, sur Au(111) plus particulièrement [132] (bien que d'autres métaux tels que l'argent et le nickel soient également utilisés comme substrat [72]). L'intérêt suscité par ces systèmes provient de la possibilité de produire des monocouches hautement organisées et fortement liées, représentant un système modèle pour l'étude des interactions intermoléculaires. Elles présentent également un attrait certain en vue d'applications technologiques utilisant le contrôle et la modification des propriétés de surface telles que l'adhérence, la lubrification et l'inhibition de la corrosion [133].

Dans les sections suivantes, nous nous intéresserons donc à différentes molécules thiolées déposées sur des substrats d'Au(111). Dans un premier temps, nous exposerons les résultats obtenus sur des alcanethiols comprenant dix atomes de carbone. Dans la section suivante, nous nous attarderons plus particulièrement à la liaison avec le substrat, en analysant des thiocyanates. Mais avant d'interpréter les résultats obtenus, synthétisons les différentes connaissances acquises sur ces S.A.M.s d'alcanethiols.

3.3.1 Le processus d'auto-assemblage

Des monocouches auto-assemblées d'alcanethiols peuvent être réalisées de diverses manières, incluant notamment le dépôt à partir d'une solution ou d'une phase gazeuse. La méthode traditionnellement utilisée est le dépôt en solution. Le système-modèle que représentent les alcanethiols sur Au(111), en utilisant typiquement une solution d'éthanol ou d'hexane avec des concentrations allant du micromolaire au millimolaire, a été intensivement étudié par de nombreux groupes de recherche [123].

La formation de ces couches peut être considérée comme un processus en deux étapes : d'abord, une liaison chimique des molécules au substrat, suivie par un auto-assemblage favorisé par la diffusion thermique et les interactions de *van der Waals* entre les chaînes hydrocarbonées. Il est fréquemment admis que la première étape d'adsorption aboutit à un recouvrement de surface de ~ 80 à 90 %, après typiquement seulement quelques minutes et pour des concentrations usuelles ($\sim 10^{-3}$ M). Après cela, l'organisation progresse à une vitesse beaucoup plus lente [123].

Les cinétiques d'adsorption des alcanethiols sur Au(111) sont également étudiées à l'échelle moléculaire par S.T.M. et A.F.M. Les images obtenues confortent le mécanisme proposé ci-dessus. Dans les étapes plus avancées de la croissance, un effet de réorganisation à long terme des chaînes alkyles fut découvert [134]. La question des effets à long terme dans le processus organisationnel a aussi été récemment investiguée en détail par spectroscopie non-linéaire [135]. Ces études ont abouti à la distinction d'une troisième étape dans ce processus d'auto-assemblage. Celle-ci est rattachée à la réorientation des groupements terminaux, régissant la formation (disparition) des défauts gauches ¹³.

Finalement, des effets à long terme dans la croissance et la coalescence d'îlots d'hexadecanethiols ont été suivis par A.F.M. [136]. Il a été

¹³Défauts structuraux modifiant la direction de la liaison du groupement terminal.

observé que, sur une échelle de temps allant de quelques heures à plusieurs jours, les îlots subissent un processus de coalescence conduisant à la formation d'îlots plus larges, mais moins nombreux. Durant cette diffusion, les molécules tendent à rester sur la même terrasse, évitant de traverser les marches atomiques. Cet accroissement d'îlots est associé à la densification de la couche et à la disparition des défauts [123].

3.3.2 Energétique et cinétique

La structure des couches auto-assemblées d'alcanethiols résulte de l'effet de diverses interactions. Ces dernières, ainsi que leurs importances relatives, sont cruciales lors du processus d'auto-assemblage. Les forces déterminant la structure de ces monocouches peuvent être groupées en trois catégories : les interactions entre les groupements thiols des molécules et les atomes d'or de la surface (reprenant l'adsorption et la rugosité), les forces de dispersion entre les chaînes alkyles moléculaires et les interactions entre groupements terminaux (énergie conformationnelle) [137]. Elles sont énumérées et détaillées ci-dessous :

- **L'interaction molécule-substrat : L'adsorption.**
L'énergie d'interaction molécules-substrat ou énergie d'adsorption est la plus forte de toutes les interactions. Cette énergie d'adsorption, représentant la différence d'énergie entre une molécule libre et un état adsorbé, est associée à la chimisorption.
- **L'interaction molécule-substrat : La rugosité.** La rugosité du substrat se réfère à la différence entre les divers sites d'adsorption. La surface d'or est dense et sa distribution électronique très lisse. On s'attend donc à une faible rugosité.
- **L'interaction chaîne-chaîne.** Pour des taux de recouvrement élevés, l'interaction chaîne-chaîne devient de plus en plus importante et finalement, joue un rôle crucial dans le confinement des molécules.
- **Energie conformationnelle.** Le coût énergétique d'un défaut gauche dans une chaîne hydrocarbonée est d'environ 0.022 eV. Celui-ci peut donc être thermiquement activé à température ambiante et conférer à la molécule une certaine flexibilité.

3.3.3 Organisation bidimensionnelle

La structure des alcanethiols sur Au(111) est encore actuellement le sujet de recherches intensives, utilisant notamment les méthodes diffractométriques [138], mais aussi la microscopie à effet tunnel à balayage [137, 139]. En effet, les S.T.M., munis de dispositifs électroniques permettant la mesure de courants de l'ordre du picoampère, ont permis

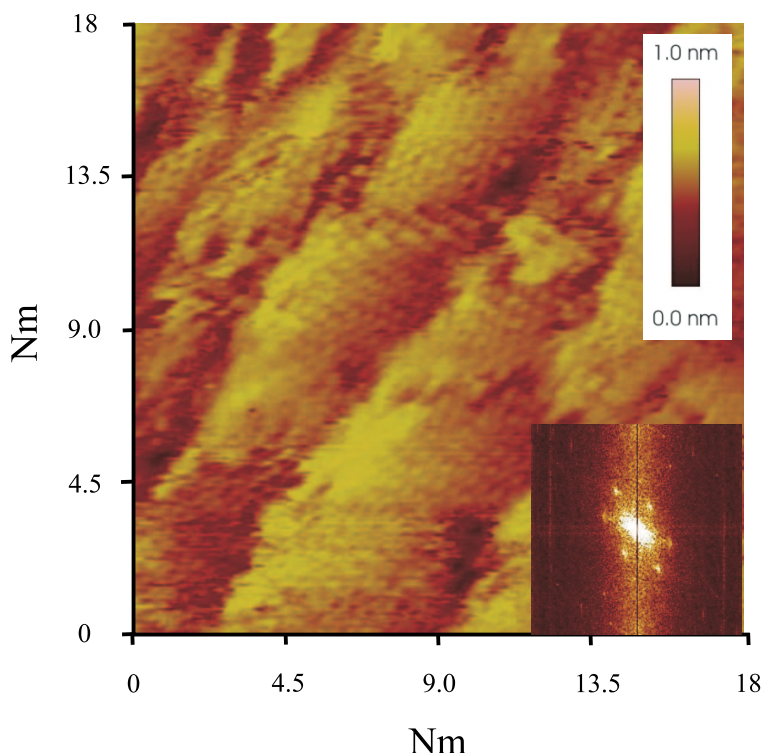


FIG. 3.13 – Image *S.T.M.* de la structure $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ du DT sur *Au(111)*, obtenue avec une pointe en *Pt/Ir*. (18 nm x 18 nm, 11 pA, -950 mV). Encadré : Transformée de Fourier de l'image.

l'obtention d'informations sur la structure, la stabilité et la dynamique, à l'échelle moléculaire, de telles monocouches [138].

A l'échelle nanométrique, les images obtenues sur du n-décane-thiol (DT) sur *Au(111)* se présentent comme à la figure 3.13. Cette image montre des terrasses sur lesquelles l'organisation moléculaire du DT peut être distinguée. La distance séparant deux molécules adjacentes est évaluée à 0.55 nm. Une analyse précise de cette structure, basée sur une transformée de Fourier à deux dimensions (encadré de la figure 3.13), révèle la structure de la monocouche. Dans cette figure, nous pouvons en effet voir apparaître les six points correspondant aux fréquences du réseau de la monocouche. Ceci nous indique que la structure observée du décane-thiol sur *Au(111)* semble être un réseau $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$. La distance intermoléculaire mesurée correspond de plus assez bien à la valeur théorique attendue (0.5 nm) [123].

Cette structure $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ a pour la première fois été observée par *Widrig* et al. [140]. Elle dispose les chaînes alkyles de manière totalement étendues dans une conformation *all-trans*. Cependant, la distance

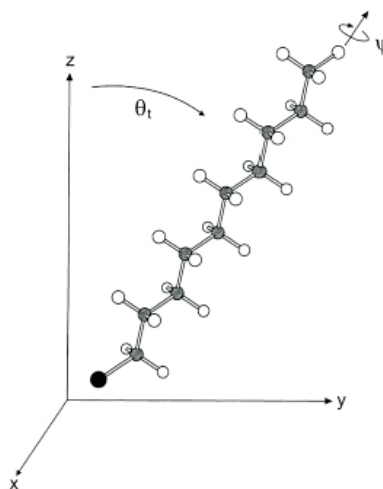


FIG. 3.14 – Représentation schématique des degrés de liberté d'une molécule d'alkanethiol, liée au substrat via un groupement thiol (sphère noire), avec une chaîne alkyle totalement étendue. L'angle θ_t se réfère à l'angle d'inclinaison par rapport à la normale au substrat, qui est d'environ 30° . L'angle ψ définit l'angle de torsion de l'axe moléculaire, d'environ 52° [123].

entre les atomes de soufre sur l'Au(111) ($4.97 \text{ \AA}$) est plus grande que le diamètre de *van der Waals* de la chaîne hydrocarbonée en configuration *all-trans* ($4.2 \text{ \AA}$). Afin de maximiser l'interaction intermoléculaire de *van der Waals*, l'axe de chaque molécule s'incline donc d'environ 30° par rapport à la normale au substrat [123]. La chaîne alkyle présente également une torsion d'environ 52° , définie par le zig-zag de la structure des atomes de carbone du squelette moléculaire [132]. Un schéma de cette organisation est présenté à la figure 3.14.

Le microscope à effet tunnel à balayage, comme nous venons de le voir, fournit des informations sur la structure des monocouches, dans l'espace réel. Cependant, le mécanisme de contraste impliqué dans la S.T.M. sur alkanethiols a été sujet à - et est toujours en cours de - discussion dans la littérature. Les expériences S.T.M. initiales sur des S.A.M.s de thiols sur Au(111) ont été réalisées avec des courants relativement élevés (étant donné les limitations techniques de l'époque). La pointe S.T.M. pénétrait dès lors considérablement dans la monocouche. Les données enregistrées correspondaient très probablement à des images des états électroniques de la surface d'or perturbée par les groupements sulfures de l'adsorbat [63]. Cette dernière décennie, des

expériences S.T.M. ont été réalisées avec des courant tunnels beaucoup plus faibles. Les résultats obtenus indiquent que les états électroniques de la chaîne alcane, aussi bien que la fonction terminale, contribuent au mécanisme de contraste. Il semble cependant toujours y avoir un effet de contact ou de pénétration dans la couche auto-assemblée [63].

3.3.4 Résumé

Les alcanethiols sur Au(111) constituent un système-modèle pour l'étude des interactions intermoléculaires. L'imagerie par S.T.M. de molécules de DT sur Au(111) est maintenant chose aisée sous ultra-haut vide (U.H.V.). La résolution atomique sur de telles couches, déposées en milieu liquide, imagées à l'air et à température ambiante, sur des substrats d'or fournis commercialement, constitue, en soi, une véritable prouesse technique. Nous avons ainsi pu identifier la structure $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ adoptée par les molécules de DT.

3.4 Les thiocyanates

Les couches auto-assemblées d'alcanethiols, telles que présentées précédemment, sont au centre de nombreuses recherches depuis de longues années. Vu leur capacité à produire des couches fortement organisées, pour lesquelles l'adhérence, la stabilité chimique et les propriétés mécaniques peuvent être contrôlées, elles ont largement été utilisées dans des applications aussi diverses que l'élaboration de dispositifs électroniques moléculaires et biomoléculaires, l'inhibition à la corrosion, l'élaboration de surfaces biocompatibles ou l'immobilisation de matériel biologique, y inclus des cellules et tissus.

Malheureusement, ces alcanethiols présentent aussi d'importants inconvénients. Ils ont en effet parfois tendance à s'oxyder en disulfures. De plus, les α,ω -dithiols, prompts à polymériser aussi bien en solution que sur une surface, forment plutôt des multicouches. Récemment, *Ciszek* et al. ont montré que des thiocyanates organiques peuvent combler les limitations sus-mentionnées. Ils constituent dès lors une alternative appropriée à l'utilisation d'alcanethiols dans des assemblages thiolates [141]. En effet, les auteurs révèlent les importants avantages des thiocyanates : stabilité chimique exceptionnelle, pas de polymérisation disulfure, pas de formation de multicouches et facilité de synthèse de la fonction SCN. Ils ont de plus caractérisé leurs couches de thiocyanates sur des substrats d'or. Ils en ont déduit que l'assemblage de ces molécules est moins dense que celui associé à des alcanethiols de même longueur [141].

Le processus d'adsorption des thiocyanates est décrit par *Ciszek* comme une réduction du thiocyanate (catalysée par la surface) pour produire du CN et du S lié de manière covalente à la surface [141]. Ils suggèrent également que le groupement cyanure puisse quitter la surface sous la forme d'une espèce $[Au(CN)_2]^-$, conduisant à une couche d'assemblage thiolate, comme décrit à la figure 3.15.

Au cours de ce travail, nous avons étudié une molécule possédant le même nombre de groupements méthylènes ainsi que le même groupement terminal que le décanethiol étudié précédemment : le décylthiocyanate [DTCN : $CH_3-(CH_2)_9-SCN$]. En plus des connaissances au niveau fondamental qui peuvent être déduites de ces expériences, l'objectif est de déduire des informations complémentaires sur l'assemblage des thiocyanates et de les comparer à celles obtenues sur des alcanethiols, en utilisant la microscopie à effet tunnel à balayage.

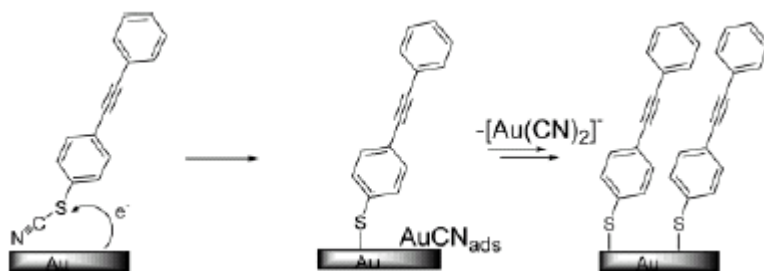


FIG. 3.15 – Mécanisme d'assemblage des thiocyanates sur $Au(111)$, proposé par Ciszek et al. [141].

3.4.1 DTCN sur $Au(111)$

Les monocouches de thiocyanates sont réalisées en immergeant un substrat d'or dans une solution $10^{-3}M$ de DTCN dans de l'éthanol durant au moins 18 heures. L'image S.T.M. de molécules de DTCN adsorbées sur $Au(111)$, présentée à la figure 3.16, expose une organisation totalement différente de celle du DT. Malgré un nombre important d'essais, aucune résolution atomique n'a jamais été atteinte sur ces échantillons. Différentes conditions d'opération et différentes méthodes de préparation des échantillons (temps d'immersion et concentration des solutions) ont été testées, mais en vain. Les images S.T.M. obtenues ont toujours été similaires à celle présentée. Cette image a été réalisée dans les mêmes conditions d'opération et de préparation que pour celle présentant le décanethiol (figure 3.13). Un dépôt recouvrant le substrat d'or caractérise cette image. La figure 3.16 met en évidence la moins bonne organisation des couches de DTCN par rapport à celles de DT.

Les chaînes d'alcanethiols sont connues pour former des couches auto-assemblées sur différents substrats métalliques à l'aide d'une liaison thiolate entre l'atome de soufre et les atomes du substrat. Ce n'est pas aussi clair dans le cas des chaînes thiocyanates. En effet, des mesures X.P.S. (réalisées par Dr *P. Louette*) indiquent un assemblage thiolate de DTCN à la surface de l'or. L'analyse des intensités des modes de vibrations des groupements méthylènes du DTCN, obtenues par S.F.G. (réalisées par Dr *L. Dreesen*), montrent que ces molécules forment une monocouche auto-assemblée avec un ordre et un assemblage plus faible que les molécules de DT (dans les mêmes conditions) [20]. Ceci vient confirmer les déductions issues de nos images S.T.M.

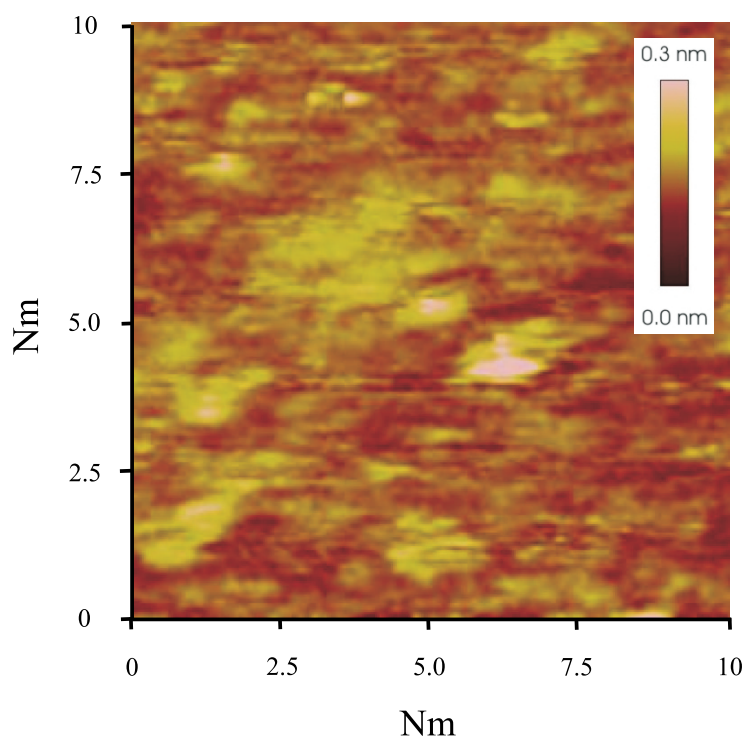


FIG. 3.16 – Image *S.T.M.* de la structure du DTCN sur $Au(111)$, obtenue avec une pointe en Pt/Ir . (19 nm x 19 nm, 11 pA, 975 mV).

3.4.2 Résumé

En conclusion, les images, reproduites à plusieurs reprises sur différents échantillons, obtenues sur le décyl thiocyanate montrent une couche moléculaire présentant un ordre et un assemblage plus faible que les molécules de DT. Ces déductions ont été confirmées par d'autres techniques [20]. Des expériences similaires ont également été réalisées sur les mêmes molécules, mais assemblées sur des substrats de $Pt(111)$ [142].

Chapitre 4

L'acide désoxyribonucléique

Résumé

L'acide désoxyribonucléique, ou A.D.N., est une molécule que l'on retrouve dans tous les organismes vivants. Il est présent dans le noyau des cellules eucaryotes, dans les cellules procaryotes, mais également dans les mitochondries et les chloroplastes. Au sein même des formes de vie les plus simples, les virus par exemple, jusque dans les milliards de cellules constituant l'être humain, l'A.D.N. est à l'origine de processus biologiques aboutissant à l'élaboration des protéines. La fonction la plus importante de cette macromolécule est qu'elle constitue le support de l'hérédité. Elle possède la propriété de se dupliquer et d'être transmise aux descendants lors de la reproduction des organismes. Malheureusement, des dégradations et altérations de l'A.D.N. peuvent survenir et conduire à la formation de maladies génétiques. La science moderne, avec l'avènement de la thérapie génique, ouvre de nouvelles voies de guérison pour ces maladies. Dans ce cadre, les techniques de condensation de l'A.D.N. constituent des étapes cruciales en vue de l'élaboration de transporteurs de gènes au sein des cellules. Ces vecteurs ont pour objectif d'emmener les acides nucléiques à l'intérieur du noyau des cellules cibles. Ces acides nucléiques peuvent coder un gène supposé se substituer à un gène muté déficient ou un gène suicide, par exemple. Pour vectoriser l'A.D.N., on peut faire appel à des vecteurs viraux ou synthétiques. Parmi ces derniers, signalons les polymères polycationiques qui forment des polyplexes avec l'A.D.N. C'est à ces polyplexes que nous nous intéresserons dans ce chapitre. Nous tenterons de déterminer si les propriétés physiques des condensats formés jouent un rôle dans le mécanisme de transfection, afin d'en améliorer le processus. Auparavant, nous détaillerons la structure et les propriétés de cette molécule de la vie qu'est l'A.D.N.

4.1 Historique

L'histoire de l'acide désoxyribonucléique débute en 1869, date à laquelle *Fritz Miescher* découvre une substance acide, la “nucléine”, au coeur même du noyau des cellules. Cinquante ans plus tard, en 1920, *P.A. Levine* observe que cette substance (en fait, l'A.D.N.) est composée d'un sucre, d'un phosphate et d'une combinaison de bases puriques et pyrimidiques [143]. Les éléments constitutifs de l'A.D.N. étaient maintenant connus. Il restait à en déterminer sa structure et son rôle dans l'organisme.

Concernant le rôle de l'A.D.N., il faut attendre 1928. En effet, à cette époque, le scientifique anglais *Fred Griffith* (1877 - 1941) met en évidence le processus de transformation bactérienne, ouvrant ainsi la voie à l'identification du support de l'hérédité [144]. Il travaille alors sur les souches (appelées souches *R* et *S*) d'un pneumocoque, le *Diplococcus pneumoniae*. Ces souches se différencient, entre autres, par leur caractère létal (*S*) ou non (*R*) sur la souris. *Griffith* observe que la souche inoffensive, au contact de la souche mortelle (dont les individus ont été tués), acquiert le caractère pathogène. Ce phénomène fut appelé la *transformation bactérienne*. Ces constatations laissèrent suggérer l'existence, chez les cellules bactériennes, d'un “facteur transformant”, susceptible d'être intégré par d'autres bactéries et leur conférant, de façon héréditaire, de nouvelles propriétés génétiques [144].

La nature du “facteur transformant” ne sera cependant élucidée que plus de dix ans après par *Avery, MacLeod* et *McCarty* [145, 146]. En 1944, *Oswald Avery* et ses collaborateurs découvrent que ce facteur n'est autre que l'A.D.N. La transformation des bactéries *R* s'effectue donc par incorporation de fragments d'A.D.N. provenant des bactéries *S* tuées. Cette découverte est cependant beaucoup trop révolutionnaire pour l'époque et la communauté scientifique n'accepte pas facilement l'hypothèse de l'A.D.N. comme support de l'hérédité.

L'importance fondamentale des travaux réalisés par *Avery* ne sera reconnue que tardivement. Certains scientifiques, comme *E. Chargaff*, ont cependant saisi immédiatement la portée immense de ces travaux. Ce dernier se consacre alors totalement à l'étude des acides nucléiques. Ses travaux contribuent à répandre l'idée que l'A.D.N. puisse être une molécule porteuse de l'information génétique. *Chargaff* montre, en outre, que le rapport cytosine/guanine (C/G) et adénine/thymine (A/T) est constant et quasiment égal à un chez toutes les espèces étudiées [147, 148, 149]. Ces résultats sont connus sous le nom de “règles de *Chargaff*”. Ces règles seront déterminantes pour l'élaboration du modèle de la structure de l'A.D.N. par *Watson* et *Crick* quelques années plus tard.

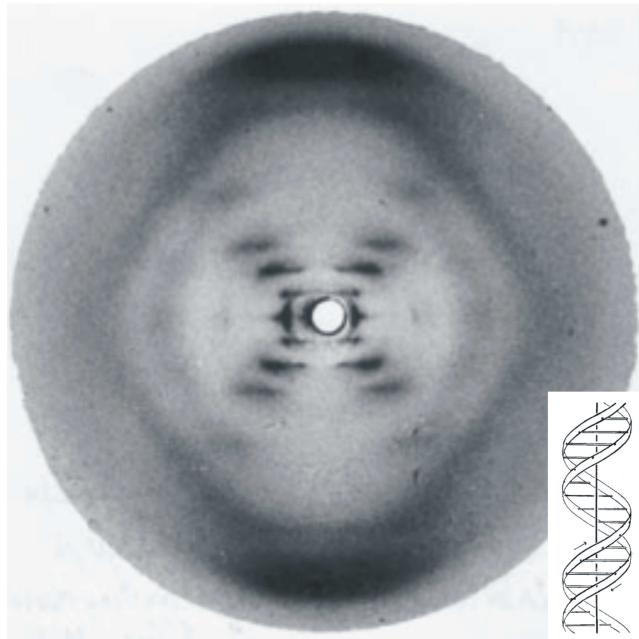


FIG. 4.1 – Radiographie d'A.D.N. obtenue par diffraction de rayons X par Rosalind Franklin en 1952 [150]. Encadré : Structure en double hélice proposée par Watson et Crick en 1953 [151].

Pour la structure de l'A.D.N. précisément, tout s'accélère début des années 50. En effet, en 1951, *Rosalind Franklin*, une jeune physico-chimiste travaillant à l'unité de biophysique du *King's College* de *London*, identifie deux formes d'A.D.N. [152]. Un an plus tard, début 1953, *Franklin* présenta de magnifiques clichés de diffraction de rayons X (figure 4.1) [150]. Elle en déduit alors dans son cahier de rapport que l'A.D.N. présente une structure en doubles brins, les groupements phosphates étant tournés vers l'extérieur [153]. Au même moment, *Watson* et *Crick* élaborent un modèle tridimensionnel de l'A.D.N. en hélice double (encadré de la figure 4.1) [151, 154, 155]. Ce modèle de structure n'a été conçu que sur base de la composition chimique de l'A.D.N. (désoxyribose, bases azotées et groupements phosphates), des clichés de diffraction d'A.D.N. cristallisé (principalement dus à *Rosalind Franklin* et *Maurice Wilkins* [156, 150]), des travaux d'*Erwin Chargaff* (montrant que $A/T \sim G/C \sim 1$ [147]) et de clichés de microscopie électronique (indiquant un diamètre moléculaire de 20 Å, supposant l'existence d'une double chaîne désoxyribose-phosphate). Cette structure, à l'heure actuelle connue de tous, est devenue l'emblème de la biologie moléculaire : deux brins constitués de chaînes sucre-phosphate forment une double hélice (où les orientations de chacun des brins sont oppo-

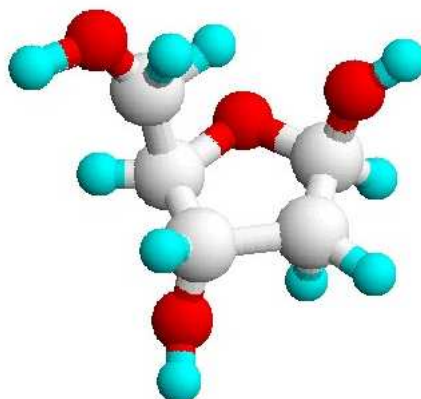


FIG. 4.2 – *Structure du désoxyribose de l'A.D.N.* Les sphères grises, rouge et bleues représentent des atomes de carbone, d'oxygène et d'hydrogène, respectivement.

sées). Les sucres de chacun des brins portent les bases azotées, chaque base d'un brin étant maintenue en vis-à-vis d'une base de l'autre brin par des liaisons hydrogènes (la cytosine en face de la guanine, l'adénine en face de la thymine). *Crick*, *Watson* et *Wilkins* reçurent en 1962 le prix *Nobel* pour leurs travaux, qui ont été qualifiés de “la plus grande réussite scientifique de notre siècle”.

