

**ÉCOLE DOCTORALE Physique Chimie-Physique (ED182)**

**Institut de Physique et de Chimie des Matériaux de Strasbourg**

**Service VAE**

## THÈSE présentée par :

**Dris IHIAWAKRIM**

soutenue le : **02 avril 2019**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Physique de la matière condensée

## Étude par les techniques avancées de microscopie électronique en transmission de matériaux fragiles

**Présidente du jury :**

**Mme. REGNAULT Elisabeth**

Professeure, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Mme. Hourlier Djamila**

**M. PATRIARCHE Gilles**

**M. PHAM-HUU Cuong**

**M. HIRLIMANN Charles**

**Mme. Hoffert Céline**

Directrice de recherche CNRS, IEMN UMR 8520, Lille

Directeur de recherche CNRS, LPN UPR20, Paris

Directeur de recherche CNRS, ICPEES UMR7515, Strasbourg

Directeur de recherche CNRS, IPCMS UMR7504, Strasbourg

Chargée d'ingénierie VAE, Université de Strasbourg

**RAPPORTEURS professionnel :**

**M. Aguy Stéphane**

Directeur scientifique, EDEN Instruments, Pessac

**SUPERVISEUR scientifique :**

**M. ERSEN Ovidiu**

Professeur, IPCMS UMR 7504, Université de Strasbourg



## Table des matières :

<a href="#"><u>Introduction générale</u></a> .....	10
<a href="#"><u>Quelques rappels historiques</u></a> .....	12
<a href="#"><u>Références de l'introduction générale</u></a> .....	15
<a href="#"><u>CHAPITRE 1</u></a> .....	16
<a href="#"><u>I. La microscopie électronique en transmission appliquée aux matériaux fragiles</u></a> .....	17
<a href="#"><u>I.1) Le microscope électronique en transmission</u></a> .....	18
<a href="#"><u>I.1.1) Microscope électronique en transmission à balayage corrigé au niveau de la sonde électronique</u></a> .....	20
<a href="#"><u>I.1.2) Spectroscopie : EELS et EDS</u></a> .....	21
<a href="#"><u>I.1.3) Mode EFTEM : Microscopie Électronique à Transmission Filtrée en Énergie.</u></a> .....	23
<a href="#"><u>I.2) Interaction électron-matière : comment prévenir les dégâts d'irradiation ?</u></a> .....	24
<a href="#"><u>I.2.1) Pourquoi un matériau est-il fragile ou sensible aux électrons ?</u></a> ....	24
<a href="#"><u>I.2.1.1) Diffusion élastique :</u></a> .....	27
<a href="#"><u>I.2.1.1.1) Déplacement atomique :</u></a> .....	28
<a href="#"><u>I.2.1.1.2) Effet de pulvérisation :</u></a> .....	28
<a href="#"><u>I.2.1.2) Collision Inélastique :</u></a> .....	29
<a href="#"><u>I.2.1.2.1) Effet de chauffage par faisceau d'électrons :</u></a> .....	29
<a href="#"><u>I.2.1.2.2) Radiolyse :</u></a> .....	30
<a href="#"><u>I.2.2) Comment protéger ou minimiser l'influence des électrons et du vide sur un matériau fragile ?</u></a> .....	31
<a href="#"><u>I.2.2.1) Cryo-microscopie : microscopie électronique à froid en mode congélation</u></a> .....	33
<a href="#"><u>I.2.2.1.1) Méthode de la vitrification développée au laboratoire :</u></a> .....	34
<a href="#"><u>I.2.2.1.1.1) Préparation de grille avec membrane de carbone <i>sur mesure</i> pour la Cryo-EM : Vitrification</u></a> .....	34
<a href="#"><u>I.2.3) Microscopie environnementale : observation en mode in-situ liquide.</u></a> .....	35

<u>I.3) Techniques de préparations :</u>	35
<u>I.3.1) Préparation de sections ultrafine : Ultramicrotome</u>	36
<u>I.3.1.1) La résine d'enrobage et préparation du bloc :</u>	36
<u>I.3.2) Coupe à froid : Cryo-Ultramicrotomie</u>	39
<u>I.3.2.1) La technique au diméthylsulfoxyde (DMSO)</u>	40
<u>I.3.2.2) La méthode CEMOVIS</u>	41
<u>I.3.2.3) La méthode Tokuyasu</u>	42
<u>I.3.3) Protocole pour la préparation de films de carbone perforés avec une distribution de taille de trou prédéfinie :</u>	44
<u>III) Conclusion :</u>	46
<u>REFERENCES CHAPITRE 1</u>	48
<u>CHAPITRE 2</u>	51
<u>II. Études par microscopie électronique à froid d'architectures nanométriques à base de carbone</u>	52
<u>II.1) Étude de la fonctionnalisation de nanotubes monoparoi par des molécules d'histidine-pyrène</u>	53
<u>II.1.1) Fabrication d'architectures à base des nanotubes fonctionnalisés</u>	55
<u>II.1.1.1) Partie expérimentale :</u>	56
<u>II.1.1.1.1) Choix des NTC : Pourquoi les nanotubes de carbone monoparoi (SWNT) ?</u>	56
<u>II.1.1.1.2) Fonctionnalisation des SWNT</u>	57
<u>II.1.1.1.2.1) Mode opératoire</u>	57
<u>II.1.1.1.2.2) Interprétation des résultats :</u>	58
<u>II.1.1.1.3) Élaboration d'un modèle multifonctionnel :</u>	58
<u>II.1.1.2) Caractérisation des auto-assemblages :</u>	58
<u>II.1.1.2.1) Observation et caractérisation par Cryo-EM :</u>	59
<u>II.1.1.2.1.1) Protocole de préparation :</u>	59
<u>II.1.1.2.1.2) SWNT marqué par l'Hexahistidine-Pyrène : Hex<sub>6</sub>-tagSWNT</u>	59
<u>II.1.1.2.1.3) Auto-assemblage supramoléculaire</u>	61
<u>II.1.1.2.1.3.1) Auto-organisation par liaison Hydrogène</u>	61



<a href="#"><u>II.1.1.2.1.3.2) Auto-assemblage des His<sub>6</sub>-tagSWNT induit par NiCl<sub>2</sub></u></a>	62
<a href="#"><u>II.1.1.2.1.4) Élaboration de nanocomposites</u></a>	63
<a href="#"><u>II.1.1.2.1.4.1) Caractérisation des nanoparticules de silice :</u></a>	64
<a href="#"><u>II.1.1.2.1.4.2) Préparation des nanocomposites :</u></a>	64
<a href="#"><u>II.1.1.2.1.4.3) Caractérisation par Cryo-ME des nanocomposites His<sub>6</sub>-TagSWNT / SiO<sub>2</sub></u></a>	65
<a href="#"><u>II.1.2) Conclusion :</u></a>	66
<a href="#"><u>REFERENCES PREMIERE PARTIE CHAPITRE 2</u></a>	68
<a href="#"><u>II.2) Graphène multifeuillet par exfoliation et fonctionnalisation du graphite en une seule étape : préparation, étude par Cryo-EM et utilisation pour l'élaboration des nanocomposites hiérarchisés</u></a>	72
<a href="#"><u>II.2.1) Exfoliation et fonctionnalisation du graphite</u></a>	74
<a href="#"><u>II.2.1.1) Conditions expérimentales : préparation du His<sub>6</sub>-tagGN et His<sub>6</sub>-tagFLG</u></a>	75
<a href="#"><u>II.2.1.2) Mise en évidence des multifeuillets de graphène fonctionnalisés par le pyrène-hexahistidine :</u></a>	76
<a href="#"><u>II.2.1.2.1) Analyse par Cryo-EM</u></a>	76
<a href="#"><u>II.2.1.2.1.1) Préparation des échantillons : vitrification<sup>45</sup></u></a>	77
<a href="#"><u>II.2.1.2.1.2) Étude de la fonctionnalisation et du degré d'exfoliation</u></a>	77
<a href="#"><u>II.2.2) Élaboration de nanocomposites 2D à partir du graphène fonctionnalisé et étude par Cryo-EM</u></a>	79
<a href="#"><u>II.2.2.1) Auto-assemblage avec des nanoparticules de magnétite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : His<sub>6</sub>-tagGN@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></u></a>	80
<a href="#"><u>II.2.2.2) Nanocomposite avec des nanoparticules de silice SiO<sub>2</sub> : His<sub>6</sub>-tagGN@SiO<sub>2</sub></u></a>	82
<a href="#"><u>II.3 Conclusion du chapitre 2.</u></a>	84
<a href="#"><u>REFERENCE DEUXIEME PARTIE CHAPITRE 2</u></a>	85
<a href="#"><u>CHAPITRE 3</u></a>	88
<a href="#"><u>III. Couplage des techniques de Cryo-STEM à haute résolution et de cartographie EDX pour l'étude d'un matériau hybride et d'un cristal moléculaire ; techniques de préparation spécifiques</u></a>	89
<a href="#"><u>III.1) Études de l'effet de l'insertion d'un métal paramagnétique dans une pérovskite Aurivillius</u></a>	90

<a href="#"><u>III.1.1 Intérêt d'étudier ces pérovskites Aurivillius par MET</u></a>	90
<a href="#"><u>III.1.1.2 Présentation des échantillons :</u></a>	91
<a href="#"><u>III.1.1.3. Protocole de synthèse :</u></a>	91
<a href="#"><u>III.1.1.4 Étude par microscopie électronique en transmission :</u></a>	94
<a href="#"><u>III.1.1.4.1) Choix de la préparation :</u></a>	94
<a href="#"><u>III.1.1.4.1.1) Protocole de préparation des sections ultrafines :</u></a>	95
<a href="#"><u>III.1.1.4.2) Caractérisation par Cryo-EM en mode balayage (STEM) :</u></a>	95
<a href="#"><u>III.1.1.4.2.1) HST :</u></a>	95
<a href="#"><u>III.1.1.4.2.2) N-HST :</u></a>	97
<a href="#"><u>III.1.1.4.2.3) ESV</u></a>	99
<a href="#"><u>III.1.1.4.2.3.1) Distance inter-feuillet : Mise en évidence de la structure lamellaire</u></a>	100
<a href="#"><u>III.1.1.4.2.3.2) Où est le cuivre ? Localisation par comparaison en Cryo-STEM haute résolution et par analyse chimique.</u></a>	102
<a href="#"><u>III.1.2. Conclusion et perspective</u></a>	106
<a href="#"><u>REFERENCES PREMIERE PARTIE CHAPITRE 3</u></a>	107
<a href="#"><u>III.2) Étude de l'interface entre deux cristaux moléculaires (Fe/Ru) macroscopiques : préparation de section et analyse par Cryo-EM</u></a>	109
<a href="#"><u>III.2.1) Présentation du matériau étudié : cristal moléculaire de monocristaux de Fe et Ru</u></a>	109
<a href="#"><u>III.2.2) Mise en évidence de l'interface Fe/Ru : préparation et résultats</u></a>	111
<a href="#"><u>III.2.2.1) Développement de protocoles de préparation : de l'ultramicrotomie à la cryo-ultramicrotomie</u></a>	112
<a href="#"><u>III.2.2.1.1) Cryo-Ultramicrotomie (C-UM) :</u></a>	112
<a href="#"><u>III.2.2.1.1.1) La technique Tokuyasu : coupe entre -160°C et -140°C</u></a>	112
<a href="#"><u>III.2.2.1.1.2) La technique CEMOVIS : coupe à la température de l'azote (~ -196°C)</u></a>	113
<a href="#"><u>III.2.2.1.2) Développement d'une nouvelle approche :</u></a>	116
<a href="#"><u>III.2.3) Conclusion et perspectives</u></a>	119
<a href="#"><u>REFERENCES DU CHAPITRE 3 : DEUXIEME PARTIE</u></a>	121
<a href="#"><u>CHAPITRE 4</u></a>	122

<u>IV. Développement de la tomographie électronique à froid (Cryo-ET) appliquée aux matériaux fragiles : exemple d'application à un réseau métallo-organique (MOF)</u> .....	123
<u>VI.1) La Cryo-tomographie : son principe</u> .....	123
<u>IV.2) Défi pour le développement de Cryo-ET</u> .....	124
<u>IV.3) Étude par Cryo-ET d'un MOF : détermination de la localisation des NPs</u> .....	126
<u>IV.3.1) Présentation de l'échantillon :</u> .....	127
<u>IV.3.2) Préparation d'échantillon</u> .....	128
<u>IV.3.3) Mesure de la dose maximum :</u> .....	129
<u>IV.3.4) Acquisition : Développement d'une méthode pour réduire les effets des électrons</u> .....	130
<u>IV.3.5) Acquisition et alignement : critère d'acceptabilité de la série</u> ..	132
<u>IV.3.6) Reconstruction :</u> .....	133
<u>IV.3.7) Analyse des données :</u> .....	135
<u>IV.4) Conclusion</u> .....	136
<u>REFERENCES CHAPITRE IV</u> .....	138
<u>CHAPITRE 5</u> .....	140
<u>V) La microscopie électronique environnementale en milieu liquide : la nucléation et la croissance de nanoparticules à base de fer dans un milieu organique</u> .....	141
<u>V.1) Développement de la microscopie MET in-situ liquide</u> .....	142
<u>V.1.1) Cellule environnementale fermée : système dédié in-situ liquide</u> .....	142
<u>V.1.2) La radiolyse</u> .....	144
<u>V.1.3) La résolution</u> .....	145
<u>V.2) Étude par MET in-situ liquide des processus de nucléation - croissance de particules à base de fer dans des milieux organiques</u> ..	146
<u>V.2.1) Décomposition thermique : synthèse ex-situ d'oxyde de fer</u> .....	147
<u>V.2.2) Synthèse in-situ en milieu liquide des nanostructures d'oxyde de fer par décomposition thermique</u> .....	148
<u>V.2.2.1) Dose d'électron</u> .....	149
<u>V.2.2.2) Étude de la nucléation :</u> .....	150

<a href="#"><u>V.2.2.2.1) Mésophase vésiculaire :</u></a>	154
<a href="#"><u>V.2.2.2.2) Mésophase micellaire inversée :</u></a>	155
<a href="#"><u>V.2.2.2.3) Conclusion :</u></a>	155
<a href="#"><u>V.2.2.3) Étude de la croissance des oxydes de fer en fonction de la dose d'électrons :</u></a>	156
<a href="#"><u>V.2.2.3.1) Mode MET : <math>d=9364 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}</math> (dose élevée) :</u></a>	156
<a href="#"><u>V.2.2.3.2) Mode MET : <math>d=6870 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}</math> (dose « moyenne ») :</u></a>	158
<a href="#"><u>V.2.2.3.3) Mode MET : <math>d=2500 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}</math> (dose faible) :</u></a>	158
<a href="#"><u>V.2.2.3.4) Mode STEM : comparaison entre deux doses d'électrons :</u></a>	159
<a href="#"><u>V.2.2.3.5) Analyse ex-situ : vérification par HRTEM et diffraction des électrons :</u></a>	161
<a href="#"><u>V.3) Conclusion :</u></a>	161
<a href="#"><u>REFERENCES CHAPITRE V</u></a>	163
<a href="#"><u>Conclusion générale et perspectives</u></a>	167

**Étude par les techniques  
avancées de microscopie  
électronique en transmission  
de matériaux fragiles.**

# **Introduction générale**

# INTRODUCTION GENERALE

Depuis toujours l'Homme s'interroge sur le monde qui l'entoure. Dès les premiers temps nos ancêtres ont essayé de donner des explications aux différents phénomènes de la nature. Déjà chez les philosophes grecs l'Homme avait une place importante dans l'univers. À cette étape de l'histoire, Démocrite, contemporain de Socrate, parlait déjà d'atome et de vide.<sup>1</sup> Il est tout à fait étonnant que déjà à cette époque on évoque l'existence des atomes, alors que l'idée même du microscope ne pouvait être conçu. Cependant c'était à partir de ces premières pensées rationnelles que sera plus tard créée la démarche scientifique, qui tente par d'autres voies de comprendre le réel. En effet, la science a depuis pour objet d'expliquer le « comment » des phénomènes naturels.

Aujourd'hui, les frontières entre les différentes disciplines qui composent les sciences dures sont devenues beaucoup plus perméables. Lorsqu'on étudie l'infiniment petit on descend vers un monde incroyable où se mêlent des phénomènes biologiques, des réactions chimiques, des interactions physiques... Ce monde minuscule est plus vaste qu'il n'y paraît, plus difficile à mesurer, plus étrange et plus magique que n'importe quelle science-fiction ou fantaisie, plus beau que n'importe quel art, et bien plus complexe qu'on ne pourrait l'imaginer. Étudier les propriétés des matériaux aux plus petites échelles allant jusqu'à celle de la physique atomique et de la chimie quantique, montre la complexité de l'organisation et des interactions dans la matière qu'elle soit biologique, organique ou inorganique.

La Microscopie Électronique en Transmission (MET) est une technique puissante qui permet de caractériser et d'analyser des objets pour en obtenir des informations souvent difficiles à décrocher par ailleurs.<sup>2</sup> De nos jours c'est une méthode bien établie et largement utilisée qui a plus d'un siècle de développement. Après un long cheminement intellectuel, qui a commencé en 1897 avec la découverte par Thompson du rapport entre la masse et la charge de l'électron en passant par Louis de Broglie qui a associé une onde aux corpuscules en 1924 et la vérification expérimentale de cette théorie par Davisson et Germer en 1927,<sup>10</sup> le premier microscope électronique en transmission (MET) fut réalisé par Ruska et Knoll.<sup>3,4</sup> C'est en 1933 que Ruska obtint pour la première fois une résolution supérieure au meilleur des microscopes optiques bien que peu de matériaux pouvaient résister à l'énergie produite par l'impact du faisceau.<sup>5</sup> Knoll, parti travailler au développement de la télévision, publia en 1935 les premières images obtenues à partir du balayage d'un échantillon solide par un faisceau d'électrons.<sup>6</sup> Cependant, le véritable premier microscope électronique à balayage fut mis en place par Von Ardenne en 1938.<sup>7</sup> Puis les années suivantes, la résolution des METs s'est rapidement améliorée grâce aux différentes interactions multiples entre les besoins des utilisateurs et les progrès scientifiques dans de nombreux domaines. Effectivement les détecteurs sont de plus en plus sensibles, l'électronique et l'informatique permettent une transmission de l'information beaucoup plus rapide. De plus la réalisation du vide est constamment en amélioration, c'est à dire contenant de moins en moins de molécules résiduelles et produisant donc moins de bruit et d'interférences. Enfin la mécanique surtout celle qui est micrométrique qui de plus en plus précise et sensible.

# INTRODUCTION GENERALE

## Quelques rappels historiques

- ❖ 1897 Découverte de l'électron par J.J. Thompson
- ❖ 1924 P. De Broglie : dualité onde-particule
- ❖ 1927 Davisson et Germer observent la diffraction des électrons par un cristal de nickel
- ❖ 1927 Hans Busch : focalise un faisceau d'électrons avec un champ magnétique inhomogène
- ❖ 1931 Max Knoll et Ernst Ruska construisent le premier microscope électronique à transmission
- ❖ 1938 Microscope électronique à transmission à balayage (STEM) (M. Von Ardenne)
- ❖ 1939 Première commercialisation d'un TEM par Siemens (Ruska, Von Borries)
- ❖ ~ 1940 Fondements théoriques de l'optique et des objectifs électroniques électromagnétique (W. Glaser, O. Scherzer)  
1964 Première commercialisation d'un microscope électronique à balayage par Cambridge Instruments
- ❖ ~ 1970 Crowther, de Rosier et Klug décrivent des techniques de reconstruction objets biologiques tridimensionnels à partir de micrographies prises en microscopie électronique.
- ❖ ~ 1970 Microscope électronique à haute résolution (HRTEM) avec résolution moins de 0,4 nm
- ❖ 1975 Henderson et Unwin déterminent la première structure d'une protéine membranaire  
reconstruction d'images prises sur des échantillons non colorés à température ambiante.
- ❖ ~ 1980 Début de la cryo-microscopie électronique (Dubochet)  
1986 Prix Nobel à **E. Ruska** (avec **G. Binning** et **H. Rohrer** qui ont développé le microscopie à effet tunnel)
- ❖ 2017 Prix Nobel à **Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson** pour " développement de la microscopie cryo-électronique pour la détermination de la structure à haute résolution des biomolécules en solution".

La microscopie électronique en transmission à froid, appelée « CryoEM » a été couronnée cette année par la plus haute distinction, le prix Nobel de Chimie décerné à Jacques Dubochet, Joachim Frank et Richard Henderson.<sup>9</sup> Cette reconnaissance montre l'étendu des efforts et des développements effectués pour permettre l'observation à haute résolution d'une part d'objets très sensible aux faisceaux d'électrons et d'autre part de réaliser des analyses de matériaux biologiques dans leur environnement en préservant leur hydratation. En effet, la MET à une longue



# INTRODUCTION GENERALE

histoire commune avec la préparation et l'analyse de matériaux de faibles contrastes sensibles aux interactions d'électron et au vide du microscope. Ces derniers sont souvent des échantillons composés d'éléments légers tel que l'hydrogène, carbone, oxygène et azote avec une faible densité électronique.<sup>9</sup> Bien que la MET ait accumulé pendant toutes ces années une grande expérience dans ce domaine, il reste encore de nombreux défis à relever, tel que l'étude en haute résolution ou encore l'analyse EELS et EDX en milieu liquide ainsi que dans la préparation et l'analyse de certains objets composés essentiellement d'éléments à faible densité électronique par Cryo-EM.

Dans cette même voie, ce travail aura à cœur de présenter les méthodologies MET déjà développées ou en cours d'optimisation pour la préparation et l'analyse des objets fragiles. Certains de ces échantillons ne sont pas uniquement délicats dans le sens d'une sensibilité aux électrons mais également à l'échelle macroscopique ils sont très difficiles à manipuler en maintenant l'intégrité de leur morphologie et de leur structure interne.

Les motivations et le but général de ces travaux ont été de développer et d'affiner les techniques actuellement disponibles de microscopie en transmission pour l'étude des matériaux inorganiques pour être capable d'étudier des échantillons différents mais tous ayant pour particularité leur extrême fragilité. En effet, l'observation et la mise en évidence de certaines propriétés de ces matériaux étaient jusqu'ici difficile à réaliser. Un travail en profondeur et de connaissance des caractéristiques intrinsèques de chaque échantillon a été mené pour permettre la mise en place de techniques et de protocoles souvent uniques pour chaque matériau. D'autre part, un travail d'élaboration et d'amélioration du processus de synthèse de certains échantillons a également été accompli.

La première partie du premier chapitre concernera une simple et brève présentation de la MET ainsi que les différents modes utilisés, puis dans la seconde moitié on discutera plus en détail de l'influence des électrons sur la dégradation des matériaux fragiles et enfin on finira par une présentation des différents développements de techniques de préparation et d'observation pour des échantillons sensibles. Cette dernière, sera consacrée aux développements approfondis et à l'adaptation de protocoles pour permettre une préparation sans répercussions ni sur la structure ni sur les propriétés physicochimiques.

Le chapitre 2 présentera l'étude de nanocomposés à base de carbone. Cette étude sera particulière dans le sens qu'elle présentera un travail complet de l'élaboration des différents matériaux avec un suivi pas à pas et de caractérisations complémentaires pour confirmer certaines propriétés observées en Cryo-EM. En effet il sera question ici dans un premier temps d'élaborer des nanomatériaux hybrides à base de nanotubes de carbone monoparoie et de graphène pour construire des systèmes à fonctionnalité multiple. Puis dans un deuxième temps de caractériser chaque propriété par Cryo-microscopie avec une préparation spécifique des

## INTRODUCTION GENERALE

échantillons permettant de conserver les échantillons intacts et proche de leur milieu natif.

Dans le chapitre 3, il sera question de l'étude de cristaux à base de molécules et de pérovskites par Cryo-EM en haute résolution en mode STEM. En effet, l'objectif ici sera de développer une technique de préparation adaptée à l'extrême fragilité de ces matériaux puis de mettre en place les conditions d'observation ayant le moins d'impact possible sur la structure et l'organisation interne de ces matériaux pour pouvoir les mettre en évidence à l'échelle nanométrique par haute résolution et en mode cartographie chimique.

Le quatrième chapitre concerne le développement de la Cryo-tomographie électronique en transmission (Cryo-ET) appliquée aux matériaux fragiles. La spécificité de ce travail porte sur la mise en place d'une méthodologie permettant de garder intacte l'échantillon tout au long de l'acquisition des images à différents angles. On proposera une étude complète en Cryo-ET d'un métallo-organique (metal-organic frameworks (MOF) en anglais) constitué d'ions métalliques coordonnés à des ligands organiques pour former des structures en trois dimensions. Dans un double objectif, le premier est de démontrer la faisabilité et le deuxième l'importance de cette technique appliquée à des matériaux sensibles au faisceau d'électrons pour en tirer des données quantifiables.

Pour finir le dernier chapitre présentera la microscopie en mode in-situ liquide. Dans cette partie on discutera de l'utilisation des électrons pour amorcer la nucléation de nanoparticules, et l'influence de la dose d'électrons sur la croissance et la morphologie des nanoparticules.

## Références de l'introduction générale

- 1 - Francis Wolff, Penser avec les anciens
- 2 - DB Williams, CB Carter, The transmission electron microscope
- 3 - Ruska, E. and Knoll, M. (1931). Die magnetische Sammelspule f/ir schnelle Elektronenstrahlen. (The magnetic concentrating coil for fast electron beams.) Z. techn. Physik 12: 389-400 und 448, submitted 18 April 1931
- 4 - T Mulvey, Origins and historical development of the electron microscope, 1962 Br. J. Appl. Phys. 13 197
- 5 - M. Knoll et E. Ruska, « Das Elektronenmikroskop », Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, vol. 78, 1932, p. 318-339.
- 6 - M. Knoll, Aufladepotential und Sekundäremission elektronenbestrahlter Körper, Zeitschrift für technische Physik 16, 467-475
- 7 - M. von Ardenne, Das Elektronen-Rastermikroskop, Zeitschrift für Physik A Hadrons and Nuclei, 108(9-10):553-572, 1938.
- 8 - Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson the Nobel Prize for Chemistry 2017 for “developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution”.
- 9 - Egerton, R., TEM Specimens and Images: Physical Principles of Electron Microscopy. 2005, Springer US. p. 93-124.
- 10 - C. J. Davisson et L. H. Germer, « Reflection of Electrons by a Crystal of Nickel », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 14, 1<sup>er</sup> avril 1928, p. 317-322

# CHAPITRE 1

**I. La microscopie électronique en transmission appliquée aux matériaux fragiles**

Dans ce chapitre, on donnera d'abord une brève présentation de la microscopie électronique en transmission (MET) tout en mettant l'accent sur les méthodes d'observations utilisées pour les matériaux fragiles et mous. Une description, beaucoup plus large et plus détaillée, est donnée dans le livre de Williams et Carter.<sup>21</sup> Dans la seconde partie, on commencera par une discussion sur l'influence des électrons sur les matériaux fragiles ainsi que les différents phénomènes issus de cette interaction et leurs conséquences éventuelles. Ensuite on présentera brièvement la démarche scientifique et historique suivie pour minimiser les conséquences néfastes de l'irradiation par le faisceau d'électrons. Enfin on terminera par la présentation succincte des techniques d'observation et de préparation développées pour nos échantillons.

L'analyse d'échantillons dans le microscope électronique est basée sur l'interaction des électrons avec la matière. Ceci a pour conséquence de générer différents types de signaux (voir figure 2). Effectivement, dans le mode parallèle,<sup>21</sup> un faisceau large traverse un échantillon mince produisant une image dont le contraste est dû à la diffraction ou au rapport masse-épaisseur. Cette image est ensuite agrandie par un ensemble de lentilles électromagnétiques et enregistrée sur une caméra CCD. Il est tout à fait possible d'étudier à la fois les échantillons provenant de la science de la matière et des sciences de la vie et de la terre en utilisant les différents modes d'imagerie et d'analyses de composition chimique disponibles en MET. Dans nos études, les principales techniques utilisées sont l'imagerie à champ clair (MET conventionnel), l'imagerie en mode balayage en transmission (STEM), l'imagerie à haute résolution (HR) ainsi que la diffraction d'électrons en aire sélectionnée (SAED, Selected Area Electron Diffraction). L'analyse de la composition chimique est réalisée par les techniques de spectroscopie des Rayons X émis par l'échantillon (EDS) et également par perte d'énergie des électrons du faisceau incident à travers le matériau (EELS). Très récemment, toute une discussion et un développement autour de la microscopie environnementale ont été entrepris, en sachant que l'analyse de matériaux dans des environnements de gaz ou liquide reste un vrai défi. En effet, la production et la propagation des électrons dans un microscope électronique nécessitent une enceinte sous ultravide. Dans un liquide ou dans un gaz, les résolutions spatiale et spectrale de l'instrument sont très vite dégradées. Pour conserver les performances de l'instrument, il faut confiner l'environnement gazeux ou liquide dans la région des pièces polaires de la lentille objectif où se trouve l'échantillon. Pour répondre à ce défi, un mode dédié aux études environnementales a été implémenté, en particulier dans notre laboratoire. Cette nouvelle possibilité d'observer, à l'échelle sub-nanométrique, la dynamique de la

## fragiles

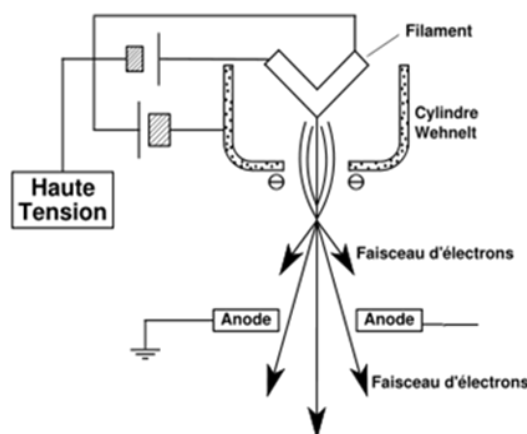
matière en phase liquide ou dans une atmosphère gazeuse ouvrent des champs d'investigation immenses dans plusieurs domaines des sciences, allant de la biologie aux sciences des matériaux en passant par la géologie. Une présentation plus détaillée de la microscopie environnementale sera donnée dans le chapitre sur l'étude in-situ en phase liquide.

### I.1) Le microscope électronique en transmission

Dans un MET en mode imagerie, ce sont les électrons transmis à travers l'échantillon qui sont analysés. Leur longueur d'onde  $\lambda$  est de l'ordre du picomètre, proportionnelle à la tension d'accélération  $E$  qui leur est appliquée conformément à la

formule  $\lambda = \frac{1,23}{\sqrt{E(1 - 10^{-6}E)}} \text{ nm}$ . Les tensions d'accélération varient entre 100 et 300 kV ce qui produit des électrons avec une longueur d'onde comprise entre  $3,7 \cdot 10^{-3} \text{ nm}$  et  $1,97 \cdot 10^{-3} \text{ nm}$ .

Le microscope est constitué d'un système de lentilles électromagnétiques qui permettent de condenser et focaliser les électrons émis par la source qui est un canon à électrons. Cette source peut être un simple filament de tungstène ou un cristal d'hexaborure de lanthane chauffé à très haute température, jusqu'à 2700 K.<sup>21</sup> Des sources à émission de champ sont de plus en plus utilisées dans les METs, les électrons qu'elles émettent ont une bonne cohérence et permettent une meilleure résolution. Le principe est de soumettre une pointe de tungstène, recouverte d'oxyde de zirconium, à une forte différence de potentiel électrique, ce qui a pour conséquence l'émission d'électrons par effet tunnel. Il existe deux types de *canons à émission de champ* (FEG en anglais pour *Field Emission Gun*) : i) l'émission de champ à froid (CFE en anglais) dans lequel la pointe reste à température ambiante ; et ii) l'émission de champ assistée thermiquement (TFE en anglais) et où la pointe est portée à une température typique de 1800 K. L'avantage certain des canons à émission de champ (Figure 1) est leur brillance jusqu'à 100 fois plus importante que les filaments thermoïoniques.<sup>44</sup>



## fragiles

Figure 1 : schéma d'un canon à électrons

Par la suite, le faisceau d'électron produit par la source est accéléré et se propage dans la colonne du MET pour atteindre l'échantillon présent au milieu de la lentille objective. Le libre parcours moyen des électrons dans l'air étant très faible ( $<100\text{nm}$ ), un vide poussé, d'au moins  $10^{-6}$  mbar, est maintenu au sein de la colonne.<sup>45</sup> Le faisceau est tout d'abord condensé par la lentille « condenseur » puis focalisé par la lentille « objectif » pour enfin être projeté sur un écran fluorescent par la lentille « projecteur ». L'image de l'échantillon peut être observée directement à partir d'une caméra CDD.

Dans un MET, les électrons du faisceau interagissent de deux façons différentes avec la matière traversée (figure 2) et ces interactions sont à l'origine de la théorie de la formation de l'image. Dans un MET, l'image est une projection 2D d'un objet en 3D qui est l'échantillon.

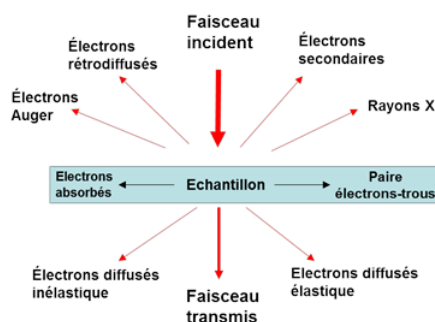


Figure 2 : Rayonnements provoqués par interaction électrons et matière

Presque tous les types de matériaux peuvent être caractérisés en utilisant un MET. Aujourd'hui, de nombreuses techniques basées sur l'imagerie, la spectroscopie et la diffraction sont utilisées en fonction des besoins d'analyse spécifiques à chaque échantillon. Ce travail, avec l'utilisation et le perfectionnement des techniques d'imagerie, d'analyse et de préparation, contribue au développement de nouvelles méthodologies pour étudier les matériaux fragiles et mous (constitués d'éléments légers), y compris les spécimens hydratés congelés. Durant nos études, nous avons utilisés deux MET commercialisés par la société JEOL (Japan Electron Optical Lens), opérant à 200 keV : le premier est un microscope JEOL 2100F Cs équipé d'un canon à émission de champ (FEG), d'un correcteur d'aberrations sphériques, de détecteurs en mode balayage (STEM), d'un spectromètre post-colonne, d'un détecteur EDS SDD (Silicon Drift Detector), d'un filtre d'image Gatan (GIF) et d'une caméra CCD 2048 x 2048 pixels (figure 3). Le second est un JEOL 2100 équipé d'un canon à électrons d'émission thermoïonique LaB6. Ce dernier a surtout été utilisé pour des expériences de tests pour la validation d'un protocole de préparation. Dans certains cas, il a également été utilisé pour réaliser des statistiques de dispersion de nanoparticules inorganiques.

## fragiles



Figure 3 : Microscope principal utilisé dans ces travaux : JEOL 2100 F avec Correcteur d'aberration sphérique sonde (résolution STEM 0,12 nm) avec canon à émission de champ (FEG)

### I.1.1) Microscope électronique en transmission à balayage corrigé au niveau de la sonde électronique

Contrairement au TEM conventionnel, dans l'imagerie STEM la sonde électronique est focalisée sur l'échantillon et l'image est formée en mode balayage (comme dans un MEB). En effet, un faisceau d'électrons est focalisé dans une sonde avec une taille qui peut être inférieure au nanomètre au niveau de la zone étudiée de l'échantillon. L'acquisition d'une image se fait par balayage de la sonde sur la zone d'intérêt point par point et à chaque position de la sonde il y a la collection des électrons transmis (figure 4a). Un grand avantage de ce mode d'analyse est la variété d'informations que l'on peut recueillir. Effectivement, on a deux modes d'observation en même temps le champ clair (BF) et le champ sombre annulaire (ADF) (figure 4b). Les électrons transmis diffusés élastiquement sont captés par le détecteur BF ainsi que par le détecteur ADF pour ceux diffusés à un angle généralement inférieur à 10 mrad. Par conséquent, le contraste de diffraction (contraste de Bragg) ainsi que le contraste masse-épaisseur sont simultanément observés dans les images STEM. Cependant, le contraste qui résulte principalement de la composition atomique (appelé Z-contraste) est dû à la diffusion de Rutherford. Cette dernière est caractérisée par une grande déviation angulaire supérieur 50 mrad par rapport à l'axe optique correspondant à l'axe de la colonne du MET. En utilisant un détecteur à grand champ angulaire (HAADF) capable de collecter ces électrons



## fragiles

avec cette grande déviation le contraste de masse (Z-contraste) devient le mécanisme dominant dans une image HAADF STEM.

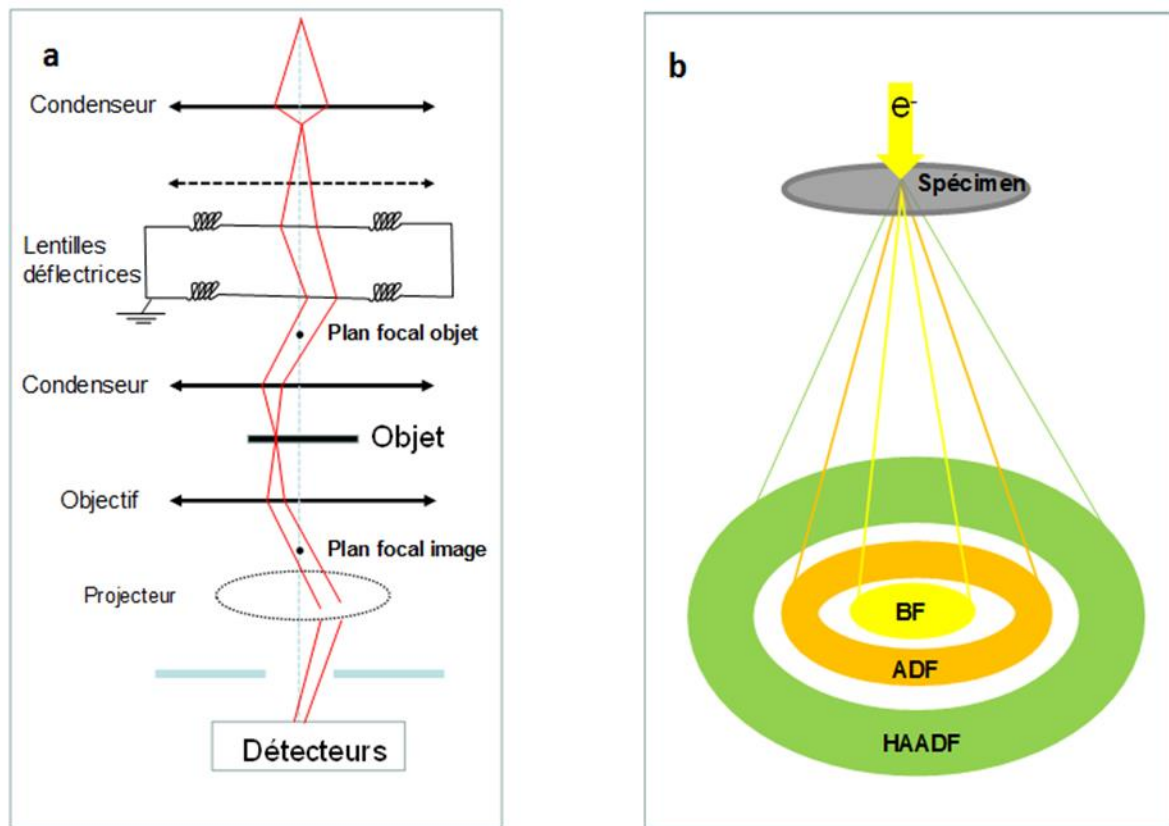


Figure 4 : (a) schéma illustrant le principe de fonctionnement du mode STEM et (b) les différents détecteurs utilisés pour former les images BF, ADF et HAADF

Dans nos études, le mode STEM a été essentiellement utilisé. En effet, ceci permettait un meilleur contrôle de la densité d'électrons donc de diminuer leur impact néfaste sur l'échantillon (moyen utilisé pour préserver la morphologie). De plus, un contraste plus important est obtenu entre les matériaux « lourds » et « légers » en utilisant le mode HAADF.

## I.1.2) Spectroscopie : EELS et EDS

Certaines de nos études ont nécessité de réaliser des analyses, soit ponctuelles, soit par cartographie d'une zone d'intérêt de nos échantillons préparés dans des conditions spécifiques, tout en préservant la structure du matériau. Effectivement, pour éviter la dégradation du spécimen lors des analyses certaines précautions ont été prises. L'avantage de notre microscope JEOL 2100F c'est qu'on peut coupler la spectroscopie par dispersion de rayons X (EDS) à celle par perte d'énergie des électrons (EELS) avec les modes d'imagerie MET et STEM. Le mode EFTEM est uniquement lié à l'EELS.

**fragiles**

Le MET traditionnel (en mode imagerie) offre une résolution spatiale supérieure pendant l'analyse EDS en raison du volume d'interaction réduit dans une section de l'échantillon lors de son bombardement aux électrons ( $\sim 5$  à  $200$  nm). Cependant, lorsque le faisceau d'électrons incident interagit avec l'échantillon, des photons X sont émis et sont caractéristiques des éléments présents. Il faut préciser que les rayons X émis se propagent dans toutes les directions de l'espace (figure 5a). En pratique, seule une fraction de ces rayons X est collectée par le spectromètre, principalement due à un angle de collecte limité et à des difficultés d'insertion d'un détecteur de grande taille dans une colonne à faisceau d'électrons sans affecter les autres performances du microscope. Dans l'analyse des matériaux fragiles composés essentiellement d'éléments légers par EDS, les spectres obtenus peuvent être impactés par la superposition des pics de rayons X de faible énergie avec le bruit électronique du détecteur. Avec le spectromètre EELS, on n'a pas ces problèmes de collecte d'information parce qu'il est placé dans le trajet du faisceau électronique qui a traversé l'échantillon, en bas de la colonne du MET. Un pourcentage significativement élevé d'électrons transportant des informations élémentaires de la zone d'intérêt peut être dirigé vers le spectromètre (figure 5b).<sup>2</sup> En effet, en mode analyse EELS on enregistre le spectre de perte d'énergie ponctuellement sur l'échantillon, ce qui permet d'observer les modifications de la structure fine du seuil d'absorption correspondant à un élément d'intérêt dans des zones de l'échantillon localisées spatialement.

De manière plus détaillée, un spectre EELS est composé de trois zones d'intérêt. i) Le « zero-loss », un pic intense à  $0$  eV correspondant aux électrons ayant traversés l'échantillon sans perdre d'énergie. Il permet d'acquérir plusieurs informations, dont la résolution énergétique grâce à la largeur à mi-hauteur. ii) La seconde zone est celle des pertes proches « low-loss » de  $0$  eV à  $50$  eV. Dans cette région de pertes d'énergie, on trouve les transitions inter-bandes. Cette zone permet également d'estimer l'épaisseur de l'échantillon en faisant le rapport des intensités entre le pic de plasmons et le pic de zero-loss. iii) La dernière zone, est celle des pertes lointaines (supérieure à  $50$  eV) où on trouve les seuils d'absorption correspondant à l'ionisation des électrons de cœur (niveaux K, L, M...). L'énergie de ces seuils d'absorption est tabulée pour différents matériaux. La spectroscopie de perte d'énergie peut être utilisée en mode TEM afin de pouvoir étudier la composition chimique d'échantillon ou en mode STEM pour faire des études locales 1D ou 2D.

## fragiles

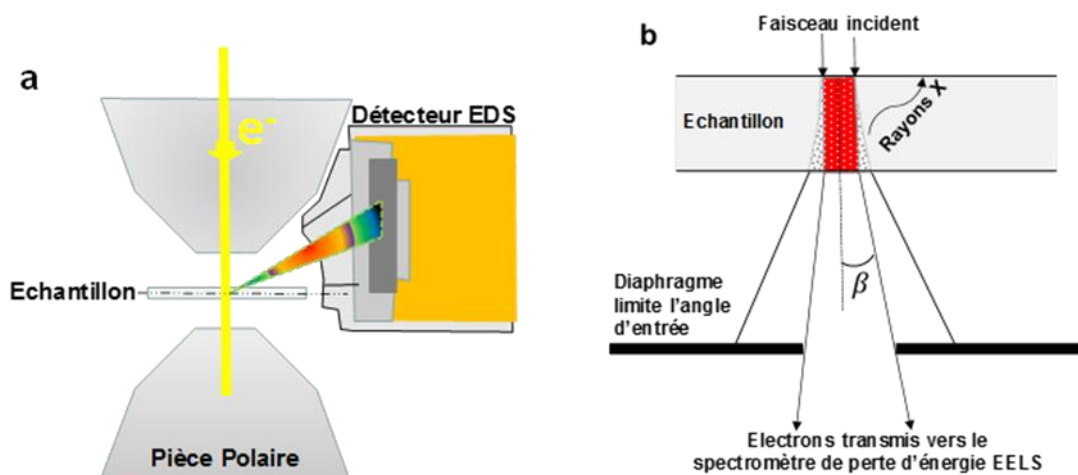


Figure 5 : schéma de la position des détecteurs EDS et EELS de collecte des rayons X, (a) EDS et (b) EELS.

En conséquence, l'EELS offre une meilleure efficacité dans la collecte de signaux, surtout pour les éléments légers. Cependant, l'EDS est plus adaptée à l'analyse de la composition chimique locale des échantillons épais et volumineux.

### I.1.3) Mode EFTEM : Microscopie Électronique à Transmission Filtrée en Énergie.

Comme son nom l'indique l'imagerie EFTEM est basée sur la spectroscopie de pertes d'énergie (EELS). En effet, le but est de mesurer la perte de l'énergie subie par les électrons lors de la traversée de l'échantillon mince. Notre MET JEOL 2100F (figure 3) possède un filtre en énergie (Gatan Imaging Filter GIF) situé post colonne. Ce GIF utilise un prisme magnétique qui permet de séparer les électrons en fonction de leur énergie. En effet, la perte d'énergie des électrons mesurée est représentée sous forme d'un spectre ou d'une image, c'est à ce propos que l'on peut réaliser des études localisées et quantitatives de la composition. En mode imagerie filtrée, après sélection du seuil d'absorption de l'élément que l'on veut mettre en évidence dans un échantillon, on obtient une image avec des zones au contraste plus intense correspondant aux régions riches avec l'élément choisie.

Le mode EFTEM a été utilisé pour améliorer la qualité des images provenant d'échantillons fragiles composés essentiellement d'éléments légers. En effet, la microscopie électronique filtrée en énergie est un outil puissant pour déterminer la composition chimique à l'échelle nanométrique en science des matériaux ou en biologie. Cette méthode offre non seulement le mode filtrage en « zero-Loss », dans lequel uniquement les électrons non diffusés ou diffusés élastiquement contribuent à l'image (augmentation du contraste comparativement à une image non filtrée), mais également le filtrage des électrons via une fenêtre en énergie sélectionnant les électrons diffusés inélastiquement, ce qui en résulte une grande variété de modes

## fragiles

d'imagerie élémentaire. En outre, la cartographie élémentaire basée sur l'imagerie EFTEM peut produire des cartes de composition résolues spatialement pour compléter les données d'analyse élémentaire basées sur la spectroscopie aux rayons X (EDS). Le principe de l'imagerie filtrée est d'obtenir une image directement sur le détecteur (caméra CCD) à partir uniquement des électrons sélectionnés par le spectromètre. Ainsi, la réalisation des images s'effectue avec un faisceau parallèle et fixe en sélectionnant, à l'aide d'une fente disposée après le système dispersif, les électrons d'une certaine gamme d'énergie (figure 6).

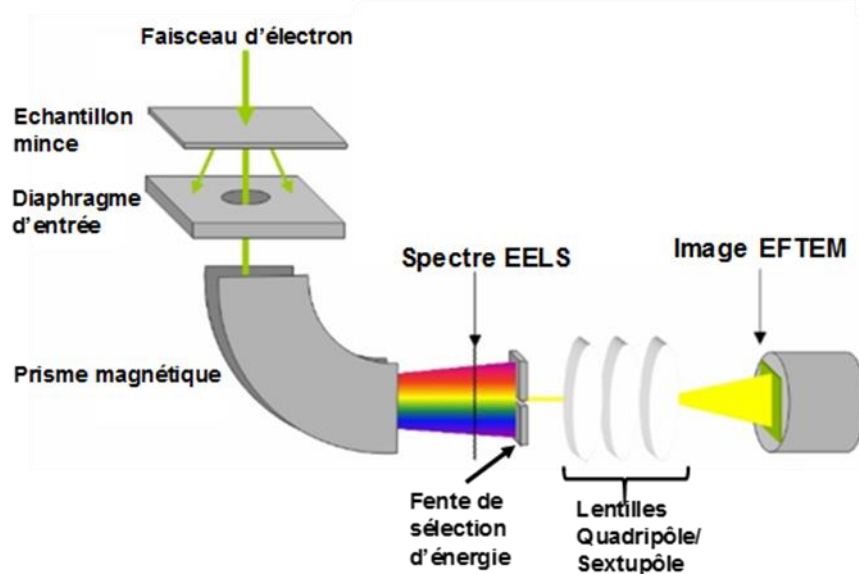


Figure 6 : schéma de principe du filtre à énergie Gatan de notre microscope

## I.2) Interaction électron-matière : comment prévenir les dégâts d'irradiation ?

La première partie de ce sous-chapitre consistera en une revue sur les différents processus de dégâts électroniques, en mettant l'accent sur les matériaux qui présentent une sensibilité et une fragilité plus prononcées à l'interaction avec les électrons. Dans la deuxième partie, nous examinerons les précautions à prendre pour éviter ou minimiser les conséquences des dégâts d'irradiations sur ces spécimens fragiles.

### I.2.1) Pourquoi un matériau est-il fragile ou sensible aux électrons ?

L'endommagement par le faisceau d'électrons des matériaux inorganiques est différent des solides organiques pour plusieurs raisons. En effet, il y a tout d'abord

**fragiles**

une différence de structure atomique, qui est plus compacte pour les premiers. Ensuite, les échantillons inorganiques ont une coordination, autour de chaque atome, beaucoup plus élevée. Ces caractéristiques apportent une résistance beaucoup plus forte au faisceau d'électrons. Hobbs a bien décrit les différentes causes de cette résistance.<sup>11</sup> Dans notre cas, certains des matériaux que nous avons étudiés sont des hybrides composés d'un solide inorganique et organique, souvent entre les deux règnes des interactions qui peuvent être de faibles énergies et qui participent à la cohésion de l'ensemble. Ce type de structure a l'inconvénient d'être encore plus sensible car souvent les premiers dégâts sont la destruction des liaisons entre les deux parties organique et inorganique.