4.2 La structure de l'A.D.N.

Les acides nucléiques, comme l'A.D.N. et l'A.R.N. (acide ribonucléique) sont des polymères de nucléotides, “les polymères de la vie”. Avant même de détailler la structure tridimensionnelle de l'A.D.N., décrivons les nucléotides qui en sont les éléments constitutifs.

4.2.1 Nucléotides et bases azotées

Dès la fin des années 20, *Levine* (1869-1940) savait que l'A.D.N. contenait du phosphore, un sucre et des bases azotées. Ces molécules s'assemblaient pour former des nucléotides. Le sucre présent dans le nucléotide est un sucre à cinq atomes de carbone, le désoxyribose (figure 4.2). Les bases élémentaires de l'A.D.N. sont au nombre de quatre : l'adénine, la thymine, la cytosine et la guanine. Elles sont issues de deux grandes familles de composés chimiques : les purines et les pyrimidines. Les bases puriques, la 6-aminopurine ou adénine (A) et la

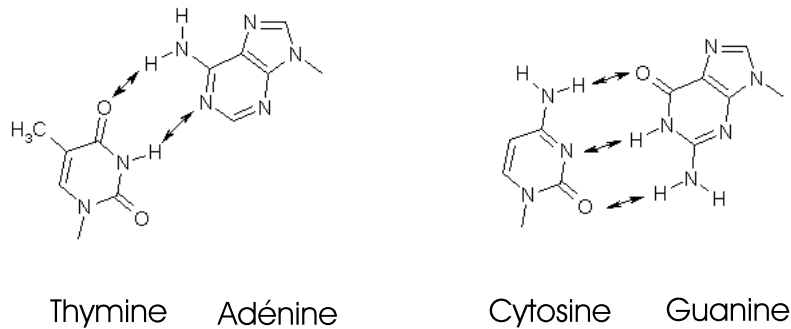


FIG. 4.3 – Structure des quatre bases de l'A.D.N. et de leur appariement.

2-amino,6-oxypurine ou guanine (G) (figure 4.3), dérivent du noyau hétérocyclique purine, constitué d'un double cycle avec cinq atomes de carbone et quatre d'azote. Les bases pyrimidiques, la 5-méthyluracile ou thymine (T) et la 2-céto, 4-aminopyrimidine ou cytosine (C) (figure 4.3), dérivent quant à elles du noyau pyrimidine, comprenant un cycle contenant quatre atomes de carbone et deux d'azote [144].

L'association d'une base et d'un sucre est appelé **nucléoside**. La liaison entre la base et le sucre est appelée liaison β -N-glycosidique. Dans les nucléosides dérivés des purines, la base est liée à l'atome de carbone 1' du sucre par son atome d'azote 9 (figure 4.4). A l'inverse, dans les nucléosides dérivés des pyrimidines, la base est liée au carbone 1' du sucre par son azote 1 (figure 4.4). Afin de réaliser un **nucléotide**, nous devons insérer un groupement phosphate au cinquième atome du sucre, le carbone 5' (figure 4.4) [80].

4.2.2 La double hélice

L'acide désoxyribonucléique est un polynucléotide. Dans cette macromolécule, les monomères, les nucléotides, se lient par des liaisons covalentes appelées liaisons phosphodiester. Ces liaisons unissent le phosphate d'un nucléotide avec le sucre du nucléotide suivant, et ainsi de suite. Cette structure aboutit à la formation d'un squelette de sucre-phosphate sur lequel sont accrochées les bases azotées (figure 4.4).

En réalité, les molécules d'A.D.N. se composent de deux chaînes polynucléotidiques enroulées en spirale pour former une double hélice. Dans cette structure, les squelettes des deux chaînes polynucléotides se trouvent sur la bordure extérieure de l'hélice. Les bases n'ayant pas toutes la même taille, *Watson* et *Crick* en déduisent qu'elles s'appariaient en couples purines-pyrimidines par les liaisons hydrogènes pour

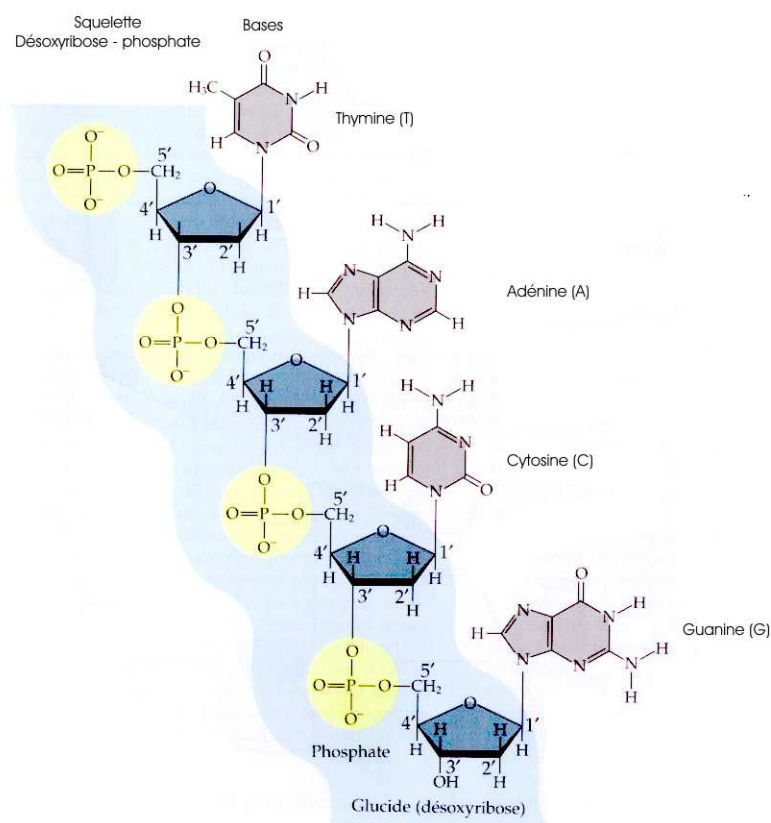


FIG. 4.4 – Structure chimique d'un brin d'A.D.N. [144].

respecter un diamètre constant de 2 nm. L'identification des couples A-T, C-G est obtenue à partir des règles de *Chargaff*.

Remarquons que les deux chaînes sont anti-parallèles. En effet, une est orientée dans la direction 3'-5' alors que l'autre, qui lui fait face, est orientée 5'-3'. Les deux chaînes sont aussi complémentaires [80]. Des travaux parallèles de *Franklin* ont permis de mettre en évidence les résultats suivants : les bases sont perpendiculaires à l'axe de l'hélice ; elles sont empilées à une distance de 0,34 nm ; un tour d'hélice contient 10,4 nucléotides (le pas d'hélice est donc de l'ordre de 3,4 nm) ; le diamètre de l'hélice est de l'ordre de 2 nm. La double hélice présente deux dépressions : une large, ou grand sillon et une étroite ou petit sillon. Leurs profondeurs sont sensiblement équivalentes et leurs largeurs de 1,14 et 0,6 nm.

4.3 Les rôles de l'A.D.N.

Chaque propriété fondamentale de la vie découle de la structure de l'A.D.N. La découverte de cette dernière a permis de comprendre sous quelle forme est stockée l'information dans la cellule, comment cette information est reproduite ou modifiée, et comment elle peut être traduite en caractéristiques physiques transmissibles à travers les générations. C'était bien "le secret de la vie" qu'avaient découvert *Crick* et *Watson* !

La structure même de l'A.D.N. lui confère plusieurs propriétés. Il remplit cependant deux rôles centraux. Premièrement, il maintient l'information génétique et est répliqué afin de transmettre cette information à toute nouvelle cellule. Deuxièmement, il contient une information codée qui est transmise à l'A.R.N.m (acide ribonucléique messenger), transcrit ensuite en protéines. De manière plus précise, l'A.D.N. constitue le matériel génétique de la cellule [157] :

Il détient l'information génétique propre à son espèce. En effet, l'ordre d'enchaînement des nucléotides constitue un message, une information permettant à la cellule d'assembler dans le bon ordre les acides aminés de ses protéines.

Il permet la reproduction. Lors de la division cellulaire, l'information est reproduite intégralement de façon à ce que chacune des deux cellules filles obtenues détienne l'ensemble de l'information présente dans la cellule-mère.

Il peut se modifier (mais pas trop). L'A.D.N. n'est pas une molécule d'une stabilité à toute épreuve. Des modifications accidentelles peuvent modifier le message. Un nucléotide, par exemple, peut être remplacé par un autre ce qui modifie le contenu de l'information et peut se répercuter sur la séquence en acides aminés de la protéine encodée avec des conséquences très variables (négligeables à catastrophiques). Ce sont ces modifications qui permettent l'évolution.

Il peut être traduit en caractéristiques physiques. Le message contenu dans l'A.D.N. doit pouvoir être "lu" par la cellule. Cette information doit pouvoir être utilisée et traduite en protéines dans le cas de l'A.D.N., en passant par un intermédiaire, l'A.R.N. messenger.

4.4 La condensation de l'ADN

Ces dernières années, les S.P.M. ont démontré leur incontestable utilité en biologie moléculaire structurale [158]. Dans ce cadre, l'A.F.M. tend cependant à être plus efficace que le S.T.M., étant donné sa capacité à imager des molécules biologiques isolantes, alors que le S.T.M. nécessite, au minimum, des échantillons faiblement conducteurs. L'A.F.M. a démontré toutes ses aptitudes à imager des structures biologiques molles telles que des cellules [159], des bactéries [160] ou des protéines [161]. Des molécules d'acide désoxyribonucléique, des plasmides en particulier, ont été fortement étudiées et des structures détaillées de ces molécules ont été mises en évidence grâce à cette technique [162, 163, 164, 165].

Récemment, le processus de condensation de l'A.D.N. a largement attiré l'attention des biologistes. En effet, le contrôle de la condensation de l'A.D.N. joue un rôle-clé dans le conditionnement de ce dernier. Le développement d'un vecteur de gènes efficace constitue en effet un défi majeur pour la thérapie génique. Il existe deux catégories de vecteurs d'acides nucléiques : les vecteurs viraux (rétrovirus, adénovirus,...) et les vecteurs synthétiques (lipides et polymères cationiques). Les vecteurs viraux semblent plus efficaces, mais peuvent induire une réponse immunitaire. En outre, les vecteurs rétroviraux posent le problème des mutations dites insertionnelles, c'est-à-dire dues à l'insertion du gène vectorisé dans le génome de la cellule transfectée [166, 167]. Afin d'éviter ces problèmes, des vecteurs non-viraux sont, bien que moins efficaces, toujours soumis à investigation dans de nombreux laboratoires. Il s'agit de lipides ou de polymères cationiques. Leur capacité à condenser l'A.D.N. semble unique pour augmenter l'efficacité de transfection. Des résultats prometteurs ont par exemple été obtenus avec des polymères polycationiques [168, 169], tels que de la poly-L-lysine [170, 171] ou du polyméthacrylate protoné amino-fonctionnalisé [172]. De tels complexes polymère/A.D.N. sont formés au travers de l'interaction électrostatique entre les groupements phosphates de l'A.D.N. chargés négativement et les groupements amines protonés du polymère.

Bien que les polymères polycationiques présentent des avantages par rapport aux vecteurs viraux, leur efficacité en tant qu'agents vectorisant l'A.D.N. reste limitée [173]. Indépendamment des caractéristiques du polymère, qui ont été discutées ailleurs [172], nous sommes en droit de nous demander quels facteurs physico-chimiques influencent l'efficacité de transfection ¹⁴. En effet, une vision physique des condensats

¹⁴ *Transfection* = l'introduction d'un matériel génétique étranger à l'intérieur d'une cellule hôte (la cellule transfectée), son intégration par la suite dans les cellules

(incluant leurs dimensions) reliée à une vision biologique (incluant l'efficacité de transfection) pourrait faciliter l'amélioration des technologies de vecteurs de gènes [174].

Les chaînes polycationiques sont suffisantes pour condenser l'A.D.N. afin de produire des complexes capables de transfecter dans des cellules en culture. Cependant, ces chaînes seules ne suffisent pas à protéger les particules de leur environnement. Les interactions entre les protéines du sérum et les complexes altèrent souvent la transfection *in vitro*. *In vivo*, ces interactions conduisent à la rapide élimination des complexes par les macrophages, cellules nettoyeuse de l'organisme [175]. Ces problèmes peuvent être évités par l'introduction de séquences hydrophiles de poly(éthylène glycol) (P.E.G.) à la surface des complexes. Ce genre de complexes a aussi été analysé par A.F.M.

Finalement, des polymères globulaires dendrimériques ont aussi été utilisés pour condenser l'A.D.N. Les dendrimères représentent une classe de polymères qui exhibent une architecture moléculaire caractérisée par un branchement dendritique régulier, avec une symétrie axiale [176]. Leur différence de structure par rapport aux polymères polycationiques linéaires induit des structures condensées différentes, qui ont aussi été observées et discutées en détail.

Plus précisément, au cours de notre recherche (réalisée en collaboration avec le laboratoire U.R.B.C.), des polymères polycationiques linéaires à base de méthacrylate [P.D.M.A.E.M.A. : poly(2-diméthyl-aminoéthyl méthacrylate)] (réalisés par le Dr I. Ydens et le Pr Ph. Dubois, L.P.C.M.), des polymères polycationiques linéaires à base de méthacrylate "PEGylés" (réalisés par le Dr I. Ydens et le Pr Ph. Dubois, L.P.C.M.) ainsi que des dendrimères globulaires tels que le SuperFect (S.F., Qiagen) ont été employés afin d'induire la condensation de l'A.D.N. Ces échantillons ont été préparés par le Dr *S. Piron*. Les données A.F.M. obtenues sur des complexes binaires de P.D.M.A.E.M.A./ A.D.N. sont exposées et discutées en fonction du rapport en poids entre polymère et A.D.N., et en fonction de l'efficacité de transfection obtenue avec ces complexes. Les caractéristiques des complexes ternaires (complexes "PEGylés") sont ensuite comparées aux propriétés des complexes binaires. Les structures S.F./A.D.N. sont finalement exposées. Afin d'apprécier l'architecture des complexes polymère / A.D.N., une image d'A.D.N. double brin non-condensé est fournie pour comparaison. Le dispositif expérimental et les méthodes de préparation des échantillons sont quant à eux exposés ailleurs [21].

hôtes, ainsi que l'expression ultérieure de la protéine étrangère encodée.

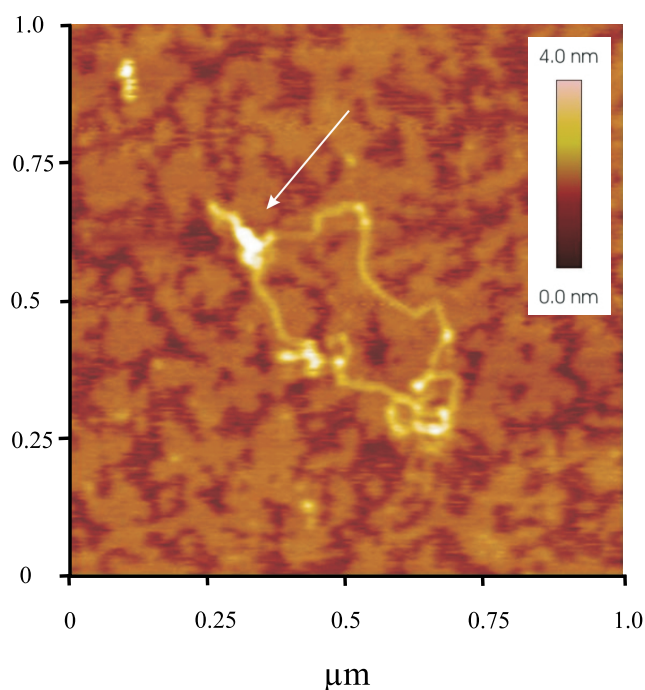


FIG. 4.5 – Image T.M.-A.F.M. à haute résolution ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$) d'une molécule d'A.D.N. déposée sur du mica.

4.4.1 L'A.D.N. non-condensé

Nous avons réalisé des images A.F.M. en mode contact intermittent (T.M.-A.F.M.). Les résultats obtenus sont stables et reproductibles. Des molécules d'A.D.N. déposées sur un substrat de mica fraîchement clivé ont été imagées, après séchage à l'air. Le substrat semble être plat avec des molécules d'A.D.N. doubles brins par dessus. Une image typique de T.M.-A.F.M. à haute résolution obtenue en balayant une petite partie de la surface est présentée à la figure 4.5. La molécule d'A.D.N. affiche une géométrie fermée, ressemblant à un cercle relaxé, avec de petites torsions des brins. Cette structure est caractéristique de la morphologie d'une molécule d'A.D.N. non-condensée [177]. Presque partout sur l'image, la hauteur et la largeur apparente moyenne de la molécule sont de 0.6 nm et 20.0 nm, respectivement. Les brins sont empilés dans la partie supérieure gauche de la figure 4.5 (indiqué par une flèche). A cet endroit, les brins ont une hauteur de 1.0 nm, environ deux fois la hauteur d'une hélice.

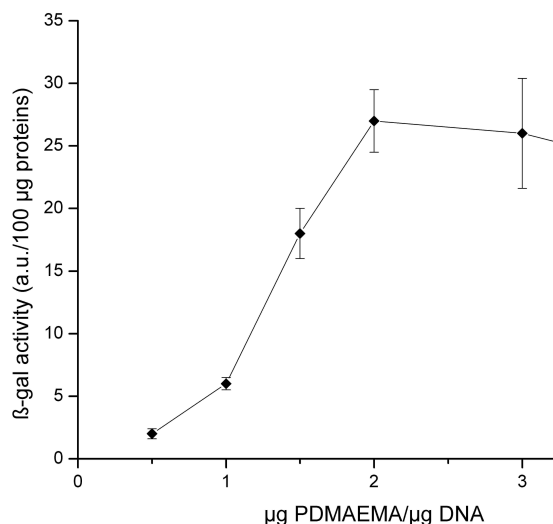


FIG. 4.6 – Efficacité de transfection des complexes *P.D.M.A.E.M.A.* / *A.D.N.*, déterminée en mesurant l'activité de la β -galactosidase (β -gal) dans les cellules transfectées, en fonction du rapport de masse utilisé entre le *P.D.M.A.E.M.A.* et l'*A.D.N.*

4.4.2 Complexes à base de méthacrylate

Complexes binaires

L'*A.D.N.* utilisé pour préparer les complexes polymère / *A.D.N.* est le plasmide pCMV β , codant pour la β -galactosidase (β -gal) de *Escherichia coli*. Avant d'aller plus loin, définissons la transfection : il s'agit de **l'introduction** d'un matériel génétique étranger à l'intérieur d'une cellule hôte (la cellule transfectée), **son intégration** par la suite dans les cellules hôtes, ainsi que **l'expression** ultérieure de la protéine codée par le gène étranger. L'efficacité de transfection est alors déterminée en mesurant l'activité de la β -galactosidase (β -gal) dans les cellules transfectées.

La figure 4.6 présente les résultats d'expériences de transfection (représentant l'activité de la β -gal en fonction du rapport massique polymère/*A.D.N.*). Elles ont été réalisées à une concentration fixe d'*A.D.N.*, en faisant varier la concentration de *P.D.M.A.E.M.A.* Les polymères cationiques se lient donc électrostatiquement aux molécules d'*A.D.N.* (présentant une charge nette négative), aboutissant aux complexes polymère/*A.D.N.* Il semble évident que le *P.D.M.A.E.M.A.* favorise l'internalisation cellulaire de l'*A.D.N.* et son expression subséquente. De

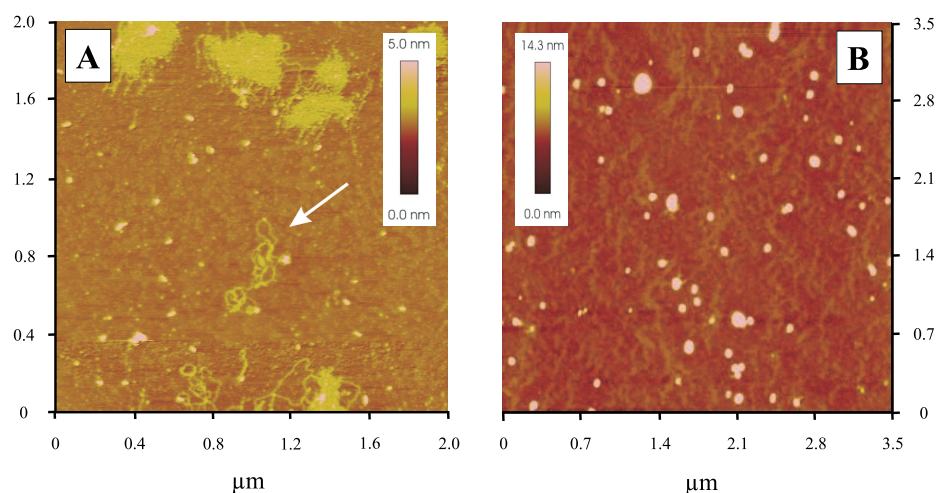


FIG. 4.7 – Images A.F.M. en mode contact intermittent de complexes de PDMAEMA/ADN déposés sur du mica, sous conditions ambiantes. (A) dans un rapport en masse de 1/1. ($2\text{ }\mu\text{m} \times 2\text{ }\mu\text{m}$). (B) dans un rapport en masse de 2/1. ($3.5\text{ }\mu\text{m} \times 3.5\text{ }\mu\text{m}$).

plus, l'efficacité de transfection est dramatiquement affectée par le rapport des poids et présente un maximum. Comme illustré à la figure 4.6, l'activité maximale de la β -gal est observée lorsque les complexes sont préparés avec $2\text{ }\mu\text{g}$ de polymère (ou plus) par μg d'A.D.N. Les rapports en masses polymère/A.D.N. plus faibles conduisent à une transfection moindre. Afin de déterminer si des différences de structure (i.e. la forme) et de taille peuvent expliquer l'évolution de l'expression de la β -gal, des complexes correspondants aux activités maximales et submaximales de transfection ont été analysés.

Les complexes obtenus dans un rapport en poids polymère/ A.D.N. de 1/1 produisent des structures faiblement condensées, telles qu'observées à la figure 4.7A. De larges agrégats plats (composés de brins linéaires et de structures sphériques) sont visibles dans la partie supérieure de l'image. Ces agrégats mesurent environ 25 nm de large, 50 nm de long et 1.2 nm de haut. Par comparaison, il semble intéressant de rappeler que cette valeur est près de deux fois supérieure à celle mesurée sur des brins d'A.D.N. seuls. Au centre de la figure (flèche blanche), nous observons une structure similaire à une molécule d'A.D.N. isolée, comme déjà présentée à la figure 4.5. Des structures toroïdales ont également été observées mais en nombre limité.

A partir de cette image (figure 4.7A), il semble donc évident que les conditions optimales de condensation (en forme et en taille) ne sont pas atteintes. Dans ce cas, la faible efficacité de transfection observée

à la figure 4.6 (pour un rapport massique polymère/A.D.N. de 1/1) pourrait être reliée aux agrégats faiblement condensés d'A.D.N. et de polymère. Comme cela fut déjà observé et démontré précédemment, pour des rapports de masse polymère / A.D.N. si faibles (<1.5), des particules plutôt larges sont formées [167]. Il a dès lors été postulé que les molécules de P.D.M.A.E.M.A. agissaient probablement comme éditeur de lien entre les molécules d'A.D.N., conduisant à la formation de larges agrégats. Ces particules sont d'ailleurs trop volumineuses pour être internalisées par les cellules par endocytose¹⁵ [178], comme semble le confirmer la faible efficacité de transfection observée.

Pour des complexes préparés dans un rapport massique polymère/A.D.N. de 2/1 (qui correspond au ratio produisant l'efficacité de transfection la plus élevée), des structures compactes et de forme circulaire sont observées, comme à la figure 4.7B. Dans ces conditions, des molécules d'A.D.N. seules n'ont jamais été observées, ce qui nous pousse à croire que tous les plasmides ont été complexés grâce au polymère.

Les distributions en diamètre et en hauteur sont présentées aux figures 4.8A et 4.8B, respectivement. Les courbes ont été obtenues après un ajustement gaussien sur les données expérimentales. Ces distributions sont calculées à partir de 75 complexes. Les valeurs moyennes des distributions en diamètre et hauteur sont de 63.9 ± 2.5 nm et 7.4 ± 0.5 nm, respectivement. Approximativement 5% des particules ont un diamètre plus important que 100 nm, et 50 % des complexes ont un diamètre supérieur à 60 nm. Dans tous les cas, ces complexes dits "binaires" se présentent sous la forme de structures bien condensées, tendant à confirmer le lien étroit existant entre le degré de condensation et l'efficacité de transfection.

Les complexes obtenus dans un rapport P.D.M.A.E.M.A. / A.D.N. de 1/1 produisent des structures faiblement condensées (figure 4.7A). Les agrégats observés semblent être des intermédiaires entre la molécule d'A.D.N. non-condensée de la figure 4.5 et les structures condensées de la figure 4.7B, comme développé par *Vijayanathan* et al. [179]. Dans ce cas, la faible efficacité de transfection observée à la figure 4.6 pourrait être reliée aux agrégats faiblement condensés de polymère/A.D.N. Ces résultats sur des condensats binaires sont comparables à ceux rapportés par d'autres groupes de recherche utilisant les mêmes techniques, bien que différents échantillons d'A.D.N. et d'agents condensants soient considérés. Des structures condensées similaires sont rapportées pour des complexes préparés avec d'autres polycations tels que la poly-L-lysine [171], des poly(amino esters) ou n-PAE [180] ou d'autres poly-

¹⁵ *Entrée de macromolécules dans la cellule, par l'entremise de vésicules, formées à même la membrane plasmique [144].*

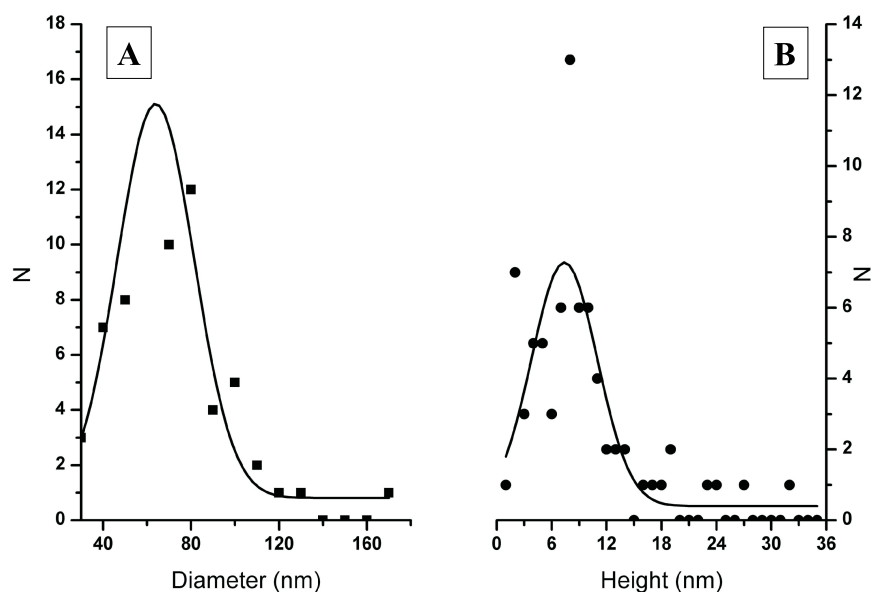


FIG. 4.8 – (A). Distribution des diamètres des complexes binaires de P.D.M.A.E.M.A./A.D.N. (dans un rapport massique de 2/1), calculée à partir d'images A.F.M. en mode contact intermittent sur environ 75 complexes. La courbe représente un ajustement gaussien des données expérimentales. (B) Distribution des hauteurs des complexes binaires de P.D.M.A.E.M.A./A.D.N. (dans un rapport massique de 2/1), calculée à partir d'images A.F.M. en mode contact intermittent sur environ 75 complexes. La courbe représente un ajustement gaussien des données expérimentales.

mères à base de méthacrylate [181].

Complexes ternaires

Les chaînes polycationiques sont suffisantes pour condenser l'A.D.N., produisant des complexes capables de transfection dans des cellules en culture. Cependant, ces chaînes polycationiques seules ne protègent pas les particules de leur environnement. En effet, les interactions entre les protéines du sérum et les complexes compromettent souvent la transfection *in vitro*. *In vivo*, ces interactions conduisent à la rapide élimination des complexes polymère/A.D.N. par le système réticuloendothélial. Ces problèmes peuvent cependant être évités en introduisant des séquences hydrophiles de polyéthylène glycol (P.E.G.) à la surface des complexes. Une stratégie originale, en deux étapes, a été développée pour produire des complexes "PEGylés" [172] : l'A.D.N. est premièrement condensé

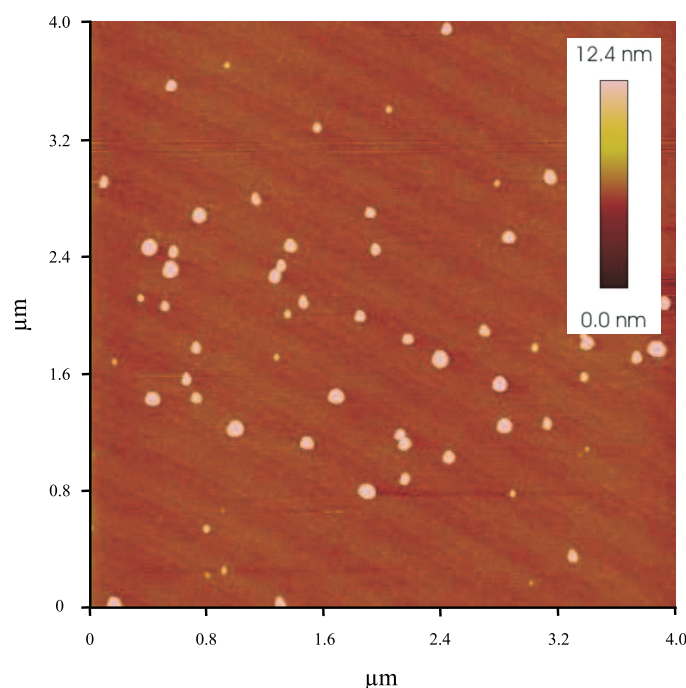


FIG. 4.9 – Image A.F.M. en mode contact intermittent de complexes ternaires de copolymère/polymère/A.D.N. (dans un rapport massique de 5/2/1), en conditions ambiantes ($4\text{ }\mu\text{m} \times 4\text{ }\mu\text{m}$).

par un polymère polycationique (P.D.M.A.E.M.A.). Les complexes ainsi préformés sont ensuite “PEGylés” par incubation en présence d’un copolymère de P(D.M.A.E.M.A.-b-M.A.P.E.G.). Ce type de complexes dits “ternaires” est également analysé par A.F.M., afin de comparer leur structure et leur taille avec celle des complexes mentionnés précédemment.

Une image représentative des complexes ternaires est présentée à la figure 4.9. Les complexes y sont préparés avec $2\text{ }\mu\text{g}$ de polymère (P.D.M.A.E.M.A.) pour $5\text{ }\mu\text{g}$ de copolymère [P(D.M.A.E.M.A. - b - M.A.P.E.G.)], par μg d’A.D.N. Il s’agit d’un rapport massique copolymère/ polymère/ A.D.N. présentant une activité de transfection maximale. Les complexes ternaires déposés sur une surface de mica y forment des structures très compactes, similaires à celles de complexes binaires (P.D.M.A.E.M.A./ A.D.N.). Aucune structure tubulaire n’est visible dans ou autour de ces complexes ternaires. Les distributions en diamètre et hauteur sont présentées aux figures 4.10A et 4.10B, respectivement. Ces distributions sont calculées à partir de 100 complexes. Les valeurs moyennes de la distribution en diamètre et en hauteur sont de $102.6 \pm 2.0\text{ nm}$ et $9.7 \pm 0.1\text{ nm}$, respectivement. Ces dimensions sont

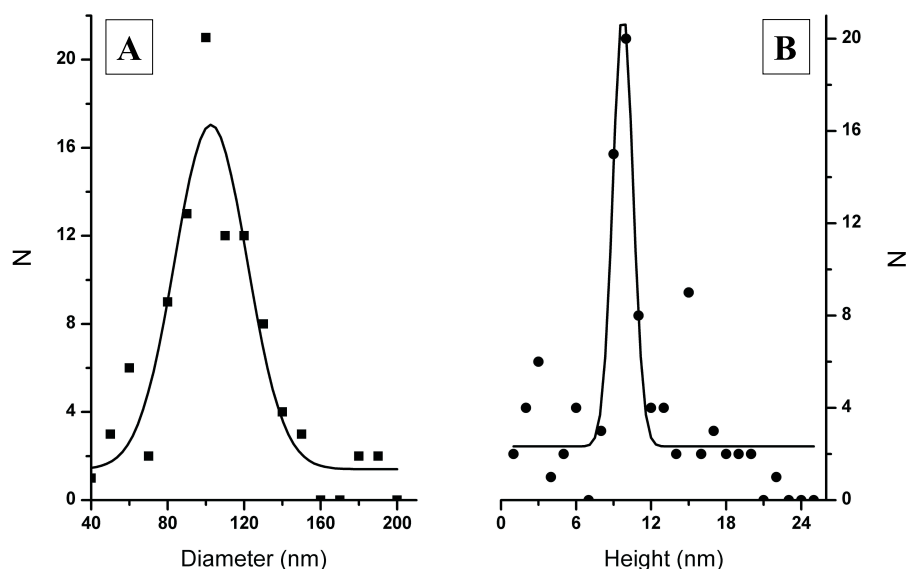


FIG. 4.10 – (A). Distribution des diamètres des complexes ternaires de copolymère/polymère/A.D.N. (dans un rapport massique de 5/2/1), calculée à partir d'images A.F.M. en mode contact intermittent sur environ 100 complexes. La courbe représente un ajustement gaussien des données expérimentales. (B) Distribution des hauteurs des complexes ternaires de copolymère/polymère/A.D.N. (dans un rapport massique de 5/2/1), calculée à partir d'images A.F.M. en mode contact intermittent sur environ 100 complexes. La courbe représente un ajustement gaussien des données expérimentales.

légèrement plus importantes que celles mesurées sur des complexes binaires.

L'image A.F.M. de la figure 4.9 met en évidence la présence de structures denses, indiquant la formation de complexes ternaires. Dès lors, la méthode de préparation en deux étapes de ces complexes empêche l'interférence du P.E.G. durant la condensation de l'A.D.N. avec le P.D.M.A.E.M.A., comme déjà observé précédemment [177]. Les diamètres mesurés sur les complexes ternaires sont légèrement plus grands que ceux obtenus sur des complexes binaires. Ceci est en accord avec une association du copolymère en bloc avec les complexes binaires de P.D.M.A.E.M.A./A.D.N. déjà préformés. Cependant, les efficacités de transfection observées avec ces deux types de complexes sont similaires [182]. La taille optimale des polyplexes peut varier en fonction de

la composition des polyplexes et diffère clairement pour les complexes binaires et ternaires. Ceci semble d'ailleurs confirmé par les observations précédemment recueillies par d'autres groupes de recherche [169, 183].

Les tailles mesurées en A.F.M. pour les complexes binaires et ternaires indiquent que les condensats se présentent sous la forme de sphères écrasées. Un tel écrasement est certainement dû aux limitations de la technique A.F.M. En fait, ce phénomène (structures comprimées sur le substrat) est identique à celui observé pour des molécules d'A.D.N. isolées. En effet, la hauteur et la largeur mesurée de la molécule d'A.D.N. de la figure 4.5 sont respectivement plus faible et plus importante que le diamètre théorique d'une double hélice d'A.D.N. (qui est d'environ 2.0 nm). Ces différences ont constitué le point central de plusieurs publications récentes [184, 185, 186, 187, 188]. Ce phénomène y est habituellement attribué à l'indentation de la molécule d'A.D.N. *Moreno-Herrero* et al. ont ainsi supposé que la compression d'une molécule d'A.D.N., due aux forces d'attraction électrostatique entre l'échantillon et le substrat contribue à la réduction des hauteurs mesurées [189]. Cependant, en utilisant l'A.F.M. en mode non-contact, des mesures de hauteurs coïncidant avec la théorie ont été relatées par *Anselmetti* et al. [190]. La très grande largeur mesurée de la molécule d'A.D.N. (au lieu des 2-3 nm attendus), ne peut, quant à elle, que refléter le rayon de la pointe, comme développé par *Lyubchenko* et al. [164]. Ces phénomènes sont à même d'expliquer la forme des complexes présentés aux figures 4.7B et 4.9.

4.4.3 Complexes à base de SuperFect

Des complexes de SuperFect/A.D.N. ont aussi été préparés sous conditions optimales selon les expériences de transfection, i.e. avec 6 μg de SuperFect (S.F.) par μg d'A.D.N. La structure des complexes est présentée à la figure 4.11. Ces derniers apparaissent sous la forme d'une protubérance centrale entourée d'une structure en spaghetti, i.e. un disque plat constitué de filaments entremêlés. Le diamètre moyen du disque est d'environ 850 nm, alors que la protubérance centrale mesure 18 nm de haut et 290 nm de large, en moyenne. Les filaments ont des diamètres allant de 12 à 24 nm, et une hauteur comprise entre 0.4 et 0.9 nm. Ces dimensions sont similaires à celles obtenues sur de l'A.D.N. seul.

Les résultats sur les complexes S.F./A.D.N. mettent en évidence le rôle de l'architecture du polymère sur les morphologies observées. Les structures visibles sur les images A.F.M. de tels complexes (figure 4.11) indiquent que ceux-ci ne forment pas une structure compacte. Cette

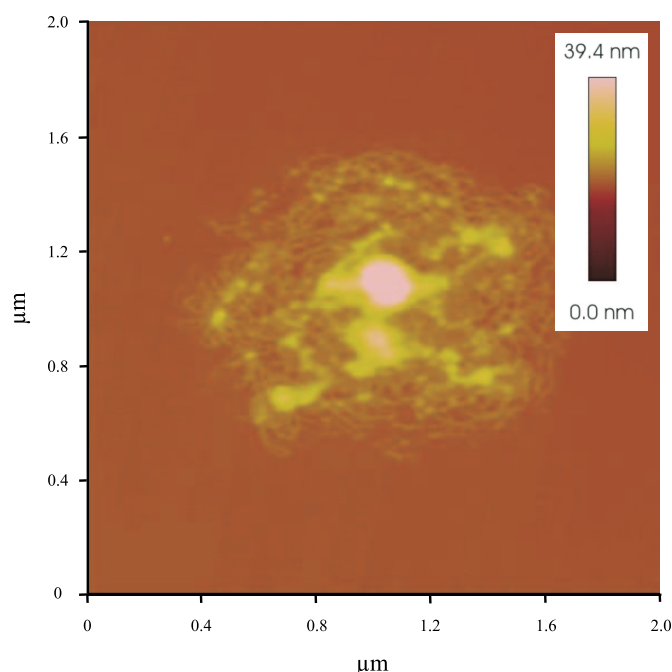


FIG. 4.11 – Image A.F.M. en mode contact intermittent de complexes de SuperFect/A.D.N. (dans un rapport massique de 6/1), déposés sur du mica et en conditions ambiantes. ($2\ \mu\text{m} \times 2\ \mu\text{m}$).

image peut être expliquée en suggérant que la protubérance centrale est un complexe de S.F./A.D.N. bien condensé, entouré par de l'A.D.N. seul ou faiblement condensé. Ces résultats sont opposés aux structures compactes observées par d'autres groupes de recherche [191]. Quelle qu'en soit la raison, nos complexes révèlent cependant une bonne efficacité de transfection (similaire à celle observée sur des complexes binaires), nous poussant à conclure que, prise isolément, l'architecture du polymère n'est pas non plus, à un certain degré, un point critique dans le processus de transfection.

4.4.4 Résumé

En conclusion, l'imagerie de molécules d'A.D.N. et de complexes polymère/ A.D.N. a été réalisée par microscopie à force atomique. Nous en avons déduit la taille et la forme des molécules et condensats. Ces expériences ont démontré une approche originale, basée sur l'observation directe, qui a permis de relier l'effet de facteurs structurels des complexes à l'efficacité de transfection. Nous avons montré que l'A.F.M. pouvait fournir des informations sur les facteurs cruciaux (taille et

forme) dont nous devons tenir compte dans l'élaboration de nouveaux vecteurs de transfection. En particulier, nous avons déduit que la taille des complexes et l'architecture du polymère, prises isolément, ne sont pas, jusqu'à un certain point, des éléments critiques dans le processus de transfection. Notons cependant que toutes les manipulations décrites ici ont été réalisées "à sec".

Chapitre 5

Les implants métalliques

Résumé

Les implants métalliques ont subi des avancées technologiques et biomédicales phénoménales ces quelques dernières années. Ils sont actuellement de plus en plus utilisés dans une large gamme de sciences médicales, remplaçant ou supportant des parties de corps perdues ou dégradées. Cependant, ils posent encore des nombreux problèmes, notamment de résistance à long terme, d'intégration dans les tissus,... De nouvelles techniques sont alors mises en oeuvre. Parmi celles-ci figure la formation d'une couche d'apatite à la surface de l'implant. L'apatite présente en effet de grandes similitudes structurelles et fonctionnelles avec la partie minérale de l'os, favorisant l'osséointégration. Le défi scientifique se situe à ce niveau. Dans ce cadre, nos techniques de microscopie à sonde locale ont été très utiles lors de la caractérisation de la croissance d'apatite sur de l'oxyde de tantale. Cette croissance (réalisée par D. Aubry - C.E.S.) a été obtenue à l'aide d'une monocouche intermédiaire entre l'oxyde de tantale et l'apatite même. Quatre couches intermédiaires (différentes par leur groupement terminal) ont été étudiées, ainsi que leur influence sur les vitesses de croissance de l'apatite. Les différents stades de préparation, de caractérisation et d'interprétation sont regroupés en sections, après une introduction sommaire aux implants, ainsi qu'à l'apatite.

5.1 Introduction

Le développement de nouveaux biomatériaux pour des applications thérapeutiques est une des tâches les plus stimulantes pour la science des matériaux ces dernières années [192, 193]. Ils sont en effet utilisés dans une large gamme de sciences médicales. L'orthopédie, par exemple, est l'un des domaines nécessitant de manière routinière de tels matériaux. Des implants sont alors utilisés, pour remplacer ou supporter des parties de corps perdues ou dégradées. Dans ce cadre, quatre différentes classes de biomatériaux, applicables aux implants, sont actuellement soumises à investigation : les métaux et alliages métalliques (Ti, Ti-6Al-4V,...) [194], des céramiques (CaSiO_3 , hydroxyapatite,...) [195], des polymères (polyéthylène,...) [196] et des matériaux naturels tels que le corail [197]. Les alliages de titane sont par exemple utilisés dans des implants métalliques orthopédiques, étant donné leur excellente biocompatibilité et leurs propriétés mécaniques. Cependant, la toxicité des éléments constituant l'alliage et leur progressive dégradation à long terme sous environnement physiologique ont été mis en évidence [198].

Pour résoudre ces problèmes, un autre métal biocompatible, le tantale, a particulièrement attiré l'attention ces dernières années. En milieu physiologique, il présente une forte résistance à la corrosion. De plus, la formation de fissures, dues à des déformations plastiques du matériau, est contrecarrée par une repassivation de la surface de tantale, réagissant avec le milieu physiologique pour recréer de l'oxyde de tantale. Ce métal présente malheureusement une masse volumique très élevée (16.654 g/cm^3), empêchant l'élaboration d'implants massifs. Des études se focalisent donc maintenant sur la formation de minces films de tantale sur les implants métalliques habituellement utilisés. Notre intérêt s'est donc tourné vers ces implants, et plus particulièrement vers ceux en tantale (oxyde de tantale).

La plupart des biomatériaux sont actuellement analysés par microscopie électronique. Cependant, la microscopie à force atomique semble être une technique très puissante dans de telles études [192]. En effet, l'A.F.M. a prouvé être incroyablement utile pour la caractérisation d'applications biologiques et biomédicales (capteurs biologiques, biopuces et implants métalliques) [10]. Il possède la capacité d'imager des structures biologiques molles (cellules, bactéries, protéines et A.D.N.) [159, 161, 160]. Cette technique permet de plus une imagerie micrométrique et submicrométrique de surfaces, pouvant aller jusqu'à la résolution atomique. Lorsqu'il est opéré en mode à contact intermittent (T.M.-A.F.M.), il empêche la dégradation et/ou la déformation de la pointe et/ou de l'échantillon [34]. En plus des données topographiques,

les propriétés chimiques du matériau étudié peuvent être déduites d'expériences en imagerie de phase [165].

Afin d'optimiser les propriétés des implants métalliques (et dès lors de faciliter leur intégration dans le corps), il est essentiel d'étudier les mécanismes de formation des os sur ces implants. Des études antérieures ont montré que l'interface entre l'implant et l'os est composée d'une couche d'apatite [199]. Cette couche d'apatite est similaire à celle présente dans la phase minérale des os naturels. Dans ce cas, l'os se développe directement sur cette couche d'apatite. Ce mécanisme est favorisé par le fait que l'os humain est constitué d'environ 65% de cristaux d'apatite en poids. Dans leurs recherches sur les implants métalliques, *Kokubo* et al. ont déduit que la présence d'une couche d'apatite sur l'implant est essentielle à la croissance de l'os sur celui-ci. De plus, cette couche est déterminante pour la bioactivité du matériau [199].

Différents traitements ont été mis au point pour favoriser la formation d'apatite sur les implants métalliques. La modification chimique des surfaces par des couches auto-assemblées est l'une de ces techniques. En particulier, *Tanahashi* et al. ont utilisé des alcanethiols présentant différents groupements terminaux (PO_4H_2 , COOH , CONH_2 , OH , NH_2 et CH_3), déposés sur des surfaces d'or, pour favoriser la nucléation d'apatite [200]. Ils ont démontré que la formation d'apatite dépendait du groupement fonctionnel présent en extrême surface. Cependant, cette étude est réalisée sur des substrats d'or, un métal peu utilisé comme implant. Afin d'approcher de plus près la réalité et d'améliorer les techniques existantes, les expériences que nous avons réalisées ont pour objet de vérifier la dépendance de la croissance d'apatite avec certains groupements fonctionnels présents en extrême surface d'une couche d'organosilane, déposée sur de l'oxyde de tantale.

Dans ce but, les surfaces de tantale utilisées ont été modifiées avec du 10-undecenyltrichlorosilane (10-UTCS). Par la suite, la terminaison vinylique de ce 10-UTCS a été convertie in situ en différents groupements fonctionnels (hydroxyles, carboxyles et phosphates), favorisant la croissance de l'apatite. Cette croissance de l'apatite a alors été comparée sur les quatre groupements terminaux différents. De plus, son évolution dans le temps a été suivie avec attention. Les résultats obtenus entre cinq et trente jours de croissance d'apatite sont comparés et discutés. Mais avant de s'attaquer à l'analyse des résultats obtenus, donnons quelques informations concernant l'apatite, sa structure et ses propriétés.

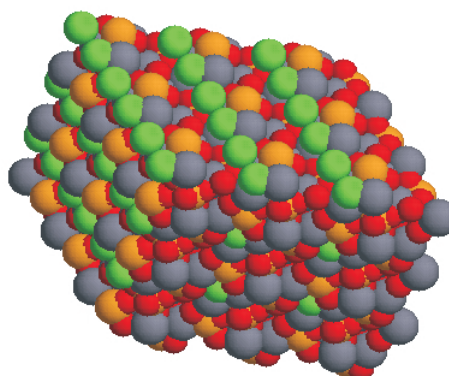


FIG. 5.1 – *Structure de l'hydroxyapatite*. Les atomes gris, oranges, rouges et verts sont respectivement des atomes de calcium, phosphore, oxygène et des groupements hydroxyles [201].

5.2 L'apatite

La composition de l'apatite est fort similaire à la composante minérale de l'os naturel. En effet, le constituant inorganique de l'os est fait d'apatites biologiques. Elles fournissent rigidité au squelette et agissent comme réservoir de calcium, phosphore, sodium et magnésium. Le terme apatite reprend une famille de minéraux à base de phosphate de calcium. Ces matériaux présentent des structures similaires (système hexagonal, groupe P63/m) et possèdent une formule structurale similaire $X_3Y_2(TO_4)Z$ (où X, Y, T et Z sont différents pour chaque type d'apatite).

Dans la nature, les compositions en X et Y de l'apatite incluent du Ca, Sr, Ba, Re, Pb, U ou Mn (et rarement Na, K, Y, Cu). Le T peut être remplacé du P, As, V, Si, S, ou C (ou CO_3). Finalement, le Z existe sous forme de F, Cl, OH ou O [198]. En médecine, les apatites d'intérêt possèdent des X et Y en calcium, du T en phosphore et du Z en fluor ou sous forme de groupe hydroxyle. Par exemple, l'apatite est appelée hydroxyapatite (HAp) lorsque le $T = P$ et $Z = OH$. A température corporelle et en milieu physiologique, deux formes de phosphate de calcium sont stables. A $pH < 4.2$, la phase de phosphate de calcium stable est la brushite. A $pH > 4.2$, la phase stable est l'hydroxyapatite. La croissance de l'apatite sur nos substrats d'oxyde de tantale, recou-

verts d'une couche d'organosilane, est réalisée en milieu simulant un liquide physiologique, maintenu à un pH de 7,25 et à 37°C. Nous nous attendons donc à y faire croître de l'hydroxyapatite.

La structure de l'hydroxyapatite $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ est composée de cristaux qui peuvent être décrits par des prismes hexagonaux rhomboédriques. L'organisation du réseau est schématisée à la figure 5.1. Les paramètres du réseau de l'hydroxyapatite sont $a = 9,432 \text{ \AA}$ et $c = 6,881 \text{ \AA}$. En plus de ses similitudes avec l'os naturel, l'hydroxyapatite est un matériau osteoconducteur, c'est-à-dire qui fournit un échafaudage provisoire à la croissance de l'os. La nature ostéoconductrice des couches d'hydroxyapatite conduit à la formation de liaisons fortes avec l'os. C'est la raison pour laquelle on le fait croître à la surface de l'oxyde de tantale.

5.3 Les implants métalliques

Les propriétés biologiques des apatites, particulièrement leur aptitude à la fixation des implants, ont fait l'objet de nombreuses études qui ont confirmé leur capacité à fournir une adhérence stable avec l'os sous-jacent [202]. L'hydroxyapatite (HA) est un matériau qui présente plusieurs avantages comme sa structure cristalline proche de celle de l'os humain. Nous connaissons de plus ses caractéristiques de biocompatibilité, ainsi que sa fiabilité dans l'établissement d'une ostéo-intégration in vivo. Elle est tolérée aussi bien en tant que matériau de comblement que pour le revêtement des prothèses métalliques. Il s'agit de plus d'une substance, qui lors de son utilisation en tant qu'implant, n'entraîne pas de réponses inflammatoires, ni de réactions pathologiques.

Les expériences réalisées dans ce cadre ont pour but d'induire la nucléation de l'apatite à la surface d'un implant. Ces expériences résultent d'une collaboration interdisciplinaire avec le laboratoire C.E.S. Les échantillons y ont été préparés par *D. Aubry* sur base de la référence [200]. Ces derniers ont ensuite été caractérisés par nos soins en A.F.M. La surface de l'implant de tantale oxydé est d'abord recouverte d'une monocouche d'organosilane (10-UTCS), terminée par une liaison vinylique. Cette liaison est modifiée sur plusieurs échantillons différents dans le but d'obtenir des monocouches terminées par des groupements hydroxyles, carboxyles et phosphates. Sur chacun de ces quatre types d'échantillons, une croissance d'apatite est induite par trempage dans un tampon physiologique (que nous appellerons, par abus de langage, milieu simulant un liquide physiologique : Simulated Body Fluid, S.B.F.). L'évolution de cette croissance est contrôlée jusqu'à trente jours. Les différentes étapes de préparation des échantillons

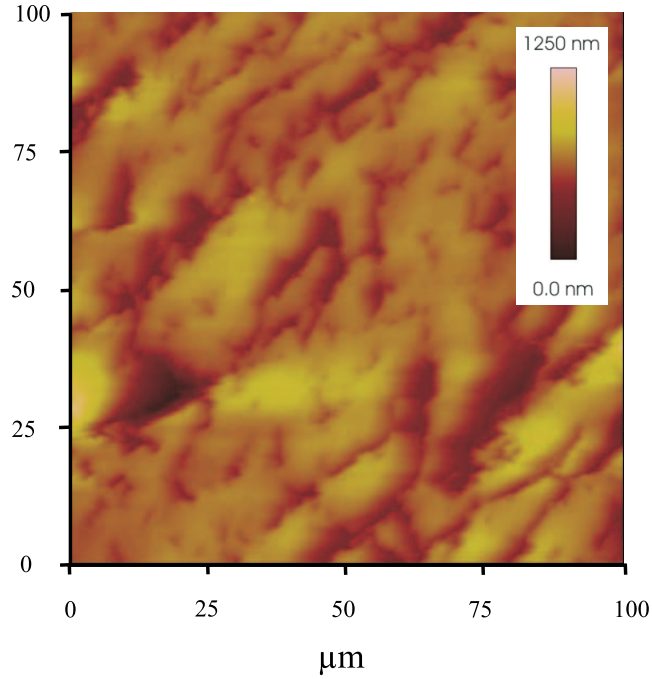


FIG. 5.2 – Image A.F.M. en mode à contact intermittent, d'une surface d'oxyde de tantale ($100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$).

sont présentées ci-dessous. Les résultats de croissance sont également exposés et discutés.

5.3.1 Oxyde de tantale

Des plaques massives de tantale ($10\ \text{mm} \times 10\ \text{mm} \times 1\ \text{mm}$), utilisées comme substrats, sont fournies par *Advent* (99,98 %). Les coupons métalliques sont d'abord polis mécaniquement (Buehler-Phoenix 4000) jusqu'à $1\ \mu\text{m}$, en utilisant des papiers de carbure de silicium présentant différentes granulations et des pâtes diamantées. Ils sont ensuite nettoyés par ultrasons via deux bains successifs de 20 minutes chacun, dans de l'éthanol absolu, et traités à l'UV-ozone pendant 30 minutes (Jelight 42-220), afin d'ôter toute contamination physisorbée avant modification de la surface. Une couche d'oxyde natif se forme alors durant ce processus et la surface est ensuite stockée sous atmosphère d'argon. Cette préparation favorise une adsorption optimale du 10-UTCS, comme déterminé et expliqué par *Aubry et al.* [22].