Lorsque le faisceau d'électrons utilisé dans un MET provoque un changement de la surface ou de la structure globale d'un échantillon, on dit que ce dernier est sensible à l'interaction avec les électrons. Il faut noter que cette modification de l'échantillon peut être temporaire ou permanente. La première question à laquelle on doit répondre est de définir exactement un matériau dit « fragile ». Dans notre cas, on dit qu'un échantillon est fragile lorsqu'il présente une sensibilité accrue aux électrons et/ou également une fragilité macroscopique lors de la préparation. D'abord, on va voir comment les électrons réagissent avec ces matériaux dits « fragiles » et quels types de modification ils engendrent sur la structure. Beaucoup d'études sur les phénomènes de dommages dus aux électrons sur des matériaux biologiques et organiques à différentes conditions ont été réalisées.<sup>11-16</sup> Ici, il n'est pas question de faire une étude exhaustive sur les dommages dus à la radiation électronique, on va plutôt se concentrer sur les types de matériaux présentés dans ce manuscrit. Autrement dit, on mettra l'accent sur les matériaux hybrides, les nanocomposites, ceux qui sont fonctionnalisés et ceux présentant une fragilité dans la préparation. Pour commencer, un matériau quel qu'il soit est composé d'atomes liés entre eux par des liaisons chimiques. Ces dernières peuvent être de plusieurs types ; Celles qu'on appelle interactions fortes « liaison covalente, liaison métallique... », les interactions beaucoup plus faibles sont « l'interaction de Van der Waals, la liaison Hydrogène ». À partir de là, on peut dire pour qu'un composé soit appelé fragile, il faut que l'énergie de certaines de ces liaisons soit plus faible que l'énergie fournie par le faisceau d'électrons. En conséquence, Il existe plusieurs types de matériaux fragiles, cela peut aller de la simple molécule organique ou de petites molécules liées par des interactions faibles, en passant par des organométalliques ou encore par des chaînes carbonées plus longues jusqu'à des systèmes hétérogènes semi ou auto-organisés formant des structures plus complexes avec une multitude d'interactions. Le premier effet des électrons sur ces dernières est de casser les liaisons les plus faibles en énergie, cette conséquence peut être immédiate dans certains cas et détériorer irréversiblement l'échantillon. Donc les liaisons chimiques confèrent à un matériau son organisation et une certaine capacité de résistance à l'irradiation. Plus il sera constitué par des interactions faibles plus il aura tendance à se détériorer sous

## fragiles

irradiation, la conservation de la structure dépend étroitement de l'énergie de ses liaisons donc de l'énergie fournie par les électrons (voir tableau 1).<sup>3</sup>

Liaison chimique	Énergie
<b>Liaison forte:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Liaison covalente</li> <li>- Liaison ionique</li> <li>- Liaison dans complexe</li> <li>- Liaison métallique</li> </ul>	<b>Énergie</b> <b>De 2 eV à 10 eV</b>
<b>Liaison faible:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Liaison Hydrogène</li> <li>- Van der Waals</li> </ul>	<b>&lt; 2 eV</b> <small>Force intermoléculaire &lt; Force intramoléculaire</small>

Tableau 1 : représentation d'un aperçu de la gamme d'énergie entre liaisons fortes et faibles.

Le rayonnement par le faisceau d'électrons est une forme d'énergie ionisante généralement caractérisée par ses taux de pénétration et de dose.<sup>1</sup> Les principaux processus qui se produisent pendant l'irradiation par des particules chargées sont les suivants : la diffusion élastique (l'énergie cinétique est conservée) et la diffusion inélastique (l'énergie cinétique est en partie ou totalement convertie en énergie interne). Dans le cas des matériaux fragiles l'effet de ces deux phénomènes peut être très nuisibles. Les électrons produisent un certain nombre d'effets lorsqu'ils traversent un échantillon, dans lequel la plus grande partie de l'énergie y est transférée. La quantité de cette énergie dépend de la composition chimique et de l'épaisseur du matériau étudié, de la tension d'accélération du faisceau incident et de la densité de courant dans le plan de l'échantillon. E. Cosslett (1978)<sup>7</sup> dans son article consacré aux dommages en haute résolution donne un exemple de transfert d'énergie dans le cas d'une membrane de carbone. Pour une tension de 60 kV chaque électron perd en moyenne environ 1 eV par nm traversé, ce qui représente une fraction non négligeable de l'énergie de liaison dans un composé organique.<sup>7</sup> Ces interactions peuvent être classées en fonction de la nature du processus physique impliqué. Les interactions primaires : i) interaction par excitation, soit d'un atome individuel, soit collectivement (« plasmon »), ii) ionisation d'un atome, iii) déplacement d'un atome. Soit par les effets secondaires : iv) émission d'électrons, v) émission de rayons X, vi) émission de lumière, vii) augmentation de la température, viii) charge électrostatique, ix) formation d'un revêtement carboné (« contamination »), x) brisure de liaison ou réticulation, xi) sublimation du matériel (perte de masse). On présente un résumé de ces effets dans le schéma ci-dessous figure 7.<sup>22</sup>



## fragiles

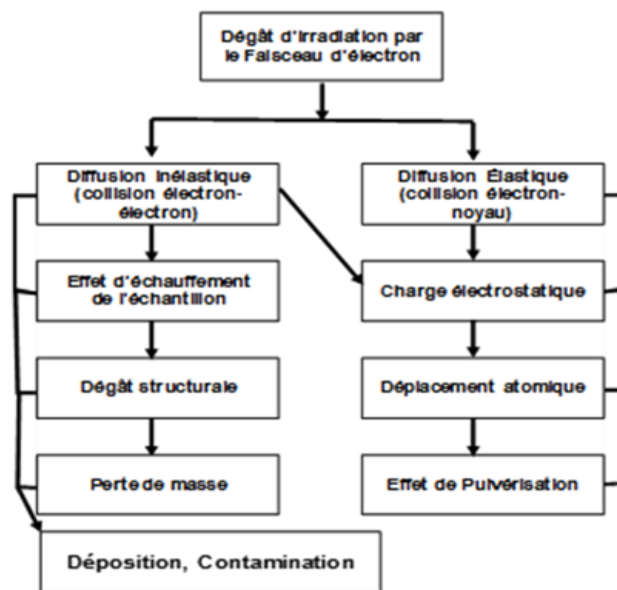


Figure 7 : classification de l'irradiation par le faisceau d'électrons en fonction du type de collision d'électrons ainsi que leur effet sur l'échantillon (Egerton)<sup>5</sup>.

La diffusion élastique donne accès à la diffraction des électrons et au contraste de phase dans les images TEM, mais dans certains cas, elle peut entraîner un déplacement atomique à la surface de l'échantillon. La diffusion inélastique donne naissance à l'émission de rayons X, utilisés pour l'analyse élémentaire EDS, et aux spectres de perte d'énergie électronique (EELS). Toutefois, la diffusion inélastique peut également produire des effets de radiolyse, qui modifient la structure d'un échantillon pouvant mener à une perte de masse du matériau. Dans certaines conditions de préparation de l'échantillon, il peut rester une fine couche organique en surface (résidus de carbone existant ou polluant de la grille). Ceci a pour conséquence lors de l'irradiation électronique de produire une contamination, ce qui obscurcit ou déforme l'image.

### I.2.1.1) Diffusion élastique :

Il est souvent admis que la collision élastique n'implique aucun changement d'énergie du faisceau transmis. Cependant, la conservation de l'énergie et de l'impulsion impose qu'un électron dévié d'un angle  $\theta$  dans le champ d'un seul noyau atomique (masse atomique  $A$ ) transfère une quantité d'énergie  $E$  (en eV) aux noyaux des éléments composant le matériau et qui est donnée par les équations suivantes :<sup>7</sup>

$$(1) E = E_{\max} \sin^2(\theta/2)$$

$$(2) E_{\max} = E_0(1,02 + E_0/10^6) / (465,7)$$

**fragiles****I.2.1.1.1) Déplacement atomique :**

Dans un TEM, l'angle de diffusion  $\theta$  est toujours très petit (inférieur à 10 mrad).<sup>6</sup> Par conséquent, le terme  $\sin^2$  dans Équation (1) assure que le transfert d'énergie est négligeable (inférieure à 1 eV). Cependant, pour un matériau fragile, la quantité d'énergie incidente suffisante pour le déplacement atomique est faible. C'est-à-dire qu'il suffit que l'énergie  $E$  soit supérieure à une certaine énergie de déplacement ( $E_d$ ), qui est fonction des propriétés intrinsèques et extrinsèques du matériau cible (force de liaison, interaction intra et intermoléculaire et masse atomique), pour déplacer les noyaux atomiques vers des positions interstitielles et ainsi dégrader la morphologie. Dans le cas d'un matériau cristallin, le déplacement se fait de sorte que les interstitiels s'agrègent pour former des boucles ou des amas de défauts, ce qui donne un contraste de diffraction caractéristique blanc sur noir.<sup>4</sup> Si  $E$  dépasse  $E_d$ , cela aura tout d'abord pour effet de perturber les liaisons et interactions de faibles énergies telles que les liaisons H et interactions de Van der Waals. Il peut y avoir à ce phénomène deux conséquences, soit  $E$  est juste supérieure à  $E_d$  et donc l'interaction est réversible c'est-à-dire que lorsqu'on supprime le faisceau d'électrons les liaisons et interactions entre les atomes des molécules se reforment ; soit  $E$  est supérieure à  $E_d$  alors le processus devient irréversible et une modification significative de morphologie peut apparaître. Dans ce dernier cas, si le temps d'exposition, même avec une énergie faible, dure suffisamment longtemps, ceci peut entraîner une mobilité atomique dans le matériau et ainsi endommager sa structure interne. Effectivement, l'énergie de transfert à l'échantillon est étroitement liée à la HT, donc plus la tension d'accélération est petite plus les effets de déplacement sont réduits. En outre, plus l'échantillon contient des éléments de masses molaires faibles ou moyennes, plus il est sensible. Comme ce type d'énergie n'affecte pas le transfert d'impulsion vers un noyau, l'abaissement de la température de l'échantillon ne peut pas être utilisé comme moyen de contrôle du processus de déplacement. Le seul moyen d'éviter les dommages de « déplacement » est d'utiliser une énergie incidente inférieure au seuil d'énergie pour le matériau en question. Si des énergies plus élevées doivent être utilisées alors la dose d'électrons doit être limitée au minimum juste suffisant pour enregistrer l'information.<sup>5</sup>

**I.2.1.1.2) Effet de pulvérisation :**

Un autre dommage est possible dans le cas de la diffusion élastique à grand angle si l'énergie  $E$  est supérieure à  $E_d$ . En effet, si ces conditions sont remplies, alors lors de la collision avec un atome se situant à la surface du matériau, celui-ci peut être libéré et ainsi quitter le matériau. Par analogie avec le déplacement des atomes de surface dû aux faisceaux d'ions, on appelle ce processus effet de pulvérisation cathodique.<sup>5</sup>



**fragiles**

L'énergie maximum de transfert,  $E_{\max}$ , est atteint pour un angle maximum  $\theta$  de  $180^\circ$ .<sup>9</sup> Plusieurs publications, en l'occurrence Medlin D.L. et al, parlent d'un cratère de pulvérisation cathodique se formant uniquement à la surface de sortie du faisceau, puisque le transfert d'impulsion est impliqué dans la direction incidente.<sup>10, 11</sup> Dans notre cas, étant à des conditions d'angle très petit, le problème de pulvérisation cathodique est très peu probable dans les collisions élastiques d'énergie inférieure à  $E_d$ .

**I.2.1.2) Collision Inélastique :**

Lorsqu'un électron du faisceau d'électrons interagit avec les électrons des atomes du matériau et perd une partie de son énergie, on parle de diffusion inélastique. En général, plus le transfert est important, plus l'angle de diffusion est important. La diffusion inélastique peut produire des effets de radiolyse, qui modifient la structure d'un échantillon ou/et enlèvent de la matière (perte de masse). Dans le cas de la présence de débris organique ambiants, l'excitation électronique provoque une contamination par formation d'hydrocarbure, ce qui obscurcit et déforme l'image.

**I.2.1.2.1) Effet de chauffage par faisceau d'électrons :**

Il faut savoir que la collision inélastique entre les électrons du faisceau incident et ceux des atomes du matériau étudié peut induire le transfert d'une quantité non négligeable d'énergie. La plus grande partie de cette énergie se retrouve sous forme de chaleur dans l'échantillon, ce qui a pour conséquence de donner lieu à une température locale  $T$  supérieure à la température  $T_0$  de l'environnement.<sup>5</sup>

Dans le cas de nos échantillons fragiles, il se produit en premier des dommages structuraux, puis rapidement une perte de masse. En effet, la sensibilité de l'échantillon aux collisions inélastiques dépend énormément de sa capacité de conduction. Un matériau, du même type que ceux qu'on étudie avec un facteur de conductivité thermique faible pour sa partie organique, sera plus susceptible de se dégrader thermiquement. Cette élévation de température est due à un transfert d'énergie lors de la collision inélastique, l'énergie cinétique est convertie en énergie thermique. Cette conversion produit un déplacement atomique, ce qui conduit à une perte de la cristallinité ou de masse. Pour nos matériaux, qui sont très sensibles aux rayonnements, la diffusion inélastique peut conduire à un état d'exciton où les lacunes peuvent s'agréger pour former des cavités et les ions déplacés peuvent se condenser pour créer des boucles de dislocation mais finiront par se diffuser vers la surface, entraînant une perte de masse.<sup>8</sup> Cependant, cette fois, l'effet peut être réduit en refroidissant l'échantillon.<sup>17</sup>

## fragiles

## I.2.1.2.2) Radiolyse :

La plupart des matériaux fragiles étudiés ici contiennent à la fois des liaisons covalentes et des liaisons faibles (Van der Waals). Cela a pour conséquence, lors de la désexcitation subséquente, de ne pas ramener le matériau à son état électronique initial. En d'autres termes, les liaisons chimiques sont brisées et le spécimen change de forme et ses composants de position. Par exemple, sur les cristaux moléculaires une perte de cristallinité a été observée par diffraction des électrons.<sup>18</sup> Le changement de configuration électronique d'une molécule provoque également une perte de structure fine observable dans un spectre de perte d'énergie des électrons, tandis que la rupture des liaisons entraîne une perte de masse (fuite d'atomes légers, en particulier l'hydrogène, l'azote et l'oxygène).

Materiau	E <sub>0</sub> (keV)	D <sub>c</sub> (C/cm <sup>2</sup> )
Glycine	60	0.0015
C <sub>26</sub> paraffine	60	0.004
Polyéthylène	100	0.01
Anthracène	60	0.07
Phthalocyanine (Pc)	60	0.1
Cu-phthalocyanine (Cu-Pc)	60	1.5
Cl <sub>16</sub> Cu-phthalocyanine	100	30

Tableau 2 : representation des doses critiques de destruction du cliché de diffraction électronique de différents matériaux (Reimer 1975).<sup>19</sup>

Une dose d'électrons critique peut être définie pour chaque processus. Dans la littérature le terme de « dose d'électrons » désigne généralement l'exposition critique aux électrons et il est souvent exprimé en C/cm<sup>2</sup> ou en e<sup>-</sup>/nm<sup>2</sup>.s (on peut facilement convertir sachant que 1C = 6,25.10<sup>-18</sup> e<sup>-</sup>), c'est la densité de courant incident par unité de surface de l'échantillon irradié. Le tableau 2 présente un tableau avec les doses d'électrons critiques pour certains matériaux organiques, on remarque une large variation de la dose critique entre ces derniers. Elle est beaucoup plus élevée pour les composés aromatiques que pour les composés aliphatiques.<sup>19</sup>

**fragiles**

La résistance au rayonnement des composés aromatiques est attribuée à la présence de cycles dans leur structure, en effet l'énergie de résonance élevée des électrons  $\pi$  permet à l'énergie déposée par diffusion inélastique d'être partagée par de nombreux électrons sans rupture de liaison. De plus, la dose nécessaire pour la perte de masse et le changement de composition dans la matière organique est habituellement plus grande que celle requise pour détruire la structure à une échelle fine (cristallinité ou organisation).<sup>20</sup> Par exemple dans les cristaux moléculaires, dont la taille de chaque molécule est équivalente à celle de la cellule unitaire, lorsqu'il se produit une distorsion moléculaire (due à une rupture de liaison limitée, éventuellement accompagnée de perte d'hydrogène) les intensités de diffraction peuvent être affectées. Plus l'irradiation est importante, plus la perte d'éléments s'étendra à d'autres. Dans la publication de Clark et al,<sup>21</sup> il est mis en évidence « l'effet de cage ». C'est-à-dire lors de la libération d'atomes H due au processus d'endommagement par rayonnement, les molécules environnantes fournissent un « effet de cage » qui empêche le déplacement des atomes de plus grands en taille.

La dose d'électrons, exprimée par  $D_e$ , peut être calculée à partir des conditions expérimentales et des caractéristiques du microscope. À partir de cette donnée on peut également définir la sensibilité aux rayonnements par une section efficace d'endommagement :  $\sigma_d = e / D_e$ ; où  $e$  est la charge électronique. Ce paramètre permet de comparer la résistance des matériaux entre eux et d'estimer la dose critique qu'il ne faut pas dépasser pour garder le spécimen dans un état proche de celui initial. Dans le chapitre sur la microscopie environnementale en milieu liquide, on verra que la dose d'électrons n'aura pas exactement la même définition que précédemment, elle dépendra d'autres paramètres tels que le temps d'exposition ou encore la taille de l'image. La maîtrise de celle-ci en microscopie environnementale est essentielle et son utilisation dans de bonnes conditions permet d'étudier certains phénomènes tout en contrôlant leurs évolutions.

### I.2.2) Comment protéger ou minimiser l'influence des électrons et du vide sur un matériau fragile ?

Lorsqu'on étudie les matériaux fragiles, sensibles au faisceau d'électrons et au vide, par microscopie électronique nous devons travailler dans des conditions permettant de conserver la morphologie et la structure des échantillons. Pour ce faire, de nombreuses techniques et développements ont été réalisés depuis l'existence du MET. En effet, l'étude dans un microscope électronique en transmission d'objets sensibles aux électrons paraissait à l'origine impossible. Cette barrière a été franchie grâce au travail acharné de certains pionniers dont des biologistes, en relation étroite avec les physiciens. Peu de temps après la démonstration expérimentale de la faisabilité d'un microscope électronique par Ernst Ruska, pour lequel il a reçu le prix Nobel de physique en 1986,<sup>23</sup> L. Marton a publié

**fragiles**

un article<sup>24</sup> dans le domaine de la biologie ou il parle de la destruction des matériaux organiques par le bombardement électronique. Cependant, Il ne s'est pas arrêté à ce constat mais a proposé plusieurs solutions pour prévenir d'une telle destruction. Marton était vraiment visionnaire car il a proposé l'utilisation du refroidissement et ainsi qu'une approche similaire à la coloration négative (augmentation du contraste par marquage spécifique de certaines molécules à l'aide de atomes de métaux lourds). Un autre problème majeur était de savoir comment conserver l'eau dans les échantillons biologiques à l'intérieur de la colonne du MET maintenue sous vide.

Pour de tels échantillons fragiles ou biologiques, le nombre de défis à affronter était encore important à l'époque de Marton. Prenons le problème du contraste, un matériau organique non dégradé présente une image avec un contraste très faible car la plupart des électrons de haute énergie passent directement à travers l'échantillon. S'ajoute le souci de la dose d'électrons qui doit être maintenue suffisamment basse pour éviter tout dommage. Ou encore la difficulté de l'épaisseur, pour que la probabilité de multiplier les événements de diffusion d'électrons soit négligeable à l'énergie électronique utilisée, il faut impérativement que les échantillons soient minces, idéalement comprenant une seule couche de particules d'intérêt. De plus, les objets étudiés se déplacent souvent à la fois en interaction avec les électrons et en raison des instabilités dû à l'échauffement local ; le mouvement réduit le contenu de l'information, en particulier lors de l'utilisation de films ou de détecteurs lents pour enregistrer des images. En conséquence, jusqu'à récemment, la résolution était généralement limitée à quelques nanomètres pour les molécules biologiques. La nécessité de travailler avec des dose d'électrons de plus faible intensité pour étudier des échantillons à faible contraste et sensible a stimulé le développement de nouvelles techniques de préparation et de nouvelles méthodes d'acquisition. La première méthode utilisée couramment et avec succès a été la coloration négative, elle a été établie dans les années 1940 et affinée au cours des 20 années suivantes.<sup>25-27</sup> Puis, toute une discussion a été menée sur les techniques nécessaires pour préserver les biomolécules à l'état hydraté dans le microscope électronique ainsi que des études pour déterminer les conditions d'une irradiation non destructive. C'est dans ce sens que Donald Parsons a développé une chambre environnementale dans laquelle il était possible de maintenir une atmosphère humide à température ambiante dans un microscope électronique.<sup>28-29</sup> En utilisant cette approche, il a démontré la diffraction d'électrons des cristaux de l'enzyme Catalase et il a prouvé par la même occasion qu'il était possible de trouver des conditions dans lesquelles la structure de la protéine reste intacte pendant l'interaction avec le faisceau d'électrons. Ensuite, un travail sur la quantification des dégâts d'irradiation induit par les électrons a été effectué par Robert Glaeser sur la catalase ainsi que sur des molécules organiques à courte chaîne.<sup>30</sup> La conclusion de ces études et spécialement sur les échantillons non colorés,<sup>31</sup> réalisés au début des années 1970, est qu'il faut veiller à maintenir une faible dose d'électrons (low-dose) afin de minimiser les dommages dus surtout à la diffusion inélastique des électrons. Dans

**fragiles**

cette technique de travail en « low dose » il y a un problème de contraste ; pour augmenter celui-ci, Glaeser et d'autres ont développé une méthode qui consiste à prendre une série d'images sur un ensemble d'objet identique et ensuite de réaliser une moyenne afin d'augmenter le rapport signal sur bruit. En d'autres termes, le rayonnement électronique serait reparti sur plusieurs copies du même objet.<sup>30,32,33</sup>

Pour s'affranchir des problèmes de glace d'eau, dans les années 1970, Henderson et Nigel Unwin ont mis en place un nouveau protocole de préparation qui permet de remplacer l'eau par une solution de glucose pour conserver les échantillons intacts dans le vide.<sup>34</sup> Puis, une étude sur l'analyse des dommages causés par les électrons a été systématiquement menée pour chaque échantillon et l'intensité des électrons a été ajustée à un faible niveau de  $\sim 100 \text{ e/nm}^2$  pour minimiser les effets du rayonnement électronique. En même temps que ces développements, toute une réflexion autour du refroidissement a été menée pour protéger les matériaux biologiques et ainsi les garder intacts dans leur milieu naturel. Dans cette partie on présente les différentes techniques d'observation ainsi que les préparations spécifiques aux matériaux fragiles que nous avons étudiés.

### **I.2.2.1) Cryo-microscopie : microscopie électronique à froid en mode congélation**

L'hypothèse que le refroidissement de l'échantillon réduisait l'évaporation de l'eau sous vide et permettait en même temps la protection du matériel biologique ou organique allait bientôt être confirmée. À partir des années 1950, Humberto Fernández-Morán a exploré les possibilités de congélation d'échantillons et de préparation de coupes minces par Cryo-sections pour des études utilisant le Cryo-EM.<sup>35</sup> Cependant, lors de la congélation, l'eau se transforme en cristaux, ce qui a pour conséquence de diffracter fortement les électrons, effaçant ainsi efficacement les signaux provenant de l'échantillon. De plus, la formation de cristaux de glace peut modifier la structure de l'échantillon. La solution pour éviter cette cristallisation est de refroidir très rapidement le matériel fragile ou hydraté. D'autres techniques ont été introduites pour empêcher la formation de glace cristalline en utilisant du saccharose ou du glycérol comme cryo-protecteurs.<sup>36,37</sup> La méthode que nous avons utilisée pour réaliser des observations en Cryo-EM était celle de la congélation rapide dans de l'éthane liquide. En effet, en 1981 Dubochet et Alasdair McDowell ont présenté une méthode permettant la formation d'un film d'eau solide non cristalline sur une grille d'échantillons pour l'observation au microscope électronique en transmission. De l'eau a été pulvérisée sur un film de carbone monté sur une grille, puis la grille a été rapidement immergée dans de l'éthane liquide ou du propane à environ  $-190^\circ\text{C}$ , maintenue par refroidissement dans de l'azote liquide.<sup>38</sup> Cette technique a permis

## fragiles

l'observation, sans destruction, d'assemblage moléculaires, des matériaux hybrides et des matériaux hydratés.

### I.2.2.1.1) Méthode de la vitrification développée au laboratoire :

Étant plutôt un laboratoire des sciences des matériaux, avec une expertise en cours d'acquisition dans la préparation d'échantillons biologique et fragiles, nous adaptons les techniques utilisées par les biologistes et nous développons d'autres protocoles pour préparer nos matériaux avec leurs spécificités.

#### I.2.2.1.1.1) Préparation de grille avec membrane de carbone *sur mesure* pour la Cryo-EM : Vitrification

On dépose une goutte de la solution contenant l'échantillon dispersé sur une grille de cuivre avec une fine couche de carbone de 5nm d'épaisseur avec des trous bien espacés traitée préalablement pour la rendre hydrophile. Un protocole de préparation de ces membranes que nous avons développé est présenté dans la figure 8.

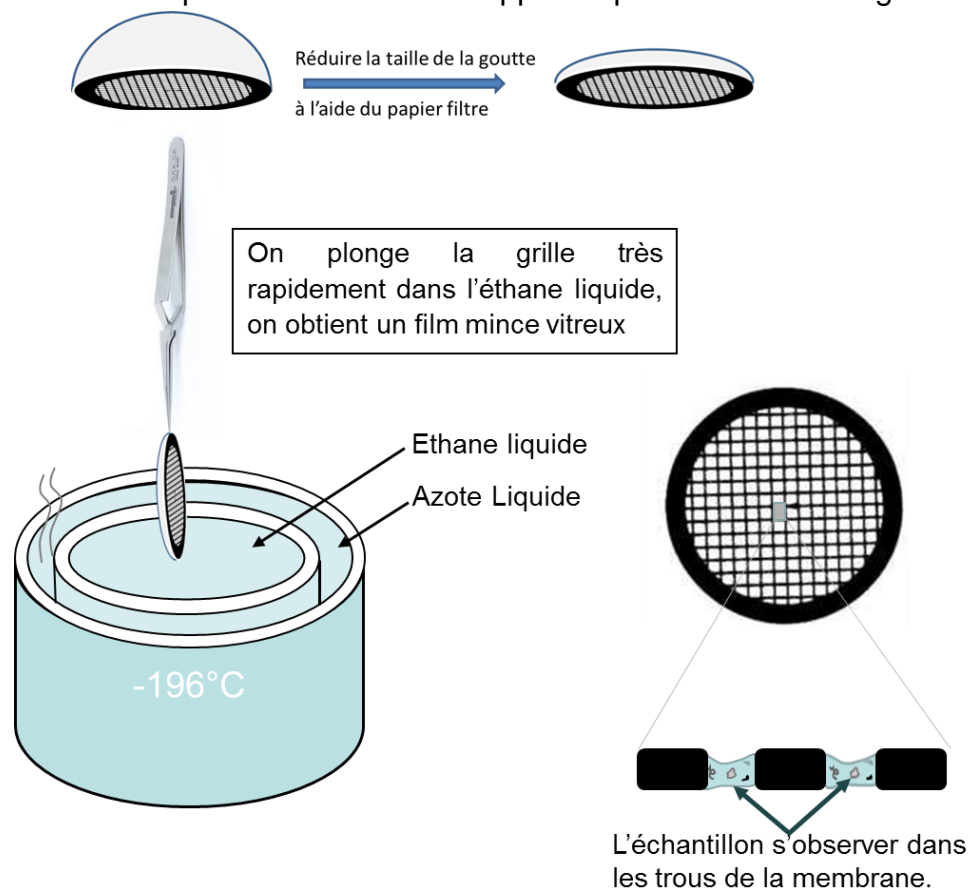


Figure 8 : protocole pour vitrifier l'échantillon dans l'éthane liquide



**fragiles**

La taille de la goutte suspendue à la grille est réduite par aspiration jusqu'à obtenir une très fine couche (inférieure au micromètre). Ensuite, la grille est plongée très rapidement dans l'éthane liquide, obtenu par refroidissement de l'éthane gazeux par l'azote liquide ( $-190^{\circ}\text{C}$ ), ceci a pour effet de rendre amorphe la glace et de protéger l'échantillon contre les dégâts provoqués lors de son insertion sous vide du microscope (figure 8). Cependant, la structure amorphe de l'eau peut être convertie en une forme cristalline si on réchauffe aux environs de  $-140^{\circ}\text{C}$ . Il faut noter que la glace vitreuse peut être maintenue autour de l'échantillon pendant des périodes prolongées si la température reste en dessous de  $-160^{\circ}\text{C}$ .<sup>39,40</sup>

### **I.2.3) Microscopie environnementale : observation en mode in-situ liquide.**

La microscopie environnementale permet également d'observer des échantillons fragiles sensibles à la déshydratation par exemple due au pompage lors de la réalisation du vide dans la chambre d'introduction (SAS) lors de l'insertion de l'échantillon dans le MET. C'est-à-dire que les analyses s'effectuent dans le milieu où se trouve le matériau donc on peut préserver la morphologie ainsi que l'organisation interne de celui-ci. Cependant, il peut exister également certaines contraintes telles que la formation de radicaux lors de l'interaction des électrons avec le milieu ou encore une montée de la température qui peuvent avoir un impact sur la structure de l'échantillon si certaines précautions ne sont pas prises telle que la maîtrise de la dose d'électrons ou encore veiller à ce que l'échantillon reste hydraté. Ce mode permet également de mettre en évidence le comportement dynamique du matériau, comme on le verra plus en détail dans le chapitre 5.

### **I.3) Techniques de préparations :**

Certains de nos matériaux, ne sont pas seulement sensibles aux électrons, ils présentent également une organisation macroscopique très fragile, comme par exemple les cristaux moléculaires. Une préparation classique a pour conséquence la destruction de cette structure. Pour réussir à mettre en évidence certaines relations et propriétés de ces matériaux, nous avons développé pour chaque échantillon une préparation spécifique. Ci-dessous nous présentons les différentes techniques utilisées qui ont été adaptées et développées selon les spécificités des études réalisées.

### I.3.1) Préparation de sections ultrafine : Ultramicrotome

La technique de coupe par ultramicrotomie est couramment utilisée pour réaliser des sections de différents types de matériaux. Le premier prototype de précision fut construit en 1950 à l'Université de Genève par D. Danon et E. Kellenberge, qui ont réalisé une coupe de 40 nm d'épaisseur.<sup>41,42</sup> Aujourd'hui, avec les ultramicrotomes de dernière génération, nous sommes capables de réaliser des coupes ultrafines de 20 à 100 nm d'épaisseur en utilisant des couteaux en diamant. Cependant préalablement à la réalisation des sections minces, il y a l'étape indispensable de la préparation du bloc de résine dur et manipulable d'un échantillon de petite taille.

#### I.3.1.1) La résine d'enrobage et préparation du bloc :

L'inclusion est une étape importante dans la réalisation de sections fines par la technique de l'ultramicrotomie de matériaux dispersés ou même de couches minces. Elle permet d'une part, de maintenir la cohésion d'un matériau multiphasé, et, d'autre part, d'obtenir un bloc compact d'un échantillon dispersé qu'on souhaite étudier. De plus l'enrobage protège les surfaces fragiles du matériau. Cette technique permet de choisir une orientation préférentielle du plan de coupe grâce au positionnement de l'échantillon à l'intérieur du bloc (coupe transverse ou plane- longitudinale). Par ailleurs, le choix de la résine est important car elle doit respecter certains critères comme avoir une dureté proche de celle de l'échantillon, avoir une forte interaction avec la surface de celui-ci ou encore être inoffensif pour le matériau. Il existe un grand nombre de types de résines, les plus utilisées sont des époxy qui sont apolaires et peuvent polymériser à température ambiante ou à relativement basse température (50°C à 120°C). Les résines acryliques sont le plus souvent polaires et polymérisables aux UV à température ambiante ou à froid (+4°C). Le choix de la résine dépend des propriétés du matériau et de la technique de préparation choisie. Nous avons développé au laboratoire la synthèse de résines époxy avec différentes duretés (tableau 3).



## fragiles

Mélange de base	- Araldyte 50% - DDSA (Dodeceny Succinique Anhydride) 50%			- Epon 55% - NMA (Nadic methyl anhydride) 45%		- Epon 50% - NMA 25% - DDSA 25%	
Accélérateurs et Durcisseurs (par rapport au total du mélange)	BDMA (Benzyldiméthylamine)			BMP 30 (2,4,6-Tris(diméthylaminométhyl)phénol)		BDMA	
	2%	3%	4%	1,5%	2%	2%	3%
Dureté (échelle de Mohs)	3	4	5	5,5	6	6,5	7
Viscosité	+++	++-	++-	++-	+--	+--	---

Tableau 3 : recettes pour fabriquer des résines à différentes duretés et viscosités.

Dans le tableau 3, nous présentons différentes « recettes » pour élaborer des résines avec différentes dureté et viscosités selon les caractéristiques du matériau que nous voulons enrober. Exemple pour un matériau avec une dureté moyenne (entre 3 et 5) nous utilisons le mélange avec l'Araldite avec 3% de BDMA du volume total du mélange. Nous pouvons augmenter la viscosité et réduire la dureté des autres mélanges en ajoutant entre 5% et 10% de dibutyle phtalate. Une fois la résine voulue obtenue nous procédons à l'encapsulation (voir figure 9).

### Préparation par la technique du sandwich

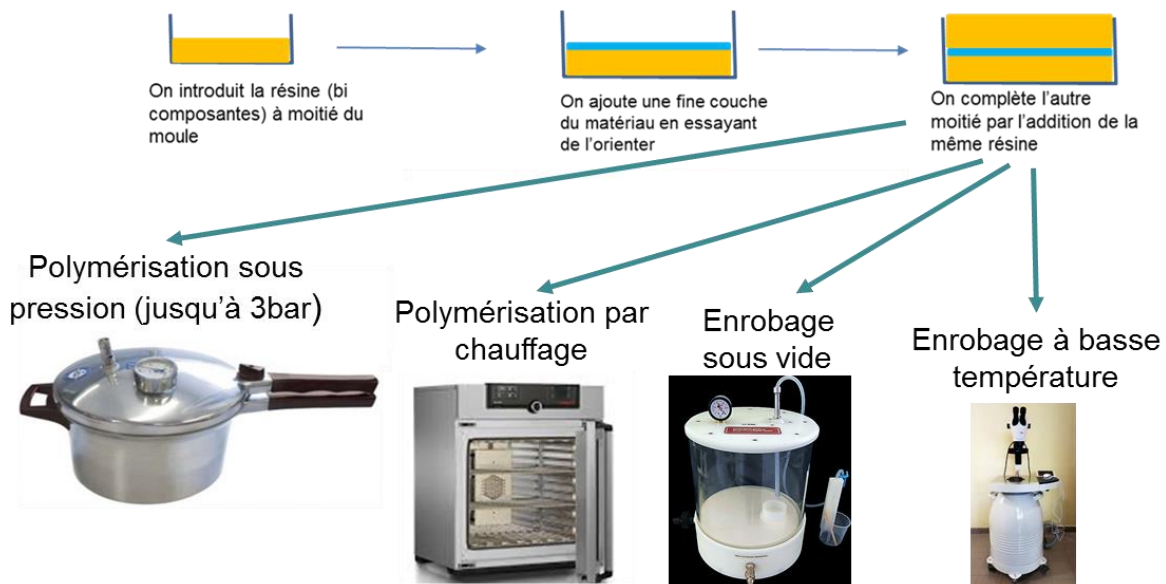


Figure 9 : Préparation du bloc de résine avec le matériau par la technique du sandwich

Dans la figure 9 ci-dessus, on présente les différentes conditions d'enrobage. En effet, la technique se pratique directement sur l'échantillon propre et sec. Cela consiste à placer l'échantillon de petite taille, de 0,1 à 1mm<sup>3</sup> selon le matériau, dans un moule ou une gélule que l'on remplit d'une solution de résine liquide. Dans la technique du sandwich nous remplissons la moitié du moule avec de la résine, après

## fragiles

polymérisation de cette dernière nous déposons la poudre à sa surface et nous remplissons l'autre moitié avec la même résine. Ensuite, pour l'enrobage plusieurs méthodes sont possibles. En effet, le choix de la résine dépend des caractéristiques physiques du matériau tel que sa dureté, sa structure interne (poreux ou non) et de sa réactivité. Il est très important que la dureté de la résine soit la plus proche possible de celle du matériau pour présenter le même comportement mécanique lors de la coupe et ainsi éviter la formation d'artefacts dus à la différence de dureté. Par exemple, pour les matériaux présentant de la microporosité on prendra une résine avec une viscosité faible, proche de celle de l'eau, et pour la faire pénétrer dans les pores nous utilisons soit l'enrobage sous vide pour obtenir une bonne adhérence résine-échantillon ou soit la technique sous pression pour réussir à faire pénétrer la résine à l'intérieur du matériau. Pour concentrer les matériaux lorsque nous utilisons des gélules, une centrifugation est parfois nécessaire.

Une fois le bloc obtenu nous procédons à la préparation d'une pyramide tronquée contenant l'échantillon. Dans une première étape on réalise à la lame de rasoir une pyramide tronquée avec comme sommet un trapèze (voir figure 10).

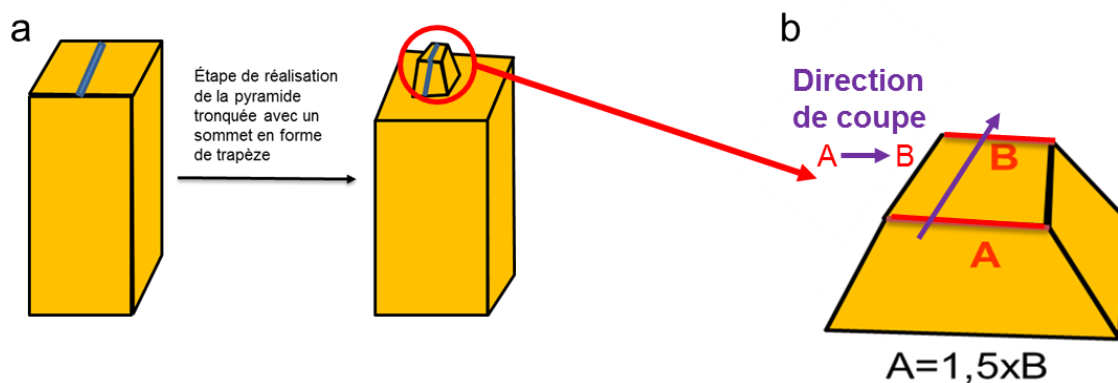


Figure 10 : Préparation de la pyramide tronquée à l'aide d'un rasoir. (b) Vue du sommet de la pyramide tronquée ; direction de coupe de l'arrête A vers l'arrête B plus petite.

Cette forme trapézoïdale est constituée d'une première arrête (A) rencontrée par le couteau large de 300  $\mu\text{m}$  et se termine par une arrête (B) de 200  $\mu\text{m}$ . L'intérêt de cette forme est de permettre en cours de coupe une diminution de la section ce qui a pour conséquence d'abaisser progressivement la force nécessaire pour la réaliser. Cette démarche permet de diminuer les artefacts sur les coupes (voir figure 10).

Une fois la pyramide obtenue, nous passons à l'étape de découpe. Pour chaque échantillon nous devons réaliser plusieurs tests pour trouver les conditions optimales de coupe (vitesse de coupe, épaisseur des sections, orientation) et ainsi obtenir des sections homogènes sans artefacts.

## fragiles

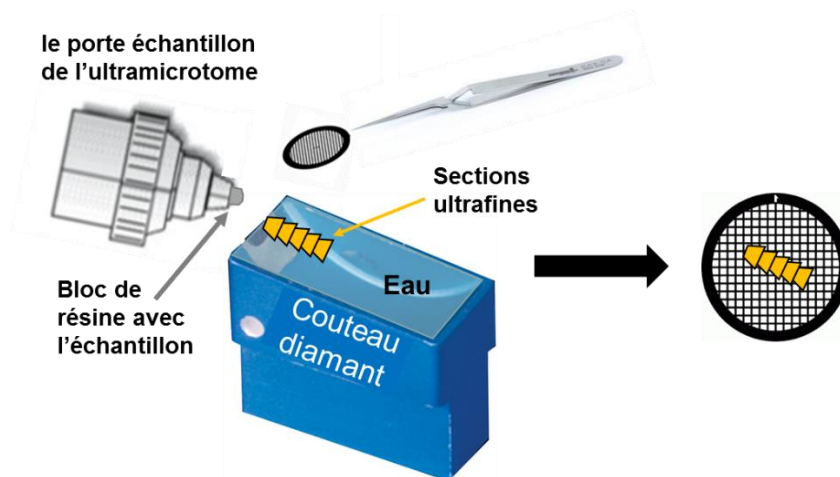


Figure 11 : réalisation des sections et récupération sur une grille avec membrane de carbone.

La lame qui effectue les coupes sur la pyramide est constituée de diamant qui est le matériau le plus dur sur Terre. Sur la figure 12, on présente les différents couteaux diamants utilisés dans nos préparations. Une fois obtenues, les coupes glissent sur la lame et se déposent à la surface du liquide contenue dans la coupelle de récupération ou elles sont maintenues en surface par la tension superficielle.

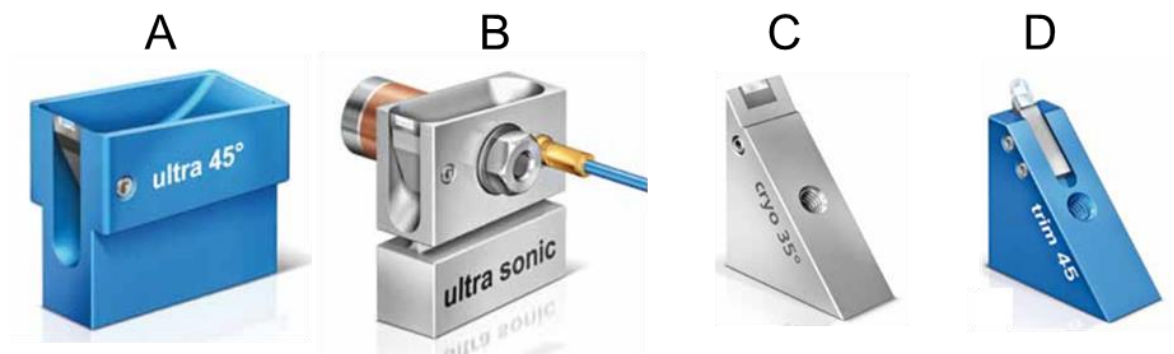


Figure 12 : représentations schématique des différents couteaux diamant utilisés pour réaliser les sections ultrafines. (A) couteau diamant standard de 2mm de large et un angle de 45° avec cuve, (B) couteau ultra sonic vibrant, (C) cryo-couteau pour couper à froid et (D) cryo-trimer pour la préparation de la pyramide à froid.

L'étape suivante est la récupération manuelle des coupes qui sont regroupées et orientées à l'aide d'un cil à la surface du liquide de la coupelle. Cette récupération se fait par contact avec la face « brillante » d'une grille MET tenue dans une pince brucelle (voir figure 11).

### I.3.2) Coupe à froid : Cryo-Ultramicrotomie

**fragiles**

L'ultramicrotomie à froid, appelé couramment Cryo-Ultramicrotomie permet l'obtention d'une lame mince d'épaisseur constante (de 30 à 150 nm) à partir de matériaux très mous ne pouvant être coupés à température ambiante. Elle a été mise au point par les biologistes et son utilisation s'étend aujourd'hui aux polymères et nous l'avons adaptée pour les matériaux hybrides et friables. Elle est basée sur la découpe d'un échantillon refroidi par le tranchant d'un couteau de diamant, également refroidi. Afin de durcir le matériau, il est refroidit jusqu'à une température proche de sa température de transition  $T_g$  (transition vitreuse), si celle-ci est connue. Les techniques de coupe à froid que nous avons utilisé, en fonction des spécificités de matériaux étudiés, ont été : i) la technique « à la membrane », méthode qui est développée spécifiquement pour les cristaux moléculaires, son développement et sa mise en place sont détaillés dans le chapitre 3, ii) la technique au diméthylsulfoxyde (DMSO) qui permet de réaliser des coupes jusqu'à  $-40^{\circ}\text{C}$  tout en gardant le solvant dans la cuve du couteau à l'état liquide, iii) la méthode Tokuyasu, dans laquelle les coupes se font à  $-160^{\circ}\text{C}$  et elles sont récupérées à l'aide d'une solution de sucre et iv) la technique CEMOVIS qui permet de couper des sections à la température de l'azote liquide ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) où, les coupes sont maintenues en lévitation à l'aide d'un champ électrostatique et puis on vient avec une grille à membrane de carbone pour les récupérer. Nous présentons ces trois dernières méthodes et le contexte dans le quelle nous les avons utilisées.

**I.3.2.1) La technique au diméthylsulfoxyde (DMSO)**

La méthode avec le DMSO permet de conjuguer l'avantage de la réalisation d'une coupe dans les conditions standard et la réalisation de celle-ci à basse température. En effet, nous utilisons le couteau standard (figure 12A) remplie d'une solution de 40% de DMSO dans l'eau distillée. Cette solution reste liquide jusqu'à une température de  $-40^{\circ}\text{C}$ . Selon le matériau et ses caractéristiques physiques (mou à température ambiante, sa  $T_g$ ) nous adaptons les températures de l'échantillon et du couteau. L'échantillon est directement refroidi à la température voulue dans l'enceinte du cryo-ultramicrotome qui contrôle la température grâce à un système qui utilise l'azote liquide pour refroidir et des résistances pour chauffer. Une fois la pyramide réalisée grâce au cryo-trimer (figure 11D), nous procédons à la coupe des sections et, selon le comportement de l'échantillon, nous adaptons les conditions de coupe (vitesse, angle, température) pour obtenir des sections sans artefacts. Les sections obtenues flottent en surface de la solution grâce aux tensions superficielles des molécules de surface et sont récupérées comme décrite dans la figure 11. Nous avons utilisé cette méthode dans certaines de nos études qui ont porté sur la caractérisation de matériaux mous (polymères) à température ambiante, donc impossible à caractériser par MET directement sans préparation préalable. Par exemple, nous avons étudié la distribution de nanoparticules de magnétites dans un

## fragiles

polymère, le polypropylène (avec une  $T_g$  de  $-13^{\circ}\text{C}$ ), selon plusieurs protocoles d'inclusion.<sup>46</sup> Pour réaliser cette étude, nous avons coupé des lames minces de 50 nm à  $-30^{\circ}\text{C}$  en utilisant la technique de DMSO. Les résultats ont permis de mettre en évidence la méthode d'inclusion de nanoparticules dans le polymère qui a donné la meilleure distribution et qui empêchait la formation d'agrégat de magnétites. Les avantages du DMSO dilué dans l'eau sont la possibilité de réaliser des coupes à froid jusqu'à  $-40^{\circ}\text{C}$  et d'être facilement éliminé par nettoyage grâce à sa grande solubilité dans l'eau ce qui permet d'éviter les phénomènes de contamination lors de l'observation des coupes.

## I.3.2.2) La méthode CEMOVIS

Cette technique a été développée par Jacques Dubochet et ses collègues et elle est connue sous le nom de cryo-EM de sections vitrifiées (CEMOVIS).<sup>40</sup> Cette technique de coupe est souvent associée à un refroidissement rapide de l'échantillon pour éviter la formation de cristaux de glace. Elle est surtout utilisée pour les matériaux biologiques, comme des cellules ou des bactéries, qui peuvent être observées par cryo-ME sous forme de sections ultrafines congelées hydratées. Les échantillons sont dans un premier temps cryo-fixés généralement par congélation sous haute pression, puis coupés en sections minces (entre 40 à 150 nm d'épaisseur) à l'aide d'un cryo-ultramicrotome. Dans notre cas, nous l'utilisons, après adaptation, selon l'échantillon étudié pour obtenir des sections fines qui sont très difficiles à obtenir autrement.

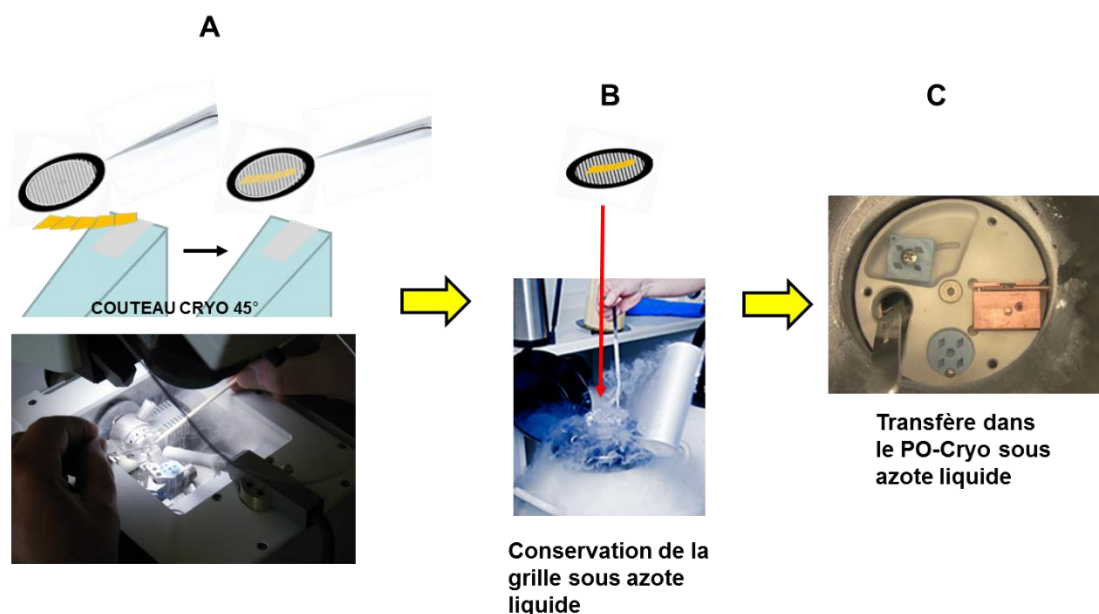


Figure 13 : (A) réalisation de coupes maintenues en lévitation par un champ électrostatique, et récupération à l'aide d'une grille de MET avec membrane de carbone perforée, (B) conservation de la

## fragiles

*grille dans un Dewar contenant de l'azote liquide et (C) transfert sous azote liquide dans le porte-objet froid pour la cryo-EM.*

Par exemple, nous l'avons utilisée pour réaliser des coupes de 70 nm d'un cristal de moléculaire de fer et ruthénium pour mettre en évidence l'interface entre ces deux cristaux. En effet, ce matériau étant très sensible aux solvants, nous n'avons pas réussi à réaliser des coupes dans les conditions standards et ni avec la méthode au DMSO. Donc nous utilisons la méthode CEMOVIS, d'abord nous congelons rapidement ce cristal (1 mm<sup>2</sup>), et puis nous le fixons sur le porte-objet cryogénique du microtome dans la chambre du cryo-ultramicrotome préalablement refroidit à la température de l'azote (-196°C). Puis, le bloc est taillé directement en place, grâce au cryo-trimer (figure 11D). Pendant la réalisation des sections, celles-ci restent en lévitation grâce à un champ électrostatique par l'action d'un accessoire prévu à cet effet. L'étape finale de dépôt des sections sur la membrane de la grille consiste à utiliser une pince avec une grille MET que nous rapprochons des coupes qui viennent s'aplatir sur la grille après l'arrêt du champ électrostatique (voir figure 13). La grille avec les coupes est conservée dans un Dewar contenant de l'azote liquide. Enfin on réalise le transfert sous azote liquide dans le porte-objet cryogénique pour réaliser l'analyse en cryo-EM, voir figure 13.