A cette étape de préparation des échantillons, la surface d'oxyde de tantale se présente sous une forme semblable à celle de la figure 5.2. Il s'agit d'une image A.F.M. tridimensionnelle de la surface d'oxyde

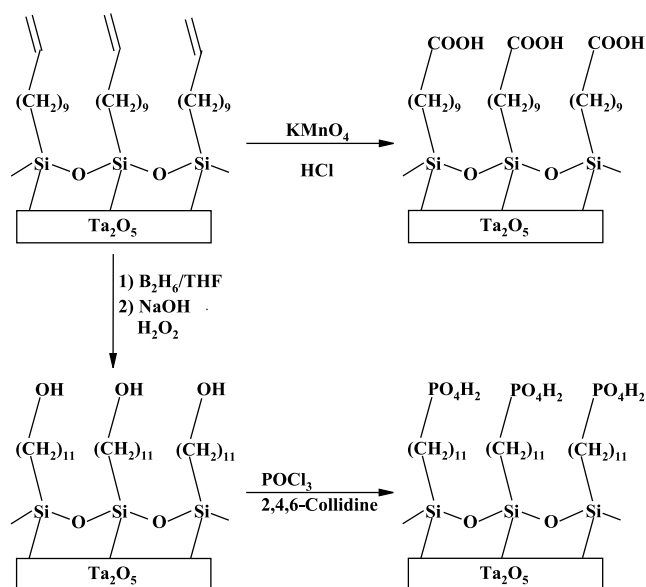


FIG. 5.3 – Diagramme des modifications du groupement vinylique terminal en groupements hydroxyles, carboxyles et phosphates [22].

de tantale obtenue en conditions ambiantes. Elle semble relativement rugueuse, présentant une rugosité moyenne d'environ 120 nm, telle que calculée à partir d'images A.F.M. de 150 μm de côté. Cette surface est composée de larges zones plates, séparées par des vallées profondes. Ces véritables canyons (entre 3 et 7 μm de large) ressemblent à des griffures de polissage se déployant partout sur la surface.

5.3.2 Organosilanes et modifications

Des études précédentes montrent la modification de surfaces à l'aide d'organosilanes, particulièrement sur des substrats de silicium. Il fut alors démontré que la modification du groupement fonctionnel terminal de ces organosilanes est possible. Une monocouche auto-assemblée de 10-undecenyltrichlorosilane (10-UTCS) se forme spontanément sur les surfaces d'oxyde de tantale lorsqu'on les immerge dans une solution 10^{-3} M de 10-UTCS dans du toluène sec à 4°C. La double liaison (groupement vinylique) terminale de la couche de 10-UTCS est ensuite modifiée in situ pour obtenir des groupements hydroxyles, carboxyles et phosphates terminaux. Les mécanismes de modifications détaillés ci-dessous sont schématisés à la figure 5.3. Ces modifications ont été réalisées par le C.E.S.

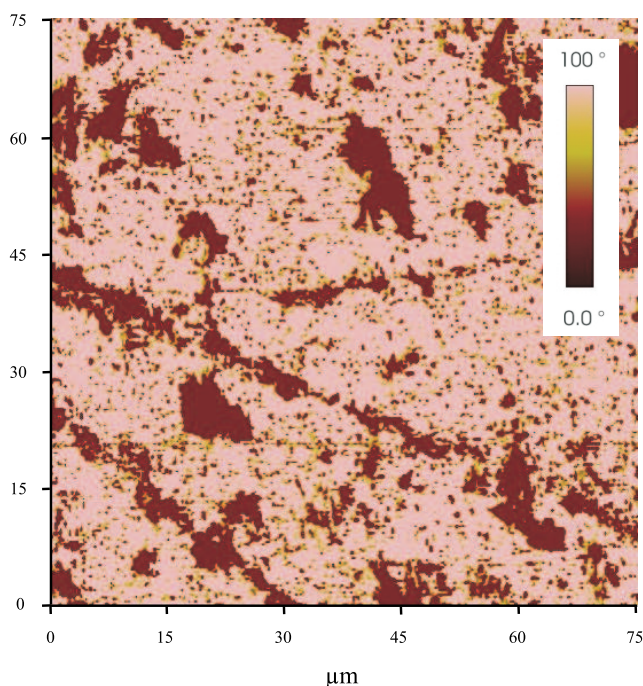


FIG. 5.4 – Image A.F.M. en mode à contact intermittent d'une surface d'oxyde de tantale recouverte d'une monocouche de 10-UTCS ($75\ \mu\text{m} \times 75\ \mu\text{m}$).

Les groupements hydroxyles sont formés par hydroboration et oxydation par H_2O_2 de la double liaison éthylénique terminale du 10-UTCS. A cette fin, les échantillons sont immergés dans 50 ml de B_2H_6 / THF 1M pendant 30 minutes à 25°C sous atmosphère d'argon. Ils sont ensuite transférés dans 6 ml d'une solution de NaOH 0.1 M, suivie par une addition de 4.3 ml de 35% H_2O_2 . La réaction est poursuivie pendant 5 minutes. Les échantillons sont finalement abondamment rincés à l'eau ultra-pure, séchés et maintenus sous atmosphère d'argon avant analyse.

Le groupement carboxyle terminal est obtenu par oxydation de la double liaison éthylénique terminale du 10-UTCS. Les échantillons sont trempés dans 50 ml d'une solution de KMnO_4 (10 mM) acidifiée par 5% en poids de HCl (37%), pendant 5 minutes à 25°C sous agitation. Finalement, les échantillons sont abondamment rincés à l'eau ultrapure, séchés et maintenus sous atmosphère d'argon avant analyse.

La phosphorylation fait suite à l'hydroxylation de la monocouche. Les groupements hydroxyles terminaux y sont convertis en groupements phosphates. Les échantillons sont ainsi placés dans 0.2 M d'oxychlorure phosphoreux et 0.2 M de 2,4,6-collidine dans de l'acétonitrile sec, sous

atmosphère d'argon pendant une heure, à 25°C. Après un rincage abondant à l'acétonitrile, les échantillons sont copieusement nettoyés à l'eau ultrapure, séchés et maintenus sous atmosphère d'argon.

L'image A.F.M. de la monocouche de 10-UTCS, présentant une double liaison C=C terminale en surface, est similaire à celles obtenues sur des monocouches présentant des groupements terminaux hydroxyles, carboxyles et phosphates. L'image de phase, présentée à la figure 5.4 (100 μm x 100 μm), révèle que la couche de 10-UTCS est fondamentalement composée de deux parties, révélées par deux contrastes différents, l'un clair l'autre sombre. La partie claire couvre environ 56% de la surface, le reste étant de la zone sombre.

Discussion

Comme déjà identifié précédemment par d'autres groupes, les organosilanes, et plus particulièrement les n-alkyltrichlorosilanes, forment des îlots recouvrant la surface du substrat, sous conditions similaires à celles réalisées ici [203]. De plus, l'organisation des chaînes carbonées des molécules dans ces îlots est relativement dense et bien ordonnée, dans une conformation *all-trans*. Ceci tend à indiquer la formation d'une couche de groupements fonctionnels en surface de l'échantillon [203]. Cette conformation dense semble être confirmée par la figure 5.4, où seulement deux contrastes sont visibles en imagerie de phase. En effet, celle-ci est liée aux propriétés du matériau au-dessus duquel se situe la pointe (rigidité, viscoélasticité,...) mais également à l'énergie dissipée par les forces pointe-échantillon. Le débat est encore ouvert sur le sujet. Quoi qu'il en soit, tout le monde s'accorde à dire que des contrastes différents en imagerie de phase indiquent des propriétés différentes aux endroits analysés de la surface. Dans notre cas, ces contrastes différents semblent être dus aux deux matériaux présents sur nos échantillons. En effet, la figure 5.4 présente deux contrastes. Tout semble indiquer que le contraste clair, recouvrant environ 56 % de la surface, peut raisonnablement être attribué à la monocouche d'organosilane auto-assemblée. Le contraste sombre ne semble lui représenter que la surface d'oxyde.

Ainsi, il semble évident que cette couche de 10-UTCS (et dès lors les couches modifiées qui en découlent) ne présente pas un recouvrement et une qualité de surface élevée. Cette couche couvre péniblement la moitié de la surface, ce qui est relativement faible pour de telles molécules. Par ailleurs, certaines études démontrent qu'il existe une température seuil, T_c , pour la réaction de silanisation [203]. Ces observations indiquent que, lorsque la silanisation est réalisée à une température située en-dessous de T_c , des monocouches de haute qualité sont obtenues.

nues, alors qu'au-dessus de T_c , des couches désordonnées sont formées. Cette température seuil dépend fortement de la nature du substrat et de la longueur de la chaîne carbonée de la molécule déposée. Malheureusement, à notre connaissance, rien n'a été publié concernant cette température pour des couches de 10-UTCS sur des surface d'oxyde de tantale. Dès lors, nous pouvons raisonnablement considérer que la formation de nos monocouches s'est déroulée à une température supérieure à la température seuil correspondant à nos conditions expérimentales, comme le suggère le faible recouvrement de surface mesuré. Par ailleurs, des expériences X.P.S. (réalisées au C.E.S.) n'ont pas révélé la présence d'atomes de chlore, indiquant la totale hydrolyse des groupements SiCl_3 et l'absence de formation de multicouches [22]. Nous pouvons dès lors conclure que les organosilanes sont chimisorbés avec une certaine désorption sur l'oxyde de tantale.

5.3.3 Formation d'apatite

La formation d'apatite sur les échantillons fonctionnalisés a été réalisée par *D. Aubry* (C.E.S.) de la manière suivante, sur base de la référence [200] : les échantillons ont été placés dans 30 ml de liquide tampon physiologique (que nous appellerons, par abus de langage, liquide simulat un liquide physiologique, S.B.F. : *Simulated Body Fluid*) pendant 5, 10, 15, 20, 25 et 30 jours à 37°C. Le liquide simulant le liquide physiologique avec des concentrations ioniques diverses (en mM : Na^+ 142.0, K^+ 5.0, Mg^{++} 1.5, Ca^{++} 2.5, Cl^- 148.0, HCO_3^- 4.2, HPO_4^- 1.0, SO_4^- 0.5) a été préparé en dissolvant du NaCl, du KCl, du $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, du $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, du NaHCO_3 , du K_2HPO_4 et du Na_2SO_4 dans de l'eau ultrapure. Cette solution a été ramenée à un pH de 7.25 à l'aide de tris(hydroxyméthyl)aminométhane et d'acide hydrochlorique 37%. Durant l'immersion, le S.B.F. a été renouvelé tous les deux jours.

La figure 5.5 montre des images T.M.-A.F.M. de la croissance d'apatite sur des groupements vinyliques, hydroxyles, carboxyles et phosphates, terminant la monocouche, après 5 jours (A, B, C et D) et après 30 jours (E, F, G et H) d'immersion dans du S.B.F. à 37°C, respectivement. La comparaison entre les images obtenues après différents temps d'immersion dans du S.B.F. révèle un remplissage des griffes de polissage par les particules d'apatite. La surface prend progressivement une forme de plus en plus "nuageuse".

Les données obtenues à des temps intermédiaires (après 10, 15, 20 et 25 jours d'immersion en S.B.F.) permettent également la visualisation de ce processus de recouvrement. En résumé, ces images permettent la visualisation du phénomène de recouvrement de la surface par une

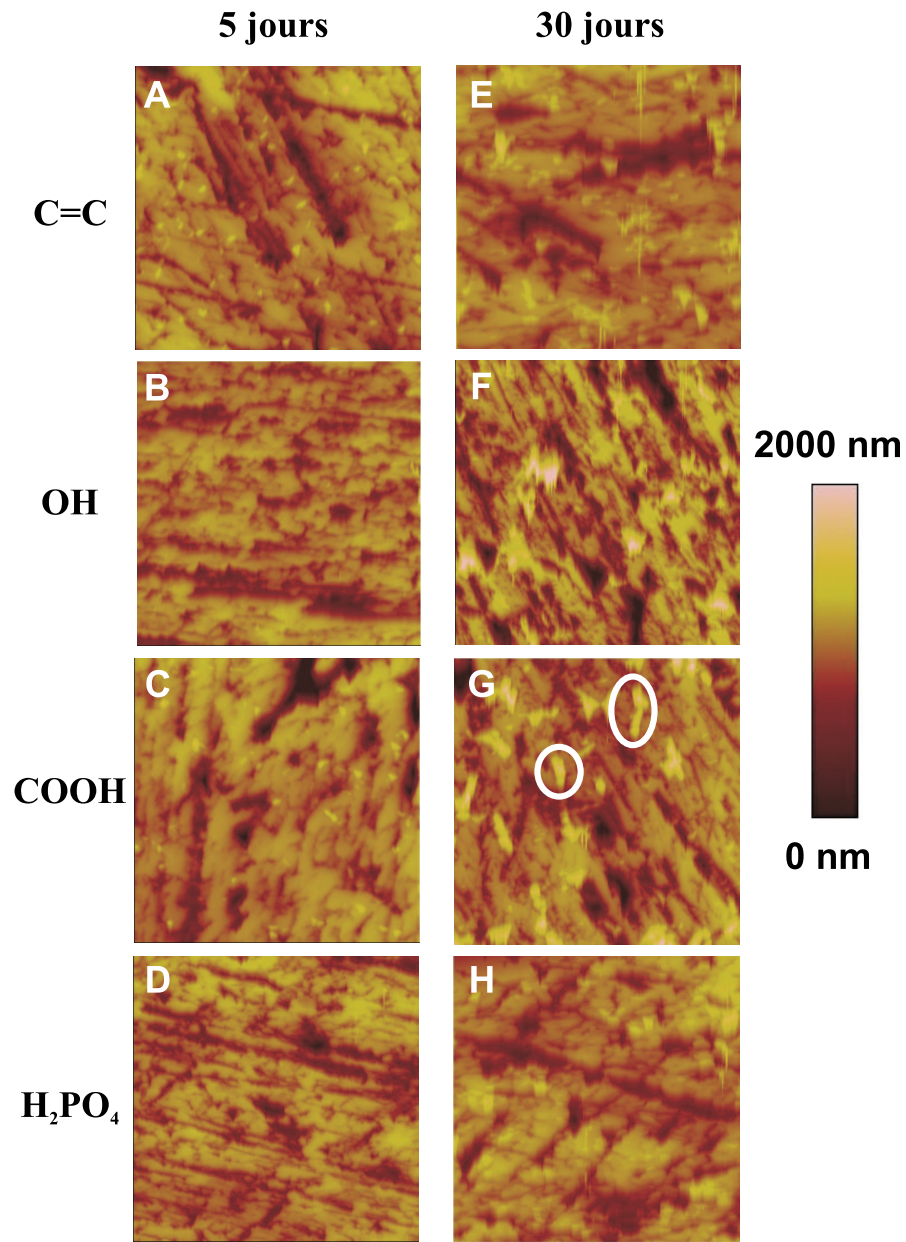


FIG. 5.5 – Images A.F.M. en mode à contact intermittent ($100\ \mu\text{m} \times 100\ \mu\text{m}$) de la croissance d'apatite sur les quatre groupements fonctionnels différents modifiant la surface d'oxyde de tantale, après 5 et 30 jours de croissance en liquide simulant le liquide physiologique. (A,E) organosilane terminaison C=C, (B,F) organosilane terminaison -OH, (C,G) organosilane terminaison -COOH, (D,H) organosilane terminaison -PO₄H₂.

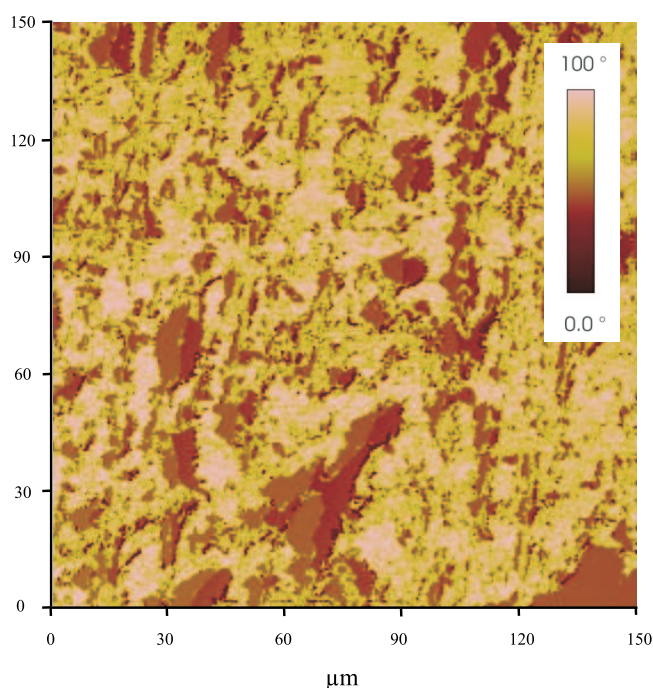


FIG. 5.6 – Image de phase de la croissance d'apatite sur des groupements carboxyles terminaux après 5 jours d'immersion en S.B.F. (150 μm x 150 μm).

couche d'apatite. Un de ces phénomènes les plus exceptionnels est le recouvrement des griffures de polissage par les particules d'apatite, régulièrement observé.

Des bâtonnets d'origine inconnue sont aussi visibles sur la plupart des échantillons, principalement après 10 et 15 jours d'immersion en S.B.F., et clairement observables après 30 jours d'immersion (cercles de la figure 5.5G). La figure 5.6 est une image de phase de l'apatite croissant sur une monocouche de terminaison $-\text{COOH}$, après 5 jours d'immersion en S.B.F. Cette image met en évidence trois contrastes différents : un blanc-vert, un brun clair et un brun foncé.

Des particules d'apatite à l'échelle micrométrique après 25 jours de croissance en S.B.F. sont présentées aux figures 5.7A à D. Ces surfaces affichent une rugosité moyenne d'environ 1.0 nm, 2.3 nm, 2.6 nm et 4.5 nm, respectivement. La figure 5.7A, sur laquelle l'apatite est formée sur une double liaison vinylique terminale, ne présente qu'un nombre limité de particules (entourées dans la figure). La taille et le nombre de particules sont légèrement plus importants dans le cas de l'apatite sur un groupement hydroxyle terminal (figure 5.7B). Par ailleurs, la taille des particules semble être plus petite sur les groupements carboxyles

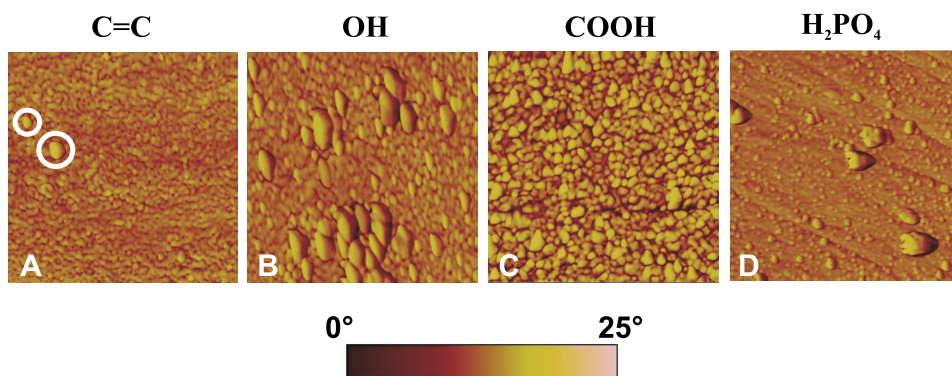


FIG. 5.7 – Images de phase montrant la croissance de l'apatite sur les quatre groupements fonctionnels terminaux : (A) vinyliques, (B) hydroxyles, (C) carboxyles et (D) phosphates, modifiant la surface d'oxyde de tantale après 25 jours d'immersion en S.B.F. ($1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$).

terminaux mais la surface est recouverte dans sa totalité, comme présenté à la figure 5.7C. Finalement, une surface relativement uniforme met en évidence des particules petites et de tailles moyenne sur les terminaisons $-\text{PO}_4\text{H}_2$ (figure 5.7D).

Discussion

La comparaison des figures 5.4 et 5.6 révèle la présence d'un contraste supplémentaire sur cette dernière. Ce contraste additionnel, c'est-à-dire celui apparaissant après 5 jours d'immersion en S.B.F., ne peut que représenter le phosphate de calcium, croissant sur la monocouche de terminaison $-\text{COOH}$. Les deux autres contrastes sont attribués au substrat et au film d'organosilane, comme déduit de la figure 5.4. Bien que différents substrats et monocouches auto-assemblées aient été utilisés, d'autres groupes de recherche ont également mis en évidence la formation de phosphate de calcium après seulement 5 jours de croissance [204, 205, 206].

Des bâtonnets d'origine inconnue sont aussi visibles sur la plupart des échantillons, principalement après 10 et 15 jours d'immersion, et clairement observables après 30 jours (figure 5.5). Bien que ceux-ci aient déjà été observés auparavant par microscopie électronique, aucune interprétation ou explication ne fut jusqu'alors proposée [22, 205]. Les images A.F.M. de la figure 5.5 révèlent également une augmentation de la taille et du nombre de tels bâtonnets avec le temps d'immersion. Aucune autre espèce chimique que celles constituant le substrat, la monocouche ou l'apatite n'a été mise en évidence par X.P.S. (D. Aubry,

C.E.S.) [207].

Les résultats X.P.S. confirment la présence de phosphate et de calcium (caractéristiques des cristaux d'apatite) à la surface de chaque échantillon, sur chacun des groupements fonctionnels terminaux de la monocouche d'organosilane après seulement 5 jours de croissance [22]. Or, la croissance d'apatite sur des monocouches auto-assemblées d'alkanethiols sur Au(111) avait nécessité 10 jours d'immersion en S.B.F. avant l'apparition de signaux de calcium et de phosphate dans les spectres X.P.S. de *Tanahashi* et al. [200]. Les mesures spectroscopiques réalisées par *D. Aubry* indiquent également une augmentation de la quantité de calcium et de phosphore avec le temps d'immersion en S.B.F [22]. Ceci semble concorder avec les images A.F.M., apparaissant de plus en plus “nuageuses” au fur et à mesure du dépôt (i.e. du temps d'immersion en S.B.F.).

Plus précisément, *Aubry* et al. relèvent une augmentation similaire et régulière de la quantité de calcium et de phosphore sur les groupements vinyliques et hydroxyles. L'intensité des signaux X.P.S. du calcium et phosphore sur les groupements terminaux carboxyles et phosphates est beaucoup plus importante que sur les groupements vinyliques et hydroxyles. La croissance d'apatite ne semble dès lors pas fortement accélérée par l'introduction des groupements hydroxyles en extrême surface de la monocouche. Cette interprétation apparaît tout à fait cohérente avec les images de la figure 5.7A et B. Ces images de phase présentent en effet un nombre restreint de particules, par rapport à celles obtenues sur des groupements terminaux carboxyles et phosphates. Les figures 5.7C et 5.7D montrent une quantité de particules beaucoup plus importante. Celles-ci couvrent pratiquement toute la surface dans le cas de la terminaison -COOH, en accord avec les données spectroscopiques et leur interprétation. Finalement, *Aubry* et al. concluent que la croissance d'apatite sur des organosilanes est fonction du groupement terminal de la monocouche et que les vitesses de croissance augmentent avec les groupements fonctionnels suivant l'ordre : $C=C \simeq OH < COOH < PO_4H_2$. Les mesures de rugosité obtenues à partir des images de la figure 5.7 vont également dans ce sens. Nous pouvons dès lors émettre l'hypothèse, sur cette base, que les particules d'apatite visibles sur les groupements phosphates et après 25 jours de croissance constituent une couche supplémentaire d'apatite.

5.3.4 Résumé

En résumé, nous avons pu mettre en évidence la formation de particules d'apatite sur des monocouches auto-assemblées d'organosilanes

sur des surfaces d'oxyde de tantale. Les différents groupements terminant ces monocouches induisent des cinétiques différentes de croissance de l'apatite. Les terminaisons phosphates induisent plus rapidement la formation d'apatite que les groupements vinyliques, hydroxyles et carboxyles présents en extrême surface. Nous avons pu confirmer, par nos images A.F.M., que la vitesse de croissance de l'apatite augmente selon son affinité avec les groupements terminaux, i.e. de la manière suivante : $C = C < -OH < -COOH < -PO_4H_2$. Les résultats montrent que les particules d'apatite s'agglomèrent au cours du temps pour former finalement une couche uniforme en surface.

Chapitre 6

Les biomolécules et interactions biomoléculaires

Résumé

L'étude de composés biologiques trouve son intérêt dans les applications (bio)technologiques éventuelles telles que des capteurs biologiques. Nombres de molécules se révèlent actuellement attrayantes, aussi bien du point de vue structurel qu'électronique. Plusieurs molécules ont ainsi été sélectionnées. Les porphyrines en font partie et la première section de ce chapitre en étudie l'adsorption sur un substrat métallique. De nombreux capteurs biologiques sont également mis en oeuvre à l'aide de protéines déposées sur substrats métalliques. La protéine fluorescente verte a plus particulièrement été étudiée dans une deuxième section. Pour terminer, nous nous sommes focalisé sur la reconnaissance moléculaire entre deux biomolécules. Le système choisi est un système modèle en la matière, à savoir, l'interaction entre la biotine et l'avidine. Chaque section résume brièvement la structure et les propriétés des composés investigués.

6.1 Les porphyrines

Parmi le nombre incalculable de composés prometteurs en mécanique et électronique moléculaire, les porphyrines jouent un rôle plus qu'important. Elles ont, par exemple, prouvé leur grande efficacité de conversion de l'énergie solaire. Elles sont également candidates pour des dispositifs électroniques et de mécanique moléculaire [208]. Les propriétés des porphyrines peuvent être précisément contrôlées en modifiant leur squelette moléculaire. En effet, la démonstration d'une relation étroite entre leur structure et leurs propriétés a ouvert de nouvelles perspectives.

Les porphyrines organiques ont été intensivement étudiées ces dernières années pour leur implication dans la constitution de l'hémoglobine (dans le cas de la protoporphyrine IX et ses dérivés) ou dans les applications technologiques telles que les systèmes photovoltaïques (dans le cas du ferrocène et des porphyrines thiolées). Par ailleurs, les protoporphyrines IX (PPIX) sont utilisées comme éléments photosensitifs dans l'élimination de cellules cancéreuses en thérapie photodynamique [209, 210]. Les centres porphyrines contenant des ions métalliques (ZnPPIX, par exemple) ne sont cependant pas appropriés dans ce contexte, car ils entravent alors le processus d'oxygénation [211].

Les caractéristiques principales des porphyrines sont liées à leur activité électronique remarquable. Des transitions électroniques intenses proviennent de leurs groupements aromatiques, constituant leur partie centrale. Les films de porphyrines peuvent présenter des différences aigües en fonction de leur conformation moléculaire sur le substrat. De nombreuses études ont été appliquées aux porphyrines en solution ou en agrégats en utilisant différentes techniques [212, 213, 214, 215].

Dans cette section, nous allons décrire des monocouches auto-assemblées de trois espèces de porphyrines différentes adsorbées sur du Pt(111), à l'air ambiant : la protoporphyrine IX (PPIX), la Zn(II) protoporphyrine IX (ZnPPIX) et la 5-[p-(6-mercaptohexoxy)-phényl]-10,15,20-triphenylporphine (TPD). La conformation géométrique de ces trois porphyrines est sondée par microscopie à effet tunnel à balayage. Nos mesures S.T.M. furent réalisées à l'air ambiant à l'aide de pointes en or fonctionnalisées, afin d'améliorer la résolution de l'image limitée par la dérive thermique. Les pointes ont été fonctionnalisées avec de l'acide 4-mercaptobenzoïque (4-MBA) et du 4-mercaptotoluène (4-MT). Les conditions expérimentales sont comprises entre 360 et 430 pA en courant et de + 425 à +765 mV en tension. Les images ainsi obtenues sont discutées en fonction de courbes spectroscopiques 2C-S.F.G. (Two Colour - Sum Frequency Generation) réalisées dans les mêmes

conditions par le Dr *C. Humbert* [25].

Préparation

Chaque porphyrine est diluée séparément dans du dichlorométhane (10^{-3}M) pendant 10 minutes au bain à ultrasons. Les monocristaux de platine utilisés sont immergés dans la solution appropriée et conservés dans le noir dans un récipient clos, pendant au moins 18 heures. Les échantillons sont enfin rincés abondamment au solvant et passés au bain à ultrasons pendant une minute (pour ôter toute multicouche éventuelle ou agrégat formé lors du dépôt). Les détails concernant les produits utilisés sont exposés en annexe B.