### I.3.2.3) La méthode Tokuyasu

Cette méthode, comme son nom l'indique, a été développée par Tokuyasu.<sup>47</sup> Elle permet de congeler rapidement à très basse température des échantillons biologiques. Elle s'applique pour des localisations fines de molécules (protéines ou acides nucléiques) au sein d'un tissu ou des cellules à l'échelle nanométrique. La partie la plus intéressante pour nos préparations a été l'utilisation d'une solution sucrée saturée, dénommée « sucrose » dans la littérature, pour récupérer les sections, car cette solution a un temps de congélation relativement lent en fonction de la température, à titre d'exemple 2 secondes à -140°C.<sup>48</sup> La solution saturée de saccharose a été obtenue avec une concentration de 2,3 M dans l'eau distillée.



## fragiles

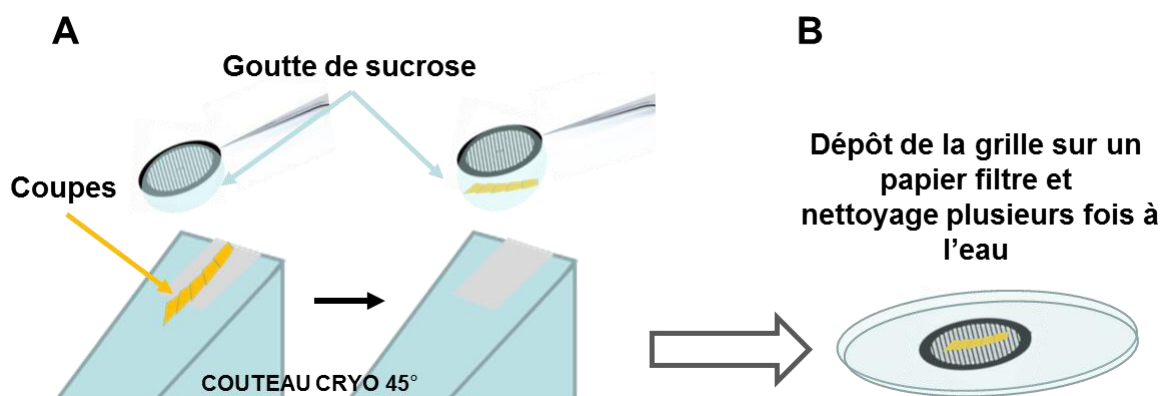


Figure 14 : (A) étapes de récupération de coupe ultrafine à l'aide de la goutte de sucre et (B) nettoyage de la grille avec les coupes plusieurs fois à l'eau distillée pour dissoudre le saccharose.

Donc cette méthode ne nécessite pas l'utilisation d'un champ électrostatique pour garder les sections en lévitation (CEMOVIS) et cela a pour conséquence de réduire les difficultés de récupération des coupes. En effet, les sections glissent le long du couteau diamant et sont récupérées à l'aide d'une goutte de sucre suspendu à une grille de MET, comme décrit dans la figure 13. L'intervalle de températures de travail pour nos études est beaucoup plus large de  $-40^{\circ}\text{C}$  à  $-140^{\circ}\text{C}$  alors qu'il est, pour les échantillons biologiques, que de  $-110^{\circ}\text{C}$  à  $-140^{\circ}$ . Cependant, il n'est pas possible de travailler dans tous les cas à la température de l'azote car l'utilisation du sucre pour récupérer les sections ne serait plus possible, sa congélation étant presque immédiate. À  $-140^{\circ}\text{C}$ , cette solution met environ 2 secondes pour durcir, donc lors de la récupération des sections nous devons être très rapide. Nous utilisons beaucoup cette technique pour réaliser des sections ultrafines (entre 50 et 90 nm d'épaisseur). Elle nous permet d'obtenir des sections ultrafines, sans artefacts et sans endommager le matériau.

Dans la figure 14, nous présentons les différentes étapes de préparation. La première étape est commune à celle de la méthode CEMOVIS, nous congelons rapidement l'échantillon dans l'azote liquide. Nous fixons l'échantillon dans le bras du cryo-ultramicrotome et puis nous réglons la température de coupe. Les sections glissent le long de la paroi du couteau à chaque nouvelle coupe. Puis les sections sont rapidement collectées à l'aide d'une goutte de sucre sur la grille de MET par l'attraction due à la tension de surface de la goutte. Ensuite cette grille est ramenée à température ambiante et déposée sur un papier filtre. La dernière étape de préparation est le lavage à l'eau pour éliminer le saccharose. Enfin, nous pouvons soit l'observer directement en MET standard, soit passer par l'étape de vitrification et réaliser les analyses par Cryo-EM pour les échantillons sensibles aux électrons.

## fragiles

## I.3.3) Protocole pour la préparation de films de carbone perforés avec une distribution de taille de trou prédéfinie :

Pour l'observation d'une poudre ou de sections fines au MET il est nécessaire d'utiliser un support. Pour ce faire nous utilisons des grilles (Cu, Ni, Au, Pd, Mo...) avec une membrane de carbone continue ou trouée. L'utilisation du carbone seul a plusieurs avantages, il est très résistant, ne contamine pas, il est bon conducteur des électrons et transparent à ces derniers. Nous avons décidé de fabriquer nos propres grilles carbonées pour disposer de membranes de qualité et propres, avec une distribution de taille de trou homogène et adaptable à l'application que nous souhaitons. Par exemple pour l'observation de nanotubes de carbone ou des aiguilles d'hydroxyapatite, nous favorisons la fabrication de membrane avec de grands trous appelés lacets de carbone. En revanche, pour des études de haute résolution sur des nanoparticules de taille inférieure à 10 nm, nous préférons utiliser des membranes ultrafines d'environ 2 nm d'épaisseur avec de petits trous. Nous avons donc développé un protocole de fabrication de membrane de carbone avec une distribution de trous homogène et d'épaisseur constante. Le protocole pour réaliser ces grilles est présenté ci-dessous.

Mode opératoire :

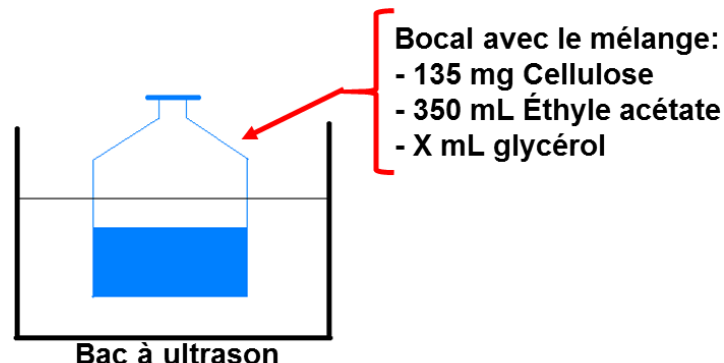


Figure 15 : mélange pour la réalisation d'une solution de cellulose. Selon la taille des trous et de leur dispersion voulues dans la membrane il faut ajouter un volume de glycérol et laisser à macérer sous ultrasons.

Ce protocole comporte plusieurs étapes, la première étape est la réalisation de solution de cellulose dans l'éthyle d'acétate (figure 15). En effet pour réaliser les trous on introduit du glycérol, car lors de l'étape de dépôt de la membrane de polymère à la surface de l'eau distillée, celui-ci se dissout et génère des trous. Selon le diamètre et la distribution des trous dans la membrane souhaitée, nous varions le volume de glycérol introduit et le temps de macération. Par exemple, pour obtenir des trous entre 0,5  $\mu\text{m}$  et 1  $\mu\text{m}$  on utilise un volume de 0,6 mL de glycérol et nous laissons macérer 6 jours (voir figure 16).



## fragiles

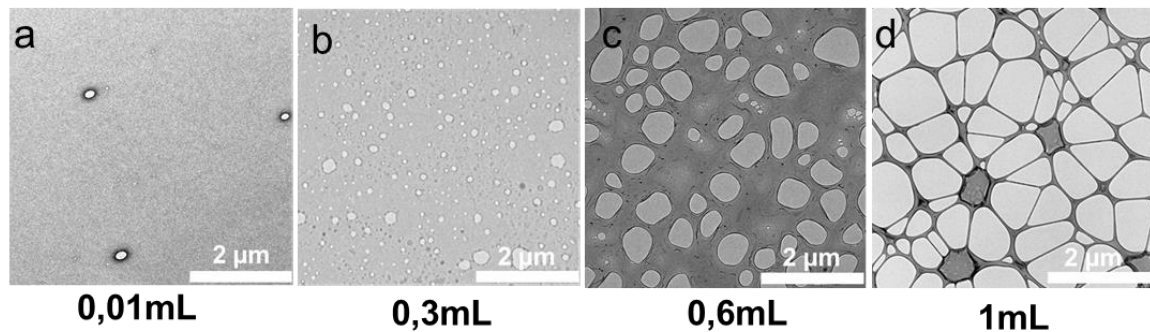


Figure 16 : distribution de taille des trous de la membrane de carbone en fonction du volume de glycérol introduit, de 0.01mL à 1mL respectivement de (a) à (d).

La deuxième étape est l'imprégnation de la lame de verre. On introduit une lame de verre de microscopie, préalablement nettoyée et rendue hydrophobe, dans la solution de cellulose. Elle est laissée une minute immergée dans la solution et puis retirée avec une vitesse de 1cm/s. Après séchage à l'abri de l'air ambiant, la membrane est désolidarisée de la lame en contact avec la surface de l'eau sous un angle de 45° (figure17).

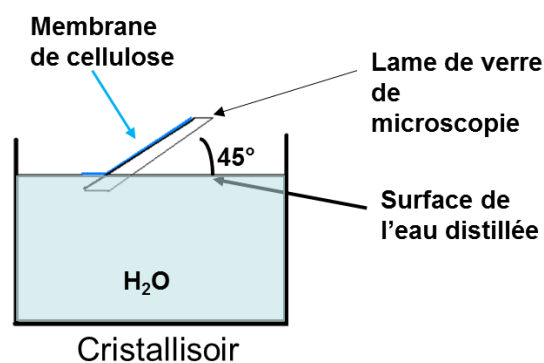


Figure 17 : la membrane de cellulose est décollée de la lame de verre par interactions répulsive de l'eau.

La troisième étape est le dépôt des grilles de MET, sur la surface de la membrane (figure 18). En effet lors du contact de la membrane avec l'eau, le glycérol se dissout et en partant laisse des places vides qui formeront les trous. D'où l'importance de la quantité de glycérol et le temps d'agitation aux ultrasons.

### fragiles

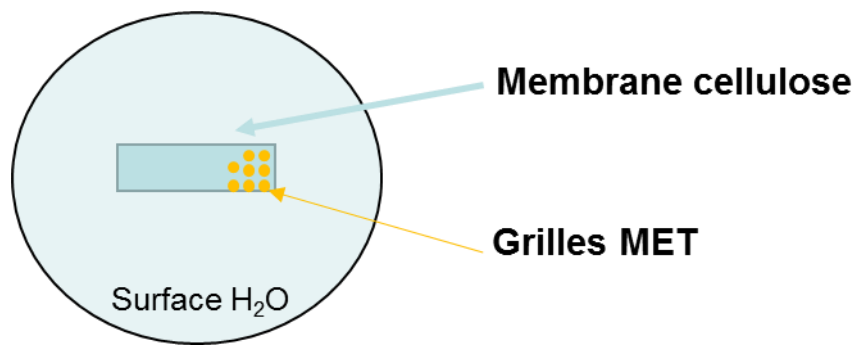


Figure 18 : dépôt des grilles de MET sur la surface de la membrane

À l'aide d'un papier poreux propre, les grilles sont récupérées par contact à sa surface. Puis elles sont gardées et séchées dans une boîte de Pétrie.

Dans la quatrième et dernière étape on effectue le dépôt d'une couche de carbone de 2 à 50 nm d'épaisseur, par sputtering (plasma) sur la membrane de cellulose percée. Enfin, la couche de carbone est libérée par dissolution à l'acétate d'éthyle de la membrane de cellulose. Cette dissolution s'effectue par dépôt de ces grilles sur une pile de trois filtres et l'acétate d'éthyle est introduit par infiltration des papiers filtres jusqu'à ils soient totalement imbibés. La manipulation doit être répétée au moins trois fois en changeant chaque fois les filtres (figure 19).

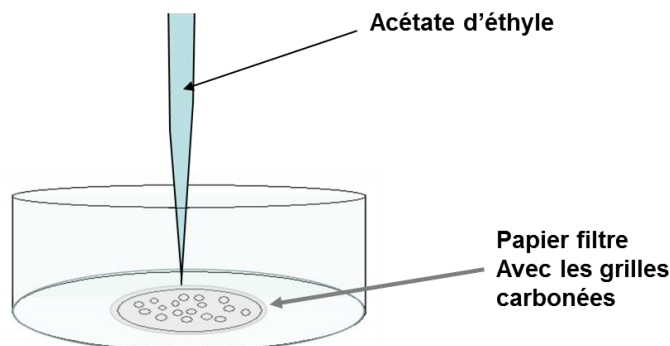


Figure 19 : dissolution de la cellulose à l'aide l'acétate d'éthyle.

Les grilles avec les membranes de carbone sont récupérées et placées sous vide pendant 24h pour bien les sécher. Puis elles sont stockées dans des boîtes sous vide statique et prêtes à l'utilisation.

### III) Conclusion :

Dans ce premier chapitre, nous avons montré l'importance de l'influence du faisceau d'électrons sur un matériau fragile. Nous avons vu que des dégâts par le faisceau d'électrons se produisent seulement au-dessus d'un certain seuil de densité de

**fragiles**

courant en fonction du matériau, ce qui signifie que les dommages d'irradiation dépendent de la dose instantanée et de la quantité de dose accumulée. Donc, la connaissance des différentes interactions et leurs énergies qui régissent la structure de chaque matériau est primordiale, ce qui nous permet de développer et d'appliquer des techniques spécifiques de préparation et d'observation pour protéger ou ralentir la dégradation de l'échantillon et ainsi permettre son analyse complète en microscopie électronique en transmission. Ces méthodes et protocoles développées ou optimisées ont été appliqués pour la réalisation des études présentées dans les chapitres suivants de ce manuscrit.

## Références chapitre 1

### REFERENCES CHAPITRE 1

1. Clcland, Marshall R., O'Neill, Mclanic T. and Thompson, Chester C., *"Sterilization with Accelerated Electrons "in Sterilization Tecnology, A Practical Guide for Manufactures and Users of Health Care Products* Van Nostrand Reinhold, New York (1993).
2. Artru X., Chehab R., Johnson B., Keppler P., Rinolfi L., and Jejcic. A., NIMBI 19,246(1996).
3. Chimie-Physique Atkins P. et De Paula J., 2004.
4. Hobbs, L.W., 1987. Radiation effects in analysis by TEM.
5. Egerton R. F. and Malac Li., Micron M. 35,399 (2004).
6. Williams, D.B. and C.B. Carter, The Instrument, in Transmission Electron. Microscopy: A Textbook for Materials Science, Springer US. p. 26-27 (2009).
7. Cosslett E., Radiation damage in the high resolution electron microscopy of biological materials (1978).
8. Makin M.J., Atom displacement radiation damage in electron microscopes, in: Electron Microscopy 1978. Vol. III, Ed. J.M. Sturgess (Microscopical Society of Canada.Toronto, 1978) pp. 330-42.
9. Banhart F., Rep. Prog. Phys. 62 (1999) 1181.
10. Medlin D.L., HowittD.G., The roles of sputtering and atomic displacement in electron irradiation induced mass loss, *"Microbeam Analysis"*, San Francisco Press, San Francisco, 271 (1991).
11. Hobbs L.W., Radiation effects in analysis by TEM. In: Hren J.J., J.I.Goldstein, Joy, D.C. (Eds.), *"Introduction to Analytical Electron Microscopy"*, Plenum Press, New York, 399 (1987).
12. Glaeser, R. M., 1974, in High Voltage Electron Microscopy, ed. P. R. Swann, C. J. Humphreys, and M. J. Goringe (Academic Press, London), pp. 370-8.
13. Glaeser, R. M., 1975, in Physical Aspects of Electron Microscopy and Microbeam Analysis, ed. B. M. Siegel and D. R. Beaman (Wiley, New York), pp. 205-29.
14. Reimer, L., 1975, in Physical Aspects of Electron Microscopy and Microbeam Analysis, ed. B. M. Siegel and D. R. Beaman (Wiley, New York), pp. 231-45.
15. Makin, M. J., 1971, in Electron Microscopy in Material Science, ed. U. Valdre (Academic Press, London), pp. 388-461.
16. Isaacson, M., 1979, Proc. Specialist Workshop on Analytical Electron Microscopy, Cornell University, 25-28 July 1978, ed. P. L. Fejes, pp. 73-87.
17. Fryer J.R., F. Holland, The reduction of radiation damage in the electron microscope. Ultramicroscopy 11,67 (1983).
18. Henderson, R., Glaeser, R.M., 1985. Quantitative analysis of image contrast in electron micrographs of beam-sensitive crystals. Ultramicroscopy 16, 139–150.

## Références chapitre 1

19. Reimer, L., 1975. Review of the radiation damage problem on organic specimens in electron microscopy. In: Siegel, B.M., Beaman, D.R. (Eds.), *Physical Aspects of Electron Microscopy and Microbeam Analysis*, Wiley, New York.
20. Isaacson, M.S., 1977. Specimen damage in the electron microscope, *Principles and Techniques of Electron Microscopy*, Vol. 7. Van Nostrand, New York, 1–78.
21. Williams, D.B. and C.B. Carter, The Instrument, in *Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science*, Springer US. p. 141-171 (2009).
22. Egerton, R.F., *Electron Energy-Loss Spectroscopy in the Electron Microscope*
23. Ruska, E., Nobel Lectures, Physics 1981-1990, Tore Frängsmyr and Gösta Ekspong, Eds. (1993) World Scientific Publishing, Singapore
24. Marton, L. (1934) Electron microscopy of biological objects. *Nature* 133, 911-911
25. Hall, C. E., Jakus, M. A., and Schmitt, F. O. (1945) The structure of certain muscle fibrils as revealed by the use of electron stains. *J. Applied Physics* 16, 459-465
26. Brenner, S., and Horne, R. W. (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta* 34, 103-110
27. Huxley, H. E., and Zubay, G. (1961) Preferential staining of nucleic acid-containing structures for electron microscopy. *J. Biophys. Biochem. Cytology* 11, 273-296
28. Parsons, D. F. (1974) Structure of wet specimens in electron microscopy. Improved environmental chambers make it possible to examine wet specimens easily. *Science* 186, 407-414
29. Matricardi, V. R., Moretz, R. C., and Parsons, D. F. (1972) Electron diffraction of wet proteins: catalase. *Science* 177, 268-270
30. Glaeser, R. M. (1971) Limitations to significant information in biological electron microscopy as a result of radiation damage. *J. Ultrastruct. Res.* 36, 466-482
31. Crowther, R. A., DeRosier, D. J., and Klug, A. (1970) The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. *Proc. R. Soc. London. A* 317, 319-340
32. Frank, J. (1975) Averaging of low exposure electron micrographs of non-periodic objects. *Ultramicroscopy* 1, 159-162
33. Kuo, I. A. M., and Glaeser, R. M. (1975) Development of methodology for low exposure, high resolution electron microscopy of biological specimens. *Ultramicroscopy* 1, 53-66
34. Unwin, P. N. T., and Henderson, R. (1975) Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *J. Mol. Biol.* 94, 425-432
35. Fernández-Morán, H. (1960) Low-temperature preparation techniques for electron microscopy of biological specimens based on rapid freezing with liquid Helium II. In *Annals of the New York Academy of Sciences* 85, 689-713
36. Clark, W.R.K., Chapman, J.N., Macleod, A.M., Ferrier, R.P., 1980. Radiation damage mechanism in copper phthalocyanine and its chlorinated derivatives. *Ultramicroscopy* 5, 195–208.

## Références chapitre 1

37. Haas, D. J. (1968) X-ray studies on lysozyme crystals at  $-50^{\circ}$  C. *Acta Cryst. B* 24, 604-604
38. Haas, D. J., and Rossmann, M. G. (1970) Crystallographic studies on lactate dehydrogenase at  $-75$  degrees C. *Acta Crystallogr B* 26, 998-1004
39. Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., and McDowell, A. W. (1984) Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308, 32-36
40. Dubochet, J., Adrian, M., Chang, J.-J., Homo, J.-C., Lepault, J., McDowell, A. W., and Schultz, P. (1988) Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 21, 129-228
41. Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J., and McDowell, A. W. (1984) Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* 308, 32-36
42. Denon, D. and E. Kellenberger (1950). Un nouveau microtome pour la microscopie électronique. *Arch. des Sci. Geneve* 3: 169-174.
43. M. Danon, E. Guyénot, E. Kellenberger et J. Weigle: Electron micrograph of a chromosome of Triton. *Nature* 165, 33; 1950.
44. M.J. Fransen, Th.L. van Rooy, P. Kruit : Field emission energy distributions from individual multiwalled carbon nanotubes. *Applied Surface Science* 146 1999 312–327
- THE MEAN FREE PATH IN AIR
45. S.G. Jennings: The mean free path in air. *J. Aerosol Sci., Vol, 19, No. 2, pp. 159-166, 1988.*
- 46- Structuration de nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer en films et étude de leurs propriétés magnétiques et de magnéto-transport. Pauly Matthias, thèse soutenue en 2011.
- 47- Tokuyasu, K. & Okamura, S. (1959) A new method for making glass knives for thin sectioning. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6, 305–308.
- 48- Tokuyasu, K.T. (1978) A study of positive staining of ultrathin frozen sections. *J. Ultrastruct. Res.* 63, 287–307.

# CHAPITRE 2

## II. Études par microscopie électronique à froid d'architectures nanométriques à base de carbone

De nombreux travaux ont été réalisés sur tous les types de matériau à base de carbone. Presque tous les domaines des sciences dites dures, de la biologie à la physique en passant par la chimie, ont étudié ou utilisé ces matériaux dans leurs recherches. Certains ont regardé de près les effets sur les êtres vivants, d'autres ont exploité leurs propriétés exceptionnelles ou les ont utilisés dans l'assemblage avec des matériaux différents pour créer de nouvelles fonctionnalités.

C'est dans cette dernière approche que nous avons mené ce travail. L'objectif de ce chapitre est de présenter les travaux réalisés sur deux matériaux à base de carbone tels que les nanotubes de carbone en particulier les nanotubes monoparoie (SWNT, Single Wall nano tube) ainsi que le graphène (GN). Dans un premier temps, nous les avons utilisés pour générer de nouvelles propriétés en les conjuguant avec une molécule organique biocompatible. Puis dans une seconde étape nous avons déterminé ces nouvelles fonctionnalités en appliquant diverses techniques de caractérisation. Cependant la technique de choix permettant une réponse directe et précise de la morphologie et de la structure était la microscopie électronique à froid (Cryo-EM) qui a l'avantage de ne pas dégrader le matériau sous l'effet de l'irradiation électronique et permet une observation dans son milieu natif.

Ce chapitre s'articulera en deux parties : nous présenterons d'abord la fonctionnalisation et son influence sur les propriétés des SWNT. Ensuite dans la deuxième partie, l'étude portera sur l'élaboration de graphène multifeuillet par exfoliation du graphite ainsi que l'analyse de ses propriétés par Cryo-EM.



## II.1) Étude de la fonctionnalisation de nanotubes monoparoï par des molécules d'histidine-pyrène

La découverte des nanotubes en 1991<sup>1</sup> ainsi que leurs extraordinaires propriétés tant électroniques que mécaniques a initié de nombreuses recherches partout dans le monde.<sup>2</sup> L'utilisation de nanotubes monoparoï (SWNT) pour la construction de nanohybrides et de nanocomposites est devenue un vaste champ d'étude présentant un fort intérêt pour le développement de nouvelles applications dans différents domaines tels que la catalyse,<sup>3</sup> la nanobiotechnologie,<sup>4</sup> l'optoélectronique,<sup>5</sup> les sciences des matériaux<sup>6</sup> ou encore la nanomédecine.

C'est dans ce contexte qu'on a étudié la possibilité de fonctionnaliser les SWNT pour les stabiliser dans l'eau et ainsi de faciliter la fabrication de nanocomposites. Rappelons que l'un des grands problèmes des SWNT dans l'eau est leur tendance à former des agrégats. Ce phénomène est également observé dans la plupart des solvants organiques.

Dans la littérature on trouve deux types d'approches pour la stabilisation des suspensions de nanotubes<sup>7</sup> : la voie covalente et la voie non-covalente. Le problème de la voie covalente pour la fonctionnalisation est lié au risque de modification de certaines propriétés électroniques et mécaniques des SWNT. Par contre, la voie non-covalente basée sur des interactions de types Van der Waals et  $\pi$ - $\pi$  stacking n'induit pas de modification de ces propriétés. Ces dernières sont possibles grâce à la structure polycyclique aromatique de surface des nanotubes de carbone comme dans le cas d'autres cycles aromatiques tels que le naphthalène, le phénanthrène, le fluorène ou encore le pyrène qui présentent tous un réseau 2D d'orbitale  $\pi$ . Cette voie est beaucoup plus avantageuse que l'approche covalente. En conséquence, notre choix s'est porté sur la voie non covalente. La bibliographie montre que beaucoup de molécules amphiphiles et/ou biomédicales telles que les protéines<sup>8</sup> ou encore les saccharides<sup>9,12</sup> ont été utilisées dans cette voie non covalente pour la fonctionnalisation selon le type d'application envisagée.

Nous avons choisi d'utiliser une molécule en chaîne de six histidines liées à un pyrène (His-Py),

On remarque que l'utilisation d'oligopeptides avec une masse molaire inférieure à deux kDa (kg/mol) était précédemment limitée à quelques exemples bien spécifiques.<sup>10</sup> Néanmoins avec des techniques de synthèse adaptées on peut obtenir des nanocomposites avec des peptides de petites chaînes d'acides aminés qui permettent un accès direct à un assemblage chimique polyvalent avec des fonctionnalités sur mesure.<sup>11</sup> Nous avons choisi d'utiliser une molécule en chaîne de six histidines car elle présente des avantages liés à sa biocompatibilité, son respect de l'environnement et de sa polyvalence. Cependant son incorporation seule dans des composites à base de nanotubes de carbone serait difficile car l'affinité est faible.

Nous avons donc choisi de lier cette molécule en chaîne de six histidines à un pyrène (His-Py), ce qui permet une interaction beaucoup plus forte, non covalente, avec les cycles aromatiques des parois des SWNT. Ce peptide a été largement utilisé en biochimie pour la purification de protéines recombinantes par chromatographie.<sup>16</sup> L'intérêt pour la fonctionnalisation des nanotubes de carbone (NTC) en suivant la technique non covalente<sup>13,14</sup> est de marquer les NTC par fonctionnalisation à l'hexahistidine (His6-tagCNTs). Ceci permet d'obtenir un composant ou un modèle à l'échelle moléculaire utile pour la conception et la construction de nouveaux nanomatériaux à base de carbone pour la production de nanohybrides innovants. En plus des propriétés solubilisantes de l'hexahistidine marquée (His6-tag) dans l'eau, le peptide biocompatible pourrait engager des interactions ioniques, des liaisons de coordination métalliques et des liaisons hydrogènes pour l'élaboration de nouveaux nanohybrides par auto-assemblage.<sup>15</sup>

Le but de ce travail est de réaliser dans un premier temps la fonctionnalisation avec ces molécules His-Py, puis dans un deuxième temps nous avons fabriqué un matériau nanocomposite et enfin nous avons caractérisé la fonctionnalisation His6-tag-SWNT ainsi que la formation de nanocomposites suite à l'addition de nanoparticules dans la solution contenant les nanotubes par cryo-microscopie électronique en transmission.

### II.1.1) Fabrication d'architectures à base des nanotubes fonctionnalisés

Une molécule destinée à fonctionnaliser les nanotubes de carbone monoparoi doit satisfaire les conditions suivantes : i) avoir un cycle aromatique pour respecter la voie non covalente en favorisant les interactions  $\pi$ - $\pi$  stacking qui facilitent la fonctionnalisation des nanotubes ; ii) posséder une chaîne atomique avec des propriétés favorisant le greffage des nanostructures pour la création de nanocomposites de préférence biocompatibles. Une molécule qui respecte ces conditions a été formulée par nos soins et donnée pour synthèse au laboratoire commercial Bio Basic, elle est composée d'une chaîne de six acides aminés d'histidine liée à un polyaromatique le pyrène (molécule dénotée His<sub>6</sub>-Py) par une liaison covalente. Du point de vue physico-chimique, l'idée consiste à solvater les nanotubes monoparoi à travers les interactions  $\pi$ - $\pi$  entre le cycle aromatique pyridine des molécules et les aromatiques du graphène des parois, tandis que les extrémités histidines hydrophiles forment des liaisons de type hydrogène avec l'eau conduisant à une très bonne stabilité de la suspension dans le temps. Une fois la molécule synthétisée, le but était de fonctionnaliser les nanotubes avec cette dernière puis de déterminer le degré de fonctionnalisation en comparant les structures obtenues à des échantillons « témoin » et enfin de corrélérer ce degré aux conditions expérimentales utilisées (voir figure 1).

Ce type d'architecture nanométrique hybride ouvre de nombreuses perspectives d'étude : nous pouvons envisager d'auto-organiser ces systèmes His<sub>6</sub>-tagSWNT sur une surface ou en solution grâce aux interactions de type Van der Waals entre les histidines, de les assembler par l'intermédiaire de métaux de coordination ou encore de former de nouveaux nanocomposites grâce à la double interaction (de type liaison d'hydrogène et covalente entre la nanoparticule d'intérêt et l'azote de l'His<sub>6</sub>-tagSWNT). À titre d'exemple, l'un des intérêts potentiels de ces systèmes est de fabriquer des nanocomposites biocompatibles pour avoir une charge globale positive sur les azotes de sorte à favoriser les interactions avec les protéines envisagées.

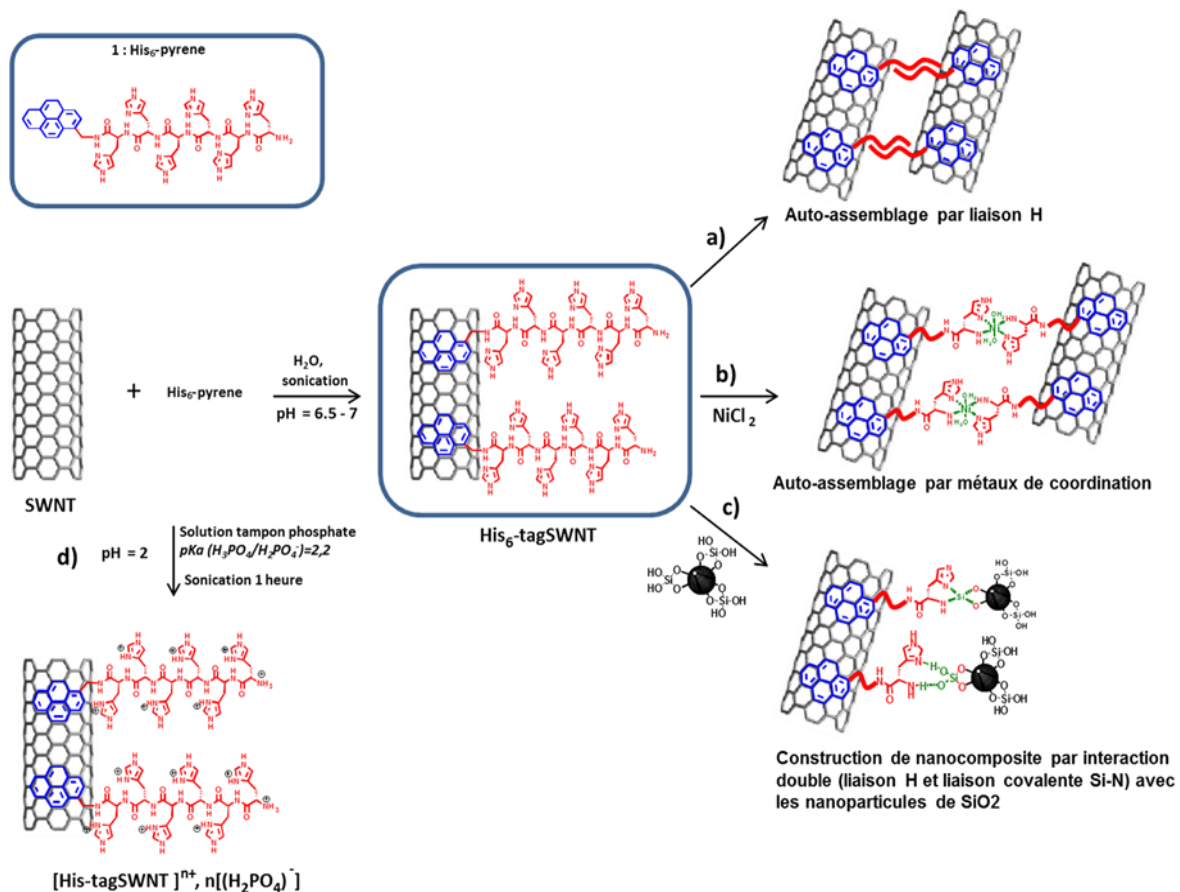


Figure 1 : différents assemblages obtenus de His<sub>6</sub>-TagSWNT, a) auto-assemblage supramoléculaire par interaction de type liaisons hydrogène et Van der Waals, b) auto-assemblage par l'intermédiaire de métaux de coordination (complexe), c) formation de nanocomposites avec des nanoparticules de SiO<sub>2</sub> et d) ionisation de His<sub>6</sub>-TagSWNT par une solution tampon de phosphate.

### II.1.1.1) Partie expérimentale :

#### II.1.1.1.1) Choix des NTC : Pourquoi les nanotubes de carbone monoparoi (SWNT) ?

En général, il a été montré par de nombreuses études, que les NTCs sont toxiques<sup>16</sup> pour les cellules vivantes. Néanmoins, les monoparoi (SWNT) le sont moins car ils semblent avoir une plus grande biocompatibilité.<sup>17,19</sup> C'est pour cette raison que notre choix s'est porté sur cette catégorie de NTCs. De plus leur toxicité peut être atténuée de façon significative si certaines précautions sont prises de manière stricte. Pour commencer, le paramètre le plus important est la pureté pour éviter d'avoir d'autres types de NTCs et si possible sans nanoparticules comme les catalyseurs (Ni, Co, Fe...) ayant servi à leur synthèse.<sup>18</sup> Ensuite vient la fonctionnalisation qui avec certaines molécules permet la biocompatibilité, cependant cette dernière n'est

possible que si un taux de recouvrement proche de 100% est atteint.<sup>19</sup> Enfin la forme et la taille des SWNT sont très importantes : Il est intéressant ici de remarquer que le nombre d'orbitales  $\pi$  exposées dans un fagot est beaucoup plus petit que sur un fil, à quantité égale de carbone. Donc un fagot est beaucoup moins toxique et peut être éliminée plus facilement par l'organisme, au contraire des formes allongées qui sont bien plus toxiques.<sup>19</sup>

### II.1.1.1.2) Fonctionnalisation des SWNT

#### II.1.1.1.2.1) Mode opératoire

Le protocole de fonctionnalisation des SWNT est schématisé dans la Figure 2. Il a nécessité trois expériences en considérant : un échantillon témoin avec les SWNTs seuls dans l'eau distillée (1), les SWNTs avec le polypeptide sans pyrène dans l'eau (2) et les SWNTs avec la molécule liée au pyrène (3).

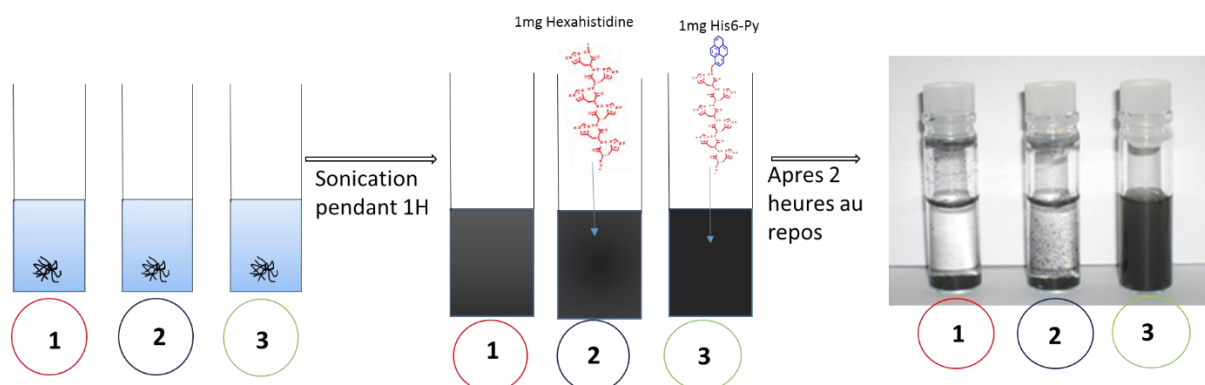


Figure 2 : protocole pour la fonctionnalisation des SWNTs. (1) le témoin avec uniquement les SWNTs, (2) avec seulement le polypeptide His6 et (3) avec la molécule His6-Pyrène.

Dans trois tubes à essais on introduit 0,5 mg de SWNTs (commercial Nanocyl) dans 1mL d'eau à un pH légèrement acide (entre 6 et 7), puis on les place tous dans une cuve à ultra-son pendant une heure. Ensuite, le premier tube à essai est laissé tel quel (témoin), dans le deuxième on additionne un milligramme de notre hexahistidine et dans le dernier on y ajoute le His6-Pyrène. Après deux heures de repos on remarque un comportement différent dans les trois tubes. Dans le témoin, rapidement la solution devient limpide et un dépôt se forme au fond du tube. Pour le deuxième tube, la vitesse de sédimentation est plus faible, cependant après le temps de repos de deux heures la solution est presque limpide. Tandis que dans la troisième expérience la solution reste bien noire, homogène et stable, ce qui correspond à une solution colloïdale stable dans le temps.

## II.1.1.1.2.2) Interprétation des résultats :

- Le témoin : on voit les nanotubes se déposer au fond du pilulier rapidement, presque instantanément après arrêt de la sonication, en laissant apparaître une solution limpide ; ceci est dû à l'hydrophobicité des SWNTs.<sup>20</sup>
- SWNTs + Hexahistidine : On constate que celui avec les molécules hexahistidine a un temps de sédimentation plus faible dû à une diminution de l'hydrophobicité des SWNTs par des interactions avec le polypeptide seul.
- SWNT + His<sub>6</sub>-Py : la solution reste noire, homogène et stable même après plusieurs jours. Il y a des interactions de type «  $\pi$  stacking » entre les benzènes de la paroi des SWNTs et la partie polyaromatique (Pyrène) d'une part, et d'autre part la stabilité dans l'eau se fait grâce à la chaîne hydrophile d'histidine qui permet des interactions de solvation avec le solvant aqueux.

## II.1.1.1.3) Élaboration d'un modèle multifonctionnel :

Le modèle multifonctionnel peut s'obtenir par plusieurs possibilités, il peut se former soit de l'auto-nano-organisation supramoléculaire entre les His<sub>6</sub>-tagSWNT grâce aux interactions de type Van der Waals entre les histidines, soit des auto-assemblages par l'intermédiaire de métaux de coordination. On peut également obtenir des structures chargées positivement grâce à un pH très faible et stable dans une solution tampon pour former ainsi des systèmes pouvant interagir avec des protéines. Ou encore favoriser la formation de nanocomposites grâce à une double interaction, de type liaisons hydrogène d'une part et covalente d'autre part entre la nanoparticule et l'azote de l'His<sub>6</sub>-tagSWNT.

L'intérêt de ces assemblages est de fabriquer des systèmes biocompatibles, fonctionnels et variables selon l'application cherchée, comme mentionné précédemment (figure 1).

## II.1.1.2) Caractérisation des auto-assemblages :

La mise en évidence des auto-assemblages peut se faire par plusieurs techniques de caractérisation mais s'avère très difficile car les résultats obtenus peuvent prêter à des interprétations parfois contradictoires. Pour éviter ces difficultés d'interprétation et également avoir accès rapidement et de façon précise à la structure de ces assemblages, à l'échelle nanométrique, la technique la plus appropriée est la MET. Cette technique de choix est la seule qui peut simultanément mettre en évidence la fonctionnalisation ainsi que la construction des auto-assemblages et les nanocomposites. De plus, elle permet de confirmer les conclusions obtenues par

d'autres techniques de caractérisations utilisées dont les résultats seront présentés dans ce chapitre.

Cependant il y avait un problème important à résoudre : la sensibilité de ces structures aux interactions avec les électrons du rayonnement électronique incident. Sans précautions, l'architecture de ces matériaux peut être détruite en quelques secondes sous le faisceau. La fragilité de ces systèmes vient de la partie organique (His<sub>6</sub>-Py) qui enrobe les SWNT. Ceux-ci peuvent facilement se dégrader sous faisceau d'électrons, conduisant ainsi à la destruction de l'auto-assemblage. Pour cette raison, on a introduit l'observation à froid pour minimiser l'effet de dégradation. Bien que l'effet des électrons ait été réduit, cela n'a pas été suffisant pour observer les assemblages comme ils se présentent dans leur environnement. Donc nous avons développé la technique de vitrification pour protéger l'échantillon et empêcher la formation de la glace cristallisée à froid.<sup>32</sup> Ceci a permis de mettre en évidence l'organisation des différents systèmes tels qu'ils sont dans leur milieu aqueux. C'était la première fois au laboratoire qu'on utilise cette technique de préparation et d'observation ; la microscopie électronique à froid en mode vitrification (Cryo-EM).

#### **II.1.1.2.1) Observation et caractérisation par Cryo-EM :**

Une fois que nous avons optimisé les conditions d'obtention de solutions colloïdales stables et homogènes dans le temps, nous avons mis en place un protocole de préparation et d'observation en utilisant les différents modes d'imagerie et d'analyse chimique en MET pour les caractériser. Pour cela il a fallu assurer, i) la préservation des auto-assemblages et ii) l'observation dans leur environnement natif.

##### **II.1.1.2.1.1) Protocole de préparation :**

*Pour la vitrification, nous utilisons le protocole décrit dans le chapitre 1 paragraphe II.2.1.1.1*

##### **II.1.1.2.1.2) SWNT marqué par l'Hexahistidine-Pyrène : Hex<sub>6</sub>-tagSWNT**

Nous avons analysé par Cryo-EM à haute résolution l'échantillon composé uniquement de Hex<sub>6</sub>-tagSWNT. Ceci nous a permis d'observer également les SWNTs commerciaux seuls qui servent de référence (figure 3). Pour éviter la formation d'assemblages supramoléculaire, l'échantillon a été passé aux ultra-sons juste avant la vitrification (figure 4).



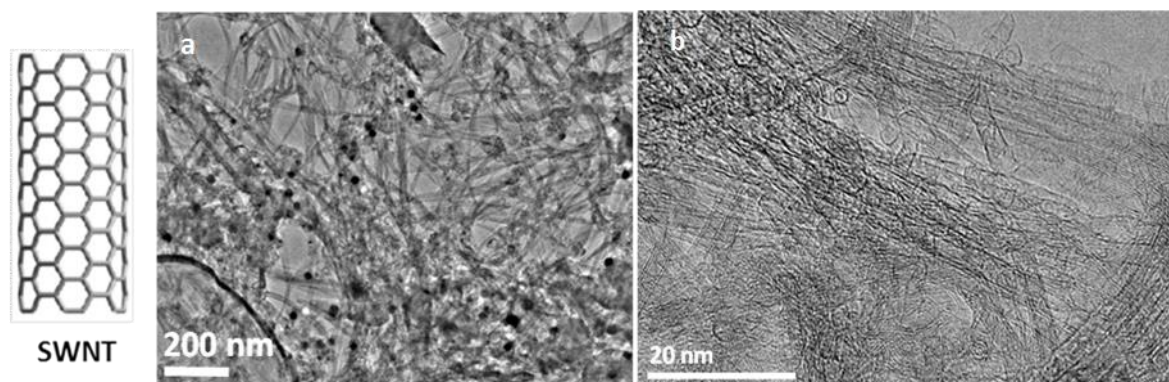


Figure 3 : Observation de fagots de SWNT. On a dispersé 1 mg de SWNT commercial (Nanocyl) dans 1 mL d'eau. Puis on a déposé une goutte sur une membrane de carbone d'une grille de cuivre. a) image de fagots de SWNTs à faible grandissement et b) vue agrandie en Haute Résolution (HRTEM).

L'analyse de ces images montre clairement la fonctionnalisation des SWNT par la molécule His<sub>6</sub>-Py par comparaison avec celles de SWNT non fonctionnalisés (référence).

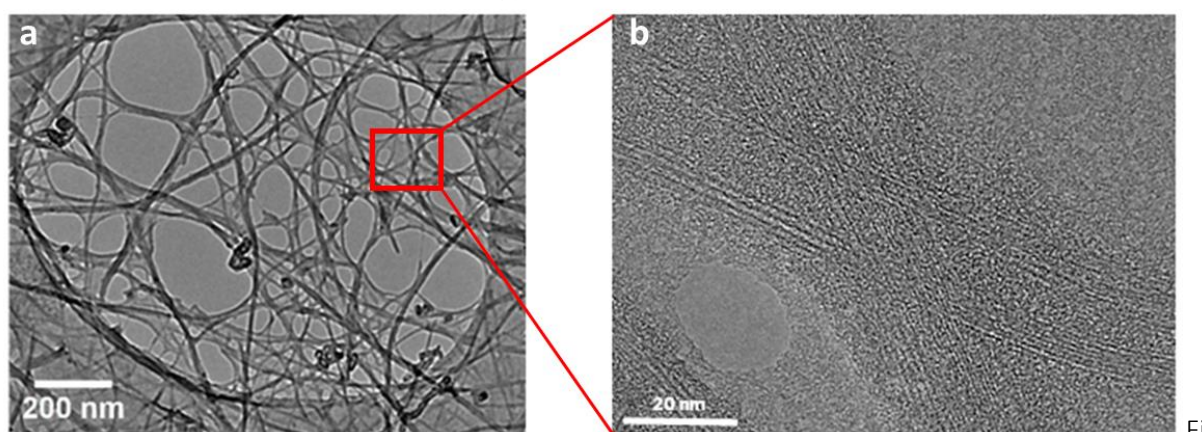
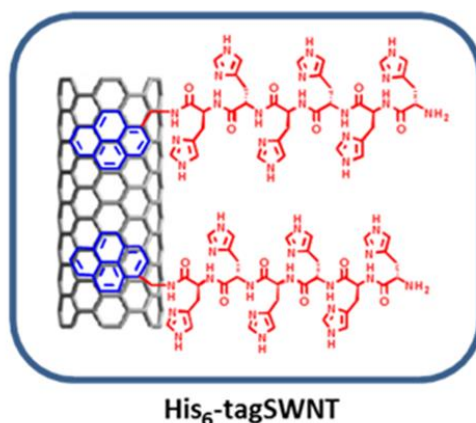


Figure 4 : image Cryo-EM à  $-180^{\circ}\text{C}$  des His<sub>6</sub>-TagSWNT. (a) Vue générale et (b) en haute résolution.

Grâce à la Cryo-EM, nous sommes donc capables de garder intacte la couche organique autour des SWNTs. Les observations à froid (température de  $-180^{\circ}\text{C}$ ) permettent d'atténuer l'influence des électrons et la couche vitreuse permet de garder l'eau sous forme amorphe donc d'être dans les conditions relativement représentatives de l'échantillon dans son milieu qui est l'environnement aqueux. On



remarque également qu'il se forme, malgré les précautions prises, des structures localisées agrégées entre les molécules His6-tagSWNt.

### II.1.1.2.1.3) Auto-assemblage supramoléculaire

On présente ici les résultats obtenus en Cryo-EM des deux types d'auto-assemblage.

#### II.1.1.2.1.3.1) Auto-organisation par liaison Hydrogène

L'auto-assemblage supramoléculaire est un processus par lequel les molécules His6-tagSWNt forment par elles-mêmes des structures avec un haut degré d'organisation de façon spontanée et autonome.<sup>20</sup>

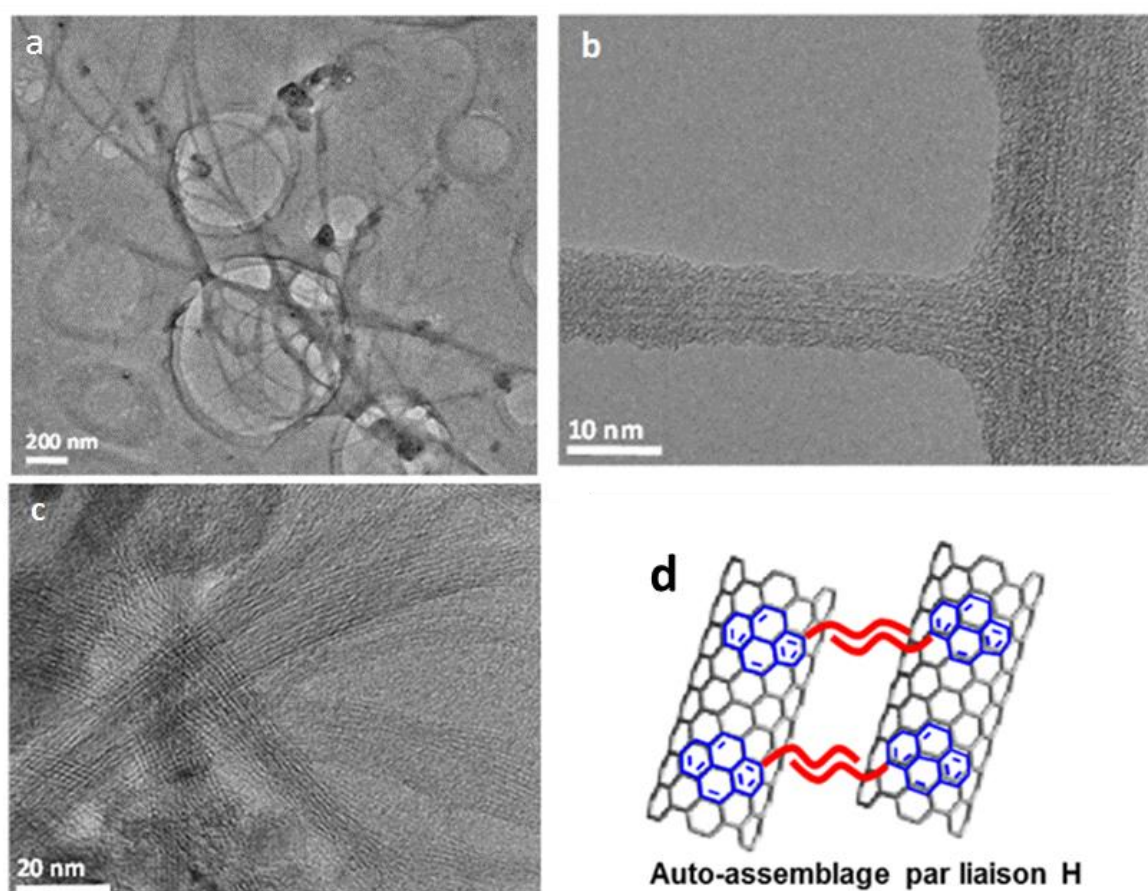


Figure 5 : images de Cryo-EM des auto-assemblages des molécules His6-TagSWNT proche de leur état natif. (a) Molécules dans la glace amorphe, (b et c) Cryo-EM haute résolution des architectures formées et (d) représentation schématique du His6-TagSWNT.

Nous avons donc pu mettre en évidence l'auto-organisation des molécules de His6-tagSWNT. Cette structure se forme grâce aux interactions de type liaison hydrogène entre les doublets électroniques des azotes d'un peptide et les hydrogènes d'un autre peptide.

II.1.1.2.1.3.2) Auto-assemblage des His<sub>6</sub>-tagSWNT induit par NiCl<sub>2</sub>

Une autre fonctionnalité du His<sub>6</sub>-tagSWNT a été démontrée, celle de la formation de liaisons de coordination avec le Nickel. Au moyen de mesures de calorimétrie isotherme (ITC), il est démontré que l'ion Ni<sup>2+</sup> présente une forte affinité pour l'oligopeptide hexahistidine en générant des complexes ternaires symétriques His<sub>6</sub>-Ni (II) -His<sub>6</sub>.<sup>21</sup> Nous avons exploité cette propriété de l'hexahistidine pour favoriser l'auto-assemblage supramoléculaire des nanotubes de carbone, via des liaisons de coordinations métalliques réversibles, lors de la réaction de His<sub>6</sub>-tagSWNT avec du chlorure de Nickel (II) dans l'eau.

Le protocole de préparation consiste à introduire dans une solution aqueuse de 2 ml de His<sub>6</sub>-tagSWNTs (figure 6a) 50 µl d'une solution aqueuse de NiCl<sub>2</sub> à 100 µM. On constate une agrégation spontanée et une précipitation de grandes structures insolubles. Ceci est la conséquence de l'auto-assemblage de His<sub>6</sub>-tagSWNT induit par la complexation de Ni (II) avec les acides aminés situés à la surface des SWNTs (Figure 6b). La suspension initiale stable de couleur noire foncée (figure 6a) devient spontanément incolore. Ce mélange a conduit à la formation de nanostructures microscopiquement ordonnées qui induisent une agglomération spontanée de grands agrégats insolubles déposés au fond du pilulier. Pour confirmer ce résultat nous avons réalisé une expérience de contrôle avec l'addition de 50 µl d'eau désionisée (sans NiCl<sub>2</sub>) qui n'a pas affecté de façon significative la stabilité de la solution colloïdale de His<sub>6</sub>-tagSWNTs par effet de dilution.



Figure 6 : (a) dispersion aqueuse stable de His<sub>6</sub>-TagSWNT et (b) agrégation et sédimentation des composites His<sub>6</sub>-TagSWNT/Ni(II)<sub>n</sub>/His<sub>6</sub>-TagSWNT.

Ces résultats suggèrent que la coordination conduit à des structures de type « sandwich » aux extrémités N-terminales des deux histidines de fin de chaîne des deux molécules His<sub>6</sub>-tagSWNTs, comme présenté schématiquement sur la figure 7 ; ceci conduit à un processus d'auto-assemblage très serré des SWNT dans des réseaux structurés de diamètre plus grand (Figure 7).

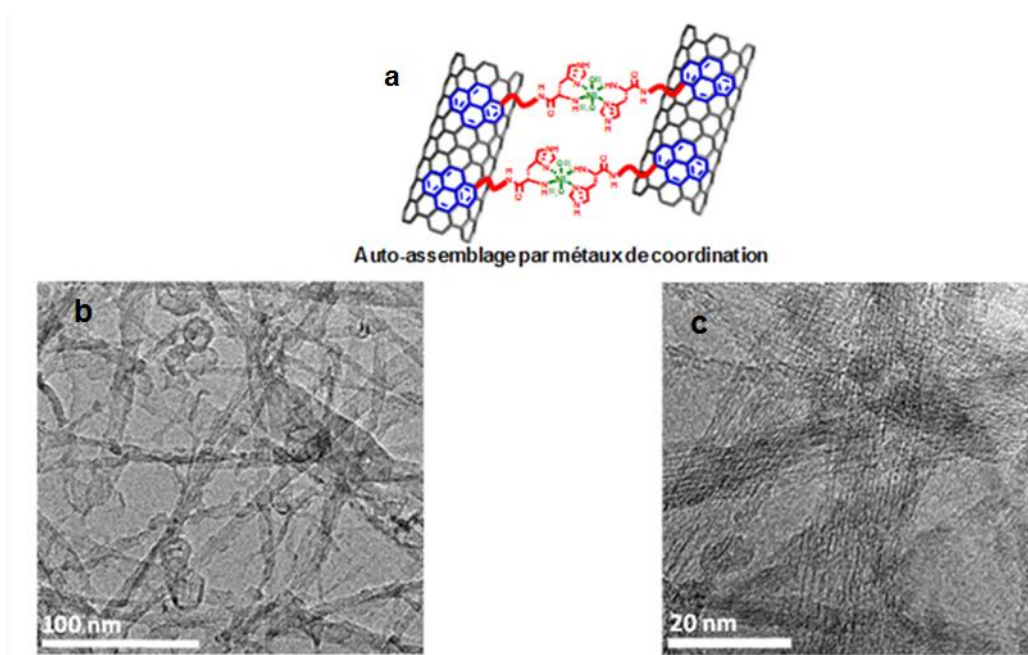


Figure 7 : (a) représentation schématique de l'interaction His6-TagSWNT/ $\text{Ni(II)}_n$ /His6-TagSWNT et (b et c) images typiques par Cryo-EM à haute résolution des structures auto-assemblées de His6-TagSWNT/ $\text{Ni(II)}_n$ /His6-TagSWNT.

Néanmoins, le mécanisme de liaison n'était pas encore compris ; il est très probable que les ions  $\text{Ni}^{2+}$  soient liés par une coordination de deux sites de chaque molécule agissant comme un pont fonctionnel. L'utilisation de l'interaction métal-ligand dans la construction de SWNT à base de peptides coordonnés représente une stratégie difficile à mettre en place en vue de son utilisation dans des applications. Cependant, le résultat essentiel de cette expérience est la possibilité de réaliser des études quantitatives en ce qui concerne le dosage de nanotubes fonctionnalisés par le polyhistidine-pyrène grâce à cette capacité à réaliser des complexes de coordination. Comme démontré par l'ensemble des études présentées, l'utilisation de la microscopie électronique en mode cryogénique a permis d'obtenir des informations directes et facilement interprétables sur les caractéristiques structurales et morphologiques des architectures obtenues par fonctionnalisation, ce qui n'est pas le cas des autres techniques qui auraient pu être envisagées ou qui ont été déjà utilisées pour leur caractérisation.<sup>33</sup>

#### II.1.1.2.1.4) Élaboration de nanocomposites

Après ces résultats encourageants, nous avons ensuite étudié la possibilité d'utiliser les structures His6-tagSWNTs dans l'élaboration de nanomatériaux composites par des liaisons hydrogènes et/ou des liaisons covalentes afin de contrôler précisément l'architecture moléculaire à l'échelle nanométrique. Pour en démontrer la faisabilité, nous avons choisi des nanoparticules de silice qui offrent la possibilité de créer des

liaisons H et des liaisons covalentes grâce aux fonctionnalités des silanols<sup>25,26</sup> sur leur surface externe pour la fabrication de nanocomposites.

#### II.1.1.2.1.4.1) Caractérisation des nanoparticules de silice :

La distribution en taille des nanoparticules de silice dispersées dans l'eau a été déterminée par diffusion dynamique de la lumière en utilisant un appareil Zetasizer Nano-Zs (Malvern) à température ambiante ; elle est de  $(10 \pm 2)$  nm. Cette dispersion en taille des particules a été également vérifiée par analyse MET (figure 8b) où la distribution obtenue est de  $(9 \pm 2)$  nm.

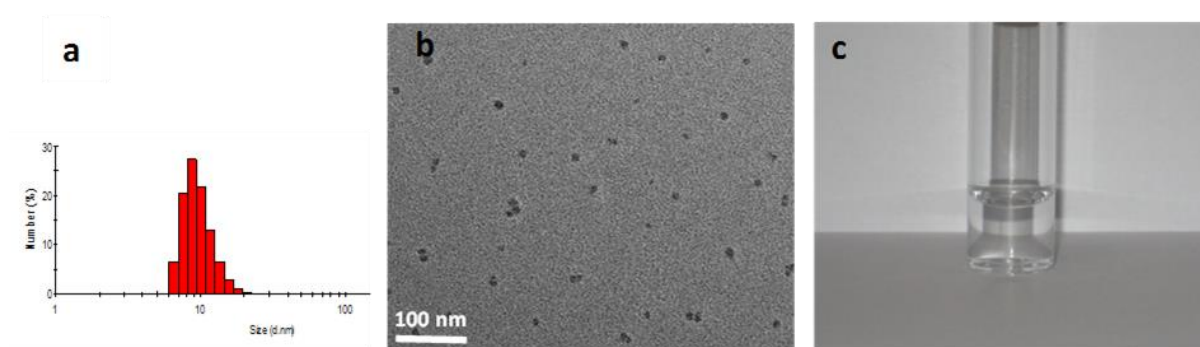


Figure 8 : a) Histogramme de la distribution en taille des nanoparticules de silice qui se trouve dans le domaine  $(10 \pm 2)$  nm, b) Image MET qui permet de déterminer une taille moyenne de  $(9 \pm 2)$  nm et c) Flacon d'une dispersion aqueuse stable de particules de  $\text{SiO}_2$ .

#### II.1.1.2.1.4.2) Préparation des nanocomposites :

Le protocole consiste à mélanger 700  $\mu\text{L}$  d'une dispersion aqueuse stable de His<sub>6</sub>-tagSWNTs avec 100  $\mu\text{L}$  d'une suspension aqueuse de nanoparticules de silice stable grâce à leurs groupements OH en surface qui créent une forte solvation avec l'eau. Après addition de  $\text{SiO}_2$  aqueux, la suspension initiale de His<sub>6</sub>-tagSWNT reste stable sans précipitation spontanée de nanocomposites ou de grandes structures insolubles (figure 9).

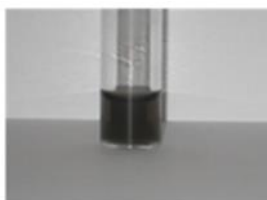


Figure 9 : dispersion aqueuse stable de nanocomposites His<sub>6</sub>-TagSWNT/ $\text{SiO}_2$ .

Notre première intuition était qu'une formation spontanée d'agrégats et une sédimentation des nanostructures se produit, comme c'était le cas pour la réaction



avec Ni (II). Cependant, la dispersion de His6-TagSWNT est restée homogène et stable lors de l'addition des nanoparticules de silice. La stabilité de la dispersion est attribuée à la grande surface du nanocomposite donc à son degré élevé de solvation par les molécules d'eau du milieu. L'excellente stabilité de la dispersion repose vraisemblablement sur un équilibre entre des liaisons d'hydrogènes inter-nanoparticules et des interactions covalentes contre des liaisons hydrogènes intermoléculaires entre le nanocomposite entier (His6-TagSWNT/SiO<sub>2</sub>) avec des molécules d'eau du solvant.

#### II.1.1.2.1.4.3) Caractérisation par Cryo-ME des nanocomposites His6-TagSWNT / SiO<sub>2</sub>

L'analyse en Cryo-HRTEM de l'échantillon révèle l'interfaçage des SWNTs avec les nanoparticules de silice via le marqueur Hexahistidine-Pyrène, ce qui conduit à un nouvel auto-assemblage hiérarchisé « His6-TagSWNT / SiO<sub>2</sub> » (Figure 9). Pour mettre en évidence les spécificités de cette architecture nanométrique, nous avons réalisé des expériences de contrôle avec des SWNT (hydrophobe) seuls (non fonctionnalisés) mélangé à la même solution aqueuse de nanoparticules de silice (hydrophiles). Ces tests témoins n'ont pas conduit aux architectures nanométriques observées précédemment, cela démontre donc le rôle fondamental des caractéristiques physico-chimiques uniques du conjugué amphiphile His<sub>6</sub>-pyrène dans notre approche ascendante utilisée pour la génération de nouveaux nanocomposites hydrosolubles.

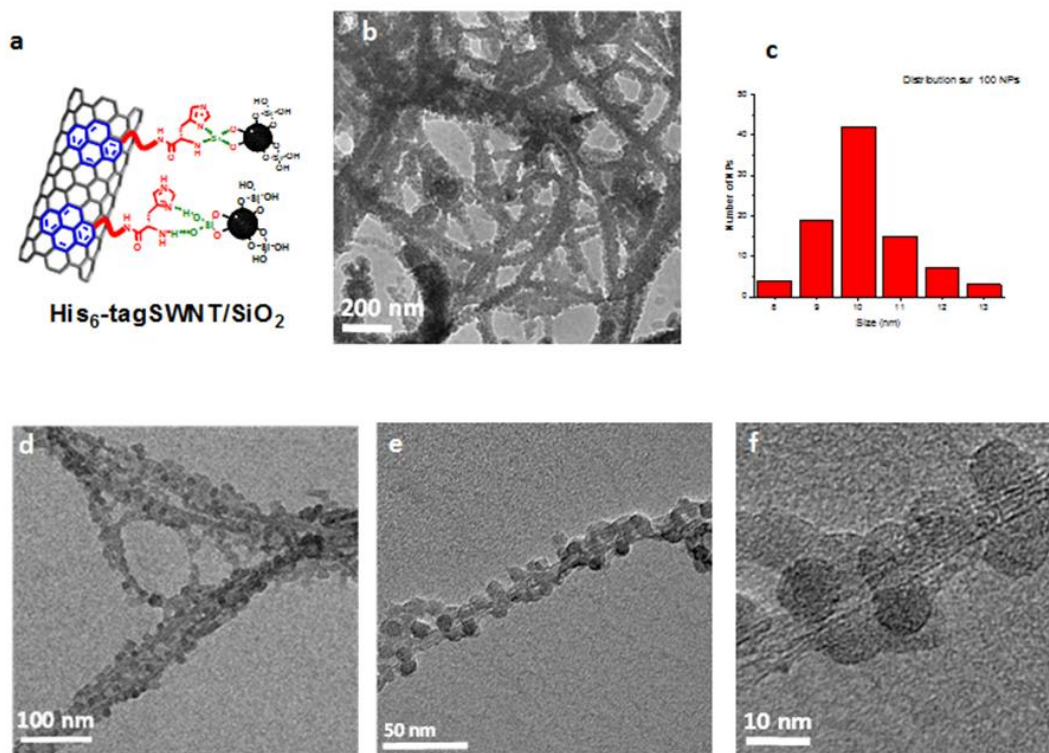


Figure 9 : images typiques de His6-TagSWNT/SiO<sub>2</sub> obtenues par Cryo-EM. (a) Représentation schématique de l'interaction His6-TagSWNT/SiO<sub>2</sub>, (b) image d'ensemble, (c) distribution en taille des billes de silice obtenue par la mesure d'une centaine de nanoparticules et (d, e et f) images par Cryo-EM haute résolution des architectures nanométriques hybrides obtenues.

Pour caractériser le nanocomposite His6-tagSWNT / SiO<sub>2</sub> du point de vue chimique, nous avons réalisé des analyses par imagerie TEM filtrée en énergie (EFTEM) et des mesures de spectroscopie de perte d'énergie électronique (EELS) sur des zones typiques de l'échantillon, toujours en conditions Cryo-EM (figure 10).

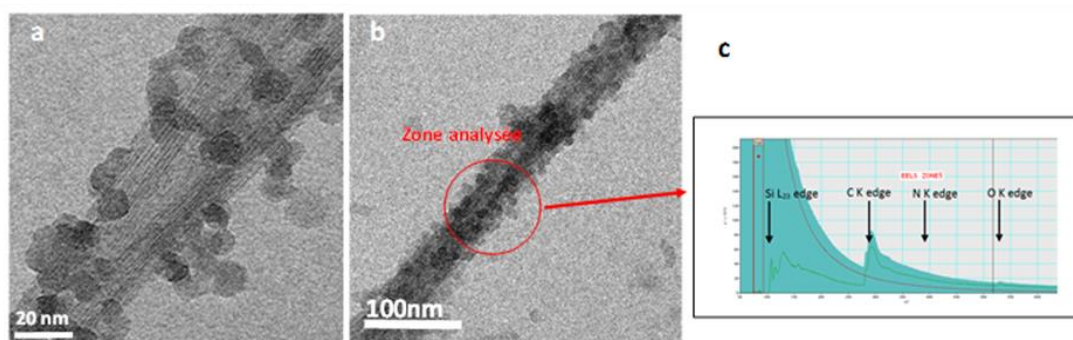


Figure 10 : (a) image TEM typique de l'échantillon analysée, (b) zone considérée pour l'analyse chimique et (c) spectre EELS correspondant mettant en évidence la présence des atomes de Si correspondants aux NPs de silices.

Un spectre EELS sur une zone sélectionnée illustre la présence de carbone, de silicium, d'oxygène (provenant des nanoparticules de SiO<sub>2</sub>) et d'azote. Ce dernier est caractéristique de la présence de la molécule à base d'hexahistidine.

### II.1.2) Conclusion :

Cette étude a permis de relever deux défis, le premier était d'être capable de fabriquer un matériau multifonctionnel et le deuxième de pouvoir le caractériser en MET sans l'endommager pour déterminer ses caractéristiques morphologiques et structurales.

Nous avons réussi avec succès à préparer un matériau multifonctionnel, le système "His6-TagSWNT", élaboré par fonctionnalisation chimique non-covalente des SWNTs. Les caractéristiques uniques de notre procédé, reposant sur l'utilisation de l'amphiphile pyrène-hexahistidine biocompatibles, ont permis l'obtention d'une dispersion aqueuse stable de His6-tagSWNT sans utiliser de conditions drastiques ou de réactifs dangereux. Ces propriétés structurales ont été étudiées par MET, analyse qui n'était pas évidente à mettre en place comme c'est le cas de tous les nanomatériaux « sensibles » constitués en partie de molécules organiques très instables sous faisceau électronique. De plus, l'idée était de les analyser dans un état proche de leur milieu natif qui est l'environnement aqueux. Nous avons donc dû

utiliser le mode Cryo-EM qui est la seule technique capable de fournir des informations directes sur la présence des molécules intactes sur l'architecture de l'ensemble ; pour ce faire, il a été indispensable tout d'abord de développer un protocole de préparation par vitrification, ensuite de réaliser l'observation à froid à une température proche de celle de l'azote liquide ( $-180^{\circ}\text{C}$ ) des échantillons préalablement congelés. Nous avons démontré grâce à la Cryo-EM que, au moyen de la fonctionnalisation chimique non-covalente et non-destructive des SWNT, des structures hybrides His<sub>6</sub>-tagSWNT ont été bien obtenues et sont susceptibles de présenter des propriétés inédites et polyvalentes induites par les propriétés du polypeptide. Par ailleurs, les analyses correspondantes par haute résolution ont apporté des informations inédites nous permettant de comprendre que la formation de ces auto-assemblages est induite soit par des liaisons hydrogènes, soit par des liaisons de coordination avec des interactions avec le nickel, soit par des liaisons covalentes. Ces propriétés intrinsèques ont ouvert la voie à une préparation efficace et spontanée du réseau SWNT/Py-His<sub>6</sub>/Ni(II)<sub>n</sub>/His<sub>6</sub>-Pyrene/SWNT et de nanocomposites solubles dans l'eau His<sub>6</sub>-tagSWNT/silice par auto-assemblage. D'autres techniques de caractérisations ont été utilisées pour apporter des informations complémentaires, comme par exemple la spectroscopie Raman qui a démontré la conservation de la structure des parois des tubes durant le processus de fonctionnalisation non covalente, ou encore l'ATG pour déterminer la quantité d'hexahistidine-pyrène impliquée dans la fonctionnalisation.

Pour résumer, cette étude a permis de développer un protocole de préparation des architectures nanométriques hybrides pour leur observation par microscopie électronique en transmission, ceci en étroite relation avec leur protocole de synthèse ; ce dernier a pu être validé grâce aux analyses par MET en mode Cryo réalisées sur l'ensemble des échantillons nécessaires pour la compréhension des étapes de fonctionnalisation et de réalisation des nanocomposites. Plus particulièrement, l'approche développée a permis de conserver l'échantillon dans son état naturel « figé » durant l'analyse TEM et par la suite de mettre en évidence les caractéristiques morphologiques et structurales des architectures obtenues pour les matériaux hybrides et les nanocomposites considérés.

## REFERENCES PREMIERE PARTIE CHAPITRE 2

1. Iijima, S.; Ichhashi, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 1993, 363, 603-605.
2. Karousis, N.; N. Tagmatarchis. Current progress on the chemical modification of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* 2010, 110, 5366-5397.
3. John, J.; Gravel, E.; Hagège, A.; Li, H.; Gacoin, T.; Doris, E. Catalytic Oxidation of Silanes by Carbon Nanotube–Gold Nanohybrids. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 7533–7536. b) Singh, P.; Lamanna, G.; Ménard-Moyon, C.; Maria Toma, F.; Magnano, E.; Bondino, F.; Prato, M.; Verma, S.; Bianco, A. Formation of Efficient Catalytic Silver Nanoparticles on Carbon Nanotubes by Adenine Functionalization. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 9893–9897.
4. a) Bottini, M.; Rosato, N.; Bottini, N. PEG-Modified Carbon Nanotubes in Biomedicine: Current Status and Challenges Ahead. *Biomacromolecules*, 2011, 12, 3381-3393. b) Kostarelas, K.; Bianco, A.; Prato, M. Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics. *Nature Nanotechnol.* 2009, 4, 627-633.
5. Shim, B. S.; Tang, Z.; Morabito, M. P.; Agarwal, A.; Hong, H.; Kotov, N. A. Integration of conductivity transparency, and mechanical strength into highly homogeneous layer-by-layer composites of single-walled carbon nanotubes for optoelectronics. *Chem. Mater.* 2007, 19, 5467-5474.
6. a) Matsumoto, K.; Fujigaya, T.; Sasaki, K.; Nakashima, N. Bottom-up design of carbon nanotube-based electrocatalysts and their application in high temperature operating polymer electrolyte fuel cells. *J. Mater. Chem.*, 2011, 21, 1187-1190. b) Lin, Y.; Watson, K. A.; Fallbach, M. J.; Ghose, S.; Smith, Jr., J. G.; Delozier, D. M.; Cao, W.; Crooks, R. E.; Connell, J. W. Rapid, Solventless, Bulk Preparation of Metal Nanoparticle-Decorated Carbon Nanotubes. *ACSNano* 2009, 3, 871–884.
7. Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of carbon nanotube. *Chem. Rev.* 2006, 106, 1105-1136.
8. a) Dieckmann, G. R.; Dalton, A. B.; Johnson, P. A.; Razal, J.; Chen, J.; Giordano, G. M.; Munoz, E.; Musselman, I. H.; Baughman, R. H.; Draper, R. K. Controlled Assembly of Carbon Nanotubes by Designed Amphiphilic Peptide Helices. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 1770–1777. (b) Karajanagi, S. S.; Yang, H. C.; Asuri, P.; Sellitto, E.; Dordick, J. S.; Kane, R. S. Protein-Assisted Solubilization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Langmuir* 2006, 22 (4), 1392–1395.
9. a) Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H. Single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 3838–3839. b) Zhang, J.; Lee, J.-K.; Wu, Y.; Murray, R. W. Photoluminescence and Electronic Interaction of Anthracene Derivatives Adsorbed on Sidewalls of Single-Walled Carbon Nanotubes.



*Nano. Lett.* 2003, 3, 403–407. c) Assali, M.; Leal, M. P.; Fernandez, I.; Romero-Gomez, P.; Baati, R.; Khair, N. Improved non-covalent biofunctionalization of multi-walled carbon nanotubes using carbohydrate amphiphiles with a butterfly-like polyaromatic tail. *Nano. Res.* 2010, 3, 764–778.

10. Arnold, M. S.; Guler, M. O.; Hersam, M. C.; Stupp, S. I. Encapsulation of Carbon Nanotubes by Self-Assembling Peptide Amphiphiles. *Langmuir* 2005, 21, 4705–4709.

11. a) Ghadiri, M. R.; Granja, J. R.; Milligan, R. A.; McRee, D. E.; Khazanovich, N. Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture. *Nature* 1993, 366, 324–327. b) Yan, X.; Zhua, P.; Li, J. Self-assembly and application of diphenylalanine-based nanostructures. *Chem. Soc. Rev.* 2010, 39, 1877–1890;

12. a) Hochuli, E.; Dobeli, H.; Schacher, A. New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* 1987, 411, 177–184; b) Ueda, E. K.; Gout, P. W.; Morganti, L. Current and prospective applications of metal ion-protein binding. *J. Chromatogr. A* 2003, 988, 1–23. c) Hart, C.; Schulenberg, B.; Diwu, Z.; Leung, W. Y.; Patton, W. F. Fluorescence detection and quantitation of recombinant proteins containing oligohistidine tag sequences directly in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 2003, 24, 599–610. d) Kim, J.; Park, H.-Y.; Kim, J.; Ryu, J.; Kwon, Y.; Do, R.; Grailhe, R. Song. Ni–nitrilotriacetic acid-modified quantum dots as a site-specific labeling agent of histidine-tagged proteins in live cells. *Chem. Commun.* 2008, 1910–1912.

13. Chen, R. J.; Zhang, Y.; Wang, D.; Dai, H. Single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123, 3838–3839.

14. a) Shen, W.; Zong, H.; D. Neff, Norton, M. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, 2009, 131, 6660–6661. b) Brellier, M.; Barlaam, B.; Mioskowski, C.; Baati R. Insight into the Complexation Mode of Bis(nitrilotriacetic acid) (NTA) Ligands with Ni<sup>2+</sup> Involved in the Labeling of Histidine-Tagged Proteins. *Chem. Eur. J.* 2009, 46, 12689–12701

15. Li, S.; He, P.; Dong, J.; Guo, Z.; Dai, L. DNA-Directed Self-Assembling of Carbon Nanotubes *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 14–15.

16. Foldvari M, Bagonluri M. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine.* 2008; 4:183–200.

17. Zhao X, Liu R. Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environ Int* 2012; 40: 244\_55.

18; Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials. *Chem Soc Rev.* 2012; 41:2323–43.

19. Madani SY, Mandel A, Seifalian AM A concise review of carbon nanotube's toxicology. *Nano Rev.* 2013 Dec 3;4. doi: 10.3402/nano.v4i0.21521.

- 20 Hasenknopf, B.; Lehn, J-M.; Kneisel, B. O.; Baum, G.; Fenske, D. (1996). "Self-Assembly of a Circular Double Helicate". *Angewandte Chemie International Edition in English*. 35 (16): 1838. doi:10.1002/anie.199618381.
21. Ariga, K.; Hill, J. P.; Lee, M. V; Vinu, A.; Charvet, R.; Acharya, S. (2008). *Science and Technology of Advanced Materials*. 9 (1): 014109. Bibcode: 2008 STAdM...9a4109A.
22. Cook, T. R.; Zheng, Y.; Stang, P. J. (2013). "Metal-organic frameworks and self-assembled supramolecular coordination complexes: Comparing and contrasting the design, synthesis, and functionality of metal-organic materials". *Chem. Rev.* 113 (1): 734–77. doi
23. Paul, R. L.; Bell, Z. R.; Jeffery, J. C.; McCleverty, J. A.; Ward, M. D. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99 (8): 4883–8.
24. Brellier, M.; Barlaam, B.; Mioskowski, C.; Baati R. Insight into the Complexation Mode of Bis(nitrilotriacetic acid) (NTA) Ligands with  $\text{Ni}^{2+}$  Involved in the Labeling of Histidine-Tagged Proteins. *Chem. Eur. J.* 2009, 46, 12689-12701.
25. R.K. Iler, *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York, 1979.
26. L.T. Zhuravlev, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2000, 173, 1- 38, The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model.
27. A.P. Legrand, H. Hommel, A. Tuel, A. Vidal, H. Balard, E. Papirer, P. Levitz, M. Czernichowski, R. Erre, H.V. Damme, *Advances in Colloid and Interface Science*, 1990, 33, 91-330, Hydroxyls of silica powders.
28. Lianos, P.; Gheorghiou, S. Solute-Solvent Interaction and its Effect on the Vibronic and Vibrational Structure of Pyrene Spectra. *Photochem. Photobiol.* 1979, 30, 355
29. Cho, E. S.; Hong, S. W.; Jo, W. H. A New pH Sensor Using the Fluorescence Quenching of Carbon Nanotubes. *Macromol. Rapid Commun.* 2008, 29, 1798-1803.
30. Chiu, C. F. ; Dementev, N. ; Borguet, E. Fluorescence Quenching of Dyes Covalently Attached to Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Phys. Chem. C*, 2011, 115, 9579-9584.
31. Kaiser, E.; Colescot, R. L.; Bossinge, C. D.; Cook, P. I. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. *Anal. Biochem.* 1970, 34, 595-598.
32. Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys.* 1988 May;21(2):129-228.
33. Baati, R.; Ihiawakrim, D.; Mafouana, R. R.; Ersen, O.; Dietlin, C.; Duportail, G. Hexahistidine-Tagged Single-Walled Carbon Nanotubes (His 6-tagSWNTs): A

Multifunctional Hard Template for Hierarchical Directed Self-Assembly and Nanocomposite Construction. *Adv. Funct. Mater.* 2012, 22 (19), 4009.

## II.2) Graphène multifeuillet par exfoliation et fonctionnalisation du graphite en une seule étape : préparation, étude par Cryo-EM et utilisation pour l'élaboration des nanocomposites hiérarchisés

En raison de ses propriétés physico-chimiques et mécaniques extraordinaires, le graphène (GN) a fait l'objet de recherches intensives dans le monde entier depuis qu'il a été isolé pour la première fois par Novoselov et coll.<sup>1</sup> Le graphène est composé d'une seule couche d'atomes de carbone structurés en nid d'abeille à deux dimensions (2D). Ainsi, il est considéré comme un nanomatériau « uniquement de surface ». De plus, une monocouche de graphène est considérée à la fois comme la matière la plus mince, la plus rigide et la plus résistante qui existe<sup>2</sup>. Ensuite, les propriétés remarquables du graphène comprennent également une conductivité thermique et une mobilité exceptionnelles des porteurs de charge<sup>3,4</sup>, ainsi que des phénomènes de transport fascinants. Par conséquent, le graphène est un matériau prometteur pour un large éventail d'applications dans la bio-nanoélectronique, les dispositifs de stockage et de détection d'énergie haute. De nouvelles applications en biologie ou en nanomédecine (délivrance de médicaments) peuvent également ouvrir de nouveaux horizons pour le graphène, car il est également considéré selon certaines études comme un matériau non toxique, ou à faible toxicité par rapport aux nanotubes ou aux nanofibres de carbone.<sup>10</sup> Nonobstant, pour exploiter pleinement les propriétés intrinsèques du graphène ainsi que les applications possibles mentionnées ci-dessus, il est nécessaire de développer une technique de préparation robuste, non toxique et à grande échelle de feuilles de graphène à une ou plusieurs couches (few layer graphène, FLG). La fabrication de matériaux à base de graphène de grande qualité et de grande surface demeure un enjeu d'une importance capitale en nanotechnologie et en science des matériaux.<sup>11</sup> À ce jour, selon l'application voulue, cinq méthodes différentes ont été utilisées pour la production de graphène monocouche ou de graphène à quelques couches.<sup>12</sup> La première est le dépôt chimique en phase vapeur (CVD) par croissance épitaxiale dans des conditions de vide poussé sur un substrat approprié.<sup>13</sup> Cette approche qui conduit au graphène mono-couche repose sur la dissolution du carbone à la surface d'un métal à haute température (1000 °C), puis sa précipitation par refroidissement du substrat métallique.

La deuxième méthode consiste en la décomposition thermique d'une plaquette de SiC sous très haute pression.<sup>14</sup>

Les feuilles de graphène peuvent également être produites par exfoliation mécanique ou pelage de couches de graphite épais. Ce processus, découvert par Geim et al, est également connu sous le nom de « scotch-tape method ». L'exfoliation mécanique

est principalement utilisée à des fins de recherche fondamentale.<sup>1</sup> On peut, par exemple, exfolier du crayon graphite pour la génération de feuilles de graphène, cependant, avec de faibles rendements et de faibles tailles.

La quatrième méthode est la création de suspensions colloïdales de graphène soit par exfoliation chimique<sup>12</sup> ou électrochimique du graphite.<sup>10,15</sup>

Le dégrafage des nanotubes de carbone a également été utilisé pour la synthèse du graphène, cependant, sous forme multicouche avec un rendement relativement faible.<sup>16</sup>

Bien que les deux premiers procédés permettent la fabrication de graphène en grandes quantités, ces technologies coûtent cher et présentent un obstacle sérieux, comme la formation de structures d'ondulation du graphène (méthode CVD) préjudiciables à la fabrication de dispositifs électroniques.<sup>7a, 13b</sup> Le coût lié à l'utilisation de substrat métallique de grande surface représente également un autre inconvénient. L'approche consistant en l'exfoliation du graphite naturel ou graphite expansé, à faible coût, en une ou plusieurs couches de graphène représente l'une des alternatives les plus prometteuses. Surtout si on peut éviter l'utilisation de produits chimiques corrosifs, les hautes températures (1000 °C) et la synthèse en plusieurs étapes ainsi que les traitements mécaniques intensifs pour produire une dispersion fonctionnalisée colloïdale du graphène, idéalement dans l'eau pure. Le développement d'une telle technique représenterait une avancée majeure pour ce domaine de recherche, et permettrait de réaliser de nombreuses applications du graphène dans le domaine électronique et offrirait de nouvelles perspectives pour interfacer, traiter et manipuler le graphène pour de nombreuses applications prometteuses dont nous avons parlé précédemment.

Dans cette première partie, nous proposons un processus simple d'exfoliation douce et efficace du graphite naturel ainsi que du graphite expansé pour obtenir une à quatre couches de graphène (FLG). Cette exfoliation est réalisée dans des conditions de température ambiante, dans l'eau pure et sous ultrasons de faible puissance. Les feuillets de graphène produits ont, en outre, été interfacés efficacement avec des nanoparticules de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnétiques (NPs) à température ambiante dans des conditions non hydrothermales, ce qui a permis d'obtenir un nanocomposite 2D. Cette conjugaison a permis d'incorporer une propriété magnétique aux autres propriétés intrinsèques du graphène. Les processus globaux d'exfoliation, fonctionnalisation et d'auto-assemblage non-covalents sont réalisés à faible consommation d'énergie et dans des milieux aqueux, deux caractéristiques fondamentales pour l'extensibilité de nos protocoles.

Nous nous sommes inspirés des travaux exposés dans la première partie de ce chapitre 2 sur la préparation de nanotubes de carbone monoparois marqués par l'hexahistidine couplée au pyrène hydrosolubles et exfoliés (His6-TagSWNTs).<sup>17</sup> Selon ces résultats, nous savons que l'oligopeptide pyrène-hexahistidine réagit fortement par physisorption via des interactions avec des surfaces planaires 2D telles que le graphène et le graphite. Cette interaction devrait finalement conduire, dans des conditions de chimie de cavitation à faible intensité et inoffensives, à l'exfoliation

du graphène et du FLG, conduisant ainsi à des dispersions colloïdales aqueuses stables. Sans conteste ces résultats suggèrent que les deux surfaces du graphène sont symétriquement fonctionnalisées avec le peptide pyrène hexahistidine (Hex<sub>6</sub>-Py), de manière dense, conduisant à un enrobage d'une bicouche peptidique Hex<sub>6</sub>-Py des feuillets de carbone, de la même manière que les phospholipides encapsulent le graphène.<sup>18</sup> Le nano-assemblage Hex<sub>6</sub>-Py-graphène (His<sub>6</sub>-tagGN) constitue une plate-forme innovante pour la bio-fonctionnalisation et la dispersion de graphène hydrophobe. L'étude et le suivi de ces différents systèmes ont été effectués par Cryo-EM, ceci a permis de prouver la faisabilité de ce concept. La Cryo-EM a été utilisée pour garder le polypeptide intact et ainsi observer ses différentes fonctionnalités à un état proche de celui de son milieu natif. Nous avons également réalisé d'autres caractérisations complémentaires pour confirmer les observations et conclusion de la Cryo-EM.

### II.2.1) Exfoliation et fonctionnalisation du graphite

Étant donné la nature hydrophobe du graphite et la forte adhérence entre les feuillets de graphène due aux forces de Van der Waals, l'exfoliation directe pour obtenir du graphène est très difficile à réaliser dans l'eau. Dans le cadre de notre étude l'intérêt pour l'obtention d'une dispersion homogène de nanomatériaux carbonés dans des milieux biocompatibles est le même que dans le cas de la première partie sur la fonctionnalisation non-covalente des nanotubes de carbone.<sup>19,20</sup> Notre approche pour l'exfoliation du graphène à partir de graphite est semblable à celle utilisée dans le cas de SWNT. Elle est basée sur la fonctionnalisation non-covalente de la surface du graphène en utilisant l'hexahistidine-pyrène biocompatibles en tant que tensioactifs. Le pyrène interagit avec la paroi latérale du nanomatériau carboné par interaction d'empilement ou de physisorption aromatique,<sup>21</sup> tandis que le polypeptide de l'amphiphile His<sub>6</sub>-Py permet la solvatation. Ceci a pour conséquence de modifier les propriétés de surface hydrophobes du graphite et du graphène. L'utilisation du phénomène de cavitation vibrationnelle (utilisation des ultrasons) fournit une force de cisaillement et une énergie thermique dans des conditions hétérogènes<sup>22</sup> pour permettre l'exfoliation du graphite qui est induite par les molécules amphiphiles dans l'eau. La stabilisation des surfaces de graphène nouvellement créées par l'enrobage simultané sur les deux faces du feuillet de graphène (de type sandwich). Ceci a pour conséquence de minimiser l'énergie du graphène hydrophobe avec de l'eau grâce aux histidines hydrophile solvatées par le milieu aqueux. On représente schématiquement le processus sur la figure 1.

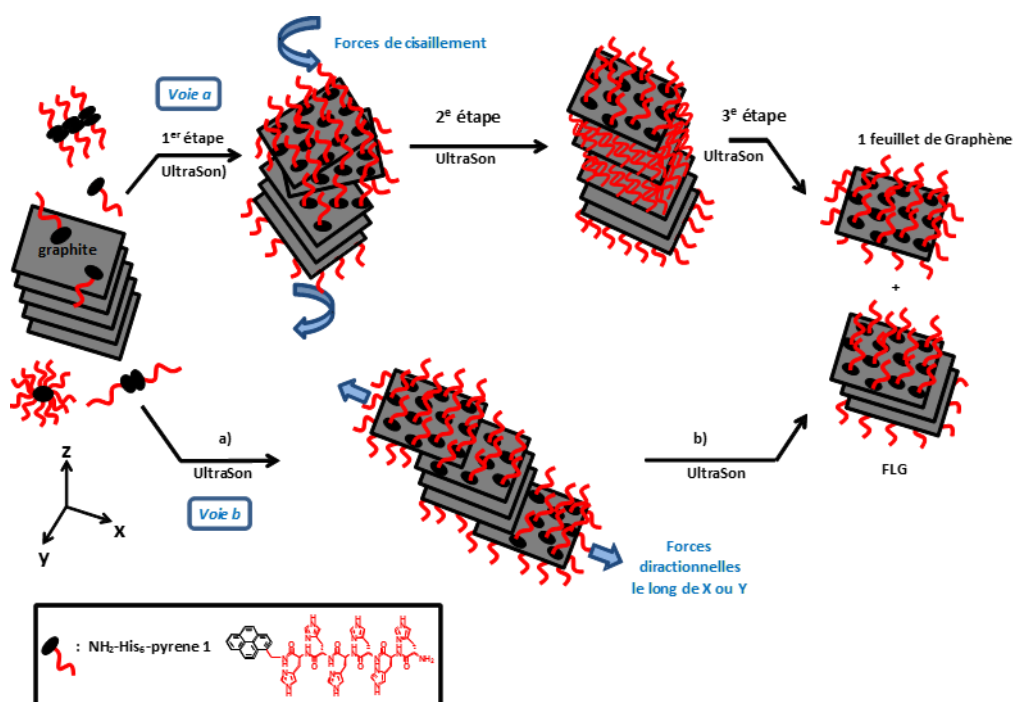


Figure1 : Fonctionnalisation et mécanisme simultané d'exfoliation du graphite pour produire du graphène monofeuillet ( $\text{His}_6\text{-tagGN}$ ) ou du graphène multifeuillet FLG ( $\text{His}_6\text{-tagFLG}$ ).

Le processus d'exfoliation du graphite passe par deux voies pour produire un mélange de graphène monofeuillet et de FLG (ici entre 2 et 4 feuillets de graphène) fonctionnalisés. Ces voies sont composées de trois étapes : (i) la création de surface de fonctionnalisation, (ii) l'étape d'intercalation et de formation de feuillets  $\beta$  et (iii) l'exfoliation et la dissociation.

### II.2.1.1) Conditions expérimentales : préparation du $\text{His}_6\text{-tagGN}$ et $\text{His}_6\text{-tagFLG}$

Nous avons réalisé deux expériences, un échantillon témoin avec le graphite seul dans l'eau distillée (1) et un mélange de graphite et de polypeptide lié au pyrène(2).



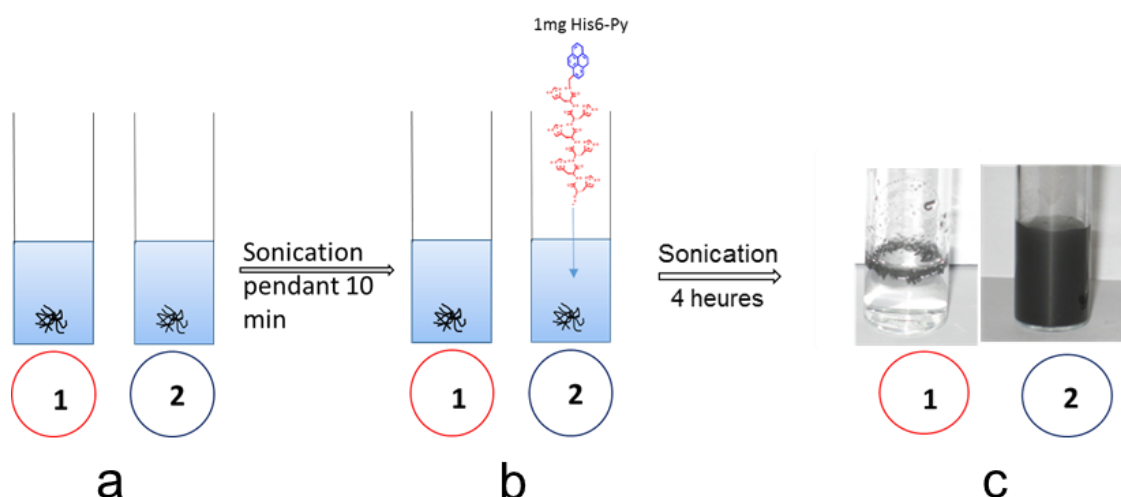


Figure 2 : Processus d'exfoliation et de fonctionnalisation du graphite.

Nous avons préparé deux tubes à essai avec 0,5 mg de graphite expansé ou de graphite naturel dans 1 ml d'eau pure. Dans le second tube à essai, on ajoute après 10 minutes de sonication 1mL d'une solution homogène de NH<sub>2</sub>-His6-pyrène<sup>17</sup> à une concentration de 1 mg / ml (2). La suspension est ensuite laissée sous influence du phénomène de cavitation pendant quatre heures à température ambiante dans un bain d'ultrason de faible fréquence (inférieure à 35 KHz). Un dépôt s'est formé dans le premier tube alors que le second a donné une suspension noire stable de His6-tagGN dispersé (Figure 2c). Il est nécessaire d'ajouter une étape de purification. Effectivement à ce stade, quelques grands agrégats fonctionnalisés et insolubles sont également formés. On les élimine tout simplement par décantation et on les sépare du surnageant aqueux noir contenant His6-tagGN. Le NH<sub>2</sub>-His6-pyrène en excès est éliminé par centrifugation pendant 30 minutes à une fréquence de 10 000 tours/minutes. Ensuite, le surnageant limpide contenant NH<sub>2</sub>-His6-pyrène n'ayant pas réagi est éliminé et les pastilles solides restantes sont redispersées dans de l'eau désionisée sous sonication (15 min). On obtient une solution noire homogène et stable sur plusieurs semaines.

### II.2.1.2) Mise en évidence des multifeuillets de graphène fonctionnalisés par le pyrène-hexahistidine :

#### II.2.1.2.1) Analyse par Cryo-EM

L'utilisation de la Cryo-EM est indispensable pour préserver l'amphiphile His6-Py fonctionnalisé en surface des feuillets de graphène. En effet, nous avons réalisé des observations en microscopie standard, sans vitrification, pour mettre en évidence ce phénomène d'endommagement du polypeptide par interaction avec les électrons du faisceau du microscope (figure 3).

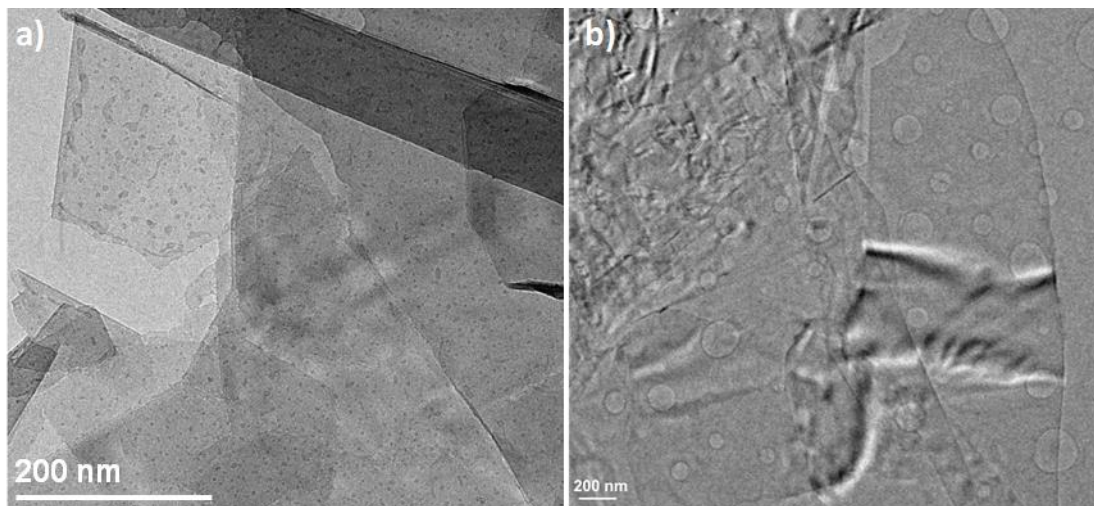


Figure 3 : a) image MET standard sans préparation spéciale et b) image Cryo-EM avec vitrification de l'échantillon.

Les observations sont réalisées sur la même solution de dispersion de His<sub>6</sub>-tagGN. L'échantillon observé sans vitrification montre la dégradation de l'hexahistidine en surface du graphène (figure 3 a). En effet, lors de l'introduction de l'échantillon dans le microscope, le vide augmente le volume de la molécule et du réseau et il se forme en surface des agrégats de peptide après juste quelques secondes d'interaction avec les électrons. Alors que sur celui qui a été préparé par vitrification et observé à froid présente une surface intacte sans modifications ni destruction de la fonctionnalisation (figure 3 b)). En conséquence, dans la suite, toutes nos études ont été effectuées par Cryo-EM.

#### II.2.1.2.1.1) Préparation des échantillons : vitrification<sup>45</sup>

Pour le protocole voir chapitre 1, paragraphe I.2.2.1.1

#### II.2.1.2.1.2) Étude de la fonctionnalisation et du degré d'exfoliation

Une analyse détaillée par Cryo-EM conventionnelle et à haute résolution a permis de mettre en évidence la présence des multifeuillets de graphène. Le nombre de feuillets

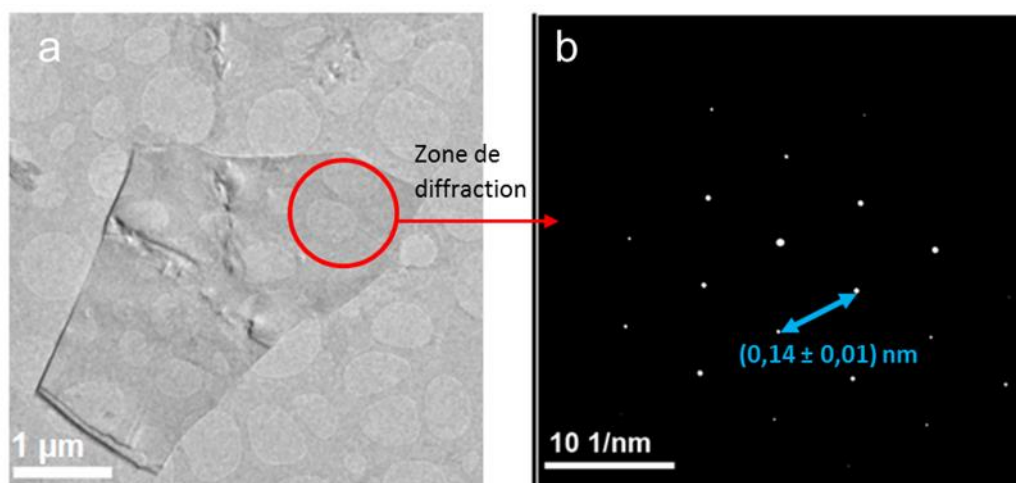


Figure 4.1 : a) image Cryo-EM d'un monofeuillet de graphène et b) la diffraction électronique correspondante.

est compris entre un et quatre et leur taille latérale entre 500 nm et 10  $\mu\text{m}$  (Figure 4.1 et 4.2). Il est important de préciser que la solution aqueuse dans laquelle ces feuillets sont dispersés reste stable après plusieurs semaines, en raison de la présence de cette fonctionnalisation de type amphiphile sur l'ensemble des feuillets. L'image en figure 4.1 a) montre un monofeuillet de plus de 4  $\mu\text{m}$  de longueur. La diffraction électronique sur une zone sélectionnée de ce graphène (SAED) confirme la présence d'une seule couche et on a bien la structure en nid d'abeille avec une distance mesurée de 0,14 nm (figure 4.1 b) représentant la distance spécifique entre les plans de graphène. Ensuite, nous avons étudié la dispersion du graphène sur plus de 100 images haute résolution. Le nombre de couche en moyenne est de 2,4 feuillets avec une prédominance de monofeuillet (figure 4.2). Ainsi, cette étude démontre la grande capacité de l'amphiphile His6-Pyrene à exfolier et fonctionnaliser le graphite.