6.1.1 Recouvrement et conformation

Les images S.T.M. obtenues sur des monocouches de TPD, PPIX et ZnPPIX adsorbées sur Pt(111) sont présentées aux figures 6.1A, 6.1B et 6.1C, respectivement. Le pourcentage visible de recouvrement peut être calculé par une procédure *Matlab* simplifiée. Une hauteur-seuil est d'abord déterminée dans l'histogramme de l'image S.T.M. de base. Ceci nous permet d'obtenir une image à deux couleurs (binaire). Une de ces deux couleurs représente les molécules, alors que l'autre constitue le substrat. Le nombre de pixels de chaque couleur est ensuite compté et un rapport calculé. Les valeurs ainsi déterminées représentent le taux de recouvrement de chaque porphyrine constituant les films organiques sur le platine. Pour la TPD, cette technique indique un recouvrement de 83%, alors que la PPIX et la ZnPPIX atteignent 76 % et 70 %, respectivement. Les images de la figure 6.1 indiquent clairement un taux plus élevé de recouvrement pour la TPD que pour la PPIX, elle-même plus présente en surface que la ZnPPIX. La structure des molécules y est également représentée.

Pour déduire l'épaisseur moyenne du film, des courbes transversales ont été réalisées sur chaque image. Pour la TPD, l'épaisseur du film est estimée entre 1.5 et 2.5 nm. Ces valeurs constituent des limites maximales pour un processus d'adsorption où les molécules se trouveraient droites (perpendiculaires au substrat) et liées au substrat par l'atome de soufre. Pour la PPIX et la ZnPPIX, l'épaisseur est comprise entre 0.3 et 0.5 nm par rapport à la surface métallique, i.e. en bon accord avec des molécules liées de manière covalente au substrat par leurs groupements carboxyles. L'information principale déduite de ces mesures est que les films de porphyrines constituent des couches assez compactes. Nous pouvons également confirmer la présence d'une seule

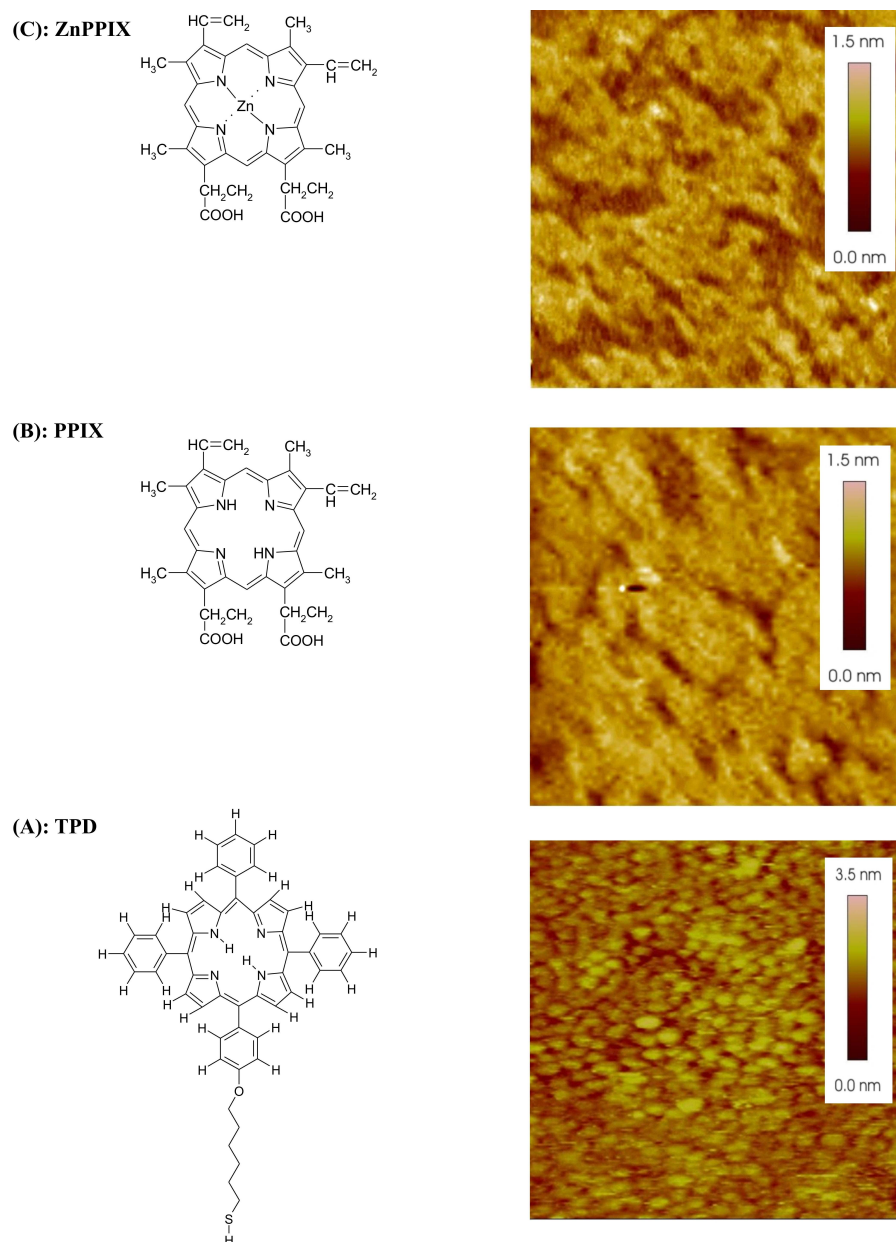


FIG. 6.1 – Structure chimique et images *S.T.M.* (80 nm x 80 nm) de monocouches de TPD (A), PPIX (B) et ZnPPIX (C), adsorbées sur Pt(111).

monocouche moléculaire en surface après dépôt. Cependant, en ce qui concerne les protoporphyrines PPIX et ZnPPIX, les mesures *S.T.M.* ne peuvent avec certitude déterminer l'organisation des molécules au sein de la monocouche. Pour aborder cette question, la spectroscopie

optique non-linéaire 2C-S.F.G. a été utilisée.

Ces mesures spectroscopiques ont été réalisées, par le Dr *C. Humbert*, sur des monocouches de TPD, de PPIX et de ZnPPIX. Les détails les concernant sont exposés ailleurs [25]. Elles ont pu fournir des informations sur l'arrangement moléculaire et l'agrégation du film de TPD. La présence d'interactions électroniques fortes entre les centres porphyrines de la TPD a été mise en évidence. Les systèmes π entre molécules voisines semblent donc se faire face. On peut parler d'empilement en paquet de cartes, les molécules étant alors perpendiculaires au substrat. Dans le cas de la PPIX, les spectres indiquent que les molécules se tiennent plutôt debout sur la surface. Pour la ZnPPIX, les conclusions sont opposées. Les données suggèrent une configuration avec des centres porphyrines se trouvant couchés (plus parallèles) au substrat, ce qui induit une structure moins dense du film, comme déduit des images S.T.M. de la figure 6.1.

Des mesures similaires ont été obtenues sur les mêmes porphyrines sur des substrats d'Au(111). Des essais ont également été réalisés avec de la PPIX et de la ZnPPIX sur du graphite H.O.P.G. Les résultats prometteurs sont cependant toujours en cours d'analyse et soumis à l'épreuve de la reproductibilité.

6.1.2 Résumé

En résumé, nous avons pu mettre en évidence un haut taux de recouvrement de la surface de Pt(111) pour toutes les porphyrines analysées. La hauteur des couches pour chaque type de porphyrine a également été mesurée. La combinaison de ces données S.T.M. avec celles issues d'expériences de spectroscopie non linéaire a révélé l'orientation et l'organisation des porphyrines sur le substrat.

6.2 La protéine fluorescente verte (GFP)

La photosynthèse constitue un système naturel de conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique. Ce mécanisme est un élément fondamental dans beaucoup de processus photochimiques et photobiologiques [216]. Différents dispositifs moléculaires artificiels ont en effet été mis au point, en imitant les propriétés des systèmes photosynthétiques biologiques. Des molécules telles que les porphyrines sont par exemple étudiées en vue de réaliser de tels systèmes.

La fabrication de dispositifs biomoléculaires peut également être réalisée grâce à l'adsorption de protéines [16]. Celle-ci a en effet été intensivement étudiée ces dernières années, tant pour son intérêt biotechnologique que pour son aspect fondamental. Nous nous sommes plus particulièrement intéressé à la protéine fluorescente verte (G.F.P. : *Green Fluorescent Protein*). De nombreuses informations sont maintenant disponibles sur cette protéine en solution grâce, notamment, aux techniques d'adsorption et de fluorescence [217, 218, 219]. Cependant, une connaissance précise de l'adsorption et de l'assemblage de cette G.F.P. sur des substrats métalliques est indispensable pour la réalisation de capteurs biologiques efficaces. Malheureusement, la quantité de données en phase adsorbée reste très limitée. Une des principales raisons en est que peu de techniques permettent d'en étudier les propriétés optiques et électroniques après adsorption.

Les protéines adsorbées gardent-elles les mêmes propriétés qu'en phase liquide ? La combinaison de la microscopie A.F.M. et de la spectroscopie S.F.G. a permis de répondre à cette question. Dans ce contexte, il est donc nécessaire de ne déposer qu'une seule monocouche de protéine. La connaissance de l'épaisseur des couches moléculaires adsorbées, difficile à obtenir par les techniques usuelles, a constitué l'atout majeur de notre technique A.F.M.

Les résultats présentés dans cette section sont directement reliés à ce domaine de recherche. L'adsorption en monocouche de la G.F.P. sur un substrat de platine a été analysée (en collaboration avec le Dr *L. Dreesen*). Dans un premier temps, la structure de cette G.F.P. et les propriétés qui en découlent, sont résumées. Les mesures A.F.M. obtenues sont ensuite exposées et discutées.

6.2.1 Structure et propriétés

La protéine fluorescente verte (G.F.P.) est issue de la méduse *Aequorea victoria*. Cette méduse émet de la lumière (figure 6.2). En réalité, la G.F.P. agit comme une protéine fluorescente secondaire, recevant de

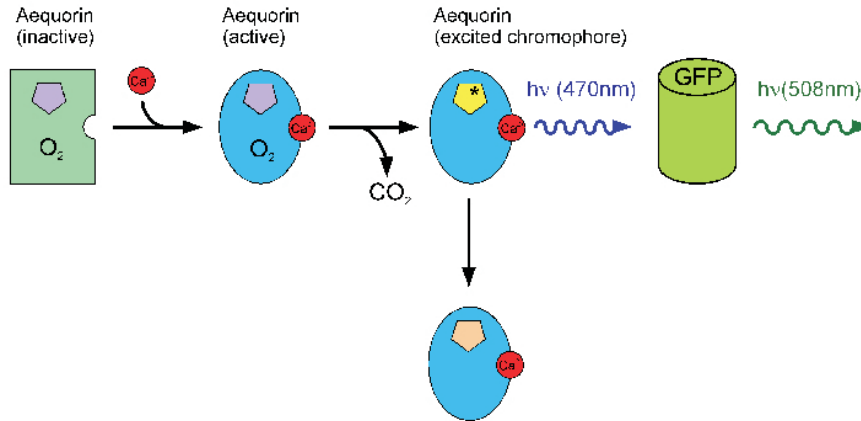


FIG. 6.2 – Résumé de la bioluminescence de *Aequorea Victoria*. L'aequorine y est représentée par un rectangle vert (inactive) et un ovale bleu (active). Le calcium ionisé est dessiné comme un cercle rouge et le chromophore par un pentagone jaune (état excité) ou brun (état fondamental). La G.F.P. est dessinée comme un cylindre vert. [221].

l'énergie d'aequorine activée, une autre protéine [220]. Ce processus est résumé à la figure 6.2. L'aequorine est un complexe de 21.4 kDa composé d'apoprotéine, d'oxygène moléculaire et de coelenterazine (pentagone violet de la figure 6.2). In vivo, lorsque l'aequorine est activée par du Ca^{++} (sphère rouge de la figure 6.2), elle catalyse l'oxydation de la coelentérazine en coelentéramide (pentagone jaune de la figure 6.2). Cette coelentéramide se trouve alors dans un état excité. Elle retrouve rapidement son état fondamental en émettant de la lumière à 470 nm, qui constitue la lumière bleue générée par l'aequorine purifiée. In vivo, un transfert d'énergie se produit de l'état excité de la coelenteramide (complexé avec l'aequorine et du Ca^{++}) vers la G.F.P. La protéine fluorescente verte retourne alors dans un état fondamental en émettant de la lumière à 508 nm, correspondant à la fluorescence verte observée.

La G.F.P. naturelle (wt-G.F.P. : *Wild Type-G.F.P.*), est une protéine comportant 238 acides aminés, avec une masse moléculaire de 27 à 30 kDa. Elle est unique parmi les protéines fluorescentes dans le sens où son fluorophore est composé de résidus d'acides aminés modifiés (résidus 65 à 67 : Ser - DehydroTyr - Gly) au sein de la chaîne polypeptidique. Sa structure se caractérise par un tonneau β (d'environ 3 nm de diamètre et 4 nm de hauteur), construit à partir de 11 feuillets β (en bleu sur la figure 6.3). A l'intérieur se trouve une hélice α (en rouge

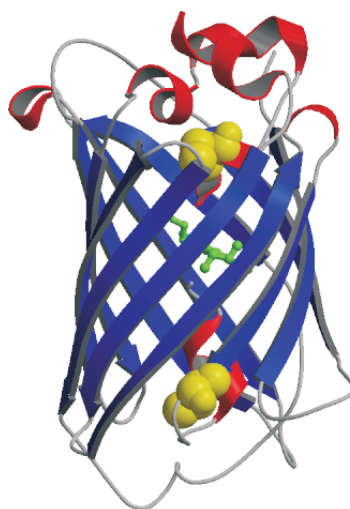


FIG. 6.3 – *Structure de la G.F.P.* [26].

sur la figure 6.3) portant le chromophore (en vert sur la figure 6.3). La wt-G.F.P. possède également deux cystéines (en jaune sur la figure 6.3), la Cys70 et la Cys48, l'une située sur l'hélice interne et l'autre sur le feuillet β 11, respectivement. La Cys48 peut être partiellement exposée au solvant. On s'attend donc à ce qu'elle agisse comme point d'ancrage sur les substrats ayant une forte affinité pour les fonctions thiols, tels que le platine ou l'or.

Nos expériences ont cependant été réalisées sur des protéines fluorescentes vertes mutantes (GFPmut2), issues de la G.F.P. naturelle. La GFPmut2 diffère de la wt-G.F.P. par une triple substitution : Ser65Ala, Val68Leu et Ser72Ala [222]. Elle a été produite (sous forme de protéine recombinante) par le Centre d'Ingénierie des Protéines de l'Université de Liège [26]. Plusieurs raisons nous ont poussé à choisir cette protéine mutante. Premièrement, la G.F.P. et ses mutants sont remarquablement stables avec la température, le pH et l'intensité lumineuse [223]. De plus, la GFPmut2 fluoresce de manière 35 fois plus intense lorsqu'excitée à 488 nm [26]. Ensuite, leurs propriétés optiques en solution ont été intensivement étudiées par absorption et fluorescence [218, 224]. Finalement, la G.F.P. est une molécule présentant un fort potentiel pour le développement de photodiodes et de commutateurs optiques [225, 226, 227]. Améliorer l'efficacité de ces dispositifs bioélectroniques nécessite une connaissance accrue des propriétés structurales et optiques après ad-

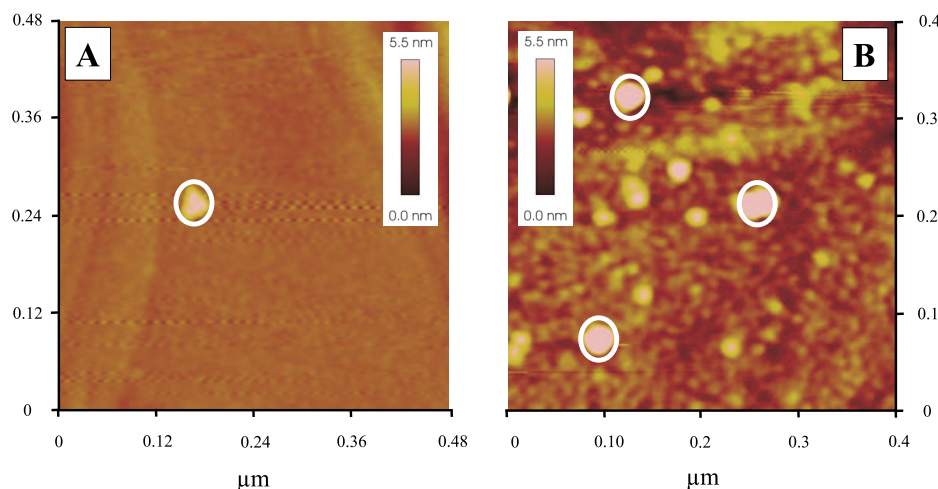


FIG. 6.4 – Images A.F.M. en mode contact de la surface de platine (A) avant (480 nm x 480 nm) et (B) après (400 nm x 400 nm) immersion dans une solution de GFPmut2 durant 18 heures.

sorption sur des surfaces métalliques. Il est donc utile de savoir sous quelle forme ces molécules s'adsorbent et de vérifier si, après adsorption, elles conservent leurs propriétés.

6.2.2 Organisation

Dans le cadre de ces recherches, les mesures A.F.M. ont permis l'évaluation du recouvrement de la surface par la protéine. Cette technique a été utilisée pour la détermination de l'épaisseur des couches moléculaires.

Des images A.F.M. (en mode contact) caractéristiques sont présentées aux figures 6.4A et 6.4B. Elles correspondent aux images obtenues avant (figure 6.4A) et après (figure 6.4B) immersion et séchage du substrat de Pt(111) dans une solution de GFPmut2 (70 μ M in 20 mM Tris-HCl tampon, pH 8.0, 250 mM NaCl), durant 18 heures. Les détails concernant les produits utilisés sont exposés en annexe B. Ces images attestent bien de l'adsorption d'une couche homogène de protéines. De plus, la surface de platine est relativement bien recouverte par ces molécules. Dans chacune des images présentées, les zones plus claires, entourées par des cercles blancs, sont dues à la rugosité du platine, résultant des recuits subis par la surface.

L'épaisseur de la couche adsorbée a été évaluée via une technique déjà utilisée précédemment par d'autres groupes de recherche [228]. Elle consiste, lors d'expériences réalisées en mode contact, à acquérir

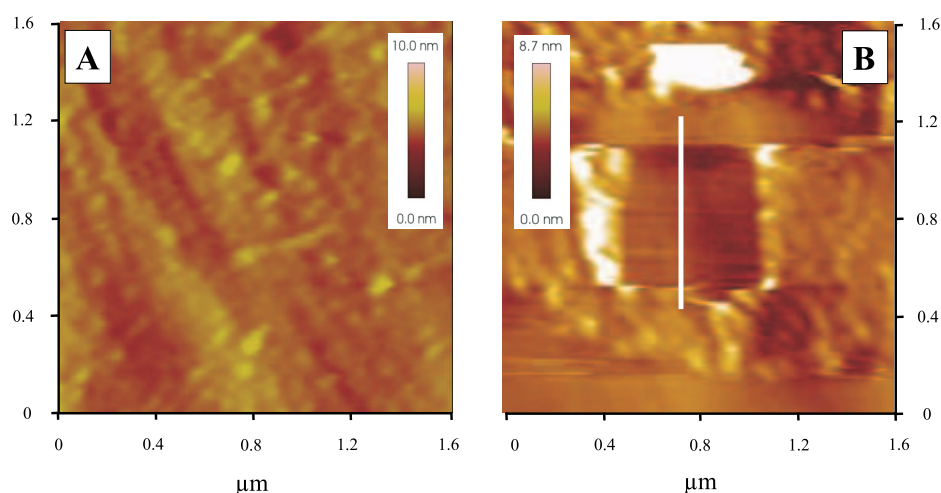


FIG. 6.5 – (A) Image A.F.M. en mode contact de la structure de la surface de platine recouverte de GFPmut2 (1.6 μm x 1.6 μm). (B) Image A.F.M. en mode contact de la même région, après balayage avec une force importante sur la zone centrale de l'image (1.6 μm x 1.6 μm).

une première image (à grande échelle) de la surface recouverte de protéines, en minimisant la force appliquée sur la surface par la pointe (figure 6.4B). Ensuite, un agrandissement est réalisé sur une zone plus précise. Une force importante est alors appliquée (contrôlée à l'aide de courbes de force). Le but est ici de véritablement racler la surface avec la pointe A.F.M., à la manière d'un balai. Les protéines de la surface sont alors poussées vers les extrémités de la zone balayée par la pointe. Après minimisation de la force appliquée, il est alors possible de visualiser (après un zoom arrière) l'aire nettoyée, comme présenté à la figure 6.5B. Au centre de la figure se trouve maintenant dessiné un carré. Celui-ci représente la surface du substrat, nettoyée des protéines qui la recouvraient. Pour comparaison, nous présentons à la figure 6.5A, une image de la surface avant sa modification par la pointe. Il est désormais possible par cette technique de mesurer la différence de hauteur entre les zones endommagées (sans molécules de G.F.P.) et intactes (avec molécules de G.F.P.).

L'image obtenue après ce procédé (figure 6.5B) confirme bien l'adsorption de molécules de G.F.P. sur le substrat. Des résidus sont en effet visibles aux bords gauches et droits du carré central. Ces résidus constituent sans nul doute des protéines poussées sur les côtés par la pointe A.F.M., lors de l'application d'une force importante. De plus, une courbe transversale réalisée, par exemple, le long de la ligne blanche de la figure 6.5B, indique une valeur d'environ 2.5 nm entre

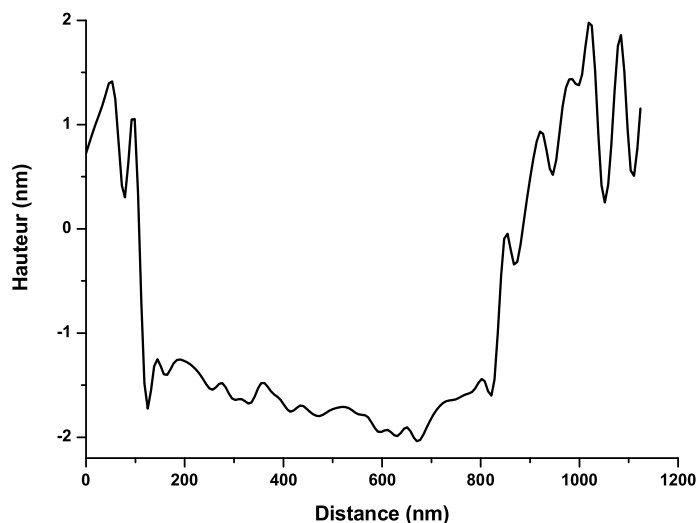


FIG. 6.6 – Courbe transversale obtenue le long de la ligne blanche de la figure 6.5B

la hauteur de la zone nettoyée et la hauteur de la surface recouverte de protéines (figure 6.6). Cette valeur représente donc l'épaisseur de la couche de protéines. Nous ne pouvons cependant pas déterminer quelle est l'orientation des protéines par rapport au substrat. Néanmoins, la hauteur mesurée est plus faible que les dimensions caractéristiques de la protéine (4 nm de hauteur et 3 nm de diamètre). Nous pouvons donc conclure que les GFPmut2 se sont adsorbées à la surface du Pt(111) sous forme d'une monocouche moléculaire. N'oublions cependant pas que le mode contact est connu pour sous-estimer les hauteurs mesurées. En effet, les pointes A.F.M. (en fonction de leur constante de raideur) ont tendance à écraser plus ou moins légèrement la couche adsorbée lors de la mesure (même après minimisation de la force appliquée). N'oublions pas non plus que ces mesures ont été réalisées à sec, ce qui peut induire des modifications de structure de la biomolécule.

6.2.3 Résumé

En conclusion, nous avons pu montrer que les molécules de GFP-mut2 sont adsorbées sous forme d'une monocouche à la surface du Pt(111). Cette information est très importante car elle a permis une interprétation adéquate de mesures spectroscopiques réalisées sur ce système [26]. Ces mesures ont établi que les protéines de GFPmut2

conservaient pratiquement les mêmes propriétés électroniques en solution et après adsorption. Ces résultats permettent d'envisager avec enthousiasme la réalisation de systèmes bioélectroniques à base de protéines adsorbées.

6.3 Les interactions biomoléculaires

La reconnaissance moléculaire constitue un des aspects importants des sciences de la vie. Cette reconnaissance se définit comme le résultat d'interactions fortes et spécifiques entre deux molécules, sans que n'apparaisse de liaison covalente ou ionique entre ces dernières. En réalité, de telles interactions sont issues de liaisons faibles entre des surfaces géométriquement complémentaires appartenant à des sites spécifiques de deux molécules différentes. La reconnaissance entre un ligand et son récepteur, entre un antigène et un anticorps, ainsi qu'entre brins complémentaires de l'A.D.N. en sont les principaux exemples.

Par exemple, la reconnaissance moléculaire spécifique entre un ligand et son récepteur est nécessaire pour fournir une sélectivité adéquate, afin de réguler l'organisation élaborée des systèmes biologiques complexes. Leur forte affinité l'un pour l'autre fait d'eux d'excellents outils dans de nombreuses recherches, telles que dans les études impliquant les capteurs biologiques. Durant la dernière décennie, des progrès significatifs ont été réalisés afin d'élucider la nature de ces interactions. De plus, diverses méthodes biophysiques, ainsi que des traitements théoriques, ont contribué à de récentes avancées [229].

Par ailleurs, l'invention des S.P.M. a elle aussi motivé de nombreuses recherches aussi bien en science des matériaux que, plus récemment, en biologie et biochimie. L'A.F.M. notamment, permettant l'analyse de matériaux isolants, est progressivement devenue très populaire car elle s'adapte parfaitement à l'imagerie de matériaux biologiques. L'A.F.M. peut également être utilisée comme un outil de mesure des processus de reconnaissance moléculaire. La précision sur la position et la sensibilité à la force permettent la détection de liaisons moléculaires. En effet, la force d'interaction entre la pointe et l'échantillon peut être mesurée en déplaçant la pointe perpendiculairement à la surface et en mesurant la force agissant sur celle-ci. A l'aide de ces courbes force-distance (ou courbes approche-retrait), des forces de l'ordre de 10 pN (ou moins), résultant d'interactions intermoléculaires uniques, ont été mises en évidence [230, 231, 232, 233, 234]. En attachant des biomolécules complémentaires sur la pointe A.F.M. ainsi que sur le substrat lui faisant face, cette capacité a été exploitée pour mesurer les forces nécessaires à la séparation des molécules en interaction, telles qu'un ligand et son récepteur.