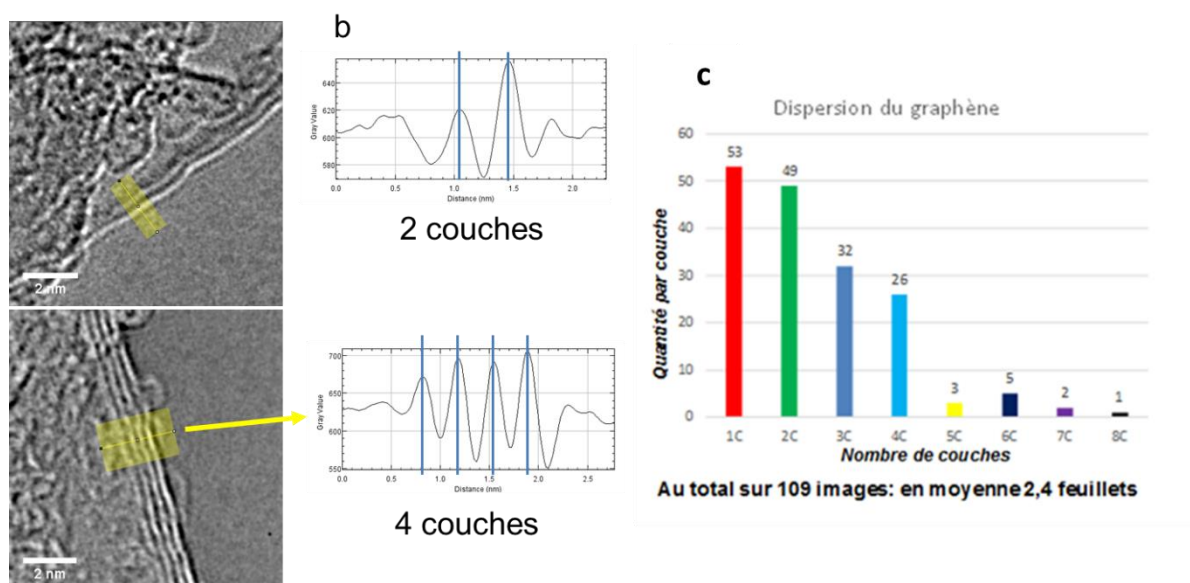


Figure 4.2 : (a) exemple d'images haute résolution utilisées pour la mesure du nombre de feuillets de graphène, (b) profile correspondant donnant le nombre de couches et (c) le diagramme représentant la distribution du nombre de feuillets de graphène dans l'échantillon.

Du point de vue phénoménologique, ce processus peut être décrit de la manière suivante : i) intercalation des molécules entre les plans « expansés » du graphène suite à l'action des ultrasons ; ii) l'hexahistidine-Pyrene interagit par physisorption à la surface avec les cycles aromatiques des plans graphitiques pour former des interactions non covalentes de type  $\pi$ - $\pi$ , minimisant l'exposition des parties hydrophobes du carbone aux molécules d'eau ; iii) le détachement des fragments fonctionnalisés de deux côtés à partir de l'agrégat de graphite initial pour former des structures FLG (Few Layer Graphene) stables. La stabilité de la solution est due à un haut degré de solubilité des peptides, ce qui conduit à une solution colloïdale très homogène de his6@graphène. Par ailleurs, une caractéristique importante est la longévité de la solution dans le temps, sans formation d'agrégats ou de superstructures complexes même après six mois, comme démontré par les analyses Cryo-EM réalisées à intervalles réguliers.

### II.2.2) Élaboration de nanocomposites 2D à partir du graphène fonctionnalisé et étude par Cryo-EM

Les multifeuillets (entre 1 et 4 couches) obtenus par des conditions douces peuvent être utilisés comme support 2D pour greffer et organiser des entités nanométriques de différents types (nanoparticules, ADN etc...) et ainsi construire des matériaux

avec des propriétés nouvelles pour des applications potentielles intéressantes.<sup>29</sup> Pour démontrer la polyvalence et la capacité du nanoassemblage His<sub>6</sub>-tagGN, nous avons étudié la possibilité d'utiliser cette plateforme multivalente pour construire un nanocomposite 2D par auto-assemblage contrôlé de nanoparticule inorganiques d'intérêt biologique.

### II.2.2.1) Auto-assemblage avec des nanoparticules de magnétite Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : His<sub>6</sub>-tagGN@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Nous avons utilisé des nanoparticules de magnétite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) avec une dispersion moyenne de 8 nm (figure 5), préparées préalablement par décomposition thermique.<sup>31</sup>

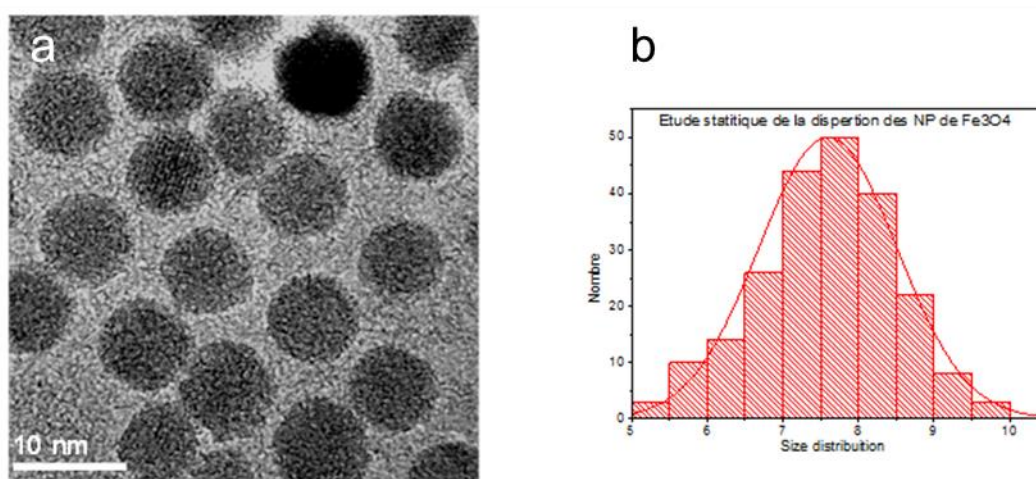


Figure 5 : a) Image MET de nanoparticules de magnétites utilisées et b) et diagramme de la distribution de taille sur 220 particules.

L'optimisation de la fonctionnalisation et de l'exfoliation a permis d'augmenter sensiblement le taux de recouvrement des NPs en surface des feuillets de graphène. L'avantage le plus probant de la magnétite est son utilité pour des applications de bio-imagerie en raison de sa faible toxicité et de sa biocompatibilité dans les milieux physiologiques.<sup>30</sup> Le squelette hexahistidine de His<sub>6</sub>-tagGN agirait comme un lieu moléculaire capable de rapprocher étroitement et de manière non covalente les NPs de la paroi du graphène (figure 6 a).



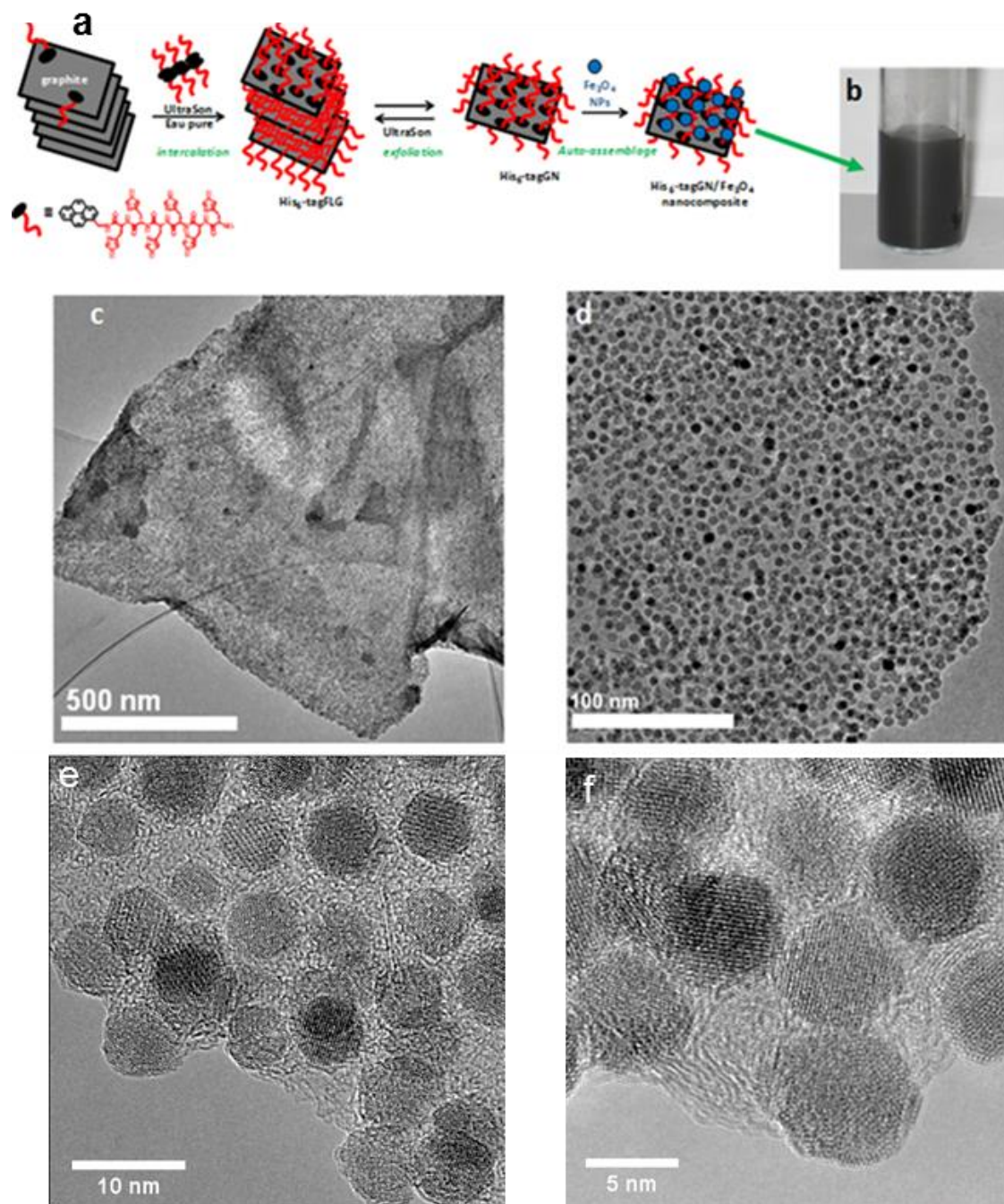


Figure 6 : (a) le processus de fonctionnalisation/exfoliation et puis l'élaboration du nanocomposite, (b) une photo de la solution stable de l'auto-assemblage, (c et d) images Cryo-EM de l'His<sub>6</sub>-tagGN@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> et (e et f) image Cryo-EM haute résolution de la surface du nanocomposite.

Le protocole de préparation de ces nanocomposites est le suivant : nous avons mélangé 1mL de la solution homogène et stable de His<sub>6</sub>-tagGN (0,25 g.L<sup>-1</sup>) avec 0,5 mg de NPs de magnétites. Après agitation, on réalise plusieurs lavages à l'eau pure pour éliminer l'excès de NPs. On obtient une solution stable et homogène (figure 6 b). Cette dernière contenant l'hybride His<sub>6</sub>-tagGN a été analysée par

cryoEM après vitrification (figure 6). On remarque une bonne dispersion des NPs sur les surfaces des feuillets de graphène ainsi qu'un fort taux de recouvrement.

### II.2.2.2) Nanocomposite avec des nanoparticules de silice $\text{SiO}_2$ : His<sub>6</sub>-tagGN@ $\text{SiO}_2$

Nous avons également étudié l'auto-assemblage avec des nanoparticules de silice comme nous l'avons fait avec les nanotubes de carbone. La technique de synthèse utilisée pour produire des NPs de  $\text{SiO}_2$  est la même que celle précédemment utilisée dans le cas de l'auto-assemblage His<sub>6</sub>-tagSWNT (voir § I.2.2.1.4.1).<sup>41,42</sup> La préparation de cet auto-assemblage est le suivant : on mélange 500  $\mu\text{L}$  d'une dispersion aqueuse stable de His<sub>6</sub>-tagGN avec 100  $\mu\text{L}$  d'une solution aqueuse stable de nanoparticules de silice préparée préalablement.<sup>41</sup> Après addition de  $\text{SiO}_2$  aqueux, la suspension initiale de His<sub>6</sub>-tagGN reste stable sans précipitation spontanée de nanocomposites insolubles ou d'agrégats (figure 7 a).

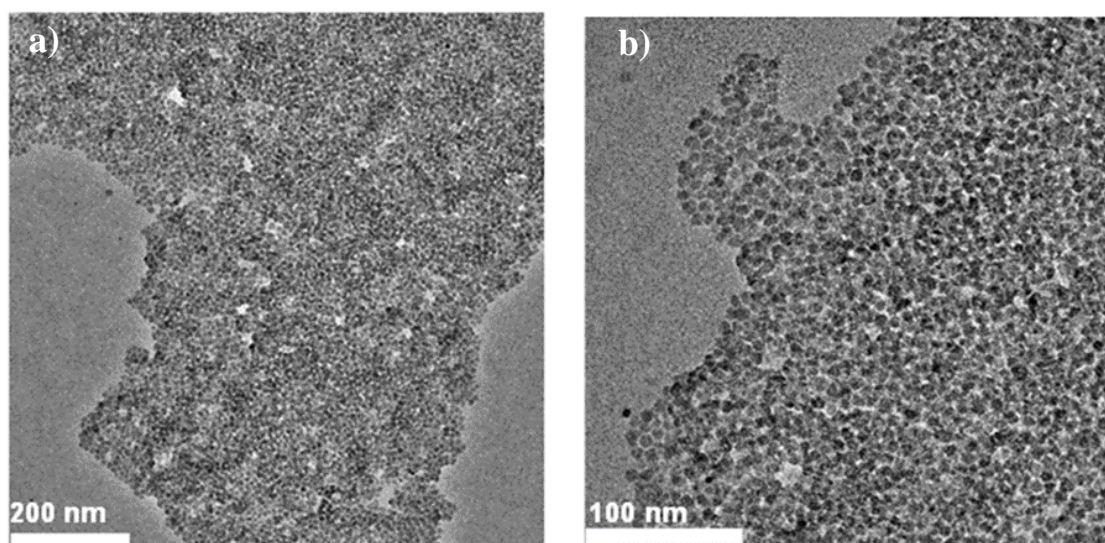


Figure 7 : images Cryo-EM du nanocomposite His<sub>6</sub>-tagGN@ $\text{SiO}_2$

L'utilisation de nanoparticules fonctionnelles en biotechnologie est un domaine en pleine expansion et qui a fait l'objet de nombreux articles de revues ou de livres.<sup>33-40</sup> Les nanoparticules de silice constituent une catégorie particulièrement intéressante, principalement due à leur biocompatibilité, à leur transparence à la gamme de l'UV proche de l'infrarouge et à leur grande stabilité physico-chimique. De plus, comme déjà mentionné dans la première partie de ce chapitre, la surface de la silice est



facilement fonctionnalisable, ce qui est généralement une étape indispensable pour les applications en biotechnologie.

La Cryo-EM montre une très bonne dispersion et un taux de remplissage important sur les surfaces des feuillets de graphène. Elle démontre également que l'élaboration de nanocomposites par auto-assemblage se fait aussi bien avec des NPs de magnétite qu'avec des NPs de silice. En effet, ici on souligne la polyvalence de la plateforme His6-tagGN. Différents types d'applications exploitant la présence des groupements de fonction à la surface du graphène ou FLG peuvent être envisagées : i) magnétisme, nanostructures magnétiques organisées (par exemple,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  voir ci-dessus); ii) nano-optique, en remplaçant les nanoparticules magnétiques ci-dessous avec des nanoparticules présentant des propriétés optiques particulières (à base de  $\text{SiO}_2$ , d'Au, Ag etc) ; iii) biologie: en attachant ADN/ARN ou protéines ; iv) utilisation comme matrice pour la réalisation de matériaux hybrides de différents types, par exemple, avec des polymères.

## II.3 Conclusion du chapitre 2.

Nous avons présenté le développement d'une nouvelle approche d'élaboration de différents systèmes fonctionnels basée sur la chimie cavitationnelle (ultrason) en utilisant des conditions douces. Puis, nous avons progressivement étudié ces systèmes par Cryo-EM et avec d'autres techniques complémentaires pour étudier leurs propriétés structurales. Nous avons montré que la Cryo-EM est indispensable pour échapper à la grande fragilité du marqueur Hexahistidine-pyrène. Avec cette technique, on a réussi à mettre en évidence la fonctionnalisation et l'exfoliation du graphène avec la molécule hexahistidine-pyrène. De plus, elle nous a permis de mesurer statistiquement le nombre de feuillets de graphène et de démontrer que le processus de fonctionnalisation mis en place est efficace. En effet avec des conditions douces, basées sur l'utilisation des ultrasons à faibles fréquence, nous avons réussi à exfolier le graphite pour l'obtention de monofeuillets de graphène.

Cette nouvelle approche, permet l'exfoliation non-covalente et la fonctionnalisation du graphène avec le peptide pyrène-hexahistidine biocompatible en une seule étape pour produire des suspensions aqueuses colloïdales stables et traitables de His6-TagGraphene (His6 @ GN). Les principales caractéristiques de notre procédé sont : 1) faible consommation d'énergie, 2) fonctionnement à température ambiante, 3) utilisation de l'eau comme solvant, dans des conditions non tamponnées, 4) non destructives au réseau graphitique, et 5) permet d'obtenir de grandes surfaces et de graphène hydrosoluble ou de feuilles de graphène à plusieurs couches de haute qualité structurale, comparées à celles préparées par des méthodes d'abrasion mécanique ou de réduction chimique de GO. Il est probable que des nanofeuillets uniques de His6-TagGN puissent être produits simultanément et de manière aléatoire dans les suspensions aqueuses colloïdales qui, finalement, se remplissent via une forme intercalée en FLG. Nous avons ensuite exploité les propriétés 2D-multivalence de His6-TagGN pour les interfacer, par auto-assemblage hiérarchique, avec des NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnétiques dans des conditions aqueuses et non-hydrothermales (température ambiante), conduisant à la formation de nanocomposites 2D magnétiques. Il est prévisible que la multivalence des nanostructures His6-TagGN élargira l'utilisation du graphène en chimie (catalyse hétérogène ...), biologie, nanoélectronique et en science des matériaux pour la génération de nanodispositifs intelligents avec des propriétés physiques adaptées.

D'autres développements sont en cours au laboratoire afin d'optimiser et de préparer des échantillons de nanorubans simples, solubles dans une solution aqueuse, et d'exploiter le plein potentiel de ces nanocomposites pour les applications mentionnées ci-dessus.

## REFERENCE DEUXIEME PARTIE CHAPITRE 2

1. K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, *Science* 2004, 306, 666.
2. C. Lee, X. Wei, J. W. Kysar, J. Hone *Science*, 2008, 321, 385-388.
3. A. A. Balandin, S. Ghosh, W. Bao, I. Calizo, D. Teweldebrhan, F. Miao, C. N. Lau *Nano Lett.* 2008, 8, 902–907.
4. a) K.I. Bolotin, K.J. Sikes, Z. Jiang, M. Klima, G. Fudenberg, J. Hone, P. Kim, H.L. Stormer *Solid State Commun.* 2008, 146, 351-355. b)
5. Meryl D. Stoller, Sungjin Park, Yanwu Zhu, Jinho An and Rodney S. Ruoff 2008, 8, 3498–3502.
6. Y. Zhang, Y.-W. Tan, H. L. Stormer, P. Kim *Nature*, 2007, 448, 457-460.
7. a) K. S. Kim, Y. Zhao, H. Jang, S. Y. Lee, J. M. Kim, K. S. Kim, J.-H. Ahn, P. Kim, J.-Y. Choi, B. H. Hong *Nature*, 2009, 457, 706-710. b) A. Reina, X. Jia, J. Ho, D. Nezich, H. Son, V. Bulovic, M. S. Dresselhaus, J. Kong *Nano Lett.* 2009, 9, 30-35.
8. Y. Yang, R. Pang, X. Zhou, Y. Zhang, H. Wu, S. Guo *J. Mat. Chem.* 2012, 22, 23194-23200.
9. V. Georgakilas, M. Otyepka, A. B. Bourlinos, V. Chandra, N. Kim, K. C. Kemp, P. Hobza, R. Zboril, K. S. Kim *Chem. Rev.* 2012, 112, 6156–6214.
10. D. Wei, L. Grande, V. Chundi, R. White, C. Bower, P. Andrew, T. Ryhänen *Chem. Commun.* 2012, 48, 1239-1241.
11. A. N. Obraztsov *Nature Nanotech.* 2009, 4, 212-213.
12. a) S. Park, R. S. Ruoff, *Nature Nanotech.* 2009, 4, 217-224. b) X. An, T. Simmons, R. Shah, C. Wolfe, K. M. Lewis, M. Washington, S. K. Nayak, S. Talapatra, S. Kar *ACS. Nano*, 2010, 10, 1295-4301.
13. a) M. Eizenberg, J. L. Blackely *Surf. Sci.* 1970, 82, 228-236. b) A.N. Obraztsov, E.A. Obraztsova, A.V. Tyurnina, A. A. Zolotukhin *Carbon*, 2007, 45, 2017-2021. c) T. Aizawa, R. Souda, R. Otani, Y. Ishizawa, C. Oshima *Phys. Rev. Lett.* 1990, 64, 768-771.
14. C. Berger, Z. Song, X. Li, X. Wu, N. Brown, C. Naud, D. Mayou, T. Li, J. Hass, A. N. Marchenkov, E. H. Conrad, P. N. First, W. A. de Heer *Science* 2006, 312, 1191-1196.

15. C.-Y. Su, A.-Y. Lu, Y. Xu, F.-R. Chen, A. N. Khlobystov, L.-J. Li *ACS Nano*, 2011, 5, 2332-2339. b) J. Wang, K. K. Manga, Q. Bao, K. P. Loh *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 8888-8891.
16. A. Ambrosi, S. Y. Chee, B. Khezri, R. D. Webster, Z. Sofer, M. Pumera *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, 50, 1-5.
17. R. Baati, D. Ihiawakrim, R. R. Mafouana, O. Ersen, C. Dietlin, G. Duportail, *Adv. Funct. Mat.* 2012, 22, 4009-4015.
18. a) A. V. Titov, P. Král, R. Pearson *ACS. Nano* 2010, 1, 229-234. b) A. A. Green, M. C. Hersam, *Nano Lett.* 2009, 9, 4031-4036. c) A. A. Green, M. C. Hersam, *J. Phys. Chem. Lett.* 2010, 1, 544-549. d) S.-J. Liu, Q. Wen, L.-J. Tang, J.-H. Jiang *Anal. Chem.* 2012, 84, 5944-5950.
19. Assali, M.; Leal, M. P.; Fernandez, I.; Romero-Gomez, P.; Baati, R.; Khiar, N. *Nano. Res.* 2010, 3, 764-778.
20. Khiar, N.; Pernia Leal, M.; Baati, R.; Ruhlmann, C.; Mioskowski, C.; Schultz, P.; Fernandez, I. *Chem. Com.* 2009, 4121-4123. f) Assali, M.; Pernia Leal, M.; Fernández, I.; Baati, R.; Mioskowski, C.; Khiar, N. *Soft Matter*, 2009, 5, 948-950.
- 21) a) R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 3838; b) J. Zhang, J.-K. Lee, Y. Wu, R. W. Murray, *Nano Lett.* 2003, 3, 403. c) Y. Xu, H. Bai, G. Lu, C. Li, G. Shi *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 5856-5857.
- 22) J. H. Bang, K. S. Suslick *Adv. Mat.* 2010, 22, 1039-1059
- 23) M. I. Katsnelson, A. Fasolino *Acc. Chem. Res.* 2012,
- 24) H. S. S. R. Maty, K. S. Subrahmanyam and C. N. R. Raon *Nanomater. Nanotechnol.* 2011, 1, 3-13.
- 25) R. Saito, M. Hofmann, G. Dresselhaus, A. Jorio, M. S. Dresselhaus *Adv. Phys.* 2011, 60, 413-550.
- 26) Y.-W. Tan, Y. Zhang, K. Bolotin, Y. Zhao, S. Adam, E. H. Hwang, S. Das Sarma, H. L. Stormer, P. Kim, *Phys. Rev. Lett.* 2007, 99, 246803.
- 27) I. Janowska, F. Vigneron, D. Bégin, O. Ersen, P. Bernhardt, T. Romero, M. J. Ledoux, C. Pham-Huu, *Carbon* 2012, 50, 3106-3110.
- 28) T. Schwamb, B. R. Burg, N. C Schirmer, D. Poulikakos, *Nanotechnol.* 2009, 20, 405704.
- 29) D. Wu, F. Zhang, P. Liu, X. Feng *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 10804-10812.
- 30) a) F. He, J. Fan, D. Ma, L. Zhang, C. Leung, H. L. Chan *Carbon*, 2010, 48, 3139-3144. b) W. Chen, P. Li, Y. Zhang, L. Zhang, Z. Deng, Z. Zhang *ACS App. Mat. Int.* 2011, 3, 4085-4091.

- 31) B. P. Pichon, O. Gerber, C. Lefevre, I. Florea, S. Fleutot, W. Baaziz, M. Pauly, M. Ohlmann, C. Ulhaq, O. Ersen, V. P.-B., P. Panissod, M. Drillon, and S. Begin-Colin *Chem. Mat.* 2011, 23, 2886-2900.
- 32) W. Baaziz, B. P. Pichon, S. Fleutot, Y. Liu, C. Lefevre, J-M. Greneche, M. Toumi, T. Mhiri and S. Begin-Colin. *J. Phys. Chem. C*, 2014, 118, 3795–3810
- 33) Knopp, D.; Tang, D.; Niessner, R., *Anal. Chim. Acta* 2009, 647 (1), 14-30.
- 34) Niemeyer, C. M., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40 (22), 4128-4158.
- 35) Sharma, P.; Brown, S.; Walter, G.; Santra, S.; Moudgil, B., *Adv. Colloid Interface Sci.* 2006, 123-126, 471-485.
- 37) Hom, L.; Tamanoi, J. *Mater. Chem.* 2009, 19, 6308-6316.
- 38) Tan, W.; Wang, K.; He, X.; Zhao, X. J.; Drake, T.; Wang, L.; Bagwe, R. P., *Med. Res. Rev.* 2004, 24 (5), 621-638.
- 39) De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M., *Adv. Mater.* 2008, 20 (22), 4225-4241.
- 40) Bulte, J. W.; Modo, M. M., *Nanoparticles in biomedical imaging*. Springer Science+Business Media LLC: 2007; Vol. 3.
- 41) R.K. Iler, *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York, 1979.
- 42) L.T. Zhuravlev, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2000, 173, 1- 38, The surface chemistry of amorphous silica. Zhuravlev model.
- 43) Zhang Y, Li D, Tan X, Zhang B, Ruan X, Liu H, Pan C, Liao L, Zhai T, Bando Y. *Carbon*, 2013, 54:143–148
- 44) Cho, E. S.; Hong, S. W.; Jo, W. H. A New pH Sensor Using the Fluorescence Quenching of Carbon Nanotubes. *Macromol. Rapid Commun.* 2008, 29, 1798-1803.
- 45) Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P. Q Rev Biophys. 1988 May ;21(2) :129-228.

# CHAPITRE 3

## CHAPITRE III

### III. Couplage des techniques de Cryo-STEM à haute résolution et de cartographie EDX pour l'étude d'un matériau hybride et d'un cristal moléculaire ; techniques de préparation spécifiques

Dans ce chapitre on présente deux études distinctes de deux types de matériaux différents mais dont le comportement vis-à-vis des électrons est très proche. En effet, ils sont relativement sensibles à une exposition, même de courte durée, au faisceau d'électrons. De plus, ils sont très délicats à préparer pour l'analyse au microscope électronique en transmission. Nous avons donc développé des protocoles de préparations et d'observations spécifiques qui sont présentés respectivement pour les deux études. Ce chapitre comporte deux parties, dans la première nous présentons l'étude d'un matériau hybride de type lamellaire. Il s'agit d'une structure pérovskite constituée de feuillets minéraux entre lesquels sont insérées des composés organiques. Le but a été de mettre en évidence la taille de l'intercalation ainsi que la localisation du cuivre dans la structure lamellaire. Ensuite en deuxième partie, nous présentons les résultats obtenus sur l'étude d'un cristal moléculaire composé de deux cristaux moléculaires séparée par une interface. Dans ce deuxième cas, le but est de mettre en évidence cette interface et les relations entre les deux cristaux.



### III.1) Études de l'effet de l'insertion d'un métal paramagnétique dans une pérovskite Aurivillius

Les matériaux lamellaires hybrides sont constitués de feuillets minéraux entre lesquels sont insérées ou greffées des composés organiques.<sup>1</sup> Les propriétés de ces composés hybrides dépendent de la cohésion des feuillets minéraux et de leur possibilité de modification par hybridation.<sup>2,3</sup> Les stratégies d'hybridation doivent être ajustées en fonction, d'une part, de la structure et de la composition chimique des feuillets minéraux et de leur charge électrostatique, et d'autre part de la nature des espèces organiques insérées et de leur mode d'association.<sup>4,5</sup>

Les Pérovskites à ions échangeables de structure lamellaire présentent des propriétés physiques particulièrement intéressantes telles que la ferroélectricité ou des propriétés optiques particulières de luminescence ou spécifiques à l'optique non linéaire.<sup>7-11</sup> Nos collègues du département DCMI (Guillaume Rogez et Pierre Rabu) sont particulièrement intéressés par la fonctionnalisation d'une phase Aurivillius de formule  $\text{Bi}_2\text{SrTa}_2\text{O}_9$  (BST), connue pour ses propriétés ferroélectriques.<sup>6</sup> Pour ce faire, ils utilisent les méthodes d'élaboration de nanomatériaux hybrides reposant sur la « chimie douce ». <sup>12</sup> Par ce procédé, il est possible de générer concomitamment dans un même matériau des composés organiques et des composés inorganique afin d'obtenir des structures hybrides.<sup>13</sup> L'intérêt de l'insertion d'un métal paramagnétique entre les feuillets est d'obtenir une propriété supplémentaire telle que le ferromagnétique.

#### III.1.1 Intérêt d'étudier ces pérovskites Aurivillius par MET

Ces matériaux peuvent être fonctionnalisés par divers cations mono ou bivalents y compris les alkyl-ammonium.<sup>14-18</sup> Ceci permet d'ajuster l'espacement ainsi que la composition de la couche intermédiaire, ce qui a pour conséquence de faire varier les propriétés des composés hybrides finals. Récemment, nos collaborateurs ont développé une méthode de synthèse innovante en utilisant le rayonnement micro-onde pour l'insertion de certaines molécules organiques ce qui a permis un gain considérable sur le temps de réaction.<sup>6,19</sup> De plus, ils ont utilisé cette méthode avec succès pour insérer des métaux paramagnétiques (Cu, Ni).

L'étude en microscopie électronique en transmission de cette structure lamellaire permet de mettre en évidence son arrangement ainsi que l'influence de la taille des molécules organiques sur l'espacement entre les feuillets en observation directe. Il est très important dans ce projet de localiser les métaux insérés dans la structure de

cette pérovskite. Pour ce faire, il a été nécessaire de développer des méthodes de préparation et d'observation spécifiques étant donné leur fragilité lorsqu'ils sont soumis à l'irradiation électronique. Les analyses ont été réalisées par la combinaison de coupes réalisées par ultramicrotomie<sup>20,21</sup> et des observations à froid, à une température ajustée expérimentalement, en modes balayage à haute résolution STEM-HAADF et spectroscopie EDX. Ceci nous a permis de déterminer la périodicité de la structure lamellaire, l'espacement entre les couches, de confirmer la structure cristallographique ainsi que les compositions chimiques des différents feuillets et de l'espace inter-couches.

### III.1.1.2 Présentation des échantillons :

Plusieurs configurations de ces matériaux ont été étudiées telles que la variation de l'espace entre feuillets en fonction de la taille des molécules organiques ou encore l'intercalation du cuivre avec différents types d'amines. Cependant nous nous restreignons à présenter ici uniquement l'étude de trois échantillons.

La technique développée pour l'insertion de métaux paramagnétique, ici en l'occurrence le cuivre (II), est faite par chimie douce en utilisant les micro ondes.<sup>6</sup> Avant l'insertion du métal Cu(II) dans la pérovskite Aurivillius  $\text{Bi}_2\text{SrTa}_2\text{O}_9$  appelé BST, elle a été protonnée et devient  $\text{H}_2\text{Bi}_{0.1}\text{Sr}_{0.85}\text{Ta}_2\text{O}_7$  appelé HST.

Les trois échantillons étudiés sont : i) la HST seule, ii) HST avec la polyamine et iii) le troisième avec des ions de cuivre libres.

- Échantillon de référence HST : correspondant à la phase BST protonnée
- Échantillon avec la polyamine, noté N-HST : HST intercalé par la polyamine ( $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ ) noté « N »
- Échantillon solide vert (ESV) : à N-HST sont ajoutés des ions de Cu(II) dits « libres » sous forme de nitrate de cuivre hydraté ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ )

### III.1.1.3. Protocole de synthèse :

Les méthodes de synthèse classique présente l'inconvénient majeur d'être très longues dans le temps, typiquement plusieurs jours.<sup>22</sup> Cette échelle de temps de réaction limite intrinsèquement le type de molécules pouvant être inséré à des molécules très stables et très simples. Afin de surmonter ce problème, la protonation et la fonctionnalisation subséquente de la phase de  $\text{Bi}_2\text{SrTa}_2\text{O}_9$  Aurivillius ont été

réalisées par micro-ondes.<sup>6</sup> Cette méthode permet de fonctionnaliser le BST de départ en quelques heures au lieu de plusieurs jours et cela a pour avantage d'augmenter sensiblement le nombre de molécules utilisable pour fonctionnaliser cette phase avec des amines beaucoup plus complexes.

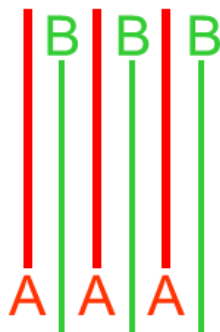


Figure 1 : L'échantillon est composé de feuillets chargés d'oxyde de tantale à structure pérovskite, de formule  $[Bi_{0.1}Sr_{0.85}Ta_2O_7]^{2-}$  (A), la charge négative est compensée dans l'espace interlamellaire (B) par 2 ions  $H^+$  (cas de HST).

La synthèse se produit en deux étapes :

- Protonation de la pérovskite Aurivillius : HST

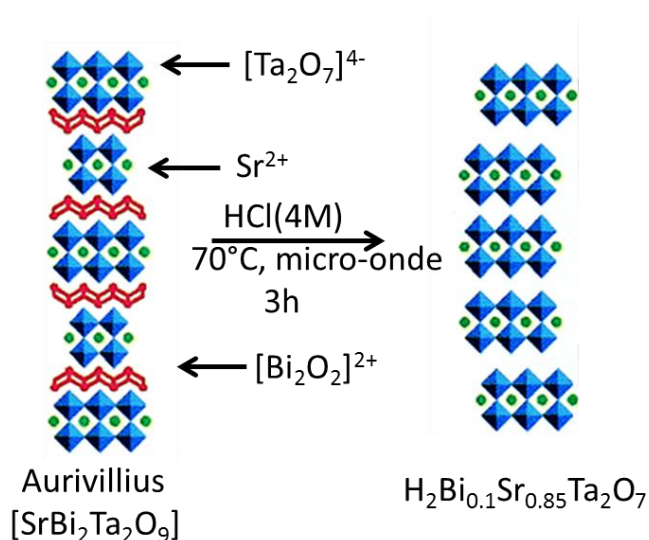


Figure 2 : protonation de la pérovskite Aurivillius assistée par micro-ondes.

La réaction de protonation de la pérovskite Aurivillius BST se fait avec une solution de HCl de 4 mol/L à 70°C dans un four à micro-onde. Après deux heures la forme HST est obtenue. Cette étape est importante car la phase protonnée permet l'insertion de nombreuses molécules.<sup>23</sup>

- Intercalation par une polyamine : N-HST

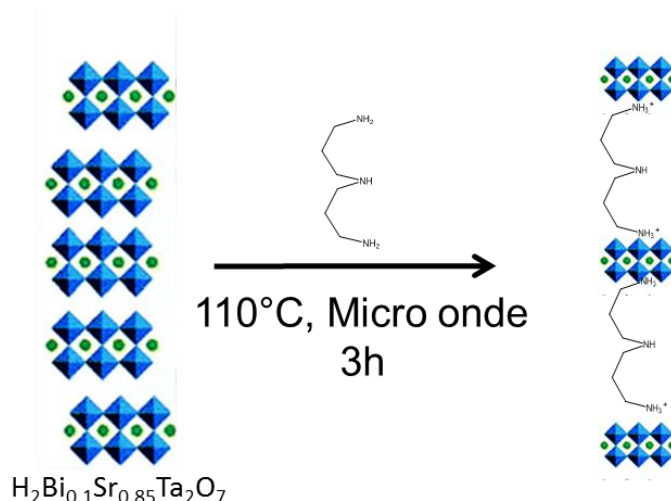


Figure 3 : insertion de la polyamine bis-(3-aminopropyl) à 110°C pendant 3 heures sous irradiation de micro-ondes.

L'intercalation de HST par cette polyamine est faite pour obtenir deux groupes terminaux  $\text{NH}_2$ . Effectivement, ces derniers jouent le rôle de pilier entre les couches minérales laissant ainsi l'amine secondaire centrale libre pour permettre la coordination d'ions métalliques ou de complexes.

- Insertion du Cuivre : ESB et ESV

Afin d'immobiliser les ions cuivre dans l'espace inter-couche de l'HST, deux réactions différentes utilisant N-HST ont été utilisées, i) l'une avec  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ , ii) l'autre

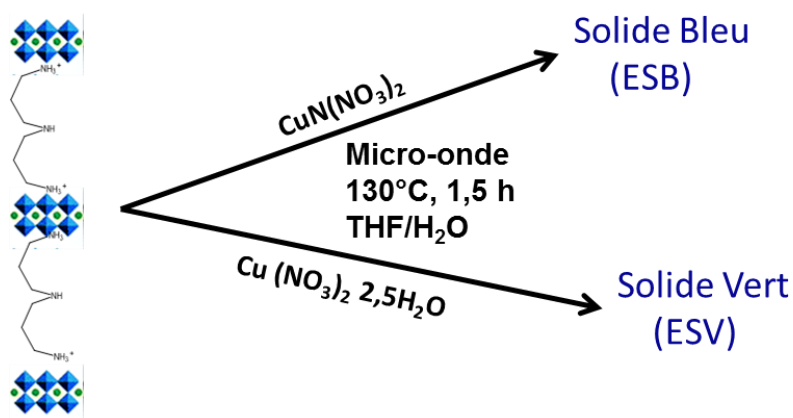


Figure 4 : Réaction d'insertion indirecte des ions de cuivre assistée par micro-onde

avec le complexe  $\text{CuN}_3(\text{NO}_3)_2$ , les deux par irradiation aux micro-ondes (voir figure 4). Après réaction, un solide vert (ESV) et un solide bleu (ESB) ont été obtenus respectivement.

Les distances interlamellaires entre feuillets ont été obtenues par l'analyse des quatre poudres par diffraction des rayons X (Figure 4.1) dans le cadre d'une thèse réalisée dans le département DCMi Yanhui Wang. Cette technique de caractérisation

a permis de calculer les distances suivantes de 0,98 nm, de 1,82 nm, de 1,2 nm et de 1,76 nm des échantillons HST, HST-polyamine, ESV et ESB respectivement.

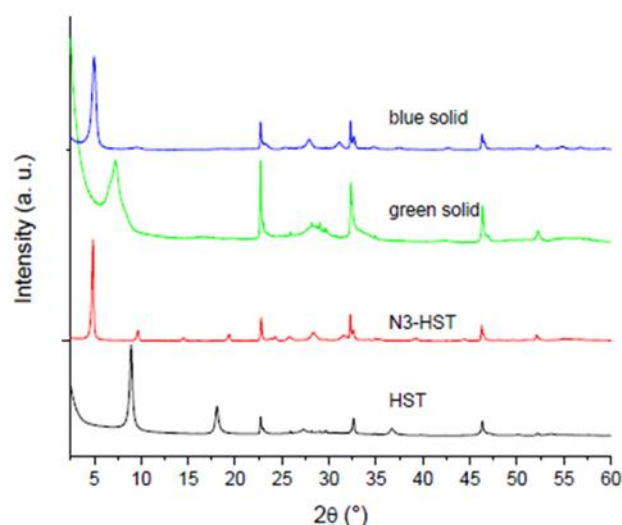


Figure 4.1 : diffractogrammes des poudres HST, HST-polyamine, solide vert (ESV) et solide bleu (ESB).

#### III.1.1.4 Étude par microscopie électronique en transmission :

Les préparations standards de ces échantillons n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Ceci pour plusieurs raisons, comme par exemple : la préparation par broyage détruit la structure lamellaire, la préparation par dispersion dans un solvant sous ultrasons produit des agrégats trop épais. Pour contourner ces difficultés de préparation, nous avons mis en place une stratégie nous permettant d'obtenir les meilleures conditions de préparation. De plus, nous avons utilisé la Cryo-EM pour les observations<sup>24,25</sup>, en sachant que ces matériaux sont doublement sensibles, à la mise sous vide et à l'interaction avec les électrons qui peuvent détruire l'organisation structurale.

##### III.1.1.4.1) Choix de la préparation :

Nous avons choisi l'ultramicrotomie pour plusieurs raisons. Tout d'abord c'est une technique qui permet d'obtenir des sections ultrafines et par ailleurs, elle permet d'obtenir facilement l'orientation que l'on désire.

## III.1.1.4.1.1) Protocole de préparation des sections ultrafines :

Nous avons utilisé plusieurs types de résines et différentes méthodes d'enrobage pour trouver les meilleures conditions d'encapsulation nécessaire à la préparation. La résine utilisée est une époxy commerciale très fluide et l'enrobage qui a donné les meilleurs résultats a été réalisé à température ambiante sous pression de deux bars (voir chapitre 1 paragraphe I.3).

## III.1.1.4.2) Caractérisation par Cryo-EM en mode balayage (STEM) :

Pour préserver la structure hybride de ces matériaux, en minimisant au maximum l'influence du vide et des électrons, nous avons utilisé la préparation par vérification des sections obtenues par la technique présentée précédemment et on a réalisé les études à froid ( $-160^{\circ}\text{C}$ ). Les quatre échantillons présentés au début de ce chapitre ont été sélectionnés pour obtenir une étude systématique. Le but est de mettre en évidence la structure lamellaire, de résoudre la distance intercalaire entre les feuillets, de réaliser une comparaison entre ces matériaux et de localiser les différents éléments chimiques par analyse chimique. La méthodologie pour déterminer la distance inter-lamelles que nous avons utilisée consiste dans la réalisation de statistiques sur au moins 100 particules de plusieurs sections.

## III.1.1.4.2.1) HST :

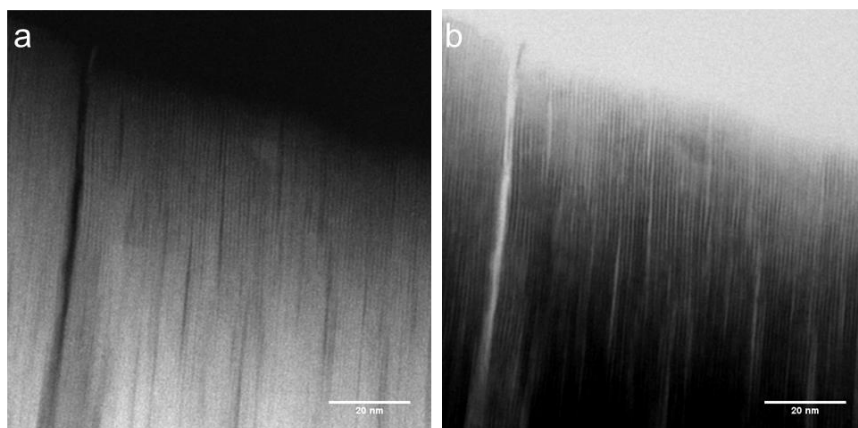


Figure 5 : images STEM du réseau lamellaire de la pérovskite HST, a) champ sombre HAADF et b) champ clair.

Cette pérovskite Aurivillius protonnée, présentée précédemment, a une distance d'interlamellaire de 0,98 nm. Cette distance a été calculée à partir de diffractogrammes de rayons X. Sur cet échantillon, la microscopie nous permet d'une

part de mettre en évidence la structure lamellaire à grande échelle (voir figure 5) et d'autre part d'obtenir la distance moyenne entre les feuillets en haute résolution STEM (voir figure 6). Le couplage de la préparation des sections de 70 nm en mode transverse et l'observation à froid permet de garder le matériau en très bon état et de mettre en évidence le réseau en feuillets. On remarque que la structure lamellaire est assez régulière, cependant on observe des défauts d'empilement qui apparaissent de temps en temps. Un autre défi qu'on a réussi à relever était d'obtenir une orientation en une vue transverse la plus parfaite possible. Ceci dans un souci d'éviter des erreurs de mesures de la distance d'intercalation des lamelles qui pourraient être dues à un angle de d'inclinaison du matériau lors de la coupe. Pour la mesure de la distance inter-feuillets, nous avons réalisé des statistiques sur plusieurs coupes provenant de deux échantillons de HST.

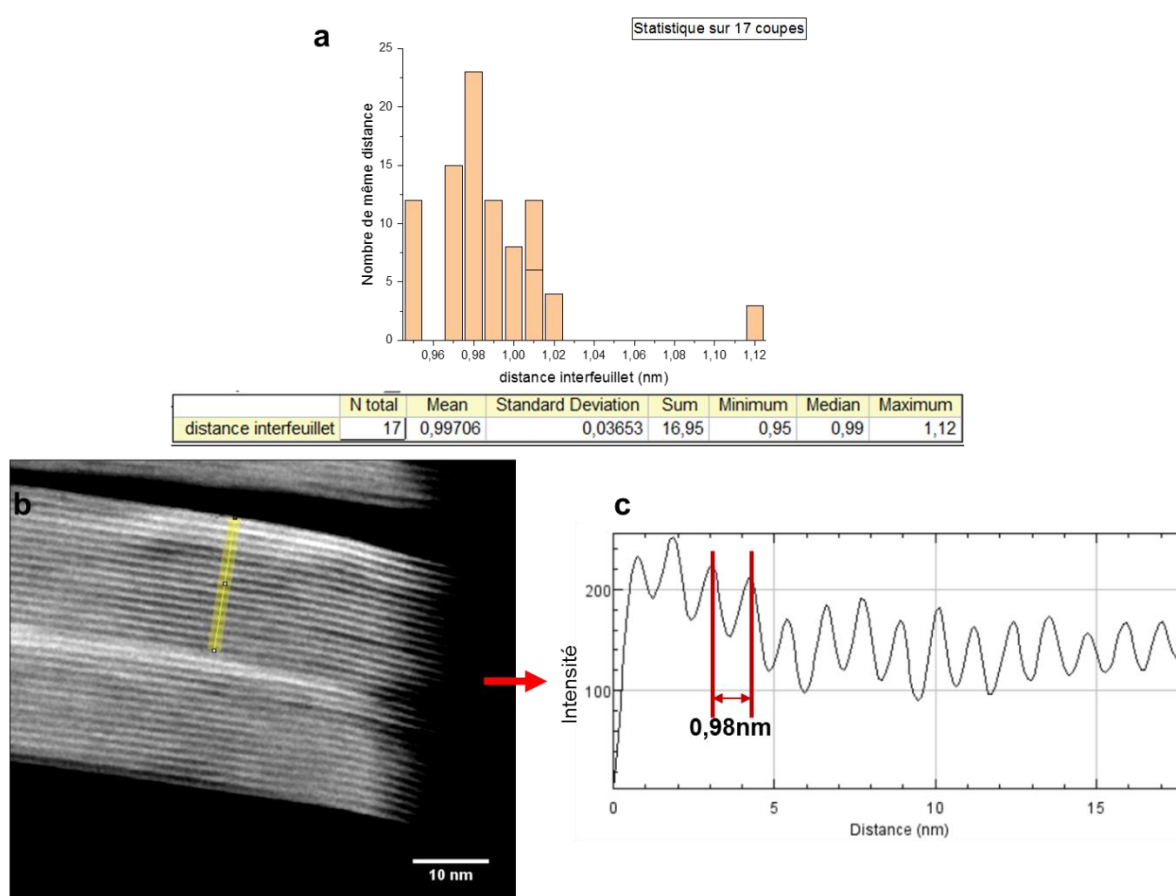


Figure 6 : a) Statistique sur 17 coupes pour déterminer la distance moyenne, b) exemple d'image STEM HAADF de la structure lamellaire bien ordonnée sur la quelle est réalisée la mesure et c) le profil d'intensité pour la détermination de l'espacement.

La figure 6 montre la méthodologie suivie pour déterminer la distance entre les feuillets. En effet, pour réaliser les statistiques de mesures de la distance nous avons suivi deux règles. La première était de choisir une coupe bien orientée et la deuxième était que cette section présente une très bonne régularité des couches avec très peu de défauts d'empilement. Pour l'échantillon HST nous avons réussi à définir une distance moyenne de 0,99 nm avec une précision de  $\pm 0,04$  nm. Ces



résultats sont en parfaite concordance avec ceux obtenus par diffraction des rayons X.

Nous avons également étudié la structure cristallographique de HST. Le diffractogramme de ce dernier nous renseigne sur sa structure tétragonale et l'indexation donne comme paramètres de maille  $a = 0,391 \text{ nm}$  et  $c = 0,977 \text{ nm}$ .<sup>14</sup> Sur le cliché de diffraction électronique de HST (figure 7), nous avons mesuré une distance de  $a=0,393 \text{ nm}$ .

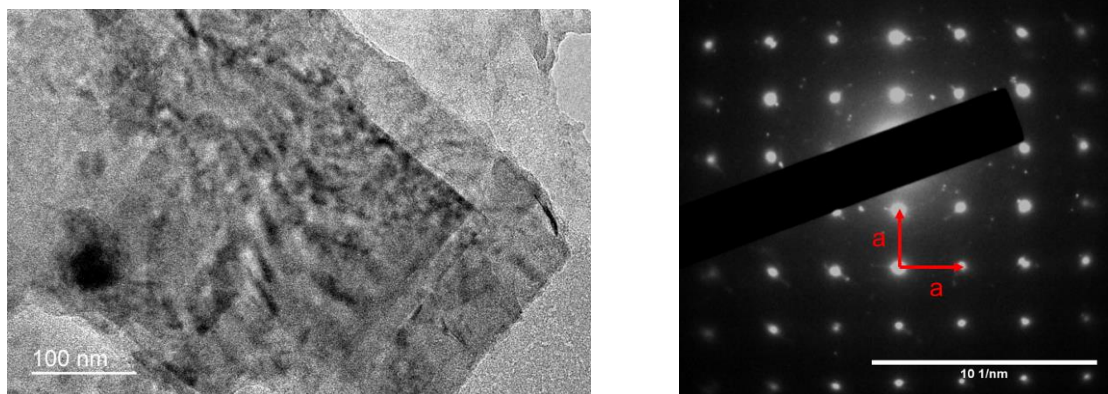


Figure 7 : a) image d'une particule de HST et b) le Cliché de diffraction électronique correspondant, toutes les réflexions présentent des intensités similaires.

L'acquisition de l'image et de la diffraction électronique ont été effectués en mode cryo-EM à partir d'une dispersion de la poudre HST dans l'éthanol. Le paramètre de maille mesuré sur les différents clichés est très proche de celui calculé à partir de la diffraction des rayons X.

#### III.1.1.4.2.2) N-HST :

Une tentative d'insertion par réaction directes cations métalliques ( $\text{Cu(II)}$ ,  $\text{Ni(II)}$ ...) entre les couches lamellaires du HST a été un échec. Donc une approche hybride organique-inorganique a été suivie. [16,17] Cette méthode indirecte passe par une première phase, la fonctionnalisation de HST par une polyamine, la bis- (3-aminopropyl) amine (N) (noté N-HST).

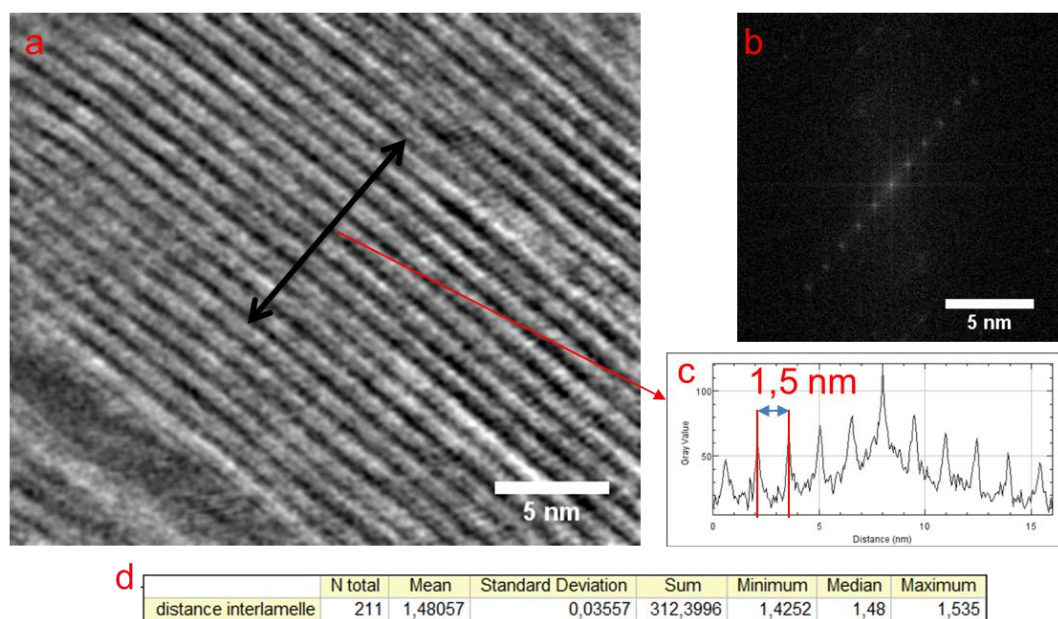


Figure 8 : a) exemple d'image STEM utilisée pour réaliser les statistiques sur la distance interlamellaire, b) cliché FFT de l'image, c) le profil d'intensité pour la détermination de l'espacement et d) tableau récapitulatif des résultats.

Nous avons réalisé des mesures statistiques de la distance entre les couches de N-HST sur les images obtenues par Cryo-EM en mode STEM (figure 8). En analysant plus de 200 particules une distance moyenne entre les couches du N-HST de 1,48 nm a été obtenu en utilisant les images Cryo-EM en mode STEM. Une différence importante avec les résultats obtenus par diffraction des rayons X. En effet les diffractogrammes de cet échantillon ont donné une distance de 1,82 nm entre les lamelles. Cette différence de plus de 0,3 nm nous a interpellé et nous a incité à rechercher si elle était le fait de la caractérisation par cryo-EM. Était-ce dû à la préparation (lors de la coupe ou à la résine) ou lors de l'observation ? Différents tests nous ont permis d'isoler le problème. En effet, la rétraction de la distance interfeuillets se produisait lors de l'interaction des électrons avec le matériau. Pour remédier à ce problème, nous avons réalisé des images « à l'aveugle ». C'est-à-dire que premièrement nous réalisons les alignements en haute résolution sur un emplacement donné après extinction du faisceau, on se déplaçait vers un endroit éloigné selon un axe x ou y. Étant donné que nous travaillions sur des sections ultrafines, les variations de la hauteur de l'échantillon sur la grille étaient très faibles donc les alignements restaient valides. Enfin très rapidement on irradiait la zone avec le faisceau et on procédait à l'enregistrement de l'image. Grâce à cette méthode nous avons obtenu des résultats proches de ceux donnés par les diffractogrammes des RX (figure 9) prouvant ainsi que nous avons réussi à préserver la structure. Une statistique a été réalisé sur plusieurs coupes qui ont donné 230 valeurs. À partir de ces données nous avons calculé une distance moyenne de 1,74 nm. Sur certaines particules on a retrouvé la distance calculée par diffraction des RX (figure 9.a).

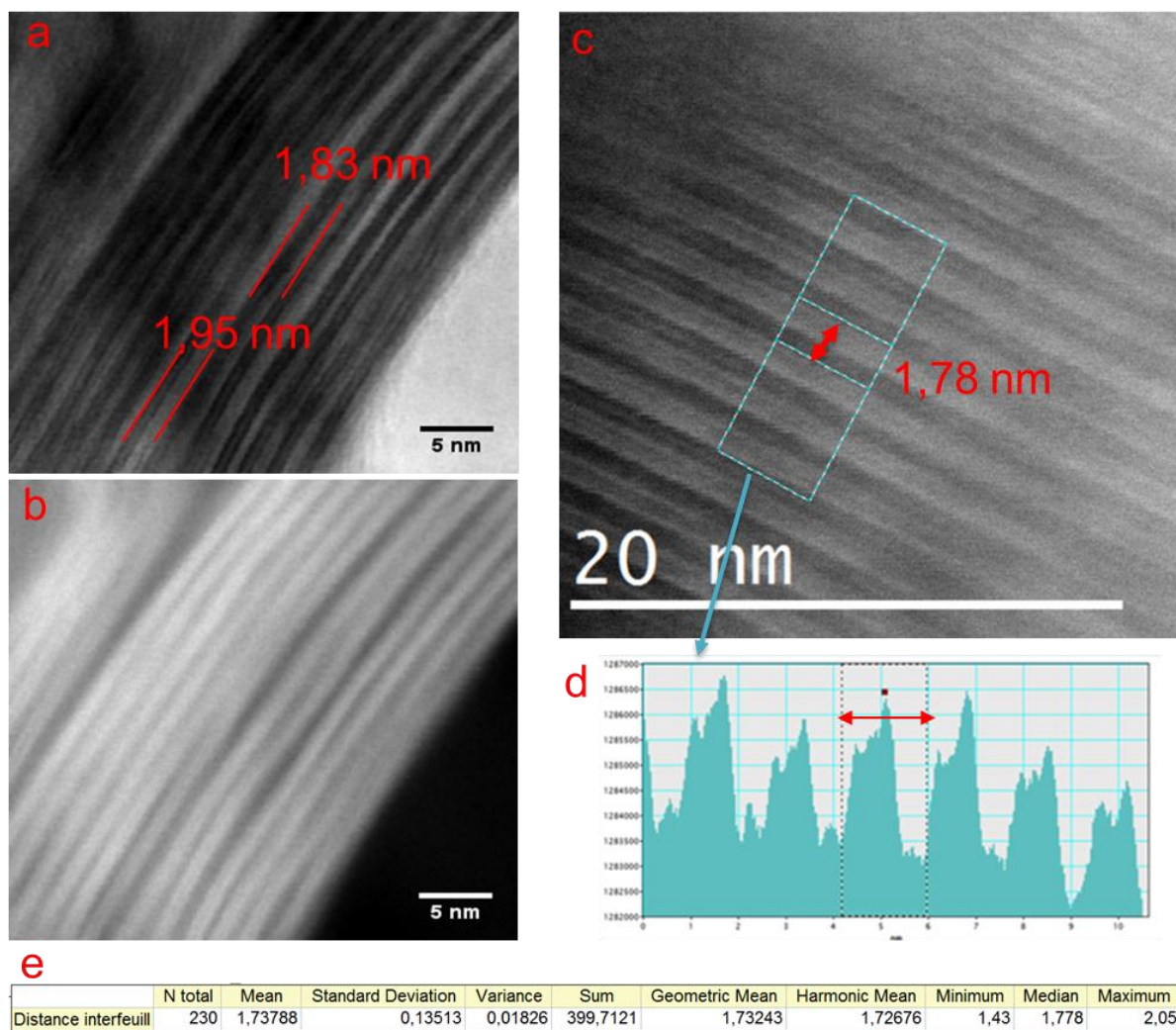


Figure 9 : a) et b) images STEM HAADF et BF utilisées pour réaliser les statistiques sur la distance interlamellaire, c) image BF sur une zone homogène avec d) le profil d'intensité correspondant pour la détermination de l'espacement et e) tableau récapitulatif des résultats.

### III.1.1.4.2.3) ESV

L'incorporation du cuivre par l'intermédiaire du nitrate de cuivre hydraté ( $\text{Cu}(\text{NO})_3 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ ) dans la pérovskite-polyamine permet l'intercalation de cet élément entre les feuillets, le produit obtenu étant une poudre verte. Cette incorporation du cuivre a tendance à réduire la distance entre les feuillets. Selon les résultats obtenus par diffraction des rayons X on passe de 1,8 nm à 1,2 nm. La cryoEM nous a permis de confirmer la conséquence de cette insertion sur la distance inter-feuillet et en comparaison avec l'échantillon N-HST on a constaté une structure plus compacte et avec moins de défauts, ce qui démontre que l'insertion du Cu est homogène. De plus nous avons étudié par cartographie chimique la localisation du cuivre et enfin nous avons déterminé la structure cristallographique par diffraction électronique et haute résolution.

### III.1.1.4.2.3.1) Distance inter-feuillet : Mise en évidence de la structure lamellaire

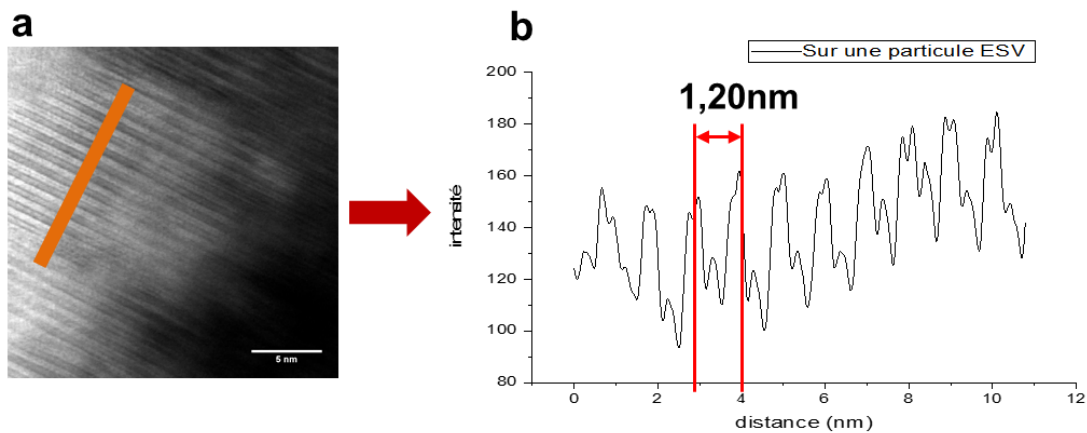


Figure 10 : Statistiques sur plusieurs particules et sur plusieurs sections : image STEM d'une particule à partir de laquelle est déterminée la distance inter-feuillet.

La détermination de la distance entre les feuillets a été faite à partir d'images enregistrées en mode cryoSTEM haute résolution sur une particule (figure 10.a) sur lesquels des profils d'intensité ont été tracés pour déterminer la distance entre les couches (figure 10.b). Sur cette particule on a une distance entre les couche de 1,2 nm ce qui correspond à celle calculée à partir du diffractogramme des rayons X. Pour confirmer la périodicité de cette distance nous avons réalisé une statistique sur 130 particules (figure 11). La distance moyenne entre les couches de l'échantillon ESV obtenue est  $d = (1,20 \pm 0,02)$  nm. Cette valeur est en total accord avec celle obtenue par diffraction des rayons X.



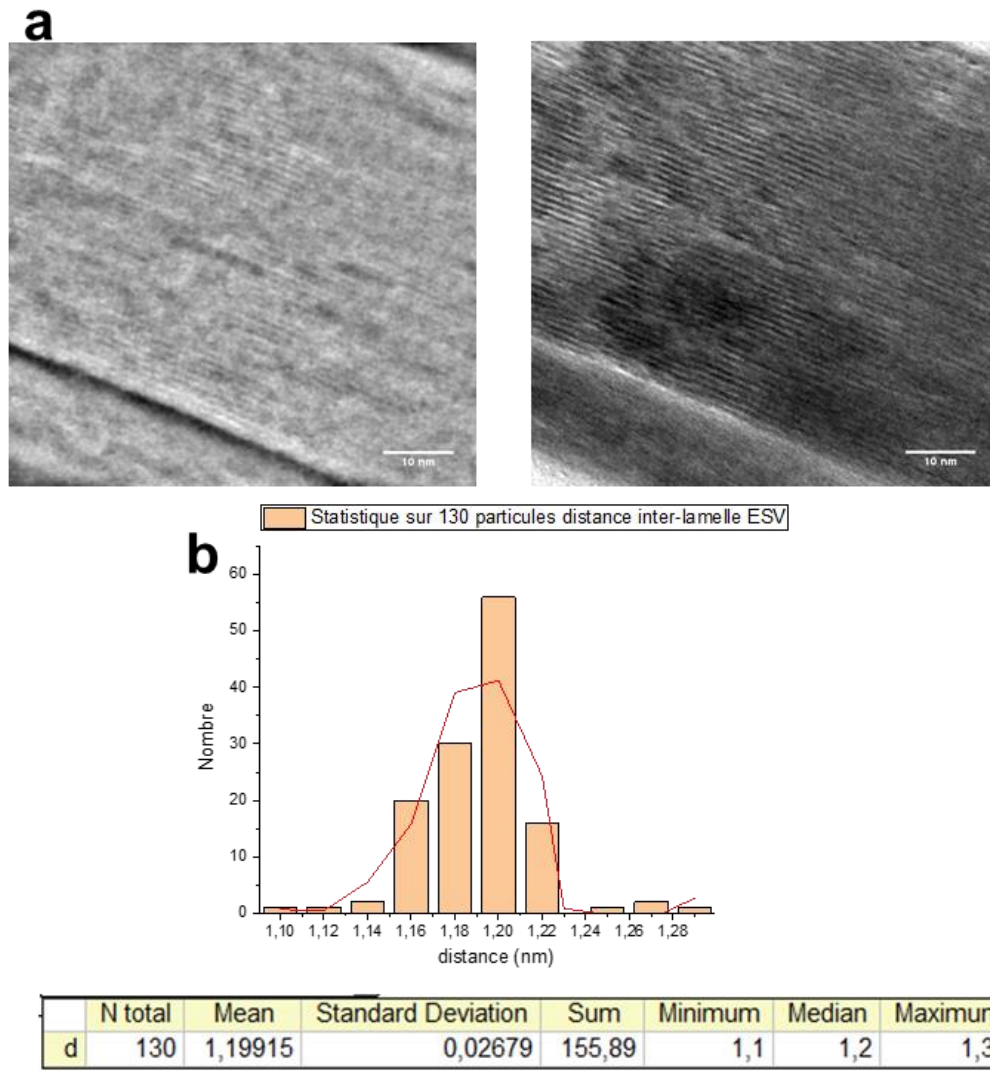


Figure 11 : a) image STEM DF et BF de la structure lamellaire, b) statistique sur 130 particules de plusieurs sections.

Ci-dessous on présente une particule avec les deux types de défauts, élargissement et rétrécissement de la distance interfeuillet. On a remarqué que certaines particules présentaient des défauts d'arrangement interne (figure 12), où sur certaines zones on pouvait observer des écartements beaucoup plus important. Néanmoins le nombre de ces défauts est minoritaire (inférieure à 5%) ce qui explique qu'ils ne soient pas mis en évidence par diffraction des rayons X.

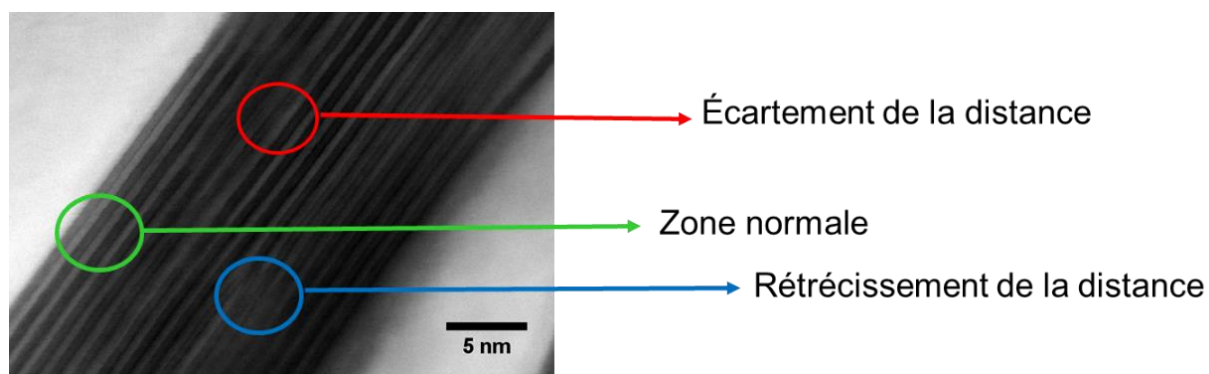


Figure 12 : Particule présentant des défauts d'écartement et de rétrécissement de la distance entre les couches.

On peut donc conclure que la distance moyenne mesurée entre deux couches minérales de même type est de  $1,20 \pm 0,02$  nm dans le cas de l'échantillon « solide vert ».

#### III.1.1.4.2.3.2) Où est le cuivre ? Localisation par comparaison en Cryo-STEM haute résolution et par analyse chimique.

Nous avons également étudié la localisation du cuivre dans la structure lamellaire. La distance interlamellaire a diminué fortement lors de la réaction de la pérovskite N-HST avec les nitrates de cuivre hydratés, passant de 1,8 nm à 1,2 nm (figure 13), ce qui tend à indiquer l'insertion des ions cuivre (en remplacement des ligands amine N). Nous avons alors réalisé des analyses chimiques par EDS pour le confirmer. Cependant la localisation précise du cuivre dans la structure est compliquée par la difficulté qu'il y a de réaliser une cartographie sans endommager la structure lamellaire. Pour résoudre ce problème nous avons comparé la structure du N-HST avec celle du ESV pour mettre en évidence le lieu exact dans la couche où s'est inséré le cuivre (figure 14). Ensuite nous avons réalisé des profils de concentrations des éléments principaux par analyse chimique EDX sur différentes zones de l'échantillon, statistiques qui nous ont permis d'obtenir une probabilité de localisation du métal de transition.

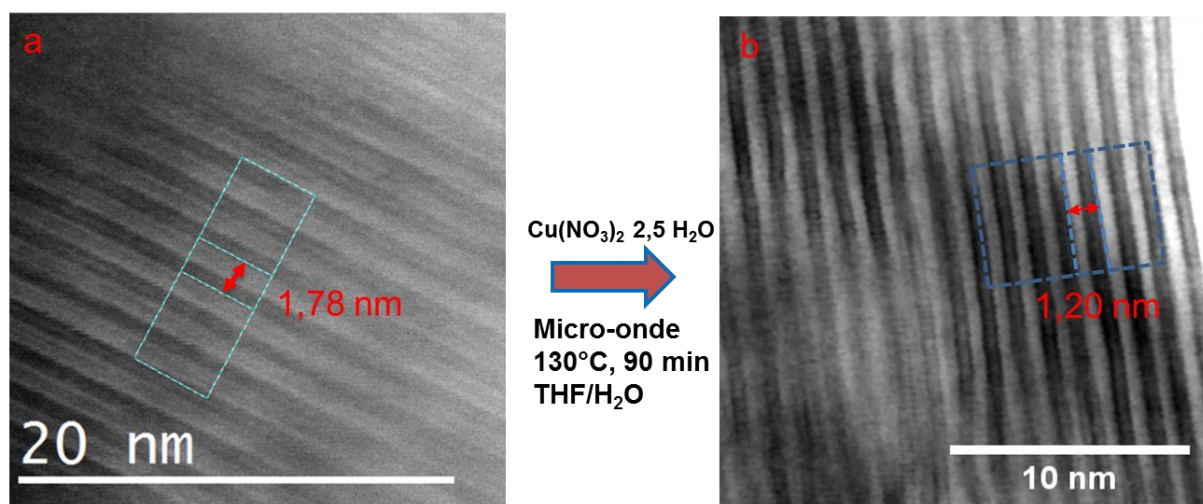


Figure 13 : diminution de la distance entre les feuillets lors de l'insertion des ions Cu. a) l'échantillon N-HST avec une distance de 1,78 nm et b) l'échantillon ESV dont la distance est 1,20 nm.

Nous avons remarqué que les images en champ clair (BF) présentaient deux contrastes différents. L'un plus intense avec deux rangées d'atomes serrés qu'on appellera la matrice et l'autre moins contrasté nommé zone intermédiaire (figure 14). Pour l'échantillon N-HST, l'espacement de la zone intermédiaire est beaucoup plus important que pour l'échantillon ESV alors que l'épaisseur de la matrice est la même. La comparaison des images des deux échantillons N-HST (figure 13.a) et ESV (figure 13.b) montre que la distance inter-lamellaire a d'une part fortement diminué et d'autre part que c'est la zone intermédiaire qui a été affectée. Ceci suppose que l'insertion des ions cuivre s'est faite dans cette partie de la structure.

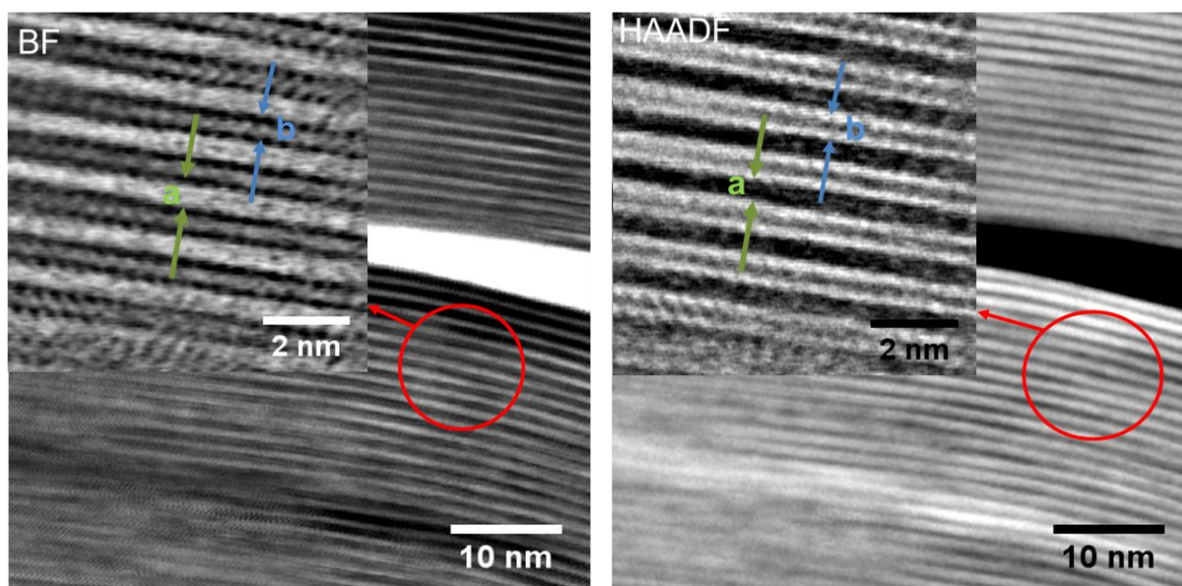


Figure 14 : images STEM BF et HAADF de ESV en haute résolution.

Lorsqu'on a regardé de plus près les images HRSTEM de ESV (figure 14), nous avons montré que la structure de la matrice était plus compacte avec deux rangées d'atomes proches, représenté par b dans la figure 14 alors que dans la zone



intermédiaire l'intensité était moins importante, représentée par a (figure 14). Donc la matrice était essentiellement composée d'atome de Ta et Sr car ce sont les éléments majoritaires de la structure (parmi les métaux) dans la composition de la pérovskite ; par ailleurs, l'image HAADF confirme cette hypothèse. La réalisation de cartographies chimiques pour identifier avec précision l'emplacement du cuivre a été rendue difficile par la destruction en moins d'une minute de la structure lamellaire lors de l'acquisition. Nous avons procédé par une méthode de comparaison entre les différents échantillons (HST, N-HST et ESV) et remarqué que seule la distance de la zone intermédiaire variait. La figure 15 montre les distances des deux espacements des échantillons HST, N-HST et ESV. L'épaisseur de la matrice reste constante dans les trois cas, environ 0,6 nm. Alors que la zone intermédiaire voit sa distance passer de 0,48 nm pour HST à 1,10 nm pour N-HST et de cette dernière à 0,60 nm pour ESV. Ces résultats confirment que les variations de la distance entre les feuillets sont régies par la zone intermédiaire, donc c'est cette dernière qui est inévitablement le lieu d'insertion du cuivre.

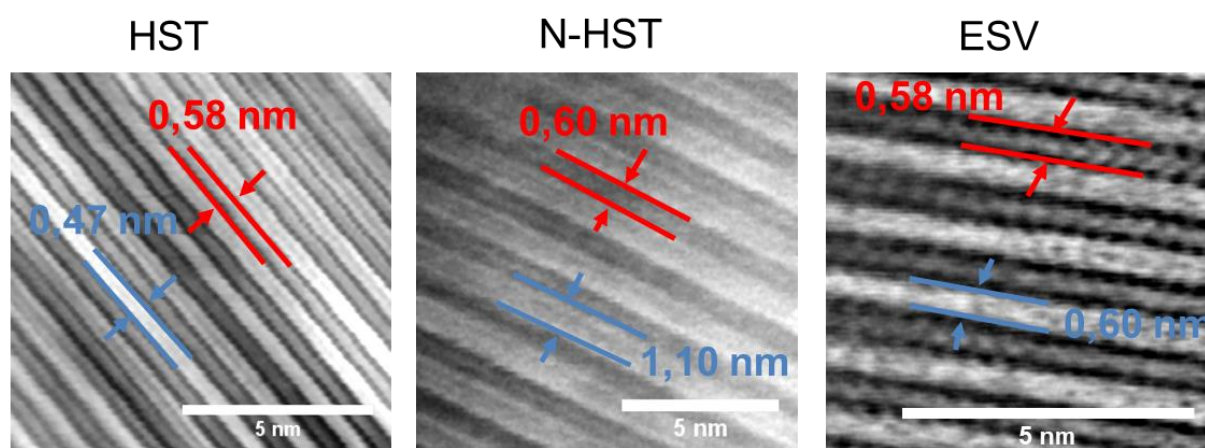


Figure 15 : comparaison des différentes distances entre les trois échantillon HST, N-HST et ESV

Pour ajouter une autre preuve à notre raisonnement précédent, nous avons utilisé l'analyse chimique en réalisant des profils de concentrations chimiques des différents éléments (Cu, Sr, Ta et Bi). Nous avons tracé plusieurs profils de concentration sur différentes coupes. Nous présentons ci-dessus un exemple dans lequel nous avons effectué un profil de concentration des éléments de Ta, Sr, Cu et Bi. Cette ligne de concentration représentait 18 points d'analyse chimique ponctuelle en fonction de la distance. Nous avons remarqué que les courbes de Ta et Sr avaient une allure semblable. Ce qui confirme que ces deux éléments sont dans la même zone en l'occurrence la matrice. Alors que pour le cuivre on a observé que l'allure de sa courbe de concentration était différente et antinomique des deux métaux précédents.

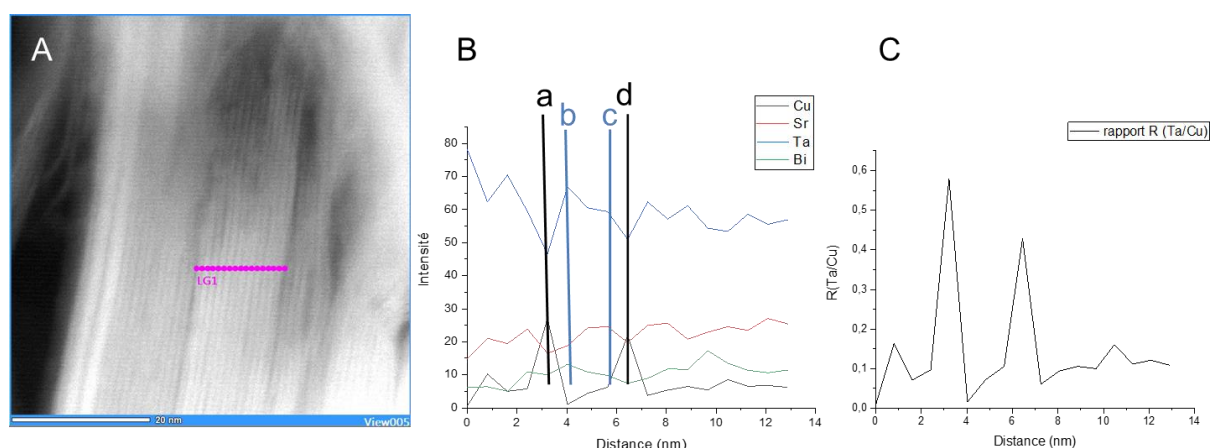


Figure 16 : A) image STEM en champ sombre (HAADF) de ESV, B) profil de concentration des éléments Ta, Sr, Cu et Bi perpendiculairement à l'orientation des feuillets, C) évolution du rapport de concentration Ta/Cu

En effet, lorsque le taux de tantale diminuait celui du cuivre augmentait (figure 16 B). Dans l'intervalle entre les deux pics a et d de la figure 19 B représentant une concentration élevée de Cu, la concentration de tantale reste assez stable avec deux augmentations b et c (figure 16 B) qui pourrait représenter les deux couches denses de la matrice. Pour confirmer la différence d'évolution nous avons réalisé une étude du rapport de concentration entre Ta et Cu. La figure 16 C confirme que lorsque la concentration du tantale diminue celle du cuivre augmente, donc leurs positions dans la structure sont différentes.

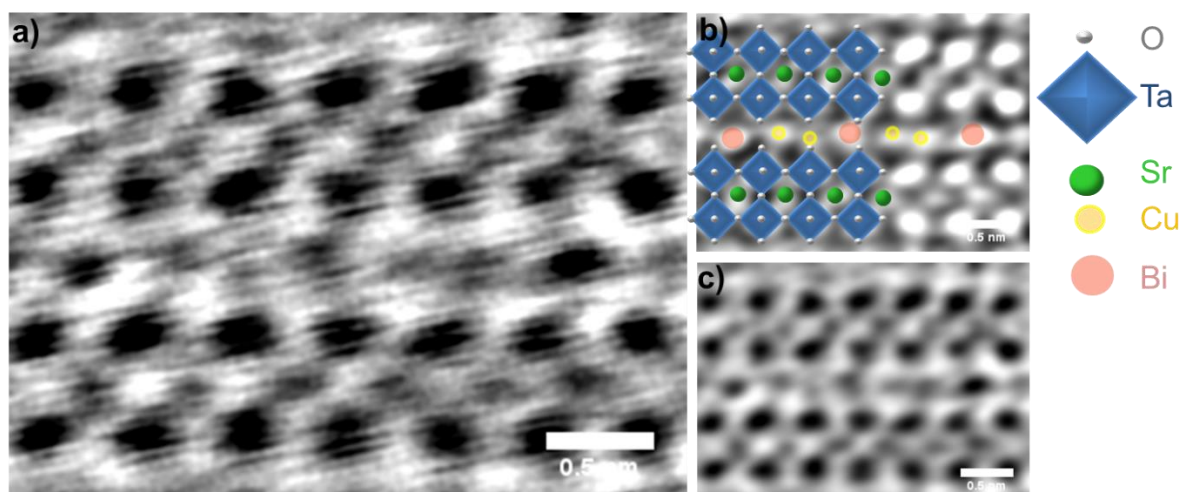


Figure 17 : a) image STEM HAADF haute résolution et des images filtrées avec un filtre Gaussien « Blur » (b) et BF (c).

De ces résultats nous avons proposé un positionnement des éléments Ta, Sr, Bi et Cu à partir d'une image Cryo-STEM haute résolution présenté dans la figure 17 ci-dessus. Nous avons appliqué le filtre Gaussien « blur » aux images HAADF et BF pour mettre en évidence la variation du contraste en fonction du numéro atomique Z des différents éléments. Ceci nous a permis par déduction et par comparaison d'identifier les atomes, schématisé sur la figure 17c. Pour le Ta et Sr, il était facile de

les placer car en plus de l'allure de leur courbe de concentration similaire, ils étaient les métaux majoritaires dans le matériau donc ils représenteraient la matrice de la structure lamellaire. De plus lors de la réaction du N-HST avec le nitrate de cuivre hydraté la distance inter-lamelle passe de 1,76 nm à 1,20 nm et seule la distance de la zone intermédiaire est impactée. Le cuivre ne pouvait être que dans cette dernière. Dans le cas du Bi, nous n'avons pas pu définir exactement son positionnement à cause du caractère aléatoire de sa courbe de concentration (figure 16). Néanmoins nous pensons que ce métal est dans la zone intermédiaire comme montré dans la figure 17c. En effet on a remarqué que l'image HAADF présentait certaines taches avec une intensité élevée équivalente à des éléments lourds, donc par déduction nous pensons qu'il s'agit des atomes de bismuth.

### III.1.2. Conclusion et perspective

Le développement de protocoles spécifiques de préparation des échantillons et d'observations et l'utilisation de la techniques Cryo-EM en mode STEM nous ont permis de mettre en évidence la structure de l'espacement inter-lamellaire, composé d'une matrice et d'une zone intermédiaire, ainsi que son épaisseur pour les différents échantillons. De plus nous avons montré que seule la distance de la zone intermédiaire changeait lors de l'introduction de cuivre. Ensuite par analyse des résultats nous avons déduit le positionnement des différents éléments chimiques composant le matériau, surtout la place du cuivre. Pour le positionnement du bismuth il reste à réaliser des expériences supplémentaires de haute résolution et à utiliser la diffraction électronique. De plus il reste à terminer les caractérisations pour l'ESB, pour ce dernier il faudra utiliser de la cartographie chimique à basse tension (80kV) pour préserver encore plus la structure du matériau.

## REFERENCES PREMIERE PARTIE CHAPITRE 3

1. Sanchez C., Ribot F., « Chemical Design of Hybrid Organic-Inorganic Materials Synthesized Via Sol-Gel Chemistry », *New J. Chemistry*, 10, 1994, 1037.
2. Sanchez C., Soler-Illia G., Ribot F., Grosso D., « Design of Functional Nanostructured Materials Through the Use of Controlled Hybrid Organic-Inorganic Interfaces », *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Chimie*, 8, 2003, 109.
3. Sanchez C., De A.A., Soler-Illia C.G., Ribot F., Lalot T., Mayer C.R., Cabuil V., « Designed Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites From Functional Nanobuilding Blocks », *Chemistry of Materials*, 13, 2001, 3061.
4. Mann S., Burkett S.L., Davis S.A., Fowler C.E., Mendelson N.H., Sims S.D., Walsh D., Whilton N.T., « Sol-Gel Synthesis of Organized Matter », *Chemistry of Materials*, 20 (24), 1997, 2300.
5. Sanchez C., Arribart H., Giraud-Guille M.M., « Biomimetism and Bioinspiration as Tools for the Design of Innovative Materials and Systems », *Nature Materials*, 4, 2005, 277.
6. Wang Y., Delahaye E., Leuvrey C., Leroux F., Rabu P., Rogez G. , « Post-Synthesis Modification of the Aurivillius Phase  $\text{Bi}_2\text{SrTa}_2\text{O}_9$  via InSitu Microwave-Assisted "Click Reaction" », *Inorg. Chem.*, 2016, 55 (19), pp 9790–9797
7. Soler-Illia G., Sanchez C., Lebeau B., Patarin J., « Chemical Strategies to Design Textured Silica and Metal Oxide-Based Organised Networks: From Nanostructured Networks to Hierarchical Structures », *Chemical Reviews*, 102, 2002, 4093.
8. Wang, Y., Wang, C., Wang, L., Hao, Q., Zhu, X., Chen, X., Tang, K., « Preparation of interlayer surface tailored protonated doublelayered perovskite  $\text{H}_2\text{CaTa}_2\text{O}_7$  with n-alcohols, and their photocatalytic activity », *RSC Adv.* 2014, 4, 4047–4054.
9. Sugahara, Y., «Chemical processes employing inorganic layered compounds for inorganic and inorganic & organic hybrid materials. » *J. Ceram. Soc. Jpn.* 2014, 122, 523–529.
10. Nedjar, R.; Borel, M. M.; Raveau, B. « Intercalation of Primary Monoamines in the Lamellar Protonic Oxide  $\text{HNb}_3\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$  » *Z. Anorg. Allg. Chem.* 1986, 540, 198–204.
11. Clément, P. ; Marchand, R., « Intercalation d'amines dans la structure en feuillets de  $\text{H}_2\text{Ti}_4\text{O}_9$ . » *C. R. Acad. Sc. Paris* 1983, 296, 1161–1164.
12. Delmas, C., Borthomieu, Y., Faure, C., « Nickel hydroxide and derived phases obtained by chimie douce » *Solid State Ionics* 1988, 26, 152

13. Sanchez C., De A.A., Soler-Illia C.G., Ribot F., Lalot T., Mayer C.R., Cabuil V., « Designed Hybrid Organic-Inorganic Nanocomposites From Functional Nanobuilding Blocks », *Chemistry of Materials*, 13, 2001, 3061.
14. K. Toda, M. Sato, « Synthesis and structure determination of new layered perovskite compounds,  $\text{ALaTa}_2\text{O}_7$  and  $\text{ACa}_2\text{Ta}_3\text{O}_{10}$  ( $\text{A} = \text{Rb}, \text{Li}$ ). » *J. Mater. Chem.* 1996, 6, 1067-1071.
15. J. Gopalakrishnan, S. Uma, V. Bhat, « Synthesis of Layered Perovskite Oxides,  $\text{ACa}_{2-x}\text{La}_x\text{Nb}_3\text{-xTi}_x\text{O}_{10}$  ( $\text{A} = \text{K}, \text{Rb}, \text{Cs}$ ), and Characterization of New Solid Acids,  $\text{HCa}_{2-x}\text{La}_x\text{Nb}_3\text{-xTi}_x\text{O}_9$  ( $0 < x \leq 2$ ), Exhibiting Variable Bronsted Acidity » *Chem. Mater.* 1993, 5, 132-136.
16. R. E. Schaak, D. Afzal, J. A. Schottenfeld, T. E. Mallouk, «  $\text{Na}_2\text{Ln}_2\text{Ti}_3\text{-xMn}_x\text{O}_{10}$  ( $\text{Ln} = \text{Sm}, \text{Eu}, \text{Gd}, \text{and Dy}$ ;  $0 \leq x \leq 1$ ): A New Series of Ion-Exchangeable Layered Perovskites Containing B-Site Manganese » *Chem. Mater.* 2002, 14, 442-448.
17. C. H. Mahler, B. L. Cushing, J. N. Lalena, J. B. Wiley, *Mater. Res. Bull.* 1998, 33, 1581-1586.
18. J. Gopalakrishnan, T. Sivakumar, K. Ramesha, V. Thangadurai, G. N. Subbanna, *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 6237-6241.
19. Akbarian-Tefaghi, S., & Wiley, J. B. (2018). Microwave-assisted routes for rapid and efficient modification of layered perovskites. » *Dalton Transactions*, 47(9), 2917–2924.
20. Helander, H. F. (1969). « Surface topography of ultramicrotome sections. » *Journal of Ultrastructure Research*, 29(5-6), 373–382.
21. J. Ayache, L. Beaunier, J. Pottu-Boumendil, G. Ehret, D. Laub : «Guide de préparation des échantillons pour la Microscopie électronique en transmission » Tome 2, Techniques Broché – 10 mai 2007
22. Tsunoda, Y.; Shirata, M.; Sugimoto, W.; Liu, Z.; Terasaki, O.; Kuroda, K.; Sugahara, Y. *Inorg. Chem.* 2001, 40, 5768-5771
23. Wang, Y.; Delahaye, E.; Leuvrey, C.; Leroux, F.; Rabu, P.; Rogez, G. « Efficient Microwave-Assisted Functionalization of the Aurivillius-Phase  $\text{Bi}_2\text{SrTa}_2\text{O}_9$ . » *Inorg. Chem.* 2016, 55, 4039–4046.
24. Schneiderová, B.; Demel, J.; Pleštil, J.; Janda, P.; Bohuslav, J.; Ihiwakrim, D.; Ersen, O.; Rogez, G.; Lang, K. « Nickel Hydroxide Ultrathin Nanosheets as Building Blocks for Electrochemically Active Layers. » *J. Mater. Chem. A* 2013, 1 (37), 11429.
25. Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P. « Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. » *Q Rev Biophys.* 1988 May ; 21 (2) : 129-228.



### III.2) Étude de l'interface entre deux cristaux moléculaires (Fe/Ru) macroscopiques : préparation de section et analyse par Cryo-EM

La chimie supramoléculaire<sup>1</sup> et la tectonique moléculaire ont récemment permis de produire une grande variété de matériaux à l'état solide ayant des dimensions et des propriétés fonctionnelles ajustables<sup>2</sup>. L'intérêt pour la croissance de cristaux en vrac ou modelés est grand, car de tels matériaux peuvent offrir des applications en optique, en électrooptique et en photo-réfractivité.<sup>5-7</sup> De tels assemblages moléculaires cristallins sont le résultat de la mise en liaison de plusieurs monocristaux. Le succès d'une telle approche conduirait au développement d'un tout nouvel ensemble de matériaux.<sup>14</sup> Il est donc important de sonder l'interface entre monocristaux dont les caractéristiques gouvernent les propriétés mécaniques, électriques ou encore magnétiques des cristaux moléculaires.<sup>11</sup> La modulation et le contrôle de ces propriétés nécessitent de bien caractériser l'interface à différentes échelles, en fonction du protocole à travers lequel elle a été engendrée. Dans notre cas, il s'agit de cristaux moléculaires étudiés dans l'équipe du Professeur Waiss Hosseini du Laboratoire de Tectonique Moléculaire de l'Université de Strasbourg. Le premier défi a été d'obtenir une lame mince parfaite à partir d'un tel cristal composé de deux parties Fe/Ru au niveau de l'interface. Puis nous avons réalisé une étude en Cryo-EM pour mettre en évidence cette interface et ses propriétés chimiques par cartographie EDS en mode STEM.

#### III.2.1) Présentation du matériau étudié : cristal moléculaire de monocristaux de Fe et Ru

L'intérêt d'étudier l'interface de ce matériau est de comprendre l'interaction entre le Fer et le Ruthénium. En effet, la formation des interfaces entre monocristaux est potentiellement importante pour de nombreuses propriétés telles que mécaniques, électriques ou encore chimiques<sup>11</sup>. Ces dernières peuvent être fortement influencées par la présence de joints de grains à l'intérieur des matériaux et non seulement par les grains eux-mêmes. Le succès d'une telle approche conduirait au développement de nouveaux ensembles de matériaux. D'où l'importance de bien étudier et comprendre la jonction entre les deux cristaux.

La synthèse des assemblages Fe/Ru était basée sur la croissance épitaxiale dans une solution aqueuse de  $[(1-2H^+)^2-(Fe^{II}(CN)_6^{4-})8H_2O]$  (composé B, monocristaux



oranges) sur un cristal composé de  $[(1-2\text{H}^+)^{2-}(\text{Ru}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-})8\text{H}_2\text{O}]$  (composé A, incolore, monocristal) utilisé comme germe cristallin (figure 1b). Dans les deux monocristaux moléculaires l'interconnexion entre les composants cationiques et anioniques se fait par le biais d'interactions électrostatiques et de liaisons H (figure 1a).

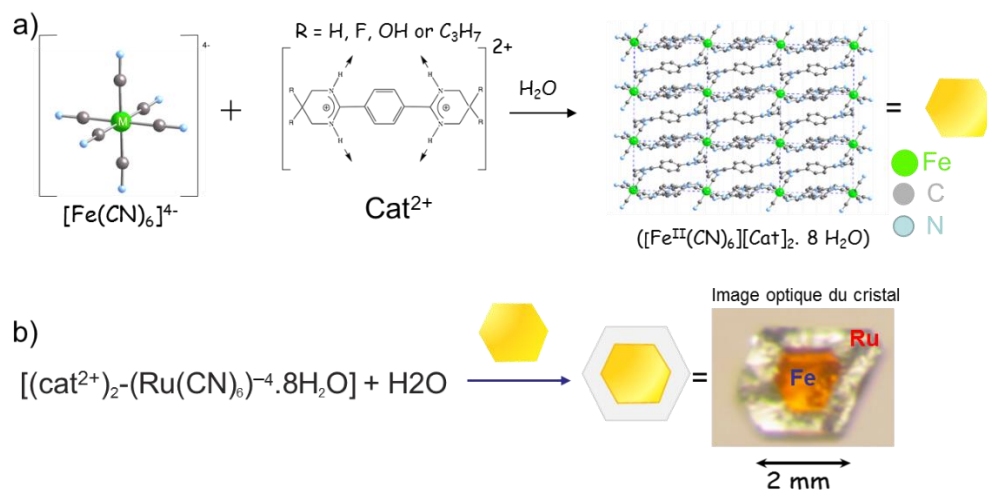


Figure 1 : représentation de la synthèse du réseau bidimensionnel isostructural, a) réaction de synthèse du premier monocristal de Fe et b) croissance du deuxième monocristal de Ru autour du premier (indice de réfraction différent).<sup>13</sup> Dans la représentation chimique du monocristal de Fe nous n'avons pas inclus les atomes d'hydrogène pour ne pas encombrer le schéma.

Dans les deux cas, le cristal est composé de  $1-2\text{H}^+$ ,  $\text{M}^{\text{II}}(\text{CN})_6^{4-}$  (où  $\text{M} = \text{Fe}$  ou  $\text{Ru}$ ) et de molécules d'eau<sup>11</sup> et peut être décrit comme un réseau encombré de liaisons 2-D H offrant des canaux remplis de molécules d'eau (figure 1). L'analyse structurale a en outre démontré que les deux cristaux étaient isostructuraux avec seulement de petites différences dans les dimensions et les angles des cellules. Les deux cristaux ont été caractérisés par diffraction des rayons X (Figure 2). Cette caractérisation a révélé la conservation des caractéristiques cristallographiques, en particulier des axes entre les deux phases cristallines, ce qui implique que le matériau composite a été généré par croissance épitaxiale.<sup>13</sup> Ce qui n'est pas surprenant puisque l'interconnexion entre des unités consécutives anioniques et cationiques est assurée par des liaisons H qui offrent une flexibilité à la fois en distance et en angle.

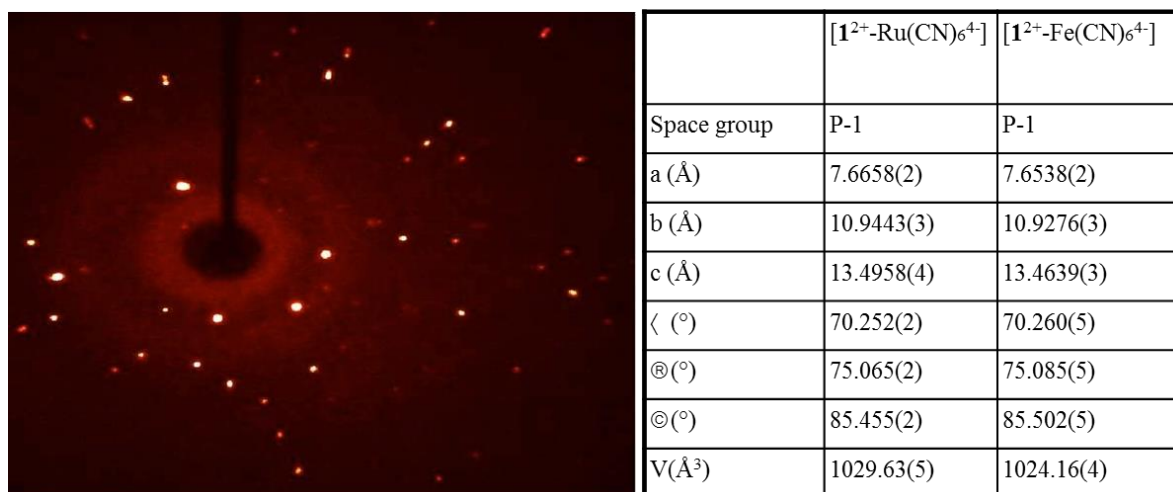


Figure 2 : diffractogramme du monocristal Fe/Ru (structure monoclinique).

Pour bien identifier les différentes phases de chaque cristal et de l'interface nous avons tout d'abord réalisé une observation par microscopie électronique à balayage (figure 3).

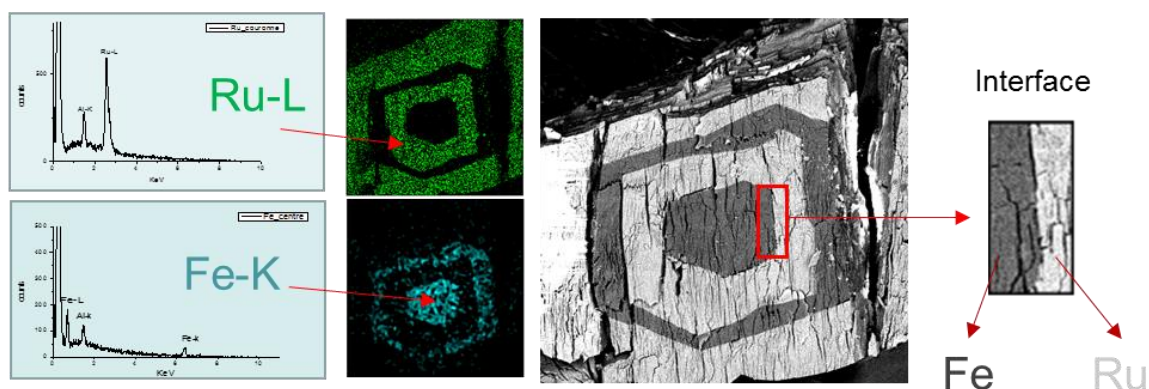


Figure 3 : image et analyse MEB du cristal de cristaux de Fe/Ru ; à droite une vue de l'interface Fe/Ru.

### III.2.2) Mise en évidence de l'interface Fe/Ru : préparation et résultats

Ce type d'interface a été observé à partir d'échantillons préparés par FIB, mais le problème de l'épaisseur s'est tout de suite posé. Les échantillons préparés par cette technique étaient trop épais donc l'observation fine de l'interface était impossible.<sup>3</sup>

On a donc proposé d'utiliser l'ultramicrotomie qui offrait plusieurs avantages, une facilité d'utilisation et d'accès ainsi que la possibilité de développer de nouveaux protocoles. De plus, on devait réaliser cette étude par Cryo-EM, car en MET standard (également en MEB) on observait la formation de trous sur la structure du cristal moléculaire, probablement dus à la mise sous vide ( $1.10^{-5}$  Pa).