La majorité des études mesurant des forces entre un ligand et son récepteur, par exemple, se sont focalisées sur l'interaction de la biotine avec l'avidine [235, 236, 237, 238]. Les raisons de la popularité de ce complexe comme système modèle proviennent de ses caractéristiques

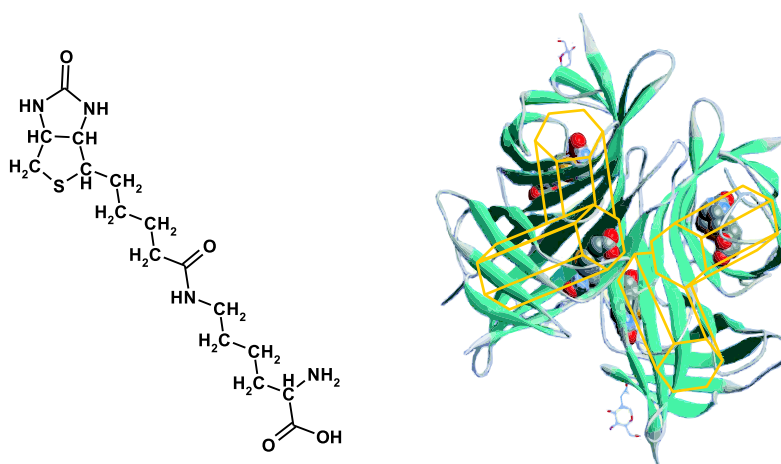


FIG. 6.7 – **A gauche** : Représentation d’une molécule de biocytine [27]. **A droite** : Structure tétramérique de l’avidine. Une représentation schématique des quatre sous-unités, esquissées par quatre prismes hexagonaux vides, est superposée à la structure de la protéine. Quatre biotines occupent les quatre sites de liaison. [27].

structurelles et fonctionnelles uniques. Celles-ci incluent une forte affinité (constante de dissociation de 10^{-13} à 10^{-15} M) et une grande spécificité de l’interaction. La symétrie centrale de l’avidine facilite son orientation, laissant des sites de liaison libres sur la face non-accolée au substrat. Au cours de nos expériences (réalisées en collaboration avec le Dr L. Dreesen), nous avons d’abord voulu vérifier, par microscopie de force, l’adsorption d’une couche de biocytine à la surface d’un substrat, le fluorure de calcium. La spectroscopie de force, réalisée à l’aide de pointes A.F.M. fonctionnalisées, a de plus permis la quantification de l’interaction mesurée entre la biocytine et l’avidine. Mais auparavant, intéressons-nous de plus près à ce “couple moléculaire” si particulier.

6.3.1 La biotine et l’avidine

Le système ligand-récepteur étudié est donc le système biotine / avidine ou plus exactement, le système biocytine/avidine. La biotine est une vitamine (la vitamine H). Sa formule chimique est $C_{10}H_{16}N_2O_3S$. La biocytine, qui est la molécule réellement utilisée ($C_{16}H_{28}N_4O_4S$) est le résultat d’une liaison covalente entre une molécule de biotine et un groupement amine d’un résidu lysine ($C_6H_{14}N_2O_2$). La structure de cette molécule est représentée dans l’image de gauche de la figure 6.7.

L’avidine quant à elle est une protéine tétramérique (15 800 Da /

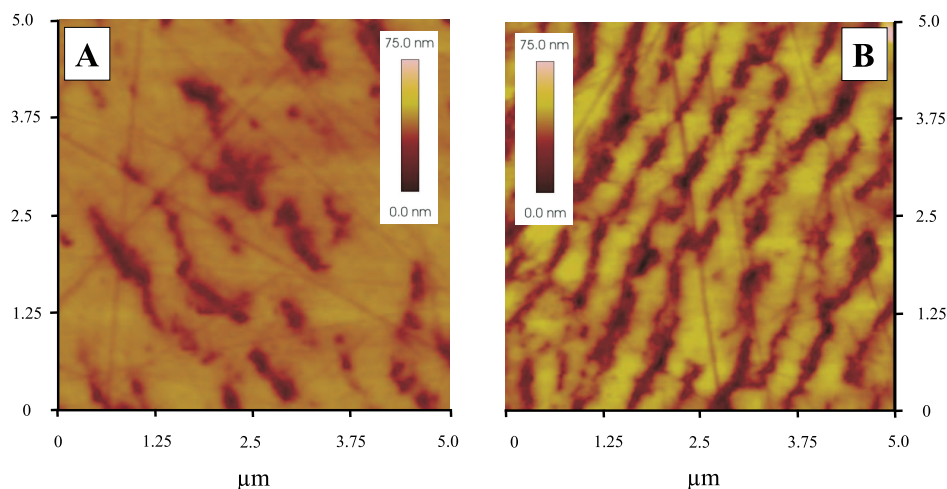


FIG. 6.8 – Surface du fluorure de calcium (A) avant ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) et (B) après ($5\ \mu\text{m} \times 5\ \mu\text{m}$) immersion dans une solution contenant de la biocytine.

monomère). On la trouve en faible quantité dans le blanc d'oeuf, par exemple. Ses quatre sous-unités se replient en quatre tonneaux β . Ces tonneaux sont schématisés par les prismes hexagonaux (jaunes) dans l'image de droite de la figure 6.7. Cette figure indique également les quatre sites de liaison pour quatre molécules de biocytine. La liaison de l'avidine avec la biotine (biocytine), bien que non-covalente, est extrêmement forte avec une constante de dissociation ($K_d \approx 10^{-15}\text{M}$, c'est-à-dire plus de trois ordres de grandeur supérieure à celle des constantes d'interactions antigène-anticorps.

6.3.2 Adsorption

Cette section présente l'adsorption de biocytine en surface du CaF_2 . Des images A.F.M. typiques de la surface du substrat avant et après dépôt de biocytine sont présentées aux figures 6.8A et 6.8B, respectivement. Les couches de biocytine ont été préparées en immergeant le substrat de CaF_2 dans une solution 10^{-2}M de biocytine dans du 2,2,2-trifluoroéthanol (T.F.E.) pendant deux heures. Un rinçage abondant au T.F.E. et un séchage sous flux d'azote ont été ensuite réalisés. Les détails concernant les produits utilisés sont exposés en annexe B.

La surface du substrat vierge (figure 6.8A) présente un certain nombre de plateaux séparés par des crevasses. Des griffes de polissage sont également visibles. La rugosité moyenne mesurée est d'environ 5.0 nm. Après dépôt de biocytine, la surface présente une structure légè-

rement différente (figure 6.8B). Des zones plus nuageuses, sous forme plus ou moins linéaire, orientées suivant une des diagonales de l'image sont maintenant visibles. La rugosité mesurée est d'environ 7.0 nm. Les structures observées et les rugosités mesurées nous indiquent donc que le dépôt de biocytine est bien présent en surface de l'échantillon. La différence des rugosités mesurées (7.0 nm - 5.0 nm = 2.0 nm) correspond de plus assez bien à la longueur d'une molécule de biocytine, en supposant un accrochage avec le substrat via le groupement carboxylique terminal. Nous pouvons donc considérer un dépôt en monocouche.

6.3.3 Mesure de force

Le mode opératoire utilisé lors des mesures de l'interaction biocytine/avidine est le suivant : le substrat de CaF_2 est recouvert d'une couche de biocytine, alors que la pointe est enveloppée de molécules d'avidine. Cet accrochage de molécules d'avidine est réalisé en trempant la pointe A.F.M. durant 30 secondes dans une solution d'avidine (HEPES 10^{-2}M , pH 7.4). Les pointes ont préalablement été nettoyées à la solution piranha et rincées à l'eau. Les détails concernant les produits utilisés sont exposés en annexe B. Une fois montée sur le microscope, la pointe est approchée progressivement de la surface et la force d'interaction entre ces deux éléments est mesurée. Cette mesure de l'interaction entre la pointe et la surface est déterminée à partir de changements dans la déflexion du levier, comme détaillé au chapitre 2.

Les courbes de force de la figure 6.9 consistent en une courbe d'approche (courbe noire), suivie d'une courbe de retrait (courbe rouge). Une courbe de force représentative de l'interaction biotine/avidine, réalisée à l'aide d'une pointe A.F.M. fonctionnalisée, est présentée à la figure 6.9A. Durant la phase d'approche, la pointe fonctionnalisée par de l'avidine est amenée au contact de la surface biotinée. Aucune interaction n'est détectée entre les surfaces jusqu'à ce qu'elles entrent en contact. Des liaisons formées entre la biotine et l'avidine forcent le levier à se tordre vers le bas, alors que la pointe est en phase de retrait (i.e. le levier est tiré vers le haut). La force exercée sur les liaisons biotine-avidine est de plus en plus forte, à mesure que la pointe est écartée de la surface. La pointe reste en fait en contact avec l'échantillon jusqu'à ce que la constante de raideur du levier soit supérieure au gradient de la force interfaciale : il y a alors rupture de la liaison biotine-avidine. La transition verticale abrupte dans la courbe de retrait correspond à ce point de séparation avec la surface. L'amplitude de cette transition verticale constitue en réalité la force adhésive des interactions entre la biocytine et l'avidine. Dans notre cas, cette force est évaluée à 6

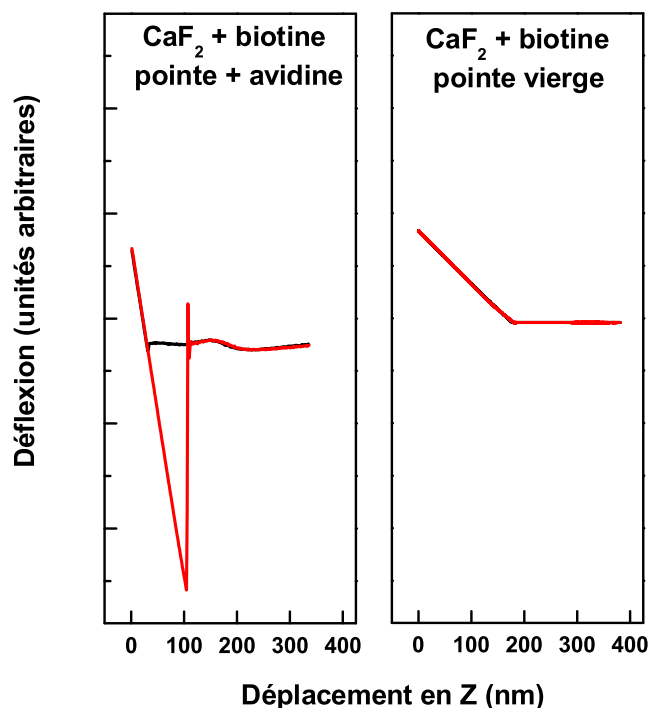


FIG. 6.9 – Courbe de force, sondant l’interaction biotine-avidine. Les trajets aller et retour de la pointe sont respectivement représentés par les courbes noires et rouges. (A) La pointe est fonctionnalisée avec de l’avidine et le substrat est recouvert de biotine. (B) le substrat est recouvert de biotine et la pointe n’est pas fonctionnalisée.

μN . En considérant la valeur d’une interaction équivalent à 200 pN, nous pouvons calculer que le nombre de complexes biotine-avidine impliqués dans cette mesure est de plusieurs dizaines de milliers d’unités. Cette valeur bien que très élevée est cependant possible, même lorsque le contact est limité à l’apex de la pointe A.F.M. Plusieurs facteurs en sont responsables. Il faut d’abord considérer la taille de la pointe, qui reste macroscopique par rapport à une molécule de biocytine, par exemple. Nous devons également tenir compte d’une certaine indentation de la pointe dans la surface.

Plusieurs contrôles ont été effectués afin de confirmer que l’adhérence détectée dans la courbe de force est bien due à l’interaction spécifique entre la biotine et l’avidine. Premièrement, plusieurs cycles d’approche-retrait ont été réalisés et indiquent des résultats similaires.

Ceci laisse supposer que les molécules de biotine sur la surface n'ont pas été enlevées lors du processus. En effet, si les forces mesurées étaient les forces nécessaires pour ôter les molécules de biotine de la surface plutôt que l'interaction biotine-avidine, les molécules de biotine seraient restées attachées aux avidines de la pointe et on n'aurait donc plus d'interaction possible. Aucune reproductibilité n'aurait alors été observée. Par un raisonnement similaire, les forces mesurées ne semblent pas correspondre à celles fixant les molécules d'avidine sur la pointe. Des mesures réalisées avec des pointes non fonctionnalisées n'indiquent la présence d'aucune force d'adhérence, comme montré à la figure 6.9B. Enfin, la surface d'avidine fut également trempée dans une solution de biocytine avant la réalisation des courbes d'approche-retrait, la rendant inactive. De cette manière, tous les sites de liaison des avidines sont complètement saturés en biocytine. Aucune force significative d'adhérence n'a été observée.

Ceci démontre que la liaison biocytine-avidine a été brisée lors des courbes de forces réalisées à l'aide de pointes fonctionnalisées avidine (figure 6.9A). En effet, si, par exemple, le lien moléculaire s'était rompu entre les sous-unités d'avidine, à l'instar de la liaison réversible biotine-avidine, ils ne se seraient pas reformés aisément au cours du rapprochement entre les deux surfaces, lors du cycle suivant. Dans ce cas, une rapide diminution de la force d'adhérence se serait produite au cours de plusieurs cycles successifs.

Dans la littérature, la plupart des études sur ce système présentent des résultats pour lesquels l'avidine est déposée sur le substrat alors que la pointe est fonctionnalisée par de la biotine [231, 233, 239, 240], ce qui fondamentalement ne devrait pas modifier la physique du problème. De plus ces autres groupement de recherches présentent une bien meilleure précision sur leur mesure, pouvant aller jusqu'à l'identification de la rupture d'un seul lien biotine-avidine [234, 235, 237]. Les résultats présentés dans cette thèse en sont encore bien loin. Il serait en effet opportun d'améliorer la méthode de fonctionnalisation des pointes. Les microleviers A.F.M. constituent également un facteur très limitatif lors de la précision des mesures. En effet, les leviers utilisés présentent une constante de raideur de plusieurs dizaines de newton par mètre, ce qui est relativement élevé pour des mesures de contact. La plupart des mesures de force d'interaction sont obtenues avec des leviers ayant des constantes de raideur d'au plus un dixième de newton par mètre.

6.3.4 Résumé

Le système biocytine-avidine étudié représente un capteur de surface sur lequel nous avons réalisé des mesures microscopiques confirmant la présence d'un dépôt moléculaire en surface. Nous avons également montré qu'en utilisant des pointes fonctionnalisées, l'A.F.M. pouvait être employé à mesurer les phénomènes de reconnaissance moléculaire. Il semble évident que cette technique reste à améliorer si l'on désire mesurer la valeur d'une seule interaction. De manière plus générale, ces mesures sont cependant suffisantes pour mettre en évidence la présence de biocytine en surface du CaF_2 et d'avidine sur la pointe (via la mesure de leur interaction), d'une manière rapide et efficace. Ces mesures de force pourraient être appliquées à l'identification d'autres interactions biomoléculaires ou pour cartographier la distribution des sites d'interaction.

Conclusion Générale

L'année 2006 marque les 25 ans de la S.T.M., mais également les 20 ans de l'A.F.M. Ces techniques relativement récentes sont rapidement devenues incontournables dans les laboratoires de physique des surfaces. Depuis leur création, les scientifiques tentent régulièrement d'élargir leur champ d'application. Ainsi, ces nanoscopes ont rapidement été employés à l'étude de matériaux organiques et de biomatériaux. Depuis plus d'une décennie maintenant, les problèmes liés à l'application de ces techniques au monde du vivant ont progressivement été atténués mais restent, dans bon nombre de cas, toujours bien présents. C'est dans ce contexte que s'est déroulée cette thèse de doctorat. Tout au long de ce manuscrit, nous avons pu surmonter les difficultés liées à cette imagerie, ce qui nous a permis d'étudier différents processus et matériaux biologiques, en vue d'applications bio- et nano-technologiques.

Dans ce contexte, l'étude des interactions entre molécules, régissant leur organisation et propriétés à l'échelle nanométrique, représente un défi considérable, tant du point de vue scientifique que technique, en regard des applications technologiques qui en découlent. Il est alors nécessaire de mettre en oeuvre des techniques d'études structurales et physico-chimiques possédant une résolution suffisante. Nous nous sommes donc attelé à développer les potentialités de techniques nanoscopiques, telles que la microscopie à effet tunnel à balayage et à force atomique, pour les appliquer à l'étude de divers types de matériaux biologiques et de biomatériaux.

Le premier exemple en est l'étude de molécules ayant la propriété de s'organiser spontanément sur des surfaces métalliques, constituant des monocouches auto-assemblées, des S.A.M.s.

Nous nous sommes d'abord intéressé à l'étude de molécules organiques physisorbées (sections 3.1 et 3.2). Les images S.T.M. obtenues révèlent une structure lamellaire bidimensionnelle d'esters de cire (palmitate de palmitoyl) [17] et d'acides gras (acide laurique et palmitique) [18] à l'interface phényloctane/graphite. Dans le cas de couches d'esters, des images à très haute résolution ont permis de déduire que les molécules sont couchées sur le substrat, le plan formé par la chaîne carbonée étant perpendiculaire à la surface de graphite. Cette organisation a pu être déterminée grâce à l'utilisation de pointes S.T.M. chimiquement modifiées. L'étude d'acides gras démontre également la transposabilité de ce procédé des pointes fonctionnalisées à d'autres systèmes. Cette technique novatrice permet une très bonne résolution, là où des pointes non modifiées n'ont jamais apporté de résultats concluants. De plus, la différence de contraste, obtenue grâce à deux types de fonctionnalisations (4-MBA et 4-MT), a mis en évidence la position et l'orientation des groupements esters au sein de la couche et de la molécule.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives, notamment dans le domaine du greffage de fonctions chimiques sur des nanostructures. Les applications éventuelles de cette technique des pointes S.T.M. fonctionnalisées semblent énormes dans tous les domaines utilisant la distinction de fonctions chimiques telles que dans les films moléculaires ou de Langmuir-Blodgett, par exemple.

Nous nous sommes également intéressé aux couches moléculaires chimisorbées. En comparant les résultats obtenus sur des couches de décanethiol et de décylthiocyanate sur Au(111) [20], l'influence de la nature du groupement chimique en interaction avec le substrat sur l'organisation des molécules a clairement été mis en évidence. En plus de l'apport scientifique indiscutable de cette étude, l'imagerie à l'échelle atomique de telles couches *déposées en milieu liquide sur des substrats d'or fournis commercialement et imagées à l'air et à température ambiante* représente un véritable défi qui a été relevé avec succès. L'importance des couches intermédiaires, du type alcane-thiol ou dérivés, utilisés dans la réalisation de capteurs biologiques, n'est plus à démontrer et justifie cette étude. Il convient cependant de noter que d'autres facteurs influencent l'organisation de telles couches. La maîtrise de la technique S.P.M. doit nous permettre d'aller plus loin dans cette voie, en investiguant l'influence sur l'organisation moléculaire de divers facteurs (température, nature du substrat [142] ou incursion de groupements fonctionnels dans la chaîne aliphatique, par exemple).

Un second exemple se rapporte à l'imagerie de molécules d'A.D.N. et de complexes polymère / A.D.N. à l'aide du microscope à force atomique [21]. Ces expériences ont démontré une approche originale qui révéla l'effet de facteurs structuraux des complexes sur l'efficacité de transfection. Nous avons démontré que l'A.F.M. pouvait fournir des informations sur les facteurs cruciaux (taille et forme) dont nous devons tenir compte dans l'élaboration de nouveaux vecteurs de transfection efficaces. La détermination du degré de condensation (taille et forme) des complexes élaborés a particulièrement retenu notre attention. Nous avons alors tenté de corréliser cet état de condensation avec l'efficacité de transfection des polyplexes correspondants.

Dans le cas de complexes binaires (complexes P.D.M.A.E.M.A. / A.D.N.), l'efficacité de transfection semble suivre l'état de condensation des complexes. Des structures faiblement condensées produisent de faibles efficacités. A l'inverse, des structures compactes présentent un fort rendement de transfection. Les images obtenues sur des composés ternaires (copolymère/ polymère/ A.D.N.) indiquent que la méthode de préparation élaborée en deux étapes empêche durant la condensation de

l'A.D.N. l'interférence du P.E.G. avec le polymère (P.D.M.A.E.M.A.). Les tailles plus élevées des complexes ternaires, par rapport aux binaires, sont en accord avec l'hypothèse de l'association ultérieure du copolymère, avec les complexes binaires de P.D.M.A.E.M.A. / A.D.N. déjà préformés. Les efficacités de transfection étant similaires entre les deux types de complexes, nous pouvons supposer que, dans ce cas, leur taille, prise isolément, n'est pas un facteur critique dans le processus de transfection, du moins jusqu'à un certain point. Les résultats obtenus sur les complexes à base de SuperFect tentent de mettre en évidence le rôle de l'architecture du polymère sur la morphologie des complexes. Prise isolément, celle-ci ne semble pas non plus, jusqu'à un certain point, un facteur critique dans le processus de transfection.

De manière générale, nos expériences montrent que la taille optimale des polyplexes peut varier en fonction de la composition des polyplexes et diffère clairement pour les complexes binaires et ternaires. Des mesures réalisées par dispersion dynamique de lumière (D.L.S. : *Dynamic Light Scattering*), réalisées par le Dr *Ch. Grandfils* (C.I.B., Ulg), semblent confirmer nos mesures. Il serait cependant opportun, à l'avenir, de réaliser ces expériences en solution aqueuse, se rapprochant ainsi des conditions physiologiques, dans lesquelles se trouvent les complexes et permettant une meilleure comparaison des résultats obtenus par d'autres techniques.

Par la suite, nous nous sommes longuement consacré aux biomatériaux, avec l'étude des méthodes de préparation des implants métalliques [23]. Dans ce cadre, la caractérisation de la croissance d'apatite sur de l'oxyde de tantale a été très fructueuse. Il s'agissait dans ce cadre de déterminer le rôle du greffage sur l'oxyde d'une monocouche de silane fonctionnalisée sur la croissance de l'apatite.

Quatre types de couches (différentes par leur groupement terminal) ont ainsi été étudiés. Nous avons alors pu mettre en évidence, par l'imagerie de phase, la dynamique de croissance d'apatite sur des couches auto-assemblées d'organosilanes. Des mesures de rugosité indiquent également des cinétiques de croissance différentes en fonction des propriétés de la couche intermédiaire. Des données X.P.S. (réalisées par *D. Aubry* et *Pr Z. Mekhalif*, C.E.S.) confirment ces constatactions [22]. Nous avons également pu confirmer, par nos images A.F.M., que la vitesse de croissance de l'apatite augmente, selon son affinité avec les groupements terminaux étudiés, en suivant l'ordre :

$$C = C < -OH < -COOH < -PO_4H_2$$

L'élaboration de biomatériaux, et particulièrement ceux appliqués aux implants métalliques détaillés dans cette thèse, nécessite quelques

améliorations. En effet, il serait utile d'augmenter la qualité de la couche intermédiaire. Les organosilanes ainsi déposés ne présentaient en effet pas un taux de recouvrement très élevé. L'augmentation du pourcentage de modification des groupements terminaux de ces mêmes couches faciliterait également le processus de croissance d'apatite.

Cette thèse se termine par un chapitre abordant plusieurs études centrées sur des applications (bio)technologiques. Divers systèmes moléculaires et biomoléculaires ont été sélectionnés pour leur implications futures dans des dispositifs bioélectroniques notamment.

Les molécules de porphyrines représentent l'un d'entre eux. Ces dernières sont particulièrement intéressantes dans l'élaboration d'interrupteurs moléculaires et de capteurs solaires, par exemple. Nous nous sommes attardé sur trois porphyrines différentes (PPIX, ZnPPIX et TPD) adsorbées sur du Pt(111). Pour chacune d'entre elles, l'organisation moléculaire, ainsi que la nature des interactions intermoléculaires ont pu être identifiés. Nous avons ainsi pu déterminer le pourcentage de recouvrement du platine par chaque porphyrine. L'épaisseur des couches a également été calculée. Ces mesures ont alors permis de conclure que chaque porphyrine forme des monocouches sur Pt(111) (dans nos conditions de préparation et d'imagerie). Nos résultats S.T.M. ont été corrélés avec des mesures de spectroscopie non-linéaire. Dans le cas de la TPD, tout s'accorde pour dire que les molécules s'empilent en paquets de cartes, les molécules étant perpendiculaires au substrat. Dans le cas de la PPIX, nous avons déduit que les molécules se tiennent plutôt debout sur la surface. Pour la ZnPPIX, les conclusions sont opposées. Les données suggèrent une configuration avec des centres porphyrines se trouvant plutôt couchés sur le substrat, ce qui induit une structure du film moins dense, comme on peut le déduire des images S.T.M. Cet exemple montre clairement l'apport complémentaire indéniable de ces techniques S.P.M. dans l'étude de tels systèmes.

Nous nous sommes également focalisé sur des dispositifs biomoléculaires, d'application directe en biotechnologie notamment. Il s'agit de systèmes réalisés grâce à la formation de protéines adsorbées sur un substrat. Une connaissance précise de tels adsorbats est essentielle à l'élaboration de capteurs biologiques puissants. Dans ce contexte, le choix de la G.F.P., déposée sur un substrat de Pt(111), nous a semblé judicieux. Nous avons ainsi pu constater la présence d'une monocouche de protéines avec des propriétés électroniques identiques à celles obtenues en solution.

Finalement, des courbes de force ont été utilisées pour quantifier la reconnaissance spécifique entre deux molécules complémentaires. En accrochant une molécule sur la pointe et en déposant son complémen-

taire sur le substrat, nous avons pu mesurer la force de l'interaction entre la biotine et l'avidine. Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives dans le domaine de la reconnaissance moléculaire. Ce système pourrait être appliqué pour différencier des interactions biomoléculaires entre des anticorps présentant différentes affinités de liaison ou pour cartographier des distributions des sites de liaison fonctionnels en surface.

En conclusion, nous avons, au cours de ce travail de recherche, étudié nombre de systèmes organiques et de biomatériaux. Ces analyses, réalisées à l'aide d'un microscope à effet tunnel à balayage et à force atomique, ont constitué des points centraux dans la compréhension et l'analyse des phénomènes et systèmes biologiques. Les différents exemples étudiés démontrent que ces techniques apportent des informations essentielles dans ces domaines. Deux résultats importants viennent confirmer cet aspect novateur : il s'agit, dans un premier temps, de la fonctionnalisation des pointes S.T.M. permettant la localisation de groupements chimiques et, dans un second temps, de la mesure de la force d'interaction entre deux molécules biologiques lors de leur reconnaissance.

En dehors des études topographiques standard, les possibilités de ces techniques microscopiques (S.T.M. et A.F.M.) restent, dans la plupart des cas, sous-estimées et sous-employées. Les propriétés tribologiques des surfaces (modifiées ou pas) semblent néanmoins de plus en plus étudiées par microscopie de force latérale (ou mode friction). Les propriétés physico-chimiques par exemple, identifiées par imagerie de phase notamment, apportent des informations importantes et un contraste inégalé dans de nombreuses recherches. De nombreux efforts restent encore à réaliser pour appliquer ces nanoscopies dans certains domaines où elles sont encore trop peu utilisées, tels que les sciences alimentaires [241], ingénierie (bio)chimique [242] ou pharmacologique [243].

Sur un plan plus personnel, ce travail de recherche m'a familiarisé avec le domaine des composés organiques et des biomatériaux, ce qui a nécessité un investissement important (notamment pour l'acquisition des notions et la compréhension des systèmes biologiques associés). Elle m'a également ouvert au travail en équipe et m'a fourni la chance de pouvoir collaborer avec de grands scientifiques de tous domaines (physiciens, chimistes et biologistes). Je voudrais donc terminer en les remerciant tous très sincèrement.

Annexe A

Caractéristiques des leviers A.F.M.

Les pointes A.F.M. utilisées au cours de cette thèse sont des pointes “Olympus Tapping Mode Etched Silicon Probes”. Leur caractéristiques pratiques sont détaillées ci-dessous.