### **III.2.2.1) Développement de protocoles de préparation : de l'ultramicrotomie à la cryo-ultramicrotomie**

Le défi ici était de réussir à obtenir une section très fine, inférieure à 100 nm d'épaisseur, à partir d'un cristal de Fe/Ru très fragile pour observer plus finement l'interface. Étant donné que la structure et l'assemblage de ce matériau étaient régies par des interactions faibles, lors de la coupe le cristal s'effritait. De plus, lors de la coupe à température ambiante, l'échantillon se dissolvait ou se dispersait au contact de l'eau de la cuve de récupération du couteau diamant. Donc nous avons utilisé plusieurs techniques et développé plusieurs méthodes de préparation. En effet, vue l'influence de l'eau nous avons tout d'abord réalisé des coupes avec d'autres solvants par exemple le diméthylsulfoxyde (DMSO), puis nous avons essayé de réaliser des sections à sec, ensuite nous avons développé la Cryo-ultramicrotomie (technique de CEMOVIS et Tokuyasu) et enfin nous avons réussi à développer une nouvelle approche qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats. Nous présentons uniquement les protocoles ayant donné les meilleurs résultats.<sup>3</sup>

#### **III.2.2.1.1) Cryo-Ultramicrotomie (C-UM) :**

Ayant été confronté à l'action de dissolution et de dispersion de l'eau sur le cristal, nous avons tout d'abord essayé d'obtenir des sections fines et intactes en utilisant d'autres solvants ayant des propriétés différentes de l'eau. Nous avons testé l'éthanol, différents solvants organiques et des hydrocarbures. Tous ces tests n'ont pas donné de résultats satisfaisants et quelques fois même apportés des difficultés supplémentaires. Donc nous nous sommes tournés vers la cryo ultramicrotomie et nous avons développé des protocoles spécifiques. Pour plus d'informations sur le principe de fonctionnement et d'utilisation de ces techniques, voire le chapitre sur la préparation.

##### **III.2.2.1.1.1) La technique Tokuyasu : coupe entre -160°C et -140°C**

Cette technique est surtout utilisée dans le but d'obtenir des sections fines de cellules ou de tout matériau biologique pour préserver toutes les propriétés structurales, morphologiques et environnementales de l'échantillon. Nous avons développé un protocole spécifique à notre échantillon. En effet, nous avons placé le cristal intact (sans résine) dans le système de refroidissement du C-UM et nous

avons procédé au refroidissement jusqu'à la température de  $-160^{\circ}\text{C}$ , puis nous avons réalisé la pyramide à l'aide du couteau diamant utilisé pour trimer (voir chapitre 1 paragraphe I.3.2.3). Ensuite nous avons coupé et procédé à la récupération des sections à l'aide d'une solution de sucre saturée. Ces coupes ont été analysées par Cryo-EM en mode image STEM et également cartographie EDX.

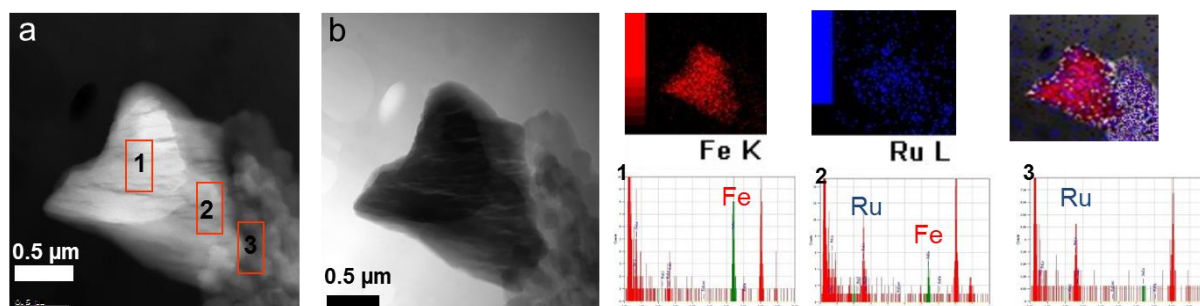


Figure 4 : cartographie de la coupe de l'interface et analyse chimique des trois régions.

La figure ci-dessus représente une cartographie d'une coupe de l'échantillon obtenue par la technique Tokuyasu. On a réussi à observer l'interface mais pas à la mettre en évidence de façon plus précise car les sections réalisées étaient encore trop épaisses et nous n'avons pas réussi à couper des sections inférieures à 120 nm. En deçà de cette épaisseur les coupes se détruisaient. De plus on observait également d'autres artefacts qui se produisaient lors de l'étape de nettoyage des coupes pour enlever l'excès de sucre. Donc nous avons exploré une autre technique ; CEMOVIS.

#### III.2.2.1.1.2) La technique CEMOVIS : coupe à la température de l'azote ( $\sim -196^{\circ}\text{C}$ )

Cette technique est une bonne alternative à la technique Tokuyasu, car elle permet de rester à très basse température tout en évitant l'étape de nettoyage et de plus les sections sont maintenues à froid. On a réussi à obtenir de meilleurs résultats que précédemment. Effectivement, nous avons réalisé des sections d'épaisseurs allant jusqu'à 70 nm. De plus la vitrification a permis de maintenir la structure intacte de cet échantillon riche en eau (figure 5).



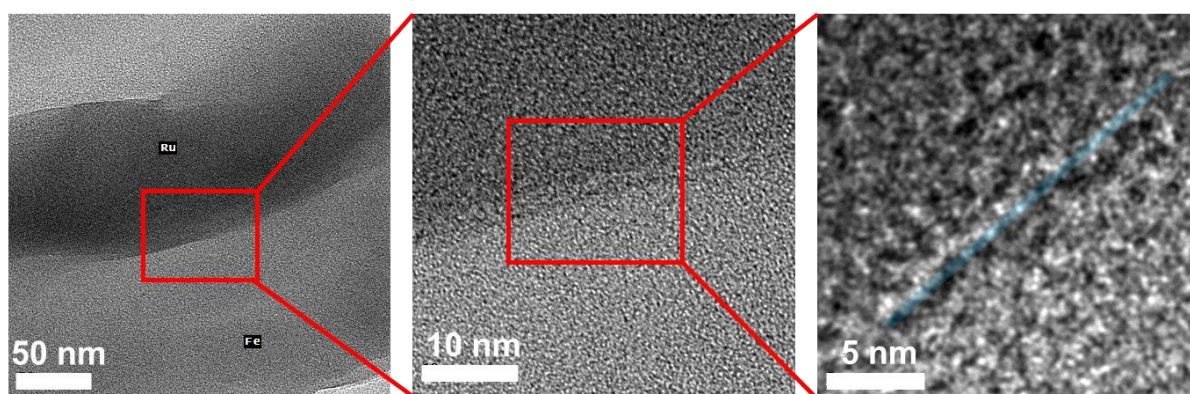


Figure 5 : images Cryo-EM de l'interface Fe/Ru.

Étant donné l'uniformité de l'épaisseur de l'échantillon, la différence de contraste des images Cryo-EM était due à la différence de la masse molaire entre le fer et le ruthénium. De plus à partir de l'analyse par haute résolution pour visualiser

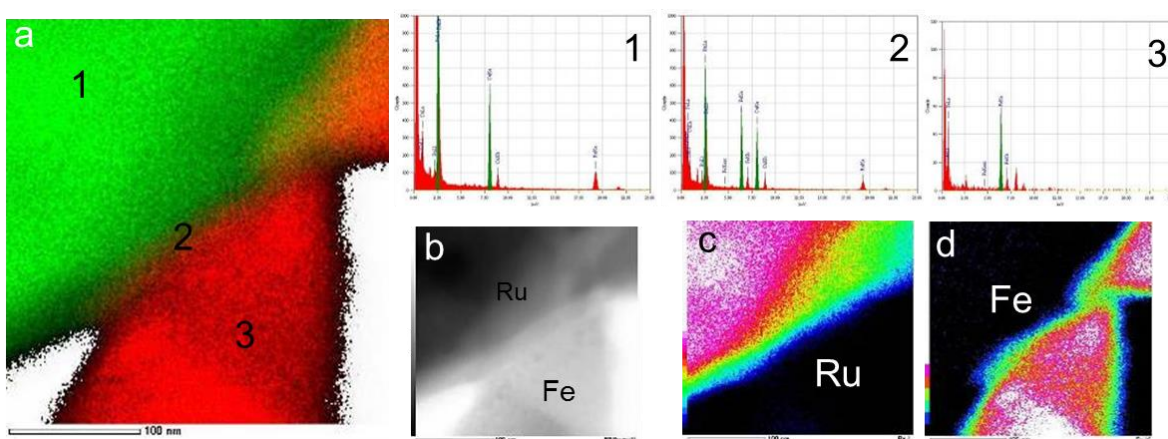


Figure 6 : cartographie de l'interface (a) avec les carte de chaque élément Ru (c) et Fe (d) et image Cryo-EM STEM en champs sombre (b). (1, 2, 3) spectres représentant les différentes zones du matériau.

l'interface, on a remarqué clairement une différence de densité entre les deux cristaux ; cependant étant donné la sensibilité du matériau à l'irradiation électronique on n'a pas réussi à observer les plans cristallins (figure 5). Pour aller plus loin et mettre en évidence l'interface sans l'endommager nous avons effectué des cartographies chimiques EDS (figure 6). Le suivi des pics Fe-K et Ru-L a été effectué le long d'une ligne traversant l'interface. Ces résultats ont montré que les zones 1 et 3 contenaient uniquement les éléments Ru et Fe respectivement, alors qu'à l'interface, zone 2, on a fait état de la présence du fer et du ruthénium simultanément (figure 6). Lorsqu'on a étudié de plus près cette interface on a remarqué qu'elle s'étendait sur une certaine épaisseur à l'intérieur des deux cristaux. Dans la figure 7 ci-dessous, nous avons montré que la largeur caractéristique de la zone interfaciale était d'une taille d'environ 50 nm.

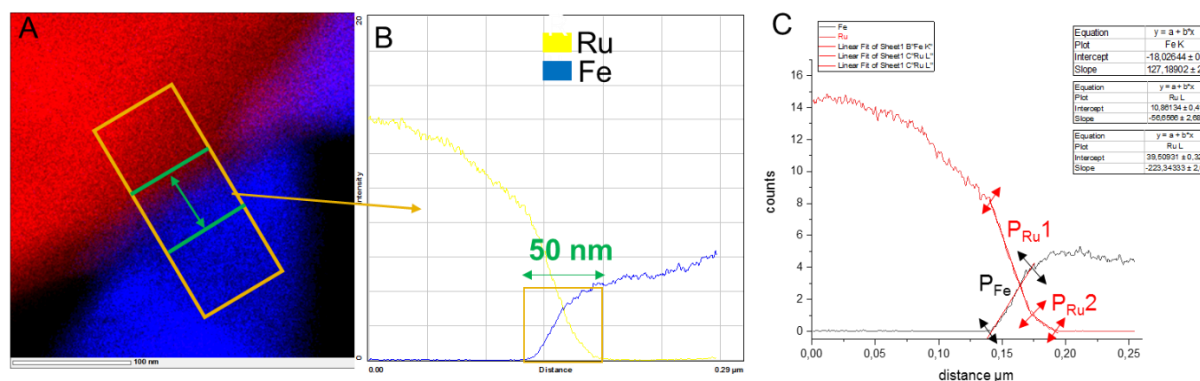


Figure 7 : détermination de la « largeur » de l'interface (A et B) ainsi que les pentes correspondantes à la dispersion des éléments Fe et Ru dans cette zone de composition intermédiaire.

Le premier enseignement tiré de ces analyses chimiques est d'avoir mis en évidence que l'interface présentait une certaine largeur, en contradiction avec les images MEB qui ont donné l'idée d'une ligne régulière et sans interpénétration entre les deux cristaux (figure 3). Plus précisément, avec la Cryo-EM nous avons mis en évidence un enchevêtrement entre le cristal de Fe et celui du Ru sur une épaisseur d'environ 50 nm. À partir du profil chimique des deux éléments (figure 7C) obtenu depuis la cartographie (figure 7A), nous avons calculé la pente de variation de composition aux alentours de l'interface. Nous avons obtenu deux valeurs pour la pente de Ru, d'environ 223 et de 56 en valeurs absolues (figure 7C). C'est-à-dire que la première partie de la rampe présentait une forte inclinaison puis il s'était produit une cassure de descente et la pente de la deuxième partie de la rampe avait diminué énormément. Alors que le fer présentait une unique pente de rampe relativement grande de 127. Le deuxième enseignement était la différence de diffusion entre les deux éléments, en effet le ruthénium avait plus tendance à aller plus loin dans le cristal de fer que les atomes de fer dans le cristal de ruthénium.

Tout ceci pouvait s'expliquer par les conditions de synthèse, car la concentration relativement faible de  $[Fe(CN)_6]^{4-}$  libres (dû à la dissolution par action de l'eau en surface du cristal de Fe) par rapport à  $[Ru(CN)_6]^{4-}$ , donc la croissance épitaxiale des couches cristallines subséquentes serait principalement obtenue par action de  $cat^{2+}$  et par les  $[Ru(CN)_6]^{4-}$  dans la solution. Cependant pour expliquer la différence de pente dans le cas du Ru et la forte pénétration du Ru dans le cristal de Fe cela pouvait être l'effet de la diffusion d'espèces moléculaires de Ru au sein du cristal composite de Fe déjà formé. De toute évidence, la deuxième pente de la rampe du Ru représentait le dernier mécanisme de diffusion dans la phase cristalline qui pouvait avoir lieu quelle que soit la manière dont le cristal composite est généré (par dissolution/recristallisation ou par coalescence). Concernant le processus de diffusion dans la phase cristalline, il convient de noter que les interactions entre les composants anioniques et cationiques sont de nature électrostatique et se produisent par l'établissement de liaisons H réversibles entre les atomes d'hydrogène acides appartenant aux « tectons » organiques ( $cat^{2+}$ ) et les centres azotés des ligands



cyanure de  $[M(CN)_6]^{4-}$  ( $M = Ru$  ou  $Fe$ ). Comme indiqué ci-dessus, la connectivité via une liaison H conduit à la formation de feuilles 2D. Le tassement de ce dernier génère des canaux, qui sont occupés par des molécules d'eau. En raison de la taille relativement petite du cation (longueur de 1,11 nm et largeur d'environ 0,2 nm) et de l'anion (géométrie octaédrique d'un diamètre de 0,62 nm), on pouvait imaginer le mouvement de ces espèces au sein du treillis. Ces mouvements pouvaient en outre être favorisés par la présence de molécules d'eau mobiles. De plus, la présence de trous et de défauts dans le monocristal de fer pouvait également augmenter la mobilité de l'espèce moléculaire Ru, cela expliquerait la diffusion prononcée dans le cristal de Fe. Donc la solution solide obtenu avait une composition fractionnelle  $[(cat^{2+})_2-(Fe(CN)_6)^{4-}]_x (Ru(CN)_6)^{4-}_{1-x} \cdot 8H_2O$ ] à l'interface, ou  $x$  variait selon la position dans cette dernière.

### III.2.2.1.2) Développement d'une nouvelle approche :

Avec la technique CEMOVIS, utilisée précédemment, nous avons réussi à réaliser des sections ultrafines de 70 nm et nous avons maintenu l'échantillon tout au long du processus, de la préparation à l'analyse en Cryo-EM, à la température de l'azote liquide ce qui a permis de garder intacte la structure du cristal moléculaire. Cependant, la mise en œuvre de cette technique était difficile et très délicate et demandait une longue pratique. De plus il fallait disposer d'un Cryo-Ultramicrotome. Donc pour pallier ces contraintes nous avons développé une nouvelle approche. Cette méthode devait en même temps être relativement facile à mettre en œuvre et se réaliser dans des conditions normales (par exemple à température ambiante...). Nous sommes restés sur l'idée d'effectuer des coupes fines pour garder tous les avantages d'un échantillon mince. Cependant pour réaliser des sections ultrafines sans défauts on se devait de se prémunir de mettre en contact les cristaux moléculaires coupés avec l'eau car leurs structures se modifiaient et souvent ils se dispersaient. On ne pouvait non plus utiliser d'autres solvants car les différents tests que nous avons effectués ont tous eu des conséquences irréversibles en détruisant la structure initiale.

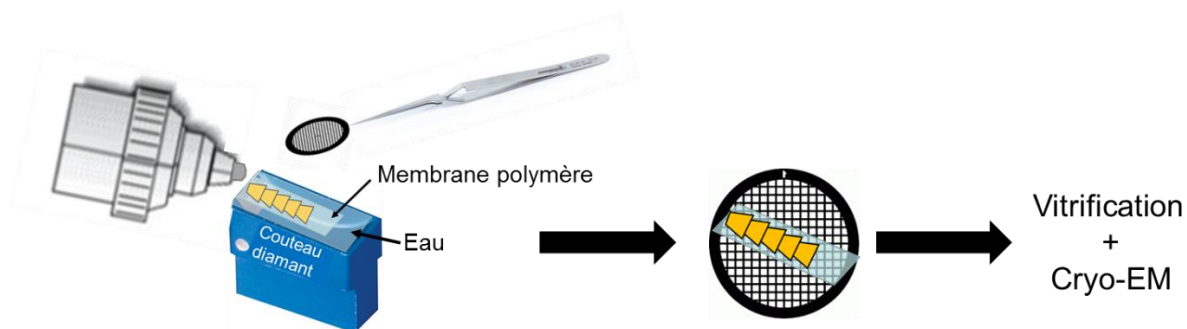


Figure 8 : processus de la préparation à l'analyse en Cryo-EM

Les cristaux de Fe et Ru ont été préalablement enrobés dans une résine époxy polymérisable à température ambiante. Puis, avant la réalisation des sections nous avons déposé une membrane de formvar à la surface de l'eau de la cuve du couteau de diamant. Ensuite nous avons procédé à la coupe en prenant soin d'éviter le contact avec l'eau. On a récupéré les sections à l'aide d'une grille de cuivre avec une membrane de carbone (figure 8). Les différentes préparations sont expliquées dans le chapitre 1 paragraphe II.2) sur la préparation.

L'observation des coupes en Cryo-EM a validé cette technique de préparation. En effet, les images acquises ont montré que les matériaux étaient intacts et on a réussi à mettre en évidence l'interface.

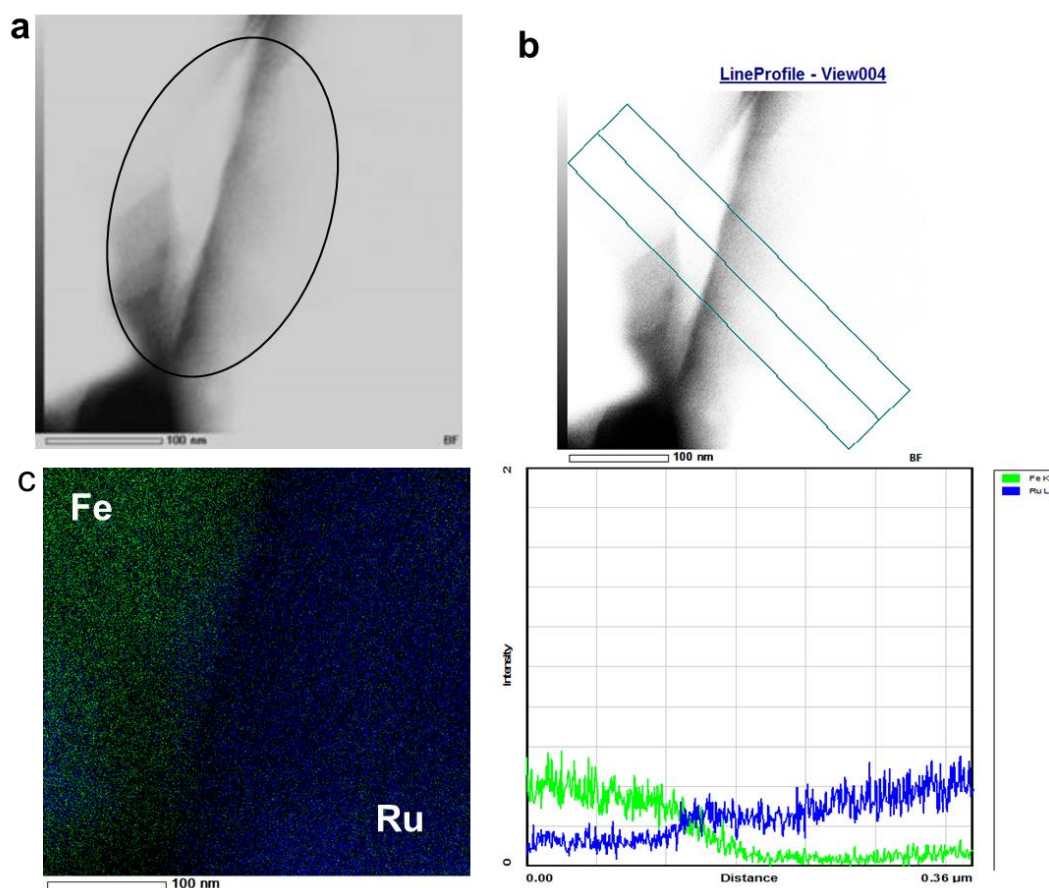


Figure 9 : a) Image STEM de la zone étudiée avec l'identification de l'interface, b) profil chimique du Fe et Ru et c) la cartographie de l'interface entre le cristal de Fe et celui Ru.

Les analyses ont donné les mêmes résultats et conclusions que ceux obtenus par la technique CEMOVIS. En effet, nous avons réussi à mettre en évidence l'interface entre le cristal de Fe et celui de Ru. De plus, nous avons également remarqué une diffusion plus prononcée du Ru dans la matrice du cristal de Fe (figure 8). Dans la figure 9, l'image en mode HAADF a montré une différence de contraste due à la différence de masse molaire entre Fe et Ru, de plus on a remarqué que l'épaisseur de l'interface était également d'environ 50 nm.

Cette méthode avait un avantage de taille, outre qu'elle est facile à utiliser, elle nous a permis de réaliser des sections dans des zones d'intérêts particulières du matériau et nous avons pu aller voir de plus près certains défauts dans le cristal moléculaire.

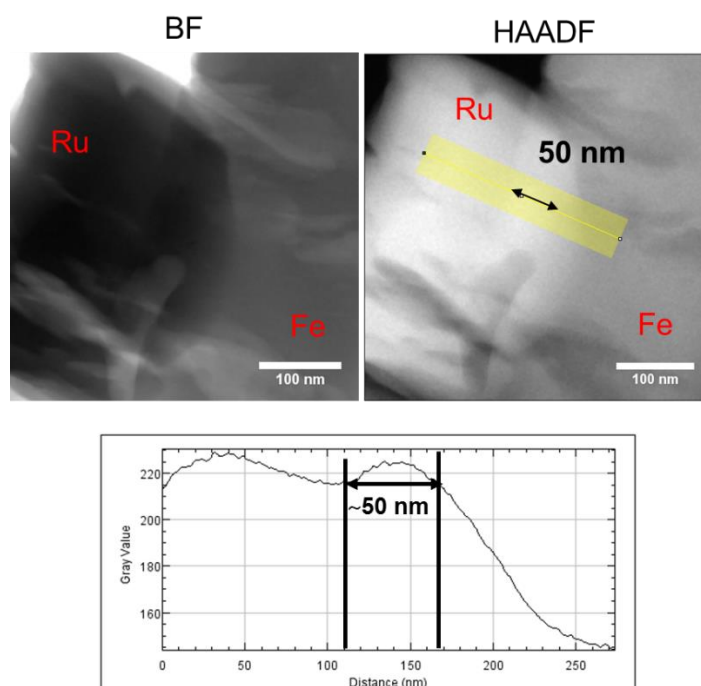


Figure 9 : images BF et HAADF en mode STEM et mesure de la largeur de l'interface à l'aide d'un profil d'intensité (en gris).

Dans l'exemple présenté ci-dessous, nous avons choisi une région sur le cristal à l'aide d'une photo obtenue avec un microscope optique. Cette aire représenta le coin de l'interface entre les deux monocristaux (figure 10). Cependant, cette région a nécessité

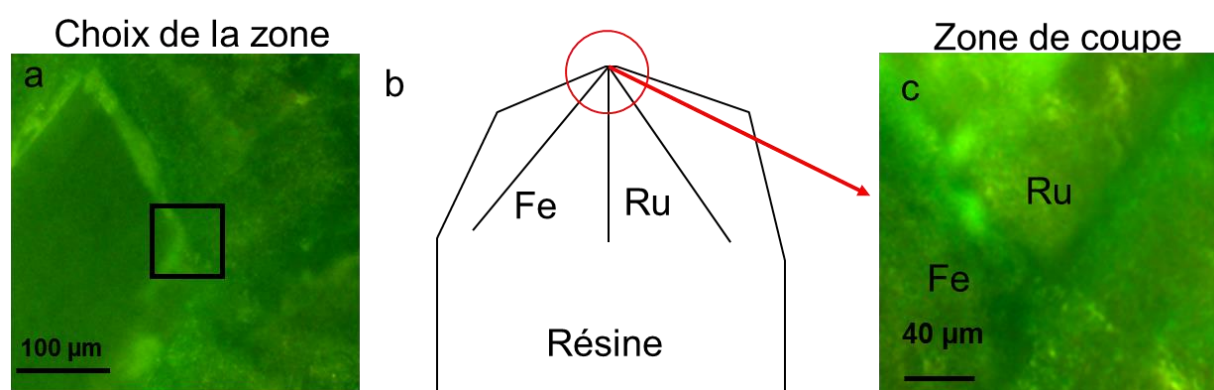


Figure 10 : a) image optique de la région choisie, b) préparation de la pyramide de la zone à couper et c) photo de la pyramide.

une préparation particulière pour réaliser les sections. En effet, chaque zone choisie demandait au préalable un repérage à l'aide d'un microscope optique ou binoculaire, puis il fallait bien orienter le bloc de résine dans le compartiment de l'ultramicrotomie

et enfin procéder à la réalisation de la pyramide pour la coupe d'épaisseur 70 nm.

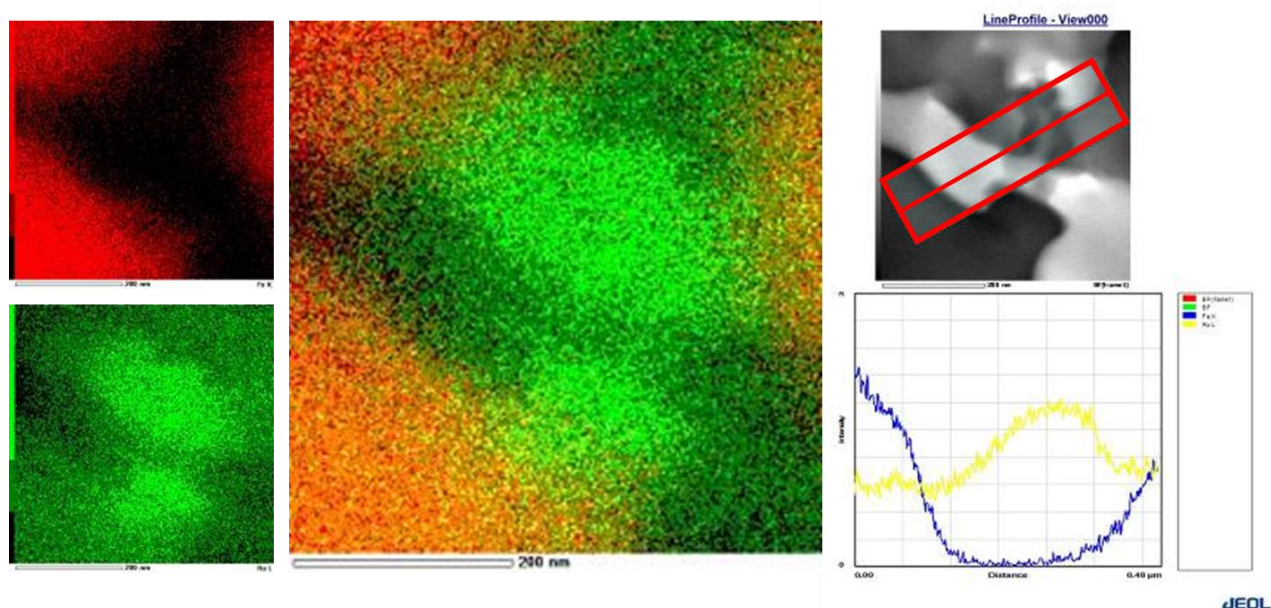


Figure 11 : cartographie chimique du coin « rectangle » de l'interface entre les deux cristaux (gauche) et variations de la composition chimique du fer et du ruthénium (droite).

L'analyse du coin de l'interface entre les deux monocristaux a montré encore un fois l'aspect de diffusion du complexe de Ru par rapport au Fe. Dans ce cas, on a remarqué que le sommet du coin était essentiellement constitué de Ru alors que les facettes présentaient les deux éléments en majorité le Fe.

Il est important de noter que cette méthode présentait deux bénéfices : le premier est la possibilité de réaliser des sections ultrafines tout en gardant le matériau fragile intact et le second de choisir n'importe quelle région de l'échantillon à étudier. Grâce à cette technique nous avons observé des régions présentant des défauts ou encore pu choisir une zone particulière comme présenté ci-dessus.

### III.2.3) Conclusion et perspectives

Le développement des techniques de préparation a été la pierre angulaire qui a permis de mettre en œuvre la Cryo-STEM couplée à la cartographie chimique pour avoir accès à la morphologie, à l'organisation, à la structure et à l'arrangement des différents éléments de ces matériaux qui auparavant n'étaient pas accessibles en microscopie standard et sans préparation spécifique.

Dans cette partie, nous avons dû résoudre deux problèmes. Le premier, le plus difficile, était le développement de techniques et de protocoles de préparation spécifique permettant l'obtention d'une couche mince de l'interface. En effet, l'échantillon présentait une fragilité accrue lors de sa manipulation macroscopique

car sa structure est régie par des interactions faibles (Van der Waals et liaison H). Dans un premier temps, nous avons utilisé plusieurs techniques de Cryo-ultramicrotomie et c'est la technique CEMOVIS qui nous a permis d'obtenir des sections fines et en bonne état. Cependant cette dernière était très délicate à mettre en œuvre. D'où l'intérêt de développer une méthode nouvelle et plus facile à mettre en œuvre. Le développement de la méthode « à la membrane » a permis d'obtenir des sections ultrafines (70 nm) et de garder l'échantillon intact.

Le deuxième défi était la caractérisation par Cryo-EM en mode STEM pour la réalisation de cartographies chimiques du cristal moléculaire. En effet, nous avons réussi à mettre en évidence l'interface entre le Fe et Ru sans détériorer le matériau. De plus, nous avons montré que la diffusion du Ru dans la matrice de Fe était plus prononcée et enfin nous avons réalisé la mesure de l'épaisseur de cette interface.

Grâce à ces développements il sera sans doute plus facile, par la suite, de réaliser des études sur des cristaux moléculaires plus complexes avec plusieurs étages de monocristaux et de différentes compositions.



**REFERENCES DU CHAPITRE 3 : DEUXIEME PARTIE**

1. J.-M. Lehn, *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, 1995.
2. M. W. Hosseini, *CrystEngComm*, 2004, 6, 318; (b) M. W. Hosseini, *Chem. Commun.*, 2005, 5825.
3. E. F. Bres, S. Ferlay, P. Dechambenoit, H. Leroux, M. W. Hosseini and S. Reyntjens, *J. Mater. Chem*, 2007, 17, 1559–1562 | 1559
- 4 B.F.Abrahams, B.F Hoskins., R. Robson *J. Am. Chem. Soc.* 1991, 113, 3606;
5. (a) C. Bosshard, K. Sutter, P. Pretre, J. Hulliger, M. Floërsheimer, P. Kaatz and P. Günter, *Organic Nonlinear Optical Materials (Advances in Nonlinear Optics, Vol 1)*, Gordon and Breach Science Publishers, Postfach, Switzerland, 1995
6. C. B. Aakeröy and A. M. Beatty, *CrystEngComm*, 1998, 1, 39;
7. J. Fraxedas, *Adv. Mater.*, 2002, 14,1603.
8. C.Janiak *Dalton Trans.* 2003, 2781;
9. Janiak C., Vieth J.L. *New J. Chem.* 2010, 34, 2366;
10. W.L.Leong, J.J. Vittal *Chem. Rev.* 2011, 111, 688
11. C. W. Dirk, E. A. Mintz, K. F. Schoch, T. J. Marks. *J. Macromol. Sci., Chem.*, 1981, Alb(I), 275.
12. S. Ferlay, V. Bulach, O. Felix, M. W. Hosseini, J.-M. Planeix and N. Kyritsakas, *CrystEngComm*, 2002, 4, 447;
13. S. Ferlay and M. W. Hosseini, *Chem. Commun.*, 2004, 788; (b) P. Dechambenoit, S. Ferlay and M. W. Hosseini, *Cryst. Growth Des.*, 2005, 5, 2310.



# CHAPITRE 4

## IV. Développement de la tomographie électronique à froid (Cryo-ET) appliquée aux matériaux fragiles : exemple d'application à un réseau métallo-organique (MOF)

La tomographie est une expertise du laboratoire, plusieurs thèses ont été soutenues dans ce domaine.<sup>1,2</sup> Par conséquent, nous n'allons pas développer ici toute la méthodologie, ni discuter sa mise en œuvre. Fort de cette compétence, c'est tout naturellement, après avoir acquis l'expérience de la Cryo-EM, que nous avons exploré la morphologie et la structure de matériaux dit « fragiles » en 3D par la mise en place de la tomographie à froid (Cryo-ET).<sup>3</sup> Le besoin de sonder certains matériaux fragiles pour en tirer les informations tridimensionnelles s'est rapidement manifesté. Pour le satisfaire, nous avons mis en application les méthodes de préparation que nous avons développées pour la Cryo-EM. Cependant, nous étions confrontés à un problème supplémentaire qui était celui du temps d'exposition. Celui-ci était minimisé au maximum lors des caractérisations en Cryo-EM. Alors qu'en tomographie électronique, il faut acquérir une moyenne de 70 images sur un même nano-objet, ce qui représente une dose accumulée d'électrons trop importante. Souvent à partir de la dixième image la particule présente déjà un début de dégradation morphologique. Dans ce chapitre, nous allons partir de l'étude d'un réseau métallo-organique (MOF) pour discuter du défi de la mise en place de la Cryo-ET ainsi que son intérêt et ses contraintes. On montrera que c'est la seule technique qui nous a permis d'obtenir une information volumétrique d'un MOF et dont tirer des données numériques.

### VI.1) La Cryo-tomographie : son principe

De plus en plus de matériaux synthétisés et étudiés sont à la frontière entre l'organique et l'inorganique, ce qui leur confère de nouvelles propriétés mais entraîne aussi de nouvelles difficultés pour les caractériser. En effet, la microstructure de ces nanomatériaux est de plus en plus complexe. Nous sommes obligés de développer de nouveaux outils pour être capable d'analyser et d'optimiser ces microstructures. D'autre part, la complexité des dispositifs nanométriques ne cessera de croître jusqu'à obtenir des assemblages composés de plusieurs types de matériaux et dont l'ensemble est maintenu par toutes sortes d'interactions dont les plus faibles. Une technique de choix pour fournir des informations résolues dans les trois directions de l'espace sur ces structures complexes et sensibles est la Cryo-ET. Comme pour la tomographie classique, la reconstruction du volume s'effectue à partir d'une série de projections en deux dimensions (figure 1), la différence étant le fait que les

projections sont enregistrées en mode Cryo-EM ; elle permet d'obtenir une résolution inférieure à la dizaine de nanomètres et même en deçà du nanomètre pour les plus résistants au faisceau d'électrons du microscope. Étant donné que la profondeur de champ en microscopie est assez grande et l'échantillon mince, la mise au point s'effectue en première approximation sur toute l'épaisseur de l'échantillon, surtout si l'on travaille en mode parallèle TEM. L'image obtenue est donc une projection de l'échantillon dans un plan perpendiculaire à la direction d'observation. En inclinant l'échantillon à l'aide du goniomètre du microscope à différents angles d'inclinaison (angles de tilt) et en réajustant à chaque reprise la mise au point de la projection, on obtient une série d'images de ce même objet. Puis à partir de cette série on peut réaliser une reconstruction 3D de l'objet à l'aide de différents algorithmes. La résolution finale dans le volume reconstruit dépend essentiellement du nombre de projections acquises et de l'angle de tilt maximum, mais également des caractéristiques de l'objet. Finalement l'analyse du volume consiste à visualiser et extraire les parties à analyser à et calculer les paramètres d'intérêt.

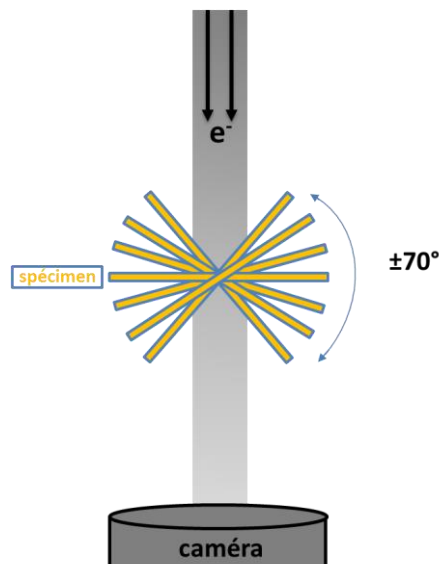


Figure 1 : Schéma de principe pour l'acquisition d'une série de projections en tomographie électronique

## IV.2) Défi pour le développement de Cryo-ET.

La tomographie MET à froid (Cryo-ET)<sup>1</sup> est une technique d'imagerie connue et très utilisée dans de nombreux sous-domaines de la biologie.<sup>4</sup> Ceci grâce à sa capacité à imager des cellules intactes, des virus et de grands complexes moléculaires dans leur état quasi-natif d'hydratation congelée.<sup>5</sup> Cette technique permet de combler l'écart de résolution entre les technologies d'imagerie à basse résolution, telles que la microscopie en fluorescence, et les technologies à haute résolution, telles que la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie RMN.<sup>15,16</sup> Grâce à ses

particularités, la Cryo-ET a été largement utilisée pour révéler l'organisation moléculaire des structures cellulaires dans les cellules bactériennes et les virus.<sup>17</sup> Par conséquent, la Cryo-ET est un outil idéal pour étudier ces structures presque intactes et leur relation avec leur environnement natif dans les reconstructions 3D (connues sous le nom de tomogrammes) à une résolution pouvant descendre jusqu'à 4 nm (même 2 nm dans les situations les plus favorables).<sup>18</sup> Cependant, seuls les laboratoires de microscopie dédié aux matériaux biologiques pouvaient prétendre à ces caractéristiques grâce à leurs MET dédiés à la cryo-microscopie. Grâce aux nombreux développements instrumentaux et méthodologiques, ils ont réussi à préparer et à acquérir presque de façon automatique des tomogrammes de leurs échantillons biologiques par congélation ultrarapide (inférieure à la milliseconde) sous très haute pression. Les échantillons vitrifiés peuvent être transférés dans le microscope à l'aide d'une cryo-canne sans jamais être en contact avec l'air ambiant. Les systèmes d'enregistrement de données sont très rapides et se font dans des espaces de stockage des données très volumineux. Dans notre laboratoire on ne dispose pas de toutes ces facilités, cependant nos matériaux d'études ne présentaient pas les mêmes caractéristiques que ceux issus de la biologie ; ce sont des matériaux hybrides, souvent hydratés, qui peuvent présenter une meilleure résistance aux dégâts d'irradiation et nous a permis d'explorer la matière hybride et fragile et d'en quantifier certains paramètres utiles. La seule différence entre une étude Cryo-EM standard et une étude en Cryo-ET est le temps d'exposition. Pour l'acquisition des images 2D aux différents angles il faut au minimum 30 minutes. Souvent après les premières images, environ une dizaine, l'échantillon présente des signes de dégradation. A noter qu'en tomographie électronique standard ces effets de dégradation apparaissent plus rapidement dès la deuxième image et de façon bien plus importante. Nonobstant, plus nous progressons sur l'acquisition des images plus les dégâts sur la structure de la particule deviennent importants. Pour résoudre ce problème nous avons d'abord mesuré le dose d'électrons que peut supporter le matériau. Ensuite, nous avons mis en œuvre l'acquisition en respectant cette condition soit en jouant sur le temps d'acquisition soit en diminuant la dose d'électrons d'exposition par image selon plusieurs protocoles, qu'on détaillera par la suite. Pour finir, si malgré ces précautions notre échantillon présentait des dégâts nous utilisons des filtres lors de la reconstruction pour diminuer l'influence de ces dégâts lorsqu'ils ne sont pas très importants, dans le sens qu'ils n'affectent que la surface et qu'ils ne modifient pas la morphologie générale de l'échantillon.

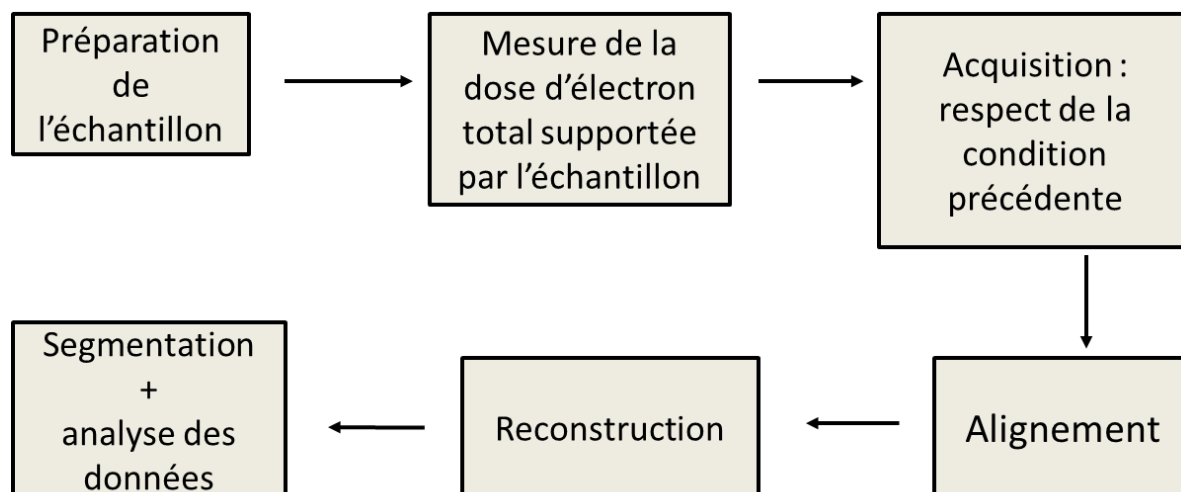


Figure 2 : méthode utilisé pour obtenir un volume 3D représentative de l'échantillon, en partant de la préparation jusqu'à l'analyse des données.

La méthodologie est résumée dans la figure 2 ci-dessus. Il faut noter que nous avons utilisés tous les modes de travail (MET, STEM, EFTEM...) que nous offre nos microscopes pour réaliser la Cryo-ET. Cependant dans ce chapitre nous détaillerons uniquement le mode STEM. Car pour plusieurs raisons, décrite dans le tableau 2 ci-dessous, ce mode permet d'obtenir une meilleure mise en évidence des caractéristiques des différents matériaux étudiés. Nous avons décrit brièvement chaque étape de la méthodologie présentée à la figure 2 lors de notre étude sur un MOF.

### IV.3) Étude par Cryo-ET d'un MOF : détermination de la localisation des NPs

Pour illustrer le développement de la Cryo-ET et sa mise en œuvre nous avons choisi un matériau hybride de type MOF. Ces derniers ont été beaucoup explorés pour une large gamme d'applications différentes, notamment la séparation, le stockage, la catalyse et plus récemment, la biomédecine.<sup>20</sup> Les bio-applications nécessitent que les éléments constitutifs (métal, ligand) des MOFs soient peu toxiques pour les mammifères.<sup>21</sup> À cet égard, des études récentes ont proposé le couplage direct d'un cation non toxique et biocompatible à des lieux endogènes ou thérapeutiquement actifs pour créer des MOF bioactifs.<sup>22</sup> En collaboration avec les chercheurs Nathalie Steunou de l'institut Lavoisier de Versailles et Nicolas Menguy de l'Université Pierre et Marie Curie de Paris nous avons étudié la structure de MOF par Cryo-ET dans le

but de déterminer la morphologie globale et le positionnement des nanoparticules (NPs) en surface ou à l'intérieur, leurs nombres et le pourcentage volumique. La problématique posée était de résoudre le positionnement exact des NPs dans le réseau métallo-organique qui pourrait expliquer les propriétés de ces structures. Dans ce cas, il s'agissait plus précisément du développement d'un nanovecteur multifonctionnel basé sur les MOF avec des propriétés de délivrance de médicament et d'imagerie.

### IV.3.1) Présentation de l'échantillon :

Le matériau que nous avons étudié était composé d'une partie organométallique le  $\text{Fe}^{\text{III}}_3\text{O}(\text{H}_2\text{O})_2\text{F}\{\text{C}_6\text{H}_3(\text{CO}_2)_3\}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  appelé « MIL-100(Fe) »<sup>23</sup> et de nanoparticules de maghémite. Il est présenté ci-dessous, figure 3, la réaction de formation du MIL-100(Fe).

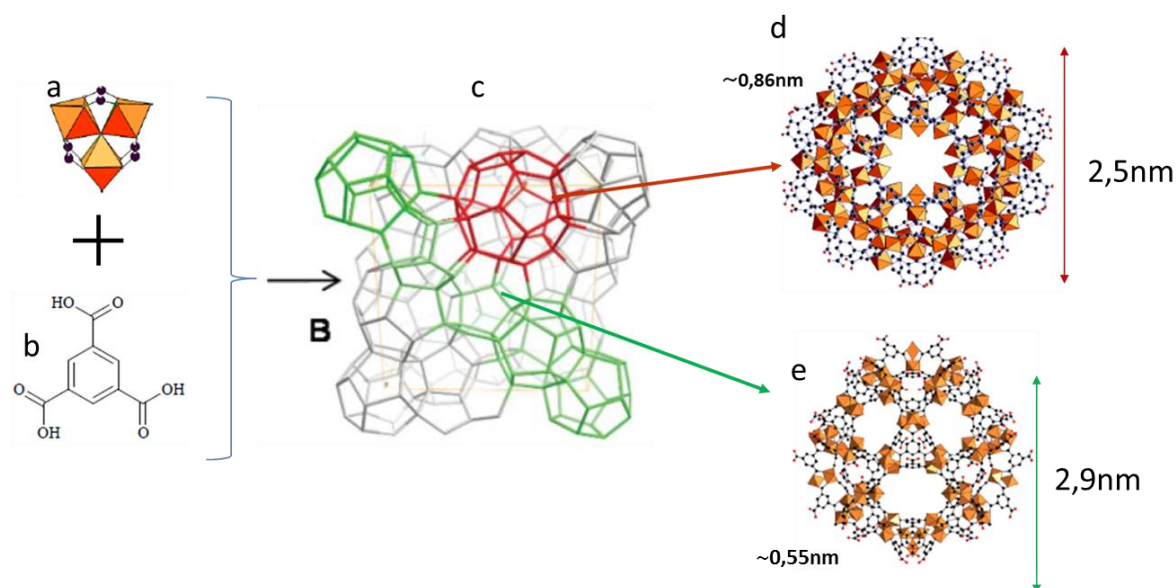
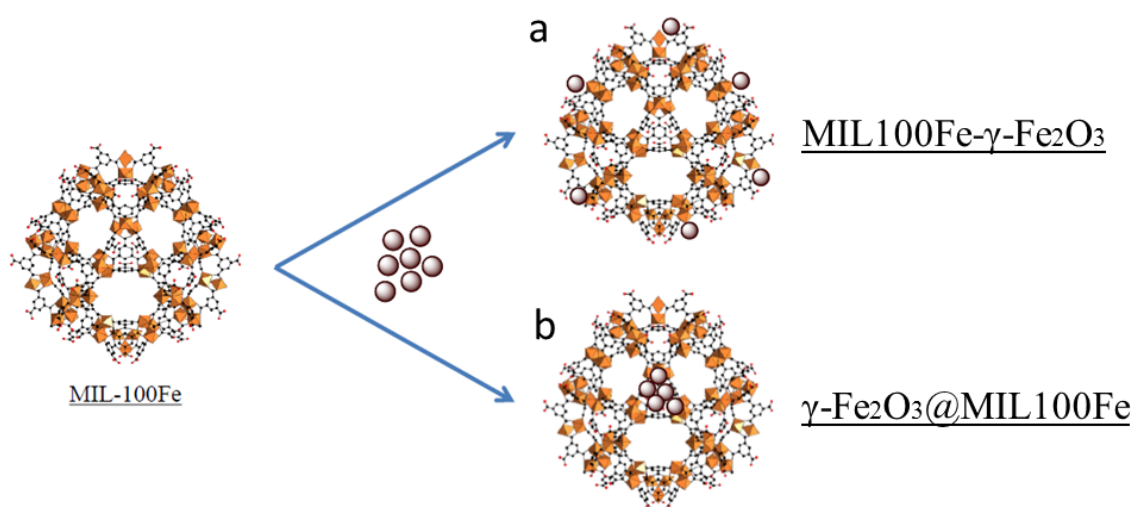


Figure 3 : Structure de MIL-100 (Fe). (a) Un trimère d'octaèdres de fer et (b) acide benzène-1,3,5-tricarboxylique (acide trimésique). (c) Vue schématique d'une cellule unitaire de MIL-100 (Fe). À droite les deux types de cages en mode polyédrique. (d) Fenêtres hexagonales et (e) pentagonales.<sup>23</sup>

Deux approches peuvent être utilisées pour la formation du réseau avec les nanoparticules de maghémite ( $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Soit les NPs sont ajoutées après formation du MOF, avec une probable localisation en périphérie. Soit la formation du MIL-100Fe se fait en présence de NPs de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  et la probabilité est forte que ces dernières soient au cœur du MOF, voir figure 4.





Fi

gure 4 : représentation des deux approches de synthèse : (a) absorption des NPs de maghémite en surface du MOF et (b) croissance du MOF sur les maghémite (système cœur-coquille).

Le but de la Cryo-ET était de déterminer avec précision le positionnement de ces NPs dans le réseau. Ceci devait permettre de valider ou non l'une ou les deux approches.

### IV.3.2) Préparation d'échantillon

Les échantillons pour la tomographie peuvent être préparés par diverses méthodes. Pour la Cryo-ET, les échantillons se présentaient en milieu liquide ; il est prélevé une goutte qui est déposée sur une fine membrane de carbone avec des trous réguliers supportée par une grille de cuivre. Cette grille est ensuite congelée à l'aide d'éthane liquide. La chute brutale de la température empêche les molécules d'eau de se réorganiser en cristaux et ainsi de la glace amorphe se forme, ce qui préserve les échantillons hydratés dans leur état d'origine avec un minimum d'artefacts. Cette préparation est exactement la même que pour une observation en Cryo-EM standard (chapitre 1, paragraphe II.2.1.1.1). Il est également possible de partir de sections minces réalisées par cryo-ultramicrotomie, dans ce cas les coupes sont gardées dans l'azote liquide et transférées directement dans le porte objet froid préalablement placé à la température de l'azote liquide. Ce porte objet spécifique dispose d'un système de refroidissement dont la température peut descendre jusqu'à la température de l'azote liquide (environ  $-195^\circ\text{C}$ ) et qui permet de plus d'avoir une amplitude angulaire jusqu'à  $\pm 70^\circ$ .