Type	Modèle OTESPAW
Constante de raideur	42 N/m (typ.) 12-103 N/m (range)
fréquence de résonance	300 kHz (typ.) 200-400 kHz (range)
rayon de courbure de la pointe	< 10 nm
longueur du levier	160 μ m
longueur de la pointe	10 μ m
configuration du levier	rectangulaire
couche réfléchissante	Al
forme de la pointe	pyramidale carrée
demi-angle d'ouverture de la pointe	17° de chaque côté, 0° avant, 35° arrière

Annexe B

Caractérisation des composés chimiques utilisés

B.1 Chapitre 1

- Pointe en Pt/Ir : Fil de Pt/Ir (20%), 0.25 mm de diamètre (*Laboimpex*, BE).
- Pointe en or : Fil d'or (99.99 + %), 0.25 mm de diamètre
- Ethanol : Merck (≥ 99.9 %), Lot : K32846483-404
- Acide sulfurique : Aldrich (95-98 %), Lot S28510-135
- Peroxyde d'hydrogène : Acros Organics (35 %), Lot : A010600701
- Acide 4-mercaptobenzoïque : Aldrich (97 %), Lot : 1074-36-8
- 4-mercaptotoluène : Fluka Chemika (> 98 %), Lot : 435065-1
- Méthoxybenzèthiol : Aldrich (97 %), Lot : 3308-473
- Acide palmitoléique : Fluka Chemika (90-95 %), Lot : 372346-1
- Graphite H.O.P.G. : Advanced Ceramics (grade ZYH), 12 mm x 12 mm x 2 mm.
- Au(111) (Arrandee) : Arrandee, 11 mm x 11 mm x 0.2 mm
- Au(111) (Monocristal) : Goodfellow, 12 mm de diamètre et ~ 3 mm d'épaisseur
- Pt(111) (Monocristal) : Goodfellow, 12 mm de diamètre et ~ 3 mm d'épaisseur

B.2 Chapitre 2

- Difluorure de calcium : Foctek
- Tantale : Advent (99.98 %)

B.3 Chapitre 3

- Palmitate de Palmitoyl : Sigma (99 %), Lot : 63H8362 et 67F8490
- 1-phényloctane : Acros Organics (99 %), Lot : A015256401
- Acide palmitique : Fluka Chemika (> 99.0 %), Lot : 407610-1
- Acide laurique : Fluka Chemika (≥ 99.0 %), Lot : 446551-1
- Ethanol : Merck (≥ 99.9 %), Lot : K32846483-404
- 1-décane-thiol : Aldrich (96 %), lot : S18443-304
- 1-décyl thiocyanate : Sigma (96 %), Lot : S345245

B.4 Chapitre 4

Les détails présentés dans le texte du chapitre, ainsi que dans la référence [172].

B.5 Chapitre 5

- 10-undécényltrichlorosilane : ABCR, M.W. : 287.740
- Borane : B_2H_6 1M/THF, Acros Organics, Lot : 521592-104
- Oxychlorure phosphoreux : $POCl_3$, Sigma, Lot : 33746-030
- 2,4,6-collidine : $C_8H_{11}N$, Merck, Lot : 6386182
- Acétonitrile : Aldrich ($>99.8\%$), Lot : 0273456
- Acide chlorhydrique : Acros Organics (37 %), Lot : A015791201
- Peroxyde d'hydrogène : Acros Organics (35 %), Lot : A013543501
- Chlorure de potassium : VXR International Prolabo (99 %), Lot : 1519
- Permanganate de potassium : Fulka Chemika (> 99 %), Lot : 7722-64-7
- Hydroxyde de sodium : Aldrich ($97 +$ %), Lot : 316180-293
- Chlorure de sodium : Merck (> 95.5 %), Lot : K29051704-146
- Chlorure de magnésium hexahydrate : Aldrich (99.99 %), lot : 431389-50G
- Chlorure de calcium hexahydrate : Aldrich (99.99 %), Lot : 470872-50G
- Hydrogénocarbonate de sodium : Aldrich ($99.7 +$ %), Lot : 13105-114
- Hydrogénophosphate de potassium : Aldrich (99.99 %), Lot : 450200-5G-A
- Sulfate de sodium : Acros Organics (99 %), Lot : A019034601
- Chlorure de calcium : Acros Organics (96 %), Lot : A016888401

B.6 Chapitre 6

- Protoporphyrine IX : Sigma (95 %), Lot : 092K1253
- Zn(II) protoporphyrine IX : Sigma, Lot : 04415HC
- Dichlorométhane : Sigma (99.9 %), Lot : 00559KC
- 2,2,2-trifluoroéthanol : Fluka Chemika (> 99 %), Lot : 1098751
- Biocytine : Sigma, Lot : 023K5002

Bibliographie

- [1] Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., and Weibel E. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters*, 40 :178, 1981.
- [2] Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., and Weibel E. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, 49(1) :57, 1982.
- [3] Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., and Weibel E. 7 x 7 reconstruction on Si(111) resolved in real space. *Physical Review Letters*, 50 :120–123, 1983.
- [4] Binnig G., Quate C.F., and Gerber Ch. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9) :930, 1986.
- [5] Colton R.J., Engel A., Frommer J.E., Gaub H.E., Gewirth A.A., Guckenberger R., Rabe J., Heckl W.M., and Parkinson B. *Procedures in Scanning Probe Microscopies*. John Wiley and sons Ltd, 1998.
- [6] Kempe A., Schopf J.W., Altermann W., Kudryavtsev A.B., and Heckl W.M. Atomic force microscopy of precambrian microscopic fossils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(14) :9117–9120, 2002.
- [7] Hodge S.M. and Rousseau D. Fat bloom formation and characterization in milk chocolate observed by atomic force microscopy. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 79(11) :1115–1121, 2002.
- [8] Schreiber F., Eberhardt A., Leung T.Y.B., Schwartz P., Wetterer S.M., Lavrich D.J., Berman L., Fenter P., Eisenberger P., and Scoles G. Adsorption mechanisms, structures, and growth regimes of an archetypal self-assembling system : Decanethiol on Au(111). *Physical Review B*, 57(19) :12476–12481, 1998.
- [9] Tsirlina G.A., Petrii O.A., and Vassiliev S.Y. Electrochemical fabrication and study of polymer-modified STM tips. *Electrochimica Acta*, 41(11/12) :1887–1890, 1996.

- [10] Ikai A. STM and AFM of bio/organic molecules and structures. *Surface Science Reports*, 26 :261, 1996.
- [11] Albrecht T.R., Mizes H.A., Nogami J., Park S., and Quate C.F. Observation of tilt boundaries in graphite by scanning tunneling microscopy and associated multiple tip effects. *Applied Physics Letters*, 52(5) :362, 1988.
- [12] Park S. and Quate C.F. Tunneling microscopy of graphite in air. *Applied Physics letters*, 48(2) :112, 1986.
- [13] De Feyter S., Grim P.C.M., Van Esch J., Kellog R.M., Feringa B.L., and De Schryver F.C. Nontrivial differentiation between two identical functionalities within the same molecule studied by STM. *Journal of Physical Chemistry B*, 102 :8981–8987, 1998.
- [14] De Feyter S., Gesquière A., de Schryver F.C., Meiners C., Sieffert M., and Mullen K. Chiral polymorphism : a scanning tunneling microscopy study. *Langmuir*, 16 :9887, 2000.
- [15] De Feyter S., Gesquière A., Abdel-Mottaleb M.M., Grim P.C.M., De Schryver F.C., Meiners C., Sieffert M., Valiyaveetil S., and Mullen K. Scanning tunneling microscopy : a unique tool in the study of chirality, dynamics, and reactivity in physisorbed organic monolayers. *Accounts of Chemical Research*, 33 :520, 2000.
- [16] Young Oh S., Park J.K., Ko C.B., and Choi J.W. Patterning of photosensitive polyimide lb film and its application in the fabrication of biomolecular microphotodiode array. *Biosensors and Bioelectronics*, 19 :103–108, 2003.
- [17] Volcke C., Simonis P., Durant F., Thiry P.A., Lambin Ph., Culot C., and Humbert C. Use of specific functionalised tips with STM : A new identification method of ester groups and their molecular structure in self-assembled overlayers. *Chemistry : A European Journal*, 11(14) :4185–4190, 2005.
- [18] Volcke C., Simonis P., Thiry P.A., Lambin Ph., Culot C., and Humbert C. Highlighting functional groups in self-assembled overlayers with specific functionalised scanning tunnelling microscopy tips. *Nanotechnology*, 16(11) :2596–2600, 2005.
- [19] STM tip functionalisation : A route to chemical contrast imaging. C., volcke and p., simonis and f., durant and p.a., thiry and ph., lambin and c., culot and c., humbert. *Physica Magazine*, 2005.
- [20] Dreesen L., Volcke C., Sartenaer Y., Peremans A., Thiry P.A., and Humbert C. Comparative study of decyl thiocyanate and decanethiol self-assembled monolayers on gold substrates. *Surface Science*. submitted.

-
- [21] Volcke C., Piroton S., Grandfils Ch., Ydens I., Dubois P., Raes M., Thiry P.A., and Humbert C. Influence of DNA condensation state on transfection efficiency in DNA/polymer complexes : An AFM study. *Journal of Biotechnology*, 2005. En révision.
 - [22] Aubry D., Delhalle J., and Mekhalif Z. Molecular functionalization of tantalum oxide surface towards development of bone growth. 2005. in preparation.
 - [23] Volcke C., Aubry D., thiry P.A., Delhalle J., and Mekhalif Z. Atomic force microscopy study of apatite formation on silanized tantalum oxide surface. En préparation.
 - [24] Humbert C., Dreesen L., Sartenaer Y., Peremans A., Thiry P.A., and Volcke C. On the protoporphyrin monolayers conformation. *ChemPhysChem*, 2005.
 - [25] Humbert C., Volcke C., Sartenaer Y., Peremans A., Thiry P.A., and Dreesen L. Molecular conformation and electronic properties of protoporphyrin-IX self assembled monolayers adsorbed on a Pt(111) surface. *Surface Science*, 2005. submitted.
 - [26] Dreesen L., Humbert C., Sartenaer Y., Caudano Y., Volcke C., Mani A.A., Peremans A., and Thiry P.A. Electronic and molecular properties of an adsorbed protein monolayer probed by two-color sum-frequency generation spectroscopy. *Langmuir*, 20 :7201–7207, 2004.
 - [27] Dreesen L., Sartenaer Y., Humbert C., Mani A.A., Méthivier C., Pradier C.-M., Thiry P.A., and Peremans A. Probing ligand-protein recognition with sum-frequency generation spectroscopy : the avidin-biotin case. *ChemPhysChem*, 11 :1719–1725, 2004.
 - [28] Binnig G., Rohrer H., Gerber Ch., and Weibel E. *Physical Review Letters*, 50 :120, 1983.
 - [29] Binnig G. and Rohrer H. *Surface Science*, 126 :236, 1983.
 - [30] Albrecht T.R. and Quate C.F. Atomic resolution imaging of a nonconductor by atomic force microscopy. *Journal of Applied Physics*, 62(7) :2599, 1987.
 - [31] Binnig G., Gerber Ch., Stoll E., Albrecht T.R., and Quate C.F. Atomic resolution with atomic force microscope. *Europhysics Letters*, 3(12) :1281–1286, 1987.
 - [32] The Official Web Site of the Nobel Foundation - NOBEL e – MUSEUM, 15 octobre 1986. <http://www.nobel.se>.
 - [33] Klein J. and Sachs W. *Scanning Probe Microscopy : Beyond the images*. 1991. Les éditions de Physique.

- [34] Simonis P. *Etude de surfaces de graphite et de nanotubes de carbone par microscopie à force atomique et par microscopie et spectroscopie à effet tunnel*. PhD thesis, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix : Faculté des Sciences, Namur, 2003.
- [35] Wortmann D. *Interpretation of scanning tunneling microscopy and spectroscopy of magnetic metal surfaces by electron theory*. PhD thesis, Universität Dortmund, 2000.
- [36] Cohen-Tannoudji C., Diu B., and Laloë F. *Mécanique Quantique I*. 1998.
- [37] Chen C.J. *Introduction to Scanning Tunneling Microscopy*. Oxford University Press, 1993.
- [38] Tersoff Jerry and Hamann D. R. Theory of the scanning tunneling microscope. *Physical Review B*, 31(2) :805, 1985.
- [39] Tersoff J. and Hamann D.R. Theory and application for the scanning tunneling microscope. *Physical Review Letters*, 50(25) :1998, 1983.
- [40] Hansma Paul K. and Tersoff Jerry. Scanning tunneling microscopy. *Journal of Applied Physics*, 62(2) :R1–R23, 1987.
- [41] Kittel C. *Physique de l'état solide*. Dunod, 1998. 7e édition.
- [42] Stroscio J.A. *Scanning Tunneling Microscopy*, volume 27 of *Methods of experimental physics*. Academic press, Inc., United Kingdom edition, 1993.
- [43] Thibaudau F. Communication personnelle.
- [44] anonyme. *Encyclopædia Universalis*. France S.A., 1998.
- [45] Simonis P. Communication personnelle.
- [46] Kis A. *Mechanical properties of mesoscopic objects*. PhD thesis, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, 2003.
- [47] Howland R. and Benatar L. *A practical guide to scanning probe microscopy*. Thermomicroscopes, 2000.
- [48] Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354 :56, 1991.
- [49] Gan Y., Chu W., and Qiao L. STM investigation on interaction between superstructure and grain boundary in graphite. *Surface Science*, 539 :120–128, 2003.
- [50] Bernhardt T.M., Kaiser B., and Rademann K. Formation of superperiodic patterns on highly oriented pyrolytic graphite by manipulation of nanosized graphite sheets with the STM tip. *Surface Science*, 408 :86–94, 1998.

-
- [51] Rong Z.Y. and Kuiper P. Electronic effects in scanning tunneling microscopy : Moiré pattern on a graphite surface. *Physical Review B*, 48(23) :17427, 1993.
 - [52] Soler J.M., Baro A.M., Garcia N., and Rohrer H. Interatomic forces in scanning tunneling microscopy : giant corrugations of the graphite surface. *Physical Review Letters*, 57(4) :444–447, 1986.
 - [53] Kobayashi K. Moire pattern in scanning tunneling microscopy of monolayer graphite. *Physical Review B*, 50(7) :4749–4755, 1994.
 - [54] Wiesendanger R. and Güntherodt H.-G. *Scanning Tunneling Microscopy II*. Springer series in Surface Science (28). Springer, second edition edition, 1995.
 - [55] Sartenaer Y. Etude des propriétés structurales et électroniques de matériaux métalliques et semi-conducteurs par microscopie et spectroscopie à effet tunnel. Mémoire de licence, 2002.
 - [56] Checco A. *Mouillage à l'échelle nanométrique : effet des forces à longue portée et des hétérogénéités du substrat*. PhD thesis, Université Paris 6, 2003.
 - [57] Lau J.M. *Imaging Membrane Proteins Using Atomic Force Microscopy Techniques*. PhD thesis, University of Cincinnati, 2002.
 - [58] Sarid D. *Scanning force microscopy with applications to electric, magnetic, and atomic forces*. Oxford University Press, 1991.
 - [59] Landau L. and Lifchitz E. *Théorie de l'élasticité*. Editions MIR, 1967.
 - [60] Pietrement O. *Imagerie et caractérisation nanomécanique des surfaces par microscopie à force atomique*. PhD thesis, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2000.
 - [61] Johnson K.L., Kendall K., and Roberts A.D. Surface energy and the contact of elastic solids. *Proceedings of the Royal Society A*, 324 :301–313, 1971.
 - [62] Feldman K. *Scanning force microscopy of organic thin films*. PhD thesis, Technische Universiteit Eindhoven, 2000.
 - [63] Schonherr H. *From functional group ensembles to single molecules : scanning force microscopy of supramolecular and polymeric systems*. PhD thesis, Universiteit Twente, 1999.
 - [64] Dejargin B.V., Muller V.M., and Toporov Y.P. Effect of contact deformations on the adhesion of particles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 53 :314–326, 1975.

- [65] Nysten B. Les microscopies à sonde locale : de l'imagerie des atomes aux spectroscopies à l'échelle nanoscopique. *Chimie Nouvelle*, 18(69) :3059–3070, 2000.
- [66] Felten A., Volcke C., Thiry P.A., and Pireaux J.-J. Plasma polymerization on carbon nanotubes. En préparation.
- [67] Garcia R. and Perez R. Dynamic atomic force microscopy methods. *Surface Science Reports*, 47 :197–301, 2002.
- [68] Magonov S.N., Elings V., and Whangbo M.-H. Phase imaging and stiffness in tapping-mode atomic force microscopy. *Surface Science*, 375 :L385–L391, 1997.
- [69] Tamayo J. and Garcia R. Effects of elastic and inelastic interactions on phase contrast images in tapping-mode scanning force microscopy. *Applied Physics Letters*, 71(16) :2394–2396, 1997.
- [70] Cleveland J.P., Anczykowski B., Schmid A.E., and Elings V.B. Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy. *Applied Physics Letters*, 20(72) :2613–2615, 1998.
- [71] Anczykowski B., Gotsmann B., Fuchs H., Cleveland J.P., and V.B. Elings. How to measure energy dissipation in dynamic mode atomic force microscopy. *Applied Surface Science*, 140 :376–382, 1999.
- [72] Kopta S. *Nanometer scale friction and wear on self-assembled monolayers investigated by atomic force microscopy*. PhD thesis, University of Basel, 2001.
- [73] Dicke C. *Ultrathin organic films as biointerfaces : a chemical force spectroscopy study*. PhD thesis, Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, 2002.
- [74] Wiesendanger R. and Güntherodt H.-G. *Scanning Tunneling Microscopy III*. Springer series in Surface Science (29). Springer, second edition, 1996.
- [75] Gao J., Luedtke W.D., Gourdon D., Ruths M., Israelashvili J.N., and Landman U. Frictional forces and Amonton's law : from the molecular to the macroscopic scale. *Journal of Physical Chemistry B*, 108 :3410–3425, 2004.
- [76] Bennewitz R. Friction force microscopy. *Materials Today*, 8(5) :42–48, 2005.
- [77] Mate C.M., McClelland G.M., Erlandson R., and Chiang S. Atomic-scale friction of a tungsten tip on a graphite surface. *Physical Review Letters*, 59(17) :1942–1945, 1987.
- [78] Meyer E., Overney R.M., Dransfeld K., and Gaylor T. *Nanoscience : friction and rheology on the nanometer scale*. World Scientific Publishing, 1998.

-
- [79] Giessibl F.J. *Science*, 267 :68–71, 1995.
 - [80] Nony L. *Analyse de la microscopie de force dynamique : application à l'étude de l'A.D.N.* PhD thesis, Université de Bordeaux I, 2000.
 - [81] Heim T. *Transport électronique dans l'ADN.* PhD thesis, Université des Sciences et Techniques de Lille 1, 2002.
 - [82] Morita S., Wiesendanger R., and Meyer E. *Noncontact atomic force microscopy*. Nanoscience and Technology Series. Springer, 2002.
 - [83] Engelhardt J.B., Dabringhaus H., and Wandelt K. Atomic force microscopy study of the CaF₂(111) surface from cleavage via island to evaporation topographies. *Surface Science*, 448 :187–200, 2000.
 - [84] Rabe J.P. and Buchholz S. Commensurability and mobility in two-dimensional molecular patterns on graphite. *Science*, 258 :424–427, 1991.
 - [85] Watel G., Thibaudau F., and Cousty J. Direct observation of long chain alkane bilayer films on graphite by scanning tunneling microscopy. *Surface Science Letters*, 281 :297, 1993.
 - [86] Mc Gonigal G.C., Bernhardt R.H., and Thomson D.J. Imaging alkane layers at the liquid/graphite interface with the scanning tunneling microscope. *Applied Physics Letters*, 57(1) :28–30, 1990.
 - [87] Israelachvili J.N. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, London, 1985.
 - [88] Zhang H.-M., Xie Z.-X., Mao B.-W., and Xu X. *Chemistry : A European Journal*, 10 :1415–1422, 2004.
 - [89] Martin D.S. The adsorption of aromatic acids onto the graphite basal surface. *Surface Science*, 536 :15–23, 2003.
 - [90] Simonis P., Goffaux F., Thiry P.A., Biro L.P., Lambin P., and Meunier V. STM study of a grain boundary in graphite. *Surface Science*, 511(1-3) :319–322, 2002.
 - [91] Morishige K., Takami Y., and Yokota Y. Structures of alkanes and alkanols adsorbed on graphite in solution : Comparison with scanning-tunneling-microscopy images. *Physical Review Letters*, 48(11) :8277–8281, 1993.
 - [92] Claypool C.L., Faglioni F., Matzger A.J., Goddard III W.A., and Lewis N.S. Effects of molecular geometry on the STM image contrast of methyl- and bromo-substituted alkanes and alkanols on graphite. *Journal of Physical Chemistry B*, 103 :9690–9699, 1999.

- [93] De Feyter S. and De Schryver F.C. Two-dimensional supramolecular self-assembly probed by scanning tunneling microscopy. *Chemical Society Reviews*, 32 :139–150, 2003.
- [94] Yablon D.G., Wintgens D., and Flynn G.W. Odd/even effect in self-assembly of chiral molecules at the liquid-solid interface : An STM investigation of coadsorbate control of self-assembly. *Journal of Physical Chemistry B*, 106 :5470–5475, 2002.
- [95] Padowitz D.F., Sada D.M., Kemer E.L., Dougan M.L., and Xue W.A. Molecular tracer dynamics in crystalline organic films at the solid-liquid interface. *Journal of Physical Chemistry B*, 106 :593–598, 2002.
- [96] Wintgens D., Yablon D.G., and Flynn G.W. Packing of HO(CH₂)₁₄COOH and HO(CH₂)₁₅COOH on graphite at the liquid-solid interface observed by scanning tunneling microscopy : methylene unit direction of self-assembly structures. *Journal of Physical Chemistry B*, 107 :173–179, 2003.
- [97] De Feyter S., Gesquiere A., Klapper M., and De Schryver F.C. Toward two-dimensional supramolecular control of hydrogen-bonded arrays : the case of isophthalic acids. *Nano Letters*, 3(11) :1485–1488, 2003.
- [98] Stabel A., Heinz R., De Schryver F.C., and Rabe J.P. Ostwald ripening of two-dimensional crystals at the solid-liquid interface. *Journal of Physical Chemistry*, 99 :505–507, 1995.
- [99] Wei G.-X., Pan G.-B., Wan L.-J., Zhao J.-C., and Bai C.-L. In situ STM of phenolic compounds on Cu(111) in solution. *Surface Science*, 520(L625-L632), 2002.
- [100] Cyr D.M., Venkataraman B., Flynn G.W., Black A., and Whitesides G.M. Functional group identification in scanning tunneling microscopy of molecular adsorbates. *Journal of Physical Chemistry*, 100 :13747–13759, 1996.
- [101] Claypool C.L., Faglioni F., Goddard III W.A., Gray H.B., Lewis N.S., and Marcus R.A. Source of image contrast in STM images of functionalized alkanes on graphite : A systematic functional group approach. *Journal of Physical Chemistry B*, 101 :5978–5995, 1997.
- [102] Stevens F., Dyer D.J., and Malba D.M. *Angewandte Chemie*, 108 :955–957, 1996.
- [103] Stevens F., Dyer D.J., and Malba D.M. *Angewandte Chemie International Edition England*, 35 :900–901, 1996.

-
- [104] Heinz R., Stabel A., Rabe J.P., Wegner G., De Schryver F.C., Corens D., Dehaen W., and Suling C. *Angewandte Chemie*, 106 :2154–2157, 1994.
 - [105] Heinz R., Stabel A., Rabe J.P., Wegner G., De Schryver F.C., Corens D., Dehaen W., and Suling C. *Angewandte Chemie International Edition England*, 33 :2080–2083, 1994.
 - [106] Askadskaya L. and Rabe J.P. Anisotropic molecular dynamics in the vicinity of order-disorder transitions in organic monolayers. *Physical Review Letters*, 69(9) :1395–1398, 1992.
 - [107] Istasse N. *Influence de la présence d’alcane sur le comportement physico-chimique de lipides utilisés en cosmétologie*. PhD thesis, Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix : Faculté des Sciences, Namur, Janvier 1999.
 - [108] Nishino T., Bühlmann P., Ito T., and Umezawa Y. Scanning tunneling microscopy with chemically modified tips : orientation-sensitive observation of ether oxygens. *Surface Science*, 490 :L579–L584, 2001.
 - [109] Ito T., Bühlmann P., and Umezawa Y. Scanning tunneling microscopy using chemically modified tips. *Analytical Chemistry*, 70 :255–259, 1998.
 - [110] Ito T., Bühlmann P., and Umezawa Y. Polypyrrole-modified tips for functional group recognition in scanning tunneling microscopy. *Analytical Chemistry*, 71 :1699–1705, 1999.
 - [111] Ohshiro T., Ito T., Bühlmann P., and Umezawa Y. Scanning tunneling microscopy with chemically modified tips : discrimination of porphyrin centers based on metal coordination and hydrogen bond interactions. *Analytical Chemistry*, 73 :878–883, 2001.
 - [112] Nishino T., Bühlmann P., Ito T., and Umezawa Y. Discrimination of functional groups with scanning tunneling microscopy using chemically modified tips : recognition of ether oxygens through hydrogen bond interaction. *Physical Chemistry and Chemical Physics*, 3 :1867–1869, 2001.
 - [113] Sautet P., Dunphy J.C., Ogletree D.F., Joachim C., and Salmeron M. Imaging a p(2x2) layer of sulfur on Re(0001) with the scanning tunneling microscope : an experimental and theoretical study of the effect of adsorption site and tip structure. *Surface Science*, 315 :127–142, 1994.
 - [114] Bartels L., Meyer G., and Rieder K.-H. Controlled vertical manipulation of single co molecules with the scanning tunneling microscope : A route to chemical contrast. *Applied Physics Letters*, 71(2) :213–215, 1997.

- [115] Meyer G., Bartels L., and Rieder K.-H. Atom manipulation with the STM : nanostructuring, tip functionalization, and femtochemistry. *Computational Materials Science*, 20 :443–450, 2001.
- [116] Bartels L., Meyer G., and Rieder K.-H. The evolution of CO adsorption on Cu(111) as studied with bare and CO-functionalized scanning tunneling tips. *Surface Science*, 432 :L621–L626, 1999.
- [117] Nishino T., Ito T., and Umezawa Y. Selective observation of hydroxy and carboxylate moieties by scanning tunneling microscopy using chemically modified tips with differing extents of hydrogen bond acidity or basicity. *Journal of Electroanalytical chemistry*, 2003.
- [118] Gesquière A., Abdel-Mottaleb M.M., De Feyter S., De Schryver F.C., Sieffert M., Müllen K., Calderone A., Lazzaroni R., and Brédas J.-L. Dynamics in physisorbed monolayers of 5-alkoxyisophthalic acid derivatives at the liquid-solid interface investigated by scanning tunneling microscopy. *Chemistry : A European Journal*, 6(20) :3739–3746, 2000.
- [119] Wawkuschewski A., Cantow H.-J., Magonov S.N., Moller M., Liang W., and Whangbo M.-H. STM study of molecular order and defects in the layer of cycloalkanes (CH₂)₄₈ and (CH₂)₇₂ adsorbed on graphite. *Advanced Materials*, 5(11) :821–826, 1993.
- [120] Rabe J.H. and Buchholz S. Direct observation of molecular structure and dynamics at the interface between a solid wall and an organic solution by scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, 66(16) :2096–2099, 1991.
- [121] Smith D.P.E., Hörber H., Gerber Ch., and Binnig G. Smectic liquid crystal monolayers on graphite observed by scanning tunneling microscopy. *Science*, 245 :43–45, 1989.
- [122] Cavalleri O., Hirstein A., Bucher J.-P., and Kern K. Ordering processes at the decanethiols/Au(111) interface. *Thin Solid Films*, (284-285) :392, 1996.
- [123] Schreiber F. Structure and growth of self-assembling monolayers. *Progress in Surface Science*, 65 :151–256, 2000.
- [124] Barrena E., Ocal C., and Salmeron M. A comparative AFM study of the structural and frictional properties of mixed and single component films of alkanethiols on Au(111). *Surface Science*, 482-485 :1216, 2001.
- [125] Tao F., Cai Y., and Bernasek S. Scanning tunneling microscopy studies of the assembly of carboxylic esters on graphite : linear distortion and multiple adsorption structures. *Langmuir*, 21 :1269–1276, 2005.

-
- [126] Meyer E., Howard L., Overney R.M., Heinzelmann H., Frommer J., Güntherodt H.J., Wagner T., Schier H., and Roth S. Molecular-resolution images of Langmuir-Blodgett films using atomic force microscopy. *Nature*, 349 :398, 1991.
- [127] Spong J.K., Mizes H.A., La Comb Jr L.J., Dovek M.M., Fromer J.E., and Foster J.S. Contrast mechanism for resolving organic molecules with tunneling microscopy. *Nature*, 338 :137–139, 1989.
- [128] Clemmer C.R. and Beebe Jr T.B. *Science*, 251 :640, 1991.
- [129] Hibino M., Sumi A., and Hatta I. Molecular motion at domain boundaries in fatty acid monolayers on graphite observed by scanning tunneling microscopy. *Thin solid films*, 273 :272–278, 1996.
- [130] Hibino M., Sumi A., and Hatta I. Scanning tunneling microscopy study on dynamic structural formation in mixed fatty-acid monolayers at liquid/graphite interface. *Thin solid films*, 281 :594, 1996.
- [131] Tao N.J. Probing potential-tuned resonant tunneling through redox molecules with scanning tunneling microscopy. *Physical Review Letters*, 76(21) :4066–4069, 1996.
- [132] Teran Arce F., Vela M.E., Salvarezza R.C., and Arvia A.J. Dynamic characteristics of adsorbed monolayers of 1-dodecanethiols on gold (111) terraces from in-situ scanning tunneling microscopy imaging. *Electrochimica Acta*, 44 :1053, 1998.
- [133] Mekhalif Z., Riga J., J.-J. Pireaux, and Delhalle J. Self assembled monolayers of dodecanethiol on electrochemically modified polycrystalline nickel surfaces. *Langmuir*, 13 :2285–2290, 1997.
- [134] Haehner G., Woell Ch., Buck M., and Grunze M. Investigation of intermediate steps in the self-assembly of n-alkanethiols on gold surfaces by soft X-ray spectroscopy. *Langmuir*, 9 :1955–1958, 1993.
- [135] Himmelhaus M., Eisert F., Buck M., and Grunze M. Self-assembly of n-alkanethiol monolayers : A study by ir-visible sum frequency spectroscopy (SFG). *Journal of Physical Chemistry B*, 104 :576–584, 2000.
- [136] Barrena E., Ocal C., and Salmeron M. Evolution of the structure and mechanical stability of self-assembled alkanethiol islands on Au(111) due to diffusion and ripening. *Journal of Chemical Physics*, 111 :9797–9802, 1999.
- [137] Poirier G.E. Characterization of organosulfur molecular monolayers on Au(111) using scanning tunneling microscopy. *Chemical Review*, 97 :1117–1127, 1997.

- [138] Delamarche E. and Michel B. Structure and stability of self-assembled monolayers. *Thin Solid Films*, 273 :54, 1996.
- [139] Schonenberger C., Jorritsma J., Sondag-Huethorst J.A.M., and Fokkink L.G.J. Domain structure of self-assembled dodecanethiol monolayers on gold. *Journal of Physical Chemistry*, 99(10) :3259–3271, 1995.
- [140] Widrig C.A., Alves C.A., and Porter M.D. *Journal of the American Chemical Society*, 113 :2805, 1991.
- [141] Ciszek J.W., Stewart M.P., and Tour J.M. Spontaneous assembly of organic thiocyanates on gold surfaces. alternative precursors for gold thiolate assemblies. *Journal of the American Chemical Society*, 126 :13172–13173, 2004.
- [142] Sartenaer Y., Humbert C., Volcke C., Tourillon G., Louette P., Peremans A., Thiry P.A., and Dreesen L. Comparison of thiocyanate and thiol self-assembled monolayers on platinum surface. *JSPS-141 activity report*, 2005.
- [143] Güç D. Half a century of DNA. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 34 :1–3, 2004.
- [144] Campbell N.A. *Biology*. De Boek Université, 3th edition edition, 1993.
- [145] Avery O.T., MacLeod M.C., and McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, 79(2) :137–158, 1944.
- [146] McCarty M. A retrospective look at the discovery of the genetic role of DNA. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 8 :889–890, 1994.
- [147] Chargaff E., Magasanik B., Vischer E., Green C., Doniger R., and Elson D. Nucleotide composition of pentose nucleic acids from yeast and mammalian tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 186 :51–67, 1950.
- [148] Chargaff E. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*, 6 :201–209, 1950.
- [149] Chargaff E. Experimenta lucifera. *Nature*, 266 :780–781, 1977.
- [150] Franklin R.E. and Gosling R.G. Molecular configuration in sodium thymonucleate. *Nature*, 171 :740–741, 1953.
- [151] Watson J.D. and Crick F.H.C. Molecular of nucleic acids : a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171 :737–738, 1953.
- [152] Klug A. Rosalind Elsie Franklin. *Encyclopedia of the Human Genome*, pages 1–2, 2003.

-
- [153] Franklin R.E. and Gosling R.G. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature*, 172 :156–157, 1953.
 - [154] Crick F.H.C. and Watson J.D. The complementary structure of deoxyribonucleic acid. *Proceedings of the Royal Society of London*, 223, Serie A :80–96, 1954.
 - [155] Watson J.D. and Crick F.H.C. The structure of DNA. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18 :123–31, 1953.
 - [156] Wilkins M.H.F., Stokes A.R., and Wilson H.R. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature*, 171 :738–740, 1953.
 - [157] Gadsby E.D. *Drug/DNA interactions and condensation investigated with atomic force microscopy*. PhD thesis, Georgia Institute of Technology, 2004.
 - [158] Firtel M. and Beveridge T.J. Scanning probe microscopy in microbiology. *Micron*, 26(4) :347–362, 1995.
 - [159] Radmacher M., Tilmann R.W., Fritz M., and Gaub H.E. From molecules to cells : Imaging soft samples with the atomic force microscope. *Science*, 257 :1900–1905, 1992.
 - [160] Razatos A., Ong Y.-L., Sharma M.M., and Georgiou G. Molecular determinants of bacterial adhesion monitored by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 :11059, 1998.
 - [161] Reich Z., Kapon R., Pilpel Y., Zmora S., and Scolnik Y. Scanning force microscopy in the applied biological sciences. *Biotechnology Advances*, 19 :451–485, 2001.
 - [162] Hansma H.G., Vesenska J., Siegerist C., Kelderman G., Morrett H., Sinsheimer R.L., Elings V., Bustmante C., and Hansma P.K. Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope. *Science*, 256 :1180–1184, 1992.
 - [163] Yang J., Takeyasu K., and Shao Z. Atomic force microscopy of DNA molecules. *Federation of the European Biochemical Societies Journal*, 301(2) :173–176, 1992.
 - [164] Lyubchenko Y., Shlyakhtenko L., Harrington R., Oden P., and Lindsay S. Atomic force microscopy of long DNA : Imaging in air and under water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 :2137–2140, 1993.
 - [165] Argaman M., Golan R., Thomson N.H., and Hansma H.G. Phase imaging of moving DNA molecules and DNA molecules repli-

- cated in the atomic force microscope. *Nucleic Acids Research*, 25(21) :4379–4384, 1997.
- [166] Chen D.J., Majors B.S., Zelikin A., and Putnam D. Structure-function relationships of gene delivery vectors in a limited polycation library. *Journal of Controlled Release*, 103 :273–283, 2005.
- [167] Cherng J.-Y., van de Wetering P., Talsma H., Crommelin D.A., and Hennink W.E. Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 13(7) :1038–1042, 1996.
- [168] van de Wetering P., Cherng J.-Y., Talsma H., Crommelin D.J.A., and Hennink W.E. 2-(dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. *Journal of Controlled Release*, 53 :145–153, 1998.
- [169] van de Wetering P., Cherng J.-Y., Talsma H., and Hennink W.E. Relation between transfection efficiency and cytotoxicity of poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)/plasmid complexes. *Journal of Controlled Release*, 49 :59–69, 1997.
- [170] Choi J.S., Lee E.J., Choi Y.H., Jeong Y.J., and Park J.S. Poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine) dendrimer : novel linear polymer/dendrimer block copolymer forming a spherical water-soluble polyionic complex with DNA. *Conjugate Biochemistry*, 10 :62–65, 1999.
- [171] Toncheva V., Wolfert M.A., Dash P.R., Oupicky D., Ulbrich K., Seymour L.W., and Schacht E. Novel vectors for gene delivery formed by self-assembly of DNA with poly(L-lysine) grafted with hydrophilic polymers. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1380 :354–368, 1998.
- [172] Piroton S., Muller C., Pantoustier N., Botteman F., Colinet S., Grandfils C., Dandrifosse G., Degée P., Dubois P., and Raes M. Enhancement of transfection efficiency through rapid and noncovalent post-PEGylation of poly(dimethylaminoethylmethacrylate)/DNA complexes. *Pharmaceutical Research*, 21(8) :1471–1479, 2004.
- [173] Itaka K., Yamauchi K., Harada A., Nakamura K., Kawaguchi H., and Kataoka K. Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system : physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency. *Biomaterials*, 24 :4495–4506, 2003.

-
- [174] Dunlap D.D., Maggi A., Soria M.R., and Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Research*, 25(15) :3095–3101, 1997.
- [175] Howard K.A., Dash P.R., Read M.L., Ward K., Tomkins L.M., Nazarova O., Ulbrich K., and Seymour L.W. Influence of hydrophilicity of cationic polymers on the biophysical properties of polyelectrolyte complexes formed by self-assembly with DNA. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1475 :245–255, 2000.
- [176] Frechet J.M. Functional polymers and dendrimers : reactivity, molecular architecture and interfacial energy. *Science*, 263 :1710–1715, 1994.
- [177] Rackstraw B.J., Martin A.L., Stolnik S., Roberts C.J., Garnett M.C., Davies M.C., and Tendler S.J.B. Microscopic investigations into PEG-cationic polymer-induced DNA condensation. *Langmuir*, 17 :3185–3193, 2001.
- [178] Jones N.A., Hill I.R.C., Stolnik S., Bignotti F., Davis S.S., and Garnett M.C. Polymer chemical structure is a key determinant of physicochemical and colloidal properties of polymer-DNA complexes for gene delivery. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1517 :1–18, 2000.
- [179] Vijayanathan V., Thomas T., Antony T., Shirahata A., and Thomas T.J. Formation of DNA nanoparticles in the presence of novel polyamine analogues : a laser light scattering and atomic force microscopic study. *Nucleic Acids Research*, 32(1) :127–134, 2004.
- [180] Lim Y.-B., Kim S.-M., Suh H., and Park J.-S. Biodegradable, endosome disruptive, and cationic network-type polymer as a highly efficient and nontoxic gene delivery carrier. *Bioconjugate Chemistry*, 13 :962–957, 2002.
- [181] Wolfert M.A., Dash P.R., Nazarova O., Oupicky D., Seymour L.W., Smart S., Strohm J., and Ulbrich K. Polyelectrolyte vectors for gene delivery : influence of cationic polymer on biophysical properties of complexes formed with DNA. *Bioconjugate Chemistry*, 10 :993–1004, 1999.
- [182] Martin A.L., Davies M.C., Rackstraw B.J., Roberts C.J., Stolnik S., Tendler S.J.B., and Williams P.M. Observation of DNA-polymer condensate formation in real time at a molecular level. *Federation of the European Biochemical Societies Letters*, 480 :106–112, 2000.
- [183] Congiu A., Pozzi D., Esposito C., Castellano C., and Mossa G. Correlation between structure and transfection efficiency : a study

- of DC-Chol-DOPE/DNA complexes. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, 36 :43–48, 2004.
- [184] Hansma H.G., Revenko I., Kim K., and Laney D.E. Atomic force microscopy of long and short double-stranded, single-stranded and triple-stranded nucleic acids. *Nucleic Acids Research*, 24(4) :713–720, 1996.
- [185] Maeda Y., Matsumoto T., and Kawai T. Observation of single- and double-stranded DNA using non-contact atomic force microscopy. *Applied Surface Science*, 140 :400–405, 1999.
- [186] Van Noort S.J.T., Van der Werf K.O., De Grooth B.G., Van Hulst N.F., and Greve J. Height anomalies in tapping mode atomic force microscopy in air caused by adhesion. *Ultramicroscopy*, 69 :117–127, 1997.
- [187] Wyman C.E., Grotkopp A., Bustamante C., and Nelson H.C.M. Determination of the heat-shock transcription factor 2 stoichiometry at looped DNA complexes using scanning force microscopy.
- [188] Yang G., Vesenska. J.P., and Bustamante C.J. Effects of tip-sample forces and humidity on the imaging of DNA with a scanning force microscope.
- [189] Moreno-Herrero F., Colchero J., and Baro A.M. DNA height in scanning force microscopy. *Ultramicroscopy*, 96 :167–174, 2003.
- [190] Anselmetti D., Dreier M., Luthi R., Richmond T., Meyer E., Frommer J., and Güntherodt H.-J. Biological materials studied with dynamic force microscopy. *Journal of Vacuum Science and Technology B*, 12 :1500–1503, 1994.
- [191] Maksimenko A.V., Mandrouguine V., Gottikh M.B., Bertrand J.-R., Majoral J.-P., and Malvy C. Optimisation of dendrimer-mediated gene transfer by anionic oligomers. *The Journal of Gene Medicine*, 5 :61–71, 2003.
- [192] Jandt K.D. Atomic force microscopy of biomaterials surfaces and interfaces. *Surface Science*, 491 :303, 2001.
- [193] Kasemo B. Biological surface science. *Surface Science Reports*, 500 :656–677, 2002.
- [194] Puleo D.A. and Nanci A. Understanding and controlling the bone-implant interface. *Biomaterials*, 20 :2311–2321, 1999.
- [195] Liu X., Ding C., and Chu P.K. Mechanism of apatite formation on wollastonite coatings in simulated body fluids. *Biomaterials*, 25 :1755–1761, 2004.
- [196] Pompe W., Worch H., Eppele M., Friess W., Gelinsky M., Hemple P., Greil ans U., Scharnweber D., and Schulte K. *Materials Science and Engineering A*, 362 :1345–1350, 2003.

-
- [197] Braye F., Irigary J.L., Jallot E., Oudadesse H., Weber G., Deschamps N., Frayssinet P., Tourenne P., Tixier H., Terver S., Lefaivre J., and Amirabadi A. Resorption kinetics of osseous substitute : natural coral and synthetic hydroxyapatite. *Biomaterials*, 17 :1345–1350, 1996.
 - [198] Johnson S. *Pulsed laser depposition of hydroxyapatite thin films*. PhD thesis, Georgia Institute of Technology, 2005.
 - [199] Kokubo T., Kim H.-M., and Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24 :2161–2175, 2003.
 - [200] Tanahashi M. and Matsuda T. Surface functional group dependence on apatite formation on self-assembled monolayers in a simulated body fluid. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34 :305–315, 1997.
 - [201] Elliot J.C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier, 1994.
 - [202] Chassot E. *Mise en oeuvre de méthodes nucléaires et de diffraction pour l'analyse de la structure de l'hydroxyapatite dopée et des transferts d'éléments métalliques à partir de biomatériaux implantés in vivo*. PhD thesis, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2001.
 - [203] Iimura K.-I., Nakajima Y., and Kato T. A study on structures and formation mechanisms of self-assembled monolayers of n-alkyltrichlorosilanes using infrared spectroscopy and atomic force microscopy. *Thin Solid Films*, 379 :230–239, 2000.
 - [204] Toworfe G.K., Composto R.J., Shapiro I.M., and Ducheyne P. Nucleation and growth of calcium phosphate on amine-, carboxyl- and hydroxyl-silane self-assembled monolayers. *Biomaterials*. in press.
 - [205] Liu Q., Ding J., Mante F.K., Wunder S.L., and Baran G.R. The role of surface functional groups in calcium phosphate nucleation on titanium foil : a self-assembled monolayer technique. *Biomaterials*, 23 :3103–3111, 2002.
 - [206] Zhu P., Masuda Y., and Koumoto K. The effect of surface charge on hydroxyapatite nucleation. *Biomaterials*, 25 :3915–3921, 2004.
 - [207] Aubry D. *Fonctionnalisation moléculaire de la surface d'oxyde de tantale pour le développement de la croissance osseuse*. Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix, 2004. Mémoire de licence.
 - [208] Moresco F., Meyer G., Rieder K.-H., Tang H., Gourdon A., and Joachim C. conformational changes of single molecules induced

- by scanning tunneling microscopy manipulation : a route to molecular switching. *Physical Review Letters*, 86(4) :672–675, 2001.
- [209] Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., Dietze A., Prasmickaite L., Bonsted A., Engesaeter B.O., Angell-Petersen E., Warloe T., Frandsen N., and Hogset A. Porphyrin related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *Journal of Microscopy*, 218 :133–147, 2005.
- [210] Rosei F., Schunack M., Naitoh Y., Jiang P., Gourdon A., Laegsgaard E., Stensgaard I., Joachim C., and Besenbacher F. Properties of large organic molecules on metal surfaces. *Progress in Surface Science*, 71 :95–146, 2003.
- [211] Labbé R.F., Vreman H.J., and Stevenson D. Zinc protoporphyrin : a metabolite with a mission. *Clinical Chemistry*, 45(12) :2060–2072, 1999.
- [212] Scudiero L., Barlow D.E., Mazur U., and Hipps K.W. Scanning tunneling microscopy, orbital-mediated tunneling spectroscopy, and ultraviolet photoelectron spectroscopy of metal(ii) tetraphenylporphyrins deposited from vapor. *Journal of the American Chemical Society*, 123 :4073–4080, 2001.
- [213] Duong B., Arechabaleta R., and Tao N.J. In situ AFM/STM characterization of porphyrin electrode films for electrochemical detection of neurotransmitters. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 447 :63–69, 1998.
- [214] Elemans J.A.A.W., Lensen M.C., Gerritsen J.W., van Kempen H., Speller S., nolte R.J.M., and Rowan A.E. Scanning probe studies of porphyrin assemblies and their supramolecular manipulation at a solid-liquid interface. *Advanced Materials*, 15(24) :2070–2073, 2003.
- [215] Rabinowitch E. Spectra of porphyrins and chlorophyll. *Reviews of Modern Physics*, 16(3-4) :226–235, 1944.
- [216] Lee B., Takeda S., Nakajima K., Noh J., Choi J., Hara M., and Nagamure T. Rectified photocurrent in a protein based molecular photo-diode consisting of a cytochrome B₅₆₂- green fluorescent protein chimera self-assembled monolayer. *Biosensors and Bioelectronics*, 19 :1169–1174, 2004.
- [217] Brandizzi F., Irons S.L., Johansen J., Kotzer A., and Neumann U. GFP is the way to glow : bioimaging of the plant endomembrane system. *Journal of Microscopy*, 214 :138–158, 2004.
- [218] Chatteraj M., King B.A., Bublit G.U., and Boxer S.G. Ultrafast excited state dynamics in green fluorescent protein : Multiple

-
- states and proton transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 :8362–8367, 1996.
- [219] Bublitz G., King B.A., and Boxer S.G. Electronic structure of the chromophore in green fluorescent protein (GFP). *Journal of the American Chemical Society*, 120 :9370–9371, 1998.
 - [220] Chalfie M. *Photochemistry and Photobiology*, 62 :651–656, 1995.
 - [221] Inouye S. and Tsuji F.I. Evidence for redox forms of the aequorea green fluorescent protein. *FEBS Letters*, 351 :211–214, 1994.
 - [222] Cormack B.P., Valdivia R.H., and Falkow S. Facs-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173 :33–38, 1996.
 - [223] Yang F., Moss L.G., and Phillips Jr. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 14 :1246–1251, 1996.
 - [224] Creemers T.M., Lock A.J., Subramaniam V., Jovin T.M., and Volker S. Three photoconvertible forms of green fluorescent protein identified by spectral hole-burning. *Nature Structural Biology*, 6 :557–560, 1999.
 - [225] Choi J.-W. and Fujihira M. Molecular-scale biophotodiode consisting of a green fluorescent protein/cytochrome C self-assembled heterolayer. *Applied Physics Letters*, 84(12) :2187–2189, 2004.
 - [226] Choi J.-W., Nam Y.-S., Oh B.-K., Lee W.H., and Fujihira M. Artificial molecular photodiode consisting of GFP/viologen heterothin film. *Synthetic Metals*, 117 :241–243, 2001.
 - [227] Cinelli R.A.G., Pellegrini V., Ferrari A., Faraci P., Nifosì R., Tyagi M., Giacca M., and Beltram F. Green fluorescent proteins as optically controllable elements in bioelectronics. *Applied Physics Letters*, 79 :3353–3355, 2001.
 - [228] Schiener J., Witt S., Hayer-Hartl M., and Guckenberger R. How to orient the functional GroEL-SR1 mutant for atomic force microscopy investigations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328 :477–483, 2005.
 - [229] Lavery R., Lebrun A., Allemand J.-F., Bensimon D., and Croquette V. Structure and mechanics of single biomolecules : experiment and simulation. *Journal of Physics : Condensed Matter*, 14 :R383–R414, 2002.
 - [230] Merkel R., Nassoy P., Leung A., Ritchie K., and Evans E. Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy. *Nature*, 397 :50–53, 1999.

- [231] Willemsen O.H., Snel M.M.E., Cambi A., Greve J., De Groot B.G., and Figdor C.G. Biomolecular interactions measured by atomic force microscopy. *Biophysical Journal*, 79 :3267–3281, 2000.
- [232] Moy V.T., Florin E.-L., and Gaub H.E. Intermolecular forces and energies between ligands and receptors. *Science*, 266 :257–259, 1994.
- [233] Ebner A., Kienberger F., Kada G., Stroh C.M., Geretschlager M., Kamruzzahan A.S.M., Wildling L., Johnson W.T., Ashcroft B., Nelson J., Lindsay S.M., Gruber H.J., and Hinterdorfer P. Localization of single avidin-biotin interactions using simultaneous topography and molecular recognition imaging. *ChemPhysChem*, 6 :897–900, 2005.
- [234] Wong J., Chilkoti A., and Moy V.T. Direct force measurements of the streptavidin-biotin interaction. *Biomolecular Engineering*, 16 :45–55, 1999.
- [235] Moy V.T., Florin E.-L., Rief M., Ludwig M., and Gaub H.E. Forced unbinding of the avidin-biotin complex. *Proceedings of the NATO Advanced Research workshop : Scanning Probe Microscopes and Molecular Materials*, 1994.
- [236] Neish C.S., Martin I.L., Henderson R.M., and Edwardson J.M. Direct visualization of ligand-protein interactions using atomic force microscopy. *British Journal of Pharmacology*, 135(8) :1943–1950, 2002.
- [237] de Paris R., Strunz T., Oroszlan K., H.-J. Güntherodt, and Hegner M. Force spectroscopy and dynamics of the biotin-avidin bond studied by scanning force microscopy. *Single Molecules*, 1(4) :285–290, 2000.
- [238] Allen S., Davies J., Dawkes A.C., Davies M.C., Edwards J.C., Parker M.C., Roberts C.J., Sefton J., Tendler S.J.B., and Williams P.M. In situ observation of streptavidin-biotin binding on an immunoassay well surface using an atomic force microscope. *Federation of the European Biochemical Societies Letters*, 390 :161–164, 1996.
- [239] Florin E.-L., Moy V.T., and Gaub H.E. Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs. *Science*, 264 :415–417, 1994.
- [240] Zhang X. and Moy V.T. Cooperative adhesion of ligand-receptor bonds. *Biophysical Chemistry*, 104 :271–278, 2003.
- [241] Morris V.J. Probing molecular interactions in foods. *Trends in food Science and Technology*, 15(291-297), 2004.

- [242] Barth J.V., Constantini G., and Kern K. Engineering atomic and molecular nanostructures at surfaces. *Nature*, 473 :671–679, 2005.
- [243] de Souza Pereira R. Atomic force microscopy as a novel pharmacological tool. *Biochemical Pharmacology*, 62 :975–983, 2001.

Publications

Articles publiés

- Laurent DREESEN, Christophe HUMBERT, Yannick SARTE-NAER, Yves CAUDANO, **Cédric VOLCKE**, Alaa Addin MANI, André PEREMANS, Paul THIRY, S. HANIQUE, J.M. FRÈRE : “Electronic and molecular properties of an adsorbed protein monolayer probed by two-color sum-frequency generation spectroscopy”, *Langmuir*, **20** (2004) 7201-7207.
- **Cédric VOLCKE**, Priscilla SIMONIS, François DURANT, Paul A. THIRY, Philippe LAMBIN, Christine CULOT, Christophe HUMBERT : “Use of specific functionalised tips with STM : A new identification method of ester groups and their molecular structure in self-assembled overlayers”, *Chemistry : A European Journal*, **11** (2005) 4185-4190.
- **Cédric VOLCKE**, Priscilla SIMONIS, Paul A. THIRY, Philippe LAMBIN, Christine CULOT and Christophe HUMBERT : “Highlighting functional groups in self-assembled overlayers with specific functionalised STM tips”, *Nanotechnology*, **16** (2005) 2596-2600.
- **Cédric VOLCKE**, Priscilla SIMONIS, François DURANT, Paul A. THIRY, Philippe LAMBIN, Christine CULOT and Christophe HUMBERT : “STM tip functionalisation : A route to chemical contrast imaging”, accepté pour publication dans *Physicalia Magazine*, (2005).
- Yannick SARTENAER, Christophe HUMBERT, **Cédric VOLCKE**, Gérard TOURILLON, Pierre LOUETTE, André PEREMANS, Paul A. THIRY and Laurent DREESEN : “Thiocyanate and thiol self-assembly process on platinum investigated by means of sum-frequency generation”, accepté pour publication dans *Physicalia Magazine*, (2005).
- Christophe HUMBERT, Laurent DREESEN, Yannick SARTE-NAER, André PEREMANS, Paul A. THIRY and **Cédric VOLCKE**, “On the protoporphyrin monolayers conformation”, ac-

- cepté pour publication dans *ChemPhysChem*, (2005).
- Yannick SARTENAER, Christophe HUMBERT, **Cédric VOLCKE**, Gérard TOURILLON, André PEREMANS, Paul A. THIRY, Laurent DREESEN and Pierre LOUETTE : “ Comparison of thiocyanate and thiol self-assembled monolayers on platinum substrates”, accepté pour publication dans *JSPS-141 activity report*, (2005).

Articles soumis

- **Cédric VOLCKE**, Sabine PIROTTON, Christian GRANDFILS, Isabelle YDENS, Philippe DUBOIS, Martine RAES, Paul A. THIRY and Christophe HUMBERT : “ Influence of DNA condensation state on transfection efficiency in DNA/polymer complexes : an AFM and DLS comparative study”, en révision pour publication dans *Journal of Biotechnology*, (2005).
- Christophe HUMBERT, **Cédric VOLCKE**, Yannick SARTENAER, André PEREMANS, Paul A. THIRY, Laurent DREESEN : “ Molecular conformation and electronic properties of Protoporphyrin-IX self assembled monolayers adsorbed on a Pt(111) surface”, soumis pour publication dans *Surface Science*, (2005).
- Laurent DREESEN, **Cédric VOLCKE**, Yannick SARTENAER, André PEREMANS, Paul A. THIRY and Christophe HUMBERT : “ Comparative study of decyl thiocyanate and decanethiol self-assembled monolayers on gold substrates”, soumis pour publication dans *Surface Science*, (2005).

Articles en préparation

- **Cedric VOLCKE**, Danielle AUBRY, Paul A. THIRY, Zineb MEKHALIF and Joseph DELHALLE : “ Atomic force microscopy study of apatite formation on silanized tantalum oxide surface”, en préparation.
- Yannick SARTENAER, Christophe HUMBERT, **Cédric VOLCKE**, Gérard TOURILLON, Pierre LOUETTE, André PEREMANS, Paul A. THIRY and Laurent DREESEN : “ Adsorption properties of decyl thiocyanate and decanethiol on platinum substrates”, en préparation.