## IV.3.3) Mesure de la dose maximum :

Comme chaque matériau a une réaction différente à l'exposition au faisceau d'électrons, l'étape de mesure de la dose d'électrons totale supportée par l'échantillon est importante. Elle permet d'avoir une information sur la résistance et la fragilité de l'objet étudié. Par ailleurs cela permet de mettre en place les précautions pour préserver sa structure des dégâts d'irradiations. En effet, les dégâts après une acquisition peuvent être plus au moins importants selon le temps d'acquisition, la dose d'électrons ou encore le mode de travail utilisé. Le choix de travail en mode STEM permet une meilleure maîtrise de la dose d'électrons totale, de plus le contraste sur les matériaux hybrides est meilleur que dans le mode MET standard et enfin il permet d'obtenir deux reconstructions simultanément une en champ clair (BF) et l'autre en champ sombre HAADF, le dernier permettant de s'affranchir de l'effet de la diffraction des nanoparticules cristallisées. Cependant, nous avons un problème lors de l'utilisation de ce mode de travail : le temps d'acquisition était beaucoup plus important que dans le cas d'une acquisition en mode MET. Et ceci avait pour effet de dégrader l'objet étudié après seulement quelques degrés d'inclinaisons, souvent après une dizaine d'images. Ici, nous présentons les conséquences de l'irradiation électronique, lors de l'acquisition en mode STEM, sur un nano-objet MOF avec les NPs de maghémites (figure 5).

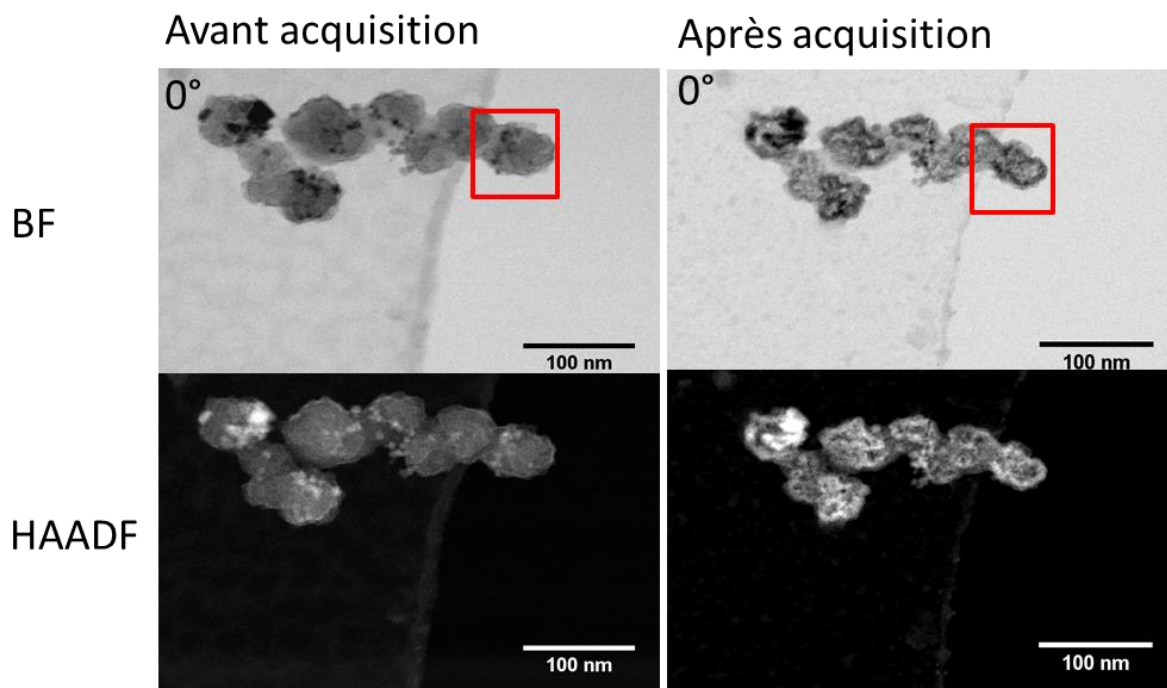


Figure 5 : Images à 0 degré avant (gauche) et après (droite) le processus d'acquisition tomographique.

Après l'acquisition des projections, l'échantillon présente des dommages importants. Sur cet exemple, on observe les premiers signes de détérioration à partir de l'angle d'inclinaison de  $32,5^\circ$  et à  $10^\circ$  la surface du matériau est totalement changée (figure 6).

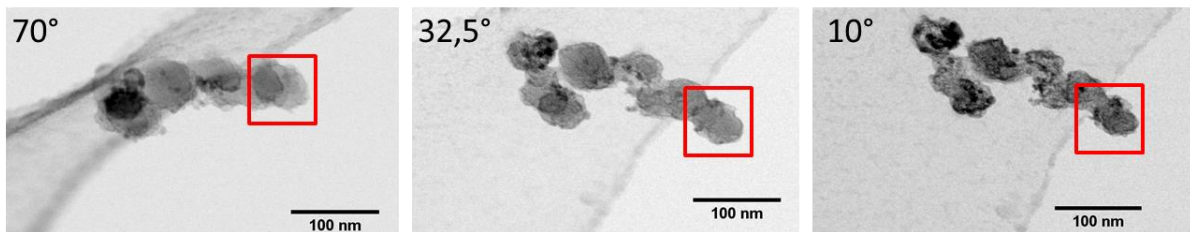


Figure 6 : suivi de la dégradation durant le processus d'acquisition.

La structure est relativement bien maintenue de  $70^\circ$  à  $32,5^\circ$ , ce qui représente 1660 secondes (en moyenne 100 secondes par projection), avec un grandissement de 300Kx et une densité de courant de  $7,9 \text{ pA/cm}^2$ . La dose électronique reçue en une seconde est d'environ  $5.10^7 \text{ e/s}$  donc la dose totale maximum est de  $8,3.10^{10}$  électrons<sup>8</sup> voir tableau 1 ci-dessous.

D = Densité de courant	$7,9 \text{ pA/cm}^2$
$t_l$ = temps d'exposition limite	1660 s
e = Charge d'un électron	$1,602.10^{-19} \text{ C}$
$i_e$ = Dose électronique	$i_e = D/e = 5.10^7 \text{ e/s}$
$d_{t\text{-max}}$ = dose totale maximal	$d_{t\text{-max}} = i_e \times t_l = 8,3.10^{10} \text{ électrons}$

Tableau 1 : récapitulatif des relations et données utilisées pour le calcul de la dose électronique totale maximale supportée par l'échantillon.

Dans ce cas on a remarqué que la morphologie globale est relativement intacte, cependant il y a une diminution du volume total. Grâce à la mesure de  $d_{t\text{-max}}$ , la limite de résistance à l'irradiation de l'échantillon est connue et permet de prendre les précautions nécessaires lors de l'acquisition pour préserver la structure de l'objet étudié.

## IV.3.4) Acquisition : Développement d'une méthode pour réduire les effets des électrons

La Cryo-ET sur les échantillons biologiques est presque exclusivement réalisée en mode parallèle soit sur des coupes d'ultramicrotomie à froid ou sur des spécimens marqués pour augmenter le contraste.<sup>6,7</sup> Les microscopistes en biologie travaillent avec une illumination très faible en deçà de  $100 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}$ ,<sup>9</sup> d'où la nécessité de prendre un nombre considérable d'images à chaque angle et un temps d'acquisition très long d'une série pouvant aller jusqu'à plusieurs jours. Pour nous le mode STEM a des avantages indéniables pour obtenir les informations essentielles sur nos échantillons hybrides (tableau 2). En conséquence, pour réduire la dose d'électrons et le temps d'exposition nous avons mis en place une méthode d'acquisition spécifique (figure 7). Pour ce faire, lors de l'expérimentation nous réalisons en premier le repérage de plusieurs nano-objets bien situés avec des angles d'inclinaison de  $\pm 70$  degré, dans la mesure du possible. Ensuite, nous choisissons un objet, autre que celui d'intérêt, le long de l'axe d'inclinaison pour y faire les réajustements des paramètres d'acquisition lors de l'enregistrement de la série des projections. Par conséquent, nous réduisons le temps d'exposition sur l'objet, ce dernier n'étant exposé aux électrons

	Cryo-STEM	Cryo-MET
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dose d'électrons faible</li> <li>- Mode HAADF: pas d'effets de diffraction</li> <li>- Meilleur contraste organique/inorganique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Temps d'acquisition faible (possibilité de faire des série de moins de 30 minutes)</li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Temps d'acquisition trop important (plus de 2 heures)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible contraste</li> <li>- Problèmes de diffraction aux grands angles d'inclinaison</li> <li>- Dose d'électrons importante</li> </ul>

Tableau 2 : schéma comparative des avantages et inconvénients de la Cryo-ET selon le mode STEM et TEM sur le matériaux hybrides.

que lors de l'enregistrement des « vraies » images. Ainsi l'échantillon n'était illuminé qu'un quart du temps par rapport à une acquisition standard, avec les corrections des

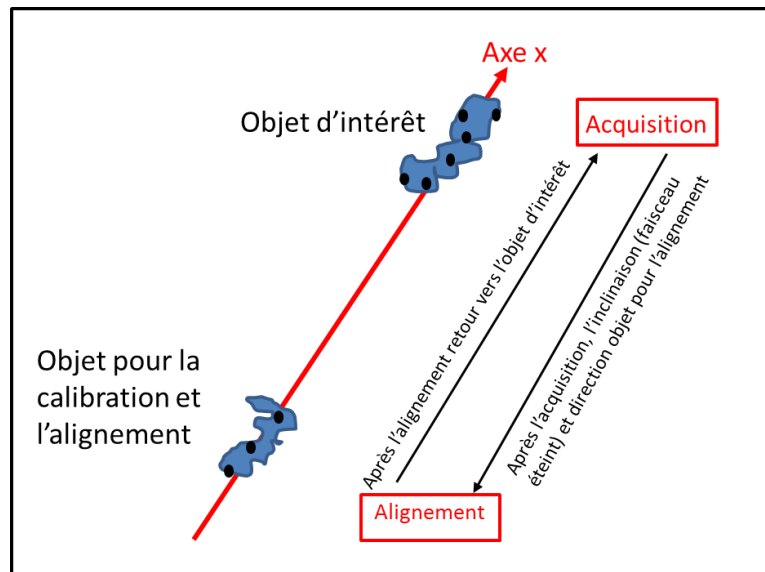


Figure 7 : Méthodologie d'acquisition d'une série de projections Cryo-ET en mode STEM.

paramètres d'acquisition réalisées sur l'objet d'étude. Ce protocole nous a permis de minimiser l'exposition de l'échantillon aux électrons et d'être en dessous de la limite de destruction de la morphologie de la particule.

#### IV.3.5) Acquisition et alignement : critère d'acceptabilité de la série

Ces séries de tilt ont été acquises en mode STEM et l'échantillon a été incliné entre  $+70^\circ$  et  $-60^\circ$  avec un incrément de  $1,5^\circ$ . Si l'acquisition des images était parfaite, il serait possible d'obtenir directement un tomogramme à partir des données brutes. Cependant, ceci est presque impossible à cause des différentes imperfections mécaniques du goniomètre et du porte-objet, lors du suivi de l'acquisition. Donc il est nécessaire d'aligner la série d'images inclinées afin de corriger toutes ces imperfections. Pour ce faire, il est impératif d'identifier et faire correspondre un seul axe de coordonnées aux différentes projections. La plupart des méthodes disponibles exécutent cette étape de manière semi-automatique en utilisant des algorithmes basés sur la fonction de corrélation croisée entre deux images qui sont implémentés dans divers logiciels (tomoJ, IMOD...).<sup>10,11</sup> Il est aussi possible de placer des marqueurs tel que des billes d'or sur l'échantillon (repères de contraste élevé appelé « fiducials markers » en anglais) afin d'augmenter la précision de l'alignement.<sup>10</sup> Ces marqueurs sont utilisés pour suivre l'alignement d'une projection à la suivante. Ceci a pour effet de créer un modèle géométrique donnant un alignement beaucoup plus précis à appliquer à la série de projections. Cependant dans notre cas nous n'avons pas utilisé de marqueur pour ne pas les confondre avec les NPs de l'échantillon.

Après l'acquisition nous avons enregistré les images à 0 degré, pour pouvoir les comparer à celles de départ (figure 8) et ainsi juger de l'acceptabilité de la série de projections.

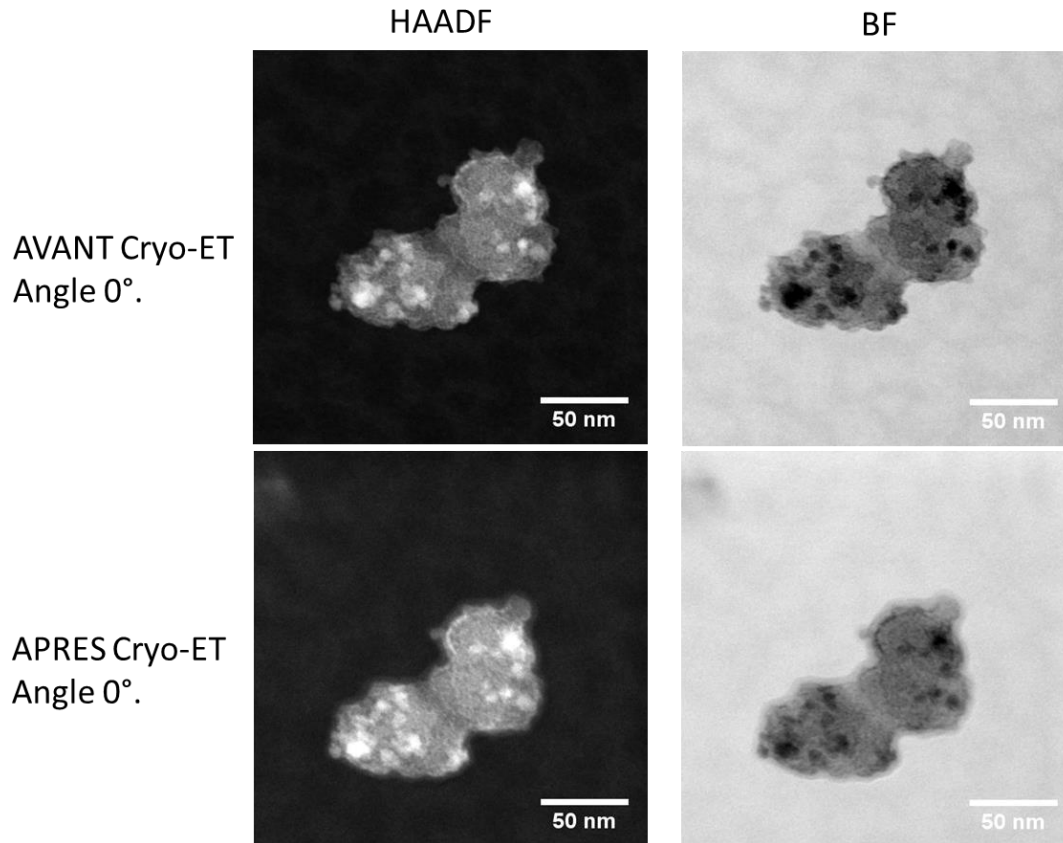


Figure 8 : présentation des images à 0 degré avant et après acquisition de la série d'images.

La première remarque est que, en utilisant les paramètres d'acquisition pré-définis, la morphologie globale a bien été préservée dans l'ensemble. On n'observe pas de détérioration notable de la structure, en exceptant le fait qu'une très fine couche de contamination s'est formée autour du grain choisi. Ces résultats nous ont permis de conclure que la série était acceptable et qu'on pouvait passer aux étapes suivantes, notamment l'alignement et la reconstruction.

#### IV.3.6) Reconstruction :



Une fois les images alignées, l'étape suivante est la reconstruction de l'objet. Pour ce faire, des algorithmes mathématiques analytiques itératifs basés sur la rétroprojection filtrée (Weighted Backprojection en anglais),<sup>12</sup> telles que la méthode de reconstruction itérative simultanée (SIRT)<sup>13</sup> et la méthode de reconstruction algébrique (ART)<sup>14</sup> ont été implémentées dans différents logiciels pour générer des cartes de densité moyenne 3D.<sup>5,6</sup> Toutes les méthodes de reconstruction dépendent de la réalisation préalable d'un alignement fin, dans le but d'obtenir une reconstruction avec la résolution théorique espérée. Du point de vue mathématique, la reconstruction d'un objet à partir de la connaissance de ses projections a été proposée par Radon. En effet, la densité massique locale de l'objet (qui est proportionnelle à l'intensité) peut être définie en chaque point par une fonction tridimensionnelle  $f(x,y,z)$ . L'ensemble des projections de l'objet correspond à la transformée de Radon de cette fonction, qui est une famille de fonctions  $Rp(xi,yi,qp)$ . La reconstruction tomographique consiste à inverser la transformée de Radon pour revenir à la fonction  $f(x,y,z)$  de départ correspondant à la densité locale moyenne.<sup>19</sup>

Pour la reconstruction nous avons choisi d'utiliser l'algorithme ART avec plus d'une vingtaine d'itérations.

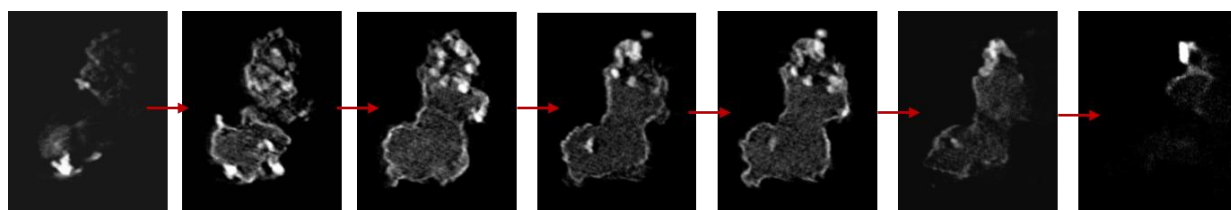


Figure 9 : coupes xy par le volume du tomogramme reconstruit.

Finalement, grâce à la segmentation, on peut mettre en évidence le positionnement des nanoparticules dans ce volume. En effet on a pu remarquer, voir la figure 9, que l'objet présentait deux parties. Dans la première les NPs de maghémite étaient à l'intérieur du MOF et dans l'autre partie en périphérie (figure 10). La figure ci-dessous montre à titre illustratif quelques coupes par le volume reconstruit, dans des directions orthogonales, pour mettre en évidence cette disparité.

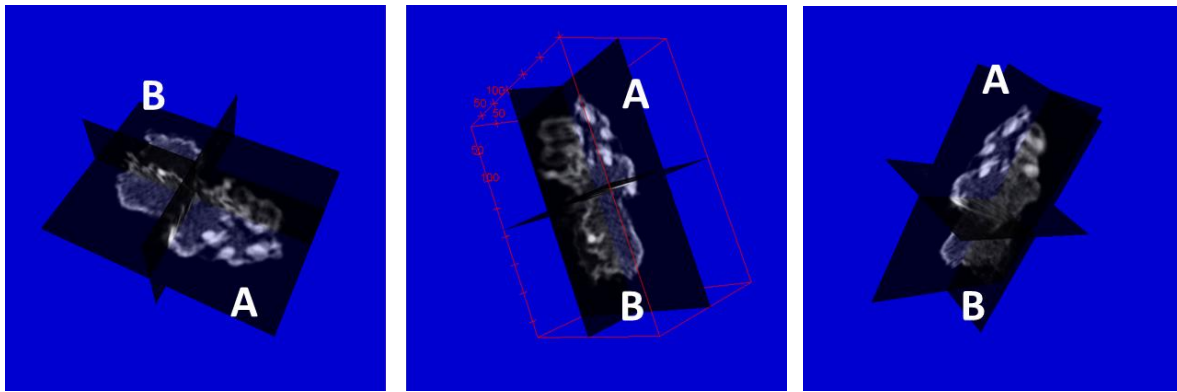


Figure 10 : coupes typiques par la reconstruction dans trois directions perpendiculaires (xy, yz et xz) (A) La partie où les NPs sont à l'intérieur du MOF et (B) la partie où les maghémities sont en surface.

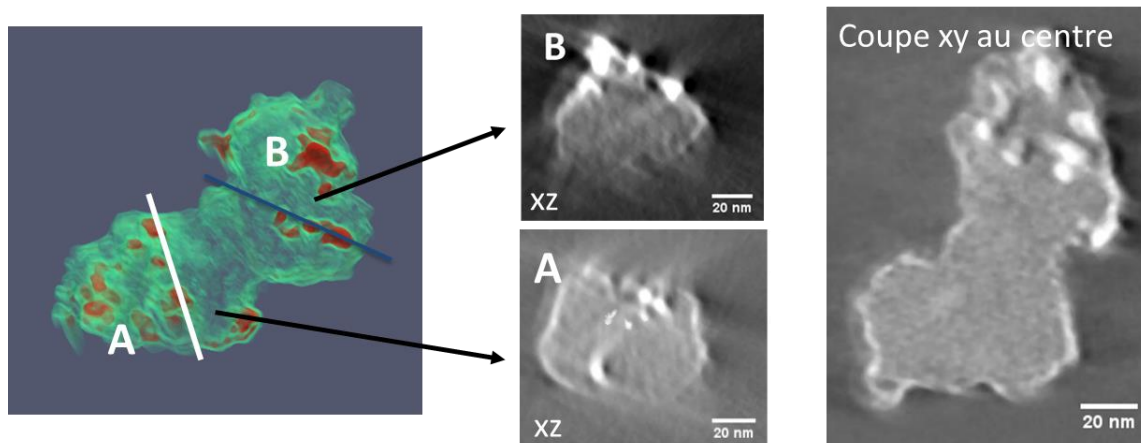


Figure 11 : à gauche la modélisation du volume 3D, au centre deux coupes « xz » de la partie B (en haut) et de la partie A (en bas) et à droite une section « xy » du volume traversant les deux parties.

Pour confirmer le positionnement des NPs, nous avons analysé la reconstruction coupe par coupe dans différentes directions (voir la figure 11). L'analyse de l'ensemble du volume a confirmé la présence de particules de maghémities à l'intérieur de la partie A et en périphérie de la partie B (figure 11).

#### IV.3.7) Analyse des données :

Comme précisé précédemment, une fois que le volume du nano-objet calculé, il peut être analysé en passant par des étapes de segmentation et de quantification. L'objectif de la segmentation est d'isoler l'arrière-plan d'un ensemble de pixels contenant des caractéristiques structurales spécifiques. Cette étape indispensable pour obtenir des informations quantitatives (volume, surface spécifique, localisation etc....) d'un volume reconstruit. Il est également possible d'obtenir une représentation schématisée à 3D « visuelle » en attribuant une couleur à chaque

composant du matériau hybride, cette dernière étape est communément appelée la modélisation 3D de l'objet.

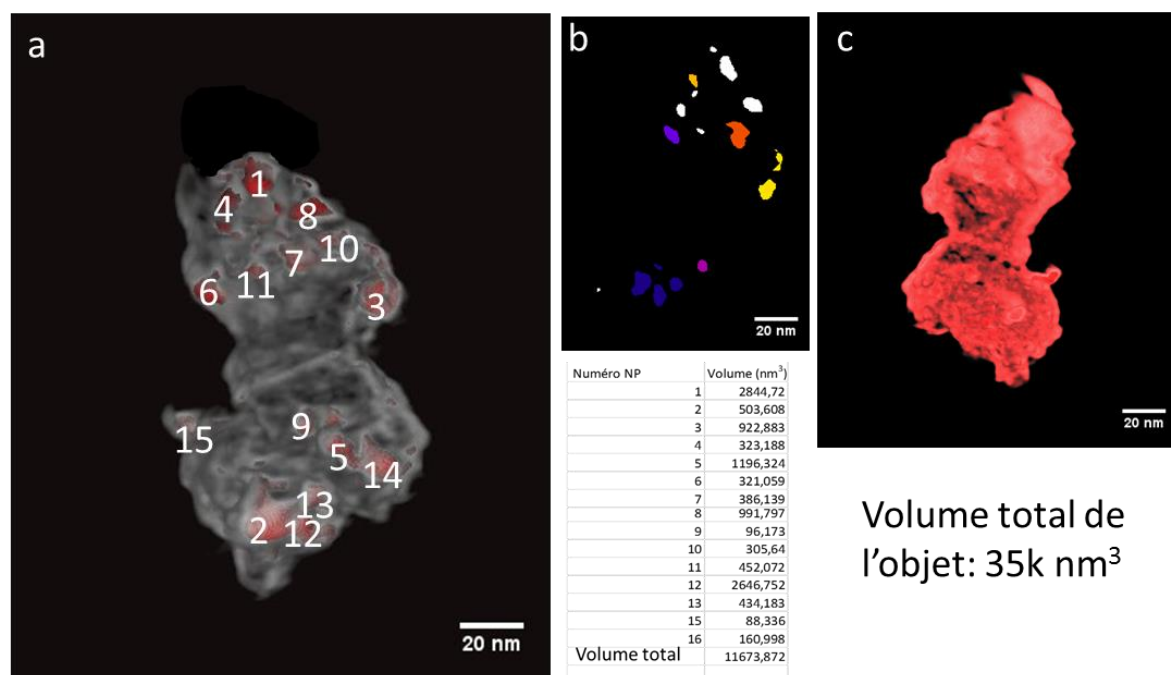


Figure 12 : quantification du volume : (a) identification et numérotation de chaque nanoparticule, (b) calcul du volume des NPs et (c) représentation et quantification du volume total de l'objet MIL-100Fe@ $\gamma$ Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Une fois les deux parties d'intérêt isolées, l'analyse quantitative est immédiate, car on a accès à la position 3D du centre de gravité de l'objet et de chaque NP et également de leurs volumes et de leurs surfaces. Plus particulièrement, pour obtenir ces données quantitatives il suffit de compter en première approximation les voxels situés à l'intérieur de l'objet sélectionné ou situés sur sa surface. À partir du volume segmenté, nous avons obtenu une représentation volumétrique de l'objet considéré à travers l'interface d'un logiciel de visualisation (figure 12). Le calcul total du volume occupé par les nanoparticules était d'environ 11 674 nm<sup>3</sup> et celui de l'objet entier était de 35 000 nm<sup>3</sup>. Donc les particules représentaient environ 30% du volume total.

#### IV.4) Conclusion

Nous avons montré la possibilité de réaliser des études en tomographie électronique en transmission sur des matériaux fragiles. Cela a nécessité de développer une méthodologie pouvant être appliquée pour tout type d'échantillon présentant une

sensibilité aux électrons. Dans notre étude, la Cryo-ET nous a permis d'avoir accès à la quantification, à la localisation de chaque partie du matériau et aux caractéristiques structurales dans les trois directions de l'espace. Ceci démontre que la formation de MOF est gouvernée par les deux approches et seul la Cryo-ET pouvait valider la voie utilisée. En effet, nous avons eu accès à plusieurs données numériques de chaque NP, comme le volume, la surface, le positionnement et l'interaction avec le MOF.

Cette méthodologie nous a permis d'étudier d'autres échantillons pour en obtenir des informations structurales, de location et distribution relative des différents constituants, et ceci de manière quantitative, tel que des nanostructures hybrides constituées d'un cœur sphérique de silice sur lequel se trouvent des satellites de nanoparticules (ferrite, Au, Ag, Pd...) de différentes morphologies. En effet, dans une étude en tomographie classique, sans l'utilisation du mode cryo, la structure de la bille de silice s'effondre ce qui a pour conséquence de perdre le volume et les NPs se détachent.

De manière générale, la cryo-tomographie nous a permis de compléter notre savoir-faire dans l'utilisation des techniques de tomographie. Jusque-là, essentiellement utilisée dans le domaine de la biologie, sa transposition au domaine des matériaux ouvre de nombreuses perspectives d'application aux échantillons sensibles difficiles à étudier par tomographie électronique conventionnelle, comme par exemple la matière molle et les nanostructures hybrides qui sont de plus en plus développées dans notre institut ou dans les laboratoires partenaires.

## REFERENCES CHAPITRE IV

- 1- Tomographie électronique analytique : développement de la cartographie chimique 3D à l'échelle du nanomètre et applications aux catalyseurs hétérogènes. *Lucian Roiban, thèse soutenue 2010.*
- 2- *Tomographie électronique de nano-objets. Ileana Florea, thèse soutenue 2011.*
- 3- Gan, Lu; Jensen, Grant J. (2012-02-01). "Electron tomography of cells". *Quarterly Reviews of Biophysics*. **45** (1): 27–56.
- 4- Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. (1988-05-01). "Cryo-electron microscopy of vitrified specimens". *Quarterly Reviews of Biophysics*. **21** (2): 129–228
- 5- Oikonomou, CM; Jensen, GJ; Chang, YW (April 2016). "A new view into prokaryotic cell biology from electron cryotomography". *Nature Reviews. Microbiology*. **14** (4): 205–20.
- 6- Al-Amoudi, Ashraf; Chang, Jiin-Ju; Leforestier, Amélie; McDowell, Alasdair; Salamin, Laurée Michel; Norlén, Lars P. O.; Richter, Karsten; Blanc, Nathalie Sartori; Studer, Daniel (2004-09-15).
- 7- Abbott A (2002) The society of proteins. *Nature* 417: 894–896
- 8- Alloyeau, D., Dachraoui, W., Javed, Y., Belkahla, H., Wang, G., Lecoq, H., Souad Ammar, Ovidiu Ersen, Andreas Wisnet, Florence Gazeau, Ricolleau, C. (2015). Unravelling Kinetic and Thermodynamic Effects on the Growth of Gold Nanoplates by Liquid Transmission Electron Microscopy. *Nano Letters*, 15(4), 2574–2581.
- 9- McIntosh, R., Nicastro, D., & Mastronarde, D. (2005). New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends in Cell Biology*, 15(1), 43–51.
- 10- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., & McIntosh, J. R. (1996). Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *Journal of Structural Biology*, 116(1), 71–76.
- 11- Bernard Heymann, J., Cardone, G., Winkler, D. C., & Steven, A. C. (2008). Computational resources for cryo-electron tomography in Bsoft. *Journal of Structural Biology*, 161(3), 232–242.
- 12- G.L. Zeng – Image reconstruction a tutorial – *Computerized Medical Imaging and Graphics* **25**, 2001, 97-103.
- 13- P. Gilbert–Iterative methods for the three-dimensional reconstruction of an object from projections–*Journal of Theoretical Biology*, **36**, 1972, 105-117.

- 14- R. Gordon, R. Bender, G. Herman – Algebraic Reconstruction Techniques (ART) for Three-dimensional Electron Microscopy and X-ray Photography – J. theor. Biol., **29**, 1970, 471-481.
- 15- Hanaor, D. A. H., Hu, L., Kan, W. H., Proust, G., Foley, M., Karaman, I., & Radovic, M. (2016). Compressive performance and crack propagation in Al alloy/Ti 2 AlC composites. *Materials Science and Engineering: A*, 672, 247–256.
- 16- Roth K. (1984) NMR Tomography. In: NMR-Tomography and -Spectroscopy in Medicine. Springer, Berlin, Heidelberg
- 17- Guerrero-Ferreira, R. C., & Wright, E. R. (2013). Cryo-electron tomography of bacterial viruses. *Virology*, 435(1), 179–186.
- 18- DIEBOLDER, C. A., KOSTER, A. J., & KONING, R. I. (2012). Pushing the resolution limits in cryo electron tomography of biological structures. *Journal of Microscopy*, 248(1), 1–5.
- 19- Radon, J. (1917). Ueber die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte langs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Académie Royale des Sciences de Saxe*, (69):262\_77.
- 20- P. Horcajada, R. Gref, T. Baati, P. K. Allan, G. Maurin, P. Couvreur, G. Férey, R. E. Morris and C. Serre, *Chem. Rev.*, 2012, 112, 1232.
- 21- I. Imaz, M. Rubio-Martinez, J. An, I. Sole-Font, N. L. Rosi and D. Maspoch, *Chem. Commun.*, 2011, 47, 7287.
- 22- J. Rabone, Y.-F. Yue, S. Y. Chong, K. C. Stylianou, J. Bacsá, D. Bradshaw, G. R. Darling, N. G. Berry, Y. Z. Khimyak, A. Y. Ganin, P. Wipar, J. B. Claridge and M. J. Rosseinsky, *Science*, 2010, 329, 1053.
- 23- Horcajada P, Surblé S, Serre C, Hong DY, Seo YK, Chang JS, Grenèche JM, Margiolaki I, Férey G. (2007). Synthesis and catalytic properties of MIL-100(Fe), an iron(III) carboxylate with large pores. *Chem. Commun.*, (27), 2820–2822.



# CHAPITRE 5

## V) La microscopie électronique environnementale en milieu liquide : la nucléation et la croissance de nanoparticules à base de fer dans un milieu organique.

Grâce aux récents développements techniques en microscopie électronique en transmission (MET), l'étude de matériaux et de leur évolution en mode dynamique dans des environnements réels est désormais possible. L'étude et la compréhension de phénomènes de formation et de croissance de matériaux en milieu liquide par MET est un véritable enjeu et l'on arrive maintenant à obtenir un aperçu direct et en temps réel des mécanismes de réaction dans des processus tels que la formation, l'agrégation ou la nanostructuration de complexes, molécules ou atomes individuels.<sup>1,2</sup> Ceci est particulièrement important pour comprendre et contrôler les propriétés et les caractéristiques structurales des nanoparticules qui sont très sensibles à tout changement subtil dans les conditions de réaction. La maîtrise des propriétés physico-chimiques des nanomatériaux implique un contrôle de leur structure (taille, forme, composition, structure atomique) et de leur organisation 2D ou 3D. Au cours de ces vingt dernières années, une très grande diversité de nanomatériaux et de super-cristaux composés de briques élémentaires nanométriques a été fabriquée par voies chimique ou physique. Cependant, en l'absence d'une compréhension complète des mécanismes de nucléation, de croissance et des phénomènes d'auto-organisation de nano-objets, l'obtention de nanomatériaux technologiquement innovants se fait de manière empirique et les rôles respectifs des paramètres de synthèse restent parfois très flous. Le principal verrou scientifique provient de la difficulté de sonder en solution ou sous flux de vapeur la nature dynamique de la formation des nanomatériaux aux échelles spatiale et temporelle adéquates.

Pour rappel, dans les chapitres précédents nous avons présenté des méthodes pour conserver les matériaux et réduire les dommages d'irradiation causés par le faisceau d'électrons. Pour cela, nous avons utilisé la Cryo-EM et les techniques de préparations associées pour préserver la morphologie et la structure de l'échantillon dans son environnement natif ou d'évolution mais à un temps donné fixe. Le but recherché était de réduire l'influence des électrons sur l'échantillon tout en essayant d'obtenir un minimum de signal pour enregistrer une image. Alors que dans ce chapitre, il est question de se servir des électrons pour initier la réaction pour suivre en direct les différentes étapes de synthèse de nanoparticules. La particularité de ces expériences est leur réalisation en milieu organique. Jusqu'à maintenant la quasi-totalité des publications dans le domaine de la microscopie environnementale en

milieu liquide (in-situ liquide) fait état de résultats en milieu aqueux. Dans ce chapitre, on discutera d'abord de la mise en place de l'in-situ liquide et de ses défis y compris une brève présentation du porte-objet liquide. Puis on exposera les résultats obtenus sur l'étude de la nucléation et la croissance de nanoparticules d'oxyde de fer dans un solvant organique en temps réel selon la synthèse par décomposition thermique.

### V.1) Développement de la microscopie MET in-situ liquide

Au cours des dernières décennies, il y a eu un grand intérêt à développer et à modifier les techniques permettant une analyse à l'échelle atomique de la matière, tels que la microscopie électronique à balayage,<sup>7</sup> la diffusion de rayons X à petits angles en incidence rasante (SAXS / GISAXS)<sup>8</sup> ainsi que les microscopies à sondes locales (AFM, STM)<sup>9</sup> pour y implémenter le mode environnemental. C'est tout naturellement que la MET a pris part à ce développement afin d'ouvrir la voie à l'analyse des matériaux biologiques ou synthétique à l'échelle nanométrique dans leurs milieux natifs ou de réactions. En effet, les études en mode in-situ liquide permettent de suivre et d'observer en temps réel aux échelles de la seconde et du nanomètre la dynamique de la matière dans un environnement liquide ou gazeux bien contrôlé. Contrairement aux études dites ex-situ (ou post-mortem) qui permettent uniquement la comparaison entre deux états de la matière (avant et après contrainte), les études in-situ donnent accès aux états intermédiaires. La cellule environnementale fermée, présentée ci-dessous a été développée pour permettre ces études in-situ liquide. De plus, compte tenu de la complexité des phénomènes observables il est important de contrôler certains processus tels que la radiolyse et la résolution.

#### V.1.1) Cellule environnementale fermée : système dédié in-situ liquide

La production et la propagation des électrons dans un microscope électronique nécessitent l'ultravide. Dans un liquide, les résolutions spatiale et spectrale de l'instrument sont très vite dégradées.<sup>3,5</sup> Pour conserver les performances de l'instrument, il faut confiner l'environnement liquide dans la région des pièces polaires de la lentille objectif où se trouve l'échantillon. Cela consiste à confiner l'environnement liquide dans une zone restreinte autour de l'échantillon en utilisant une cellule environnementale fermée. Le développement de ces dernières a été mené par les équipes de Williamson et Ross,<sup>6</sup> qui ont mis au point une cellule liquide personnalisée fabriquée sur mesure utilisant deux micro-puces de Si avec une fenêtre Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> de 100 x 100 µm. La faible distance parcourue par les électrons dans

l'environnement liquide (modulable de 50 nm à 5  $\mu\text{m}$ ) permet d'observer la dynamique de nano-objets dans de très nombreux solvants. La composition de l'environnement est finement contrôlable via un système micro-fluidique qui permet d'injecter les liquides réactifs au niveau de la fenêtre d'observation. Enfin, ces cellules micro-fabriquées peuvent intégrer des électrodes pour sonder les réactions électrochimiques, ainsi qu'accessoirement un système de chauffage très stable et ultra-rapide qui permet de contrôler la température. Une telle cellule se compose généralement de deux fenêtres en nitrure de silicium suffisamment minces pour être transparentes aux électrons et suffisamment résistantes pour supporter de fortes pressions de gaz et des températures élevées, ou contenir un liquide (figure 1).

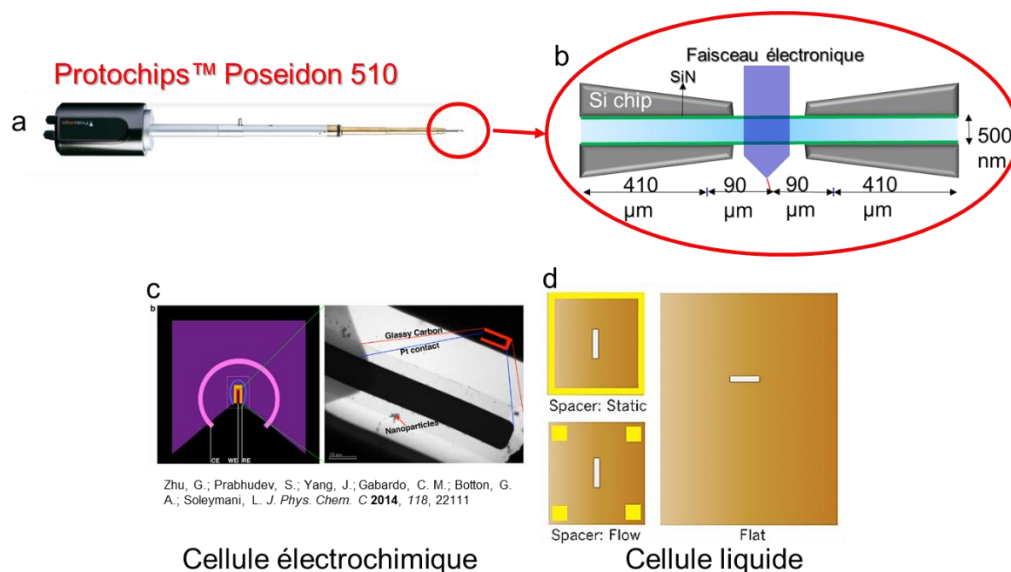


Figure 1 : représentation du système de porte-objet permettant les expériences en milieu liquide. (a) Système de Protochips Poseidon 510, (b) cellules en Si fermées avec fenêtres  $\text{Si}_3\text{N}_4$  transparentes aux électrons, (c) cellule électrochimique et (d) cellules liquides statique et avec circulation.

Pour nos études nous avons utilisé un système Poseidon 510 fabriqué par la société Protochips (figure 1). Cette configuration en sandwich se situe à la pointe du support TEM (figure 1b) et en fonction de l'épaisseur de l'échantillon, il est possible de choisir des puces avec des espaces de différentes tailles (50 nm, 150 nm, 500 nm, 1  $\mu\text{m}$  ou 5  $\mu\text{m}$ ) ce qui permet de faire varier le volume de liquide reçu. De plus on peut travailler en mode circulation (flow), surtout utilisé dans le cas d'études électrochimique ou lors d'expérience de réaction entre deux réactifs.

## V.1.2) La radiolyse

L'interaction du faisceau électronique avec l'échantillon est un facteur clé de toute expérience en microscopie électronique. Pour une interprétation rigoureuse des résultats obtenus sur des échantillons liquides, il est nécessaire de bien comprendre les effets du faisceau. Cela peut être compliqué par la diversité des interactions possibles et par la nécessité de modèles quantitatifs pour les interactions faisceau/liquide. Pour les études sur la nucléation et la croissance décrites ci-dessous, nous avons pris en compte divers effets du faisceau, thermiques et non thermiques. En ce qui concerne le chauffage dû à l'irradiation électronique (les effets thermiques), les diverses études et calculs<sup>10</sup> ont montré qu'il se produisait qu'une faible élévation de température (quelques degrés ou moins) en raison de la bonne conductivité thermique des échantillons de cellules liquides épaisses. Dans notre cas en milieu organique avec des chaînes de carbone longue (octadécène) la température maximum calculée est de 4°C, valeur calculée en utilisant la formule (équation 1) donnée par Schneider et al.<sup>13</sup> Néanmoins, le chauffage du faisceau peut altérer la diffusion et les vitesses de réaction par convection, tandis qu'une légère hausse de température altère la cinétique électrochimique.<sup>14</sup> Cependant les effets non thermiques sont plus importants et plus complexes dans notre système. Les électrons de haute énergie dans l'eau produisent des espèces ayant une vie relativement longue, telles que les radicaux OH et les électrons hydratés ( $e^-_{aq}$ ).<sup>11</sup> Dans un milieu organique, d'autres types de radicaux se forment selon la composition du solvant organique et des différentes molécules qui y sont présentes. Toutes ces espèces peuvent jouer un rôle clé dans le processus de germination et croissance de nanoparticules induits par un faisceau d'électrons à partir d'espèces solvatées.<sup>12,13</sup> La connaissance de la chimie des solutions est très importante car des espèces qui se chargent en solution peuvent éteindre les radicaux et réduire leur réactivité.

<b>a</b>		$\Delta T_{\max} = \frac{S 10^2}{\pi \alpha_{th} C_p} I \left( 1 + \frac{t}{\lambda} \right) \left( \frac{1}{4} + \frac{1}{2} L n \left[ \frac{L}{a} \right] \right)$	
<b>b</b>	<b>n-octadécane</b>	<b>c</b>	<b>n-octadécène</b>
Température de fusion, (K)	300.7	t : épaisseur du liquide,	500 nm
Chaleur latente, (KJ. kg <sup>-1</sup> )	243.5	I : courant de faisceau,	120 pA
Conductivité thermique, (W. m <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	0.358	Cp : chaleur spécifique,	2222 J.kg <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup>
Chaleur spécifique, (J. kg <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	2222	L : taille de la fenêtre,	10 <sup>-3</sup> m
Masse volumique, (kg. m <sup>-3</sup> )	771	$\alpha_{th}$ : diffusivité thermique,	2,09.10 <sup>-7</sup> m <sup>2</sup> /s
Viscosité dynamique, (Kg. m <sup>-1</sup> .s <sup>-1</sup> )	3.107.10 <sup>-3</sup>		

$$\Delta T_{\max} = 4 \text{ K}$$

Tableau 1 : (a) équation pour calculer la différence de température induit par le faisceau électronique. (b) Tableau avec les propriétés thermo-physiques du n-octadécane<sup>16</sup>. (c) Paramètre pour le calcul de l'augmentation de température maximum dans le cas de l'octadécène.

De plus, il faut savoir que des espèces réactives peuvent également être générées par des interactions entre le faisceau et le substrat. Ces espèces chargées peuvent également influencer les courants mesurés dans une expérience électrochimique.<sup>14</sup> Il est clair que des expériences dans différentes conditions de tension d'accélération ou d'intensité de faisceau sont nécessaires pour évaluer l'effet du faisceau sur tout phénomène en phase liquide étudié.

### V.1.3) La résolution

La résolution des images MET est un paramètre fondamental pour les études in-situ sur des liquides. La résolution dépend d'abord de l'épaisseur de liquide dans la cellule in-situ assemblée. Les électrons doivent passer à travers les fenêtres de nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{N}_4$ ) et l'épaisseur du liquide. Il convient de noter que le volume supplémentaire introduit par la courbure des fenêtres sous vide peut également réduire la résolution. L'effet de courbure se produit car les fenêtres  $\text{Si}_3\text{N}_4$  se gonflent vers l'extérieur ce qui a pour effet d'augmenter l'écart entre les membranes supérieure et inférieure.<sup>18</sup> De plus, la position de l'échantillon à l'intérieur entre les deux puces est également cruciale pour la résolution de l'image. À ce sujet, De Jonge et Ross<sup>19</sup> ont développé une équation analytique pour la résolution en fonction de l'épaisseur du liquide (figure 2). Puis en 2014, De Jonge et Schuh<sup>17</sup> ont montré que la position d'un échantillon dans la cellule liquide selon le mode utilisé avait une influence importante sur la résolution. En effet, ils ont remarqué le fait intéressant que la meilleure résolution en mode STEM était obtenue avec des nanoparticules sur la fenêtre supérieure, alors que la meilleure résolution pour le mode MET l'était avec les particules situées sur la fenêtre inférieure. Ensuite, ils ont noté qu'il se produisait un mouvement des nanoparticules avec un grossissement supérieur à 1200kx, ce qu'ils attribuaient au transfert d'électrons dans les particules.<sup>17</sup> Cependant, il est important de reconnaître que l'imagerie à fort grossissement est beaucoup plus sensible à la détection du mouvement des nanoparticules dans un liquide. Enfin, il est important de souligner que la plupart des auteurs ont totalement négligé tout effet de chauffage du faisceau dans leurs analyses.



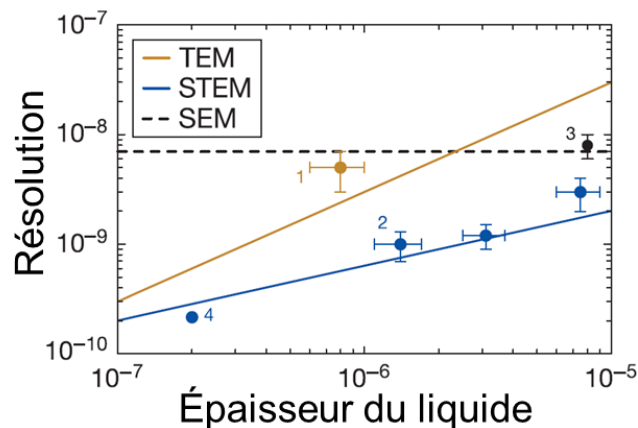


Figure 2 : résolution maximale théorique en fonction de l'épaisseur de l'eau pour le MET et le STEM. La résolution a été calculée pour des paramètres typiques, en considérant une énergie de faisceau de 200 keV, pour l'imagerie de nanoparticules d'Au sur la fenêtre inférieure dans une couche d'eau pour le mode MET et sur la fenêtre supérieure dans la couche d'eau pour le mode STEM.<sup>19</sup>

Dans nos études selon le mode d'observation choisi, on adaptera la préparation pour être dans les meilleures conditions permettant d'obtenir la meilleure résolution possible.

## V.2) Étude par MET in-situ liquide des processus de nucléation - croissance de particules à base de fer dans des milieux organiques

Les nanoparticules magnétiques sont l'objet de nombreuses études ces dernières décennies du fait de leurs propriétés magnétiques particulières dépendant fortement de leur taille, de leur composition, et de leurs interactions. Elles trouvent des applications dans de nombreux domaines, tels que les fluides magnétiques, la catalyse, la biomédecine ou pour la dépollution des eaux. Les nanoparticules présentent également un potentiel d'application élevé quant à la fabrication de futurs dispositifs miniaturisés. En effet, de par leur taille à l'échelle du nanomètre, elles sont maintenant considérées comme des briques élémentaires utilisables dans le cadre de l'approche « ascendante » (bottom-up) des nanotechnologies. D'autre part, dans le cas particulier des nanoparticules d'oxyde de fer, elles sont de plus en plus utilisées en tant qu'agent de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM)<sup>20,21</sup> et peuvent être également utilisées en tant qu'agents thérapeutiques pour l'hyperthermie magnétique notamment lorsqu'elles présentent une anisotropie magnétique élevée.<sup>22,23</sup> Compte tenu de l'importance de l'effet de la forme des nanoparticules sur l'anisotropie magnétique, le contrôle de celle-ci et de sa reproductibilité est une difficulté de synthèse. La méthode la plus utilisée et qui a

donné les meilleurs résultats sur le contrôle des caractéristiques de forme est la décomposition thermique.<sup>24</sup> Effectivement, en optimisant les conditions et les paramètres de réaction, comme par exemple la structure du précurseur de fer, sa teneur en eau, mais également la quantité de tensioactif (oléate de sodium) il est possible de contrôler la forme. Par conséquence, des nanoparticules d'oxyde de fer de forme et de composition différentes ont été obtenues tel que des nano-plaquettes, des sphères, des cubes ou encore des aiguilles.<sup>24</sup> Il est par conséquent très important de comprendre les mécanismes de synthèse et les processus dynamiques qui régissent les caractéristiques les plus importantes de tout réaction chimique en solution. Bien que cette technique ait permis de dévoiler différents aspects de la synthèse de nanoparticules dans des solutions aqueuses, très peu d'études ont été consacrées aux phénomènes se déroulant dans les solvants organiques, ceci en raison de la difficulté de telles expériences, comme la dégradation de la résolution due aux l'épaisseur du liquide organique et sa haute viscosité, ainsi que la difficulté de quantifier l'effet du faisceau.<sup>1</sup> Au cours de ce chapitre, nous présentons d'abord les résultats obtenus lors de la nucléation des NPs de ferrite puis on montre l'influence de la dose électronique sur leur croissance et morphologie finale.

### V.2.1) Décomposition thermique : synthèse ex-situ d'oxyde de fer

La décomposition thermique de stéarate de fer (organométallique) en présence d'acide oléique dans l'octadécène (figure 3) permet d'obtenir des NPs de ferrite avec des tailles et des formes maîtrisées.<sup>24</sup> La particularité de cette réaction est de se produire aux températures de décomposition des organométalliques (plus de 250°C) donc le solvant doit avoir impérativement une température d'ébullition supérieure.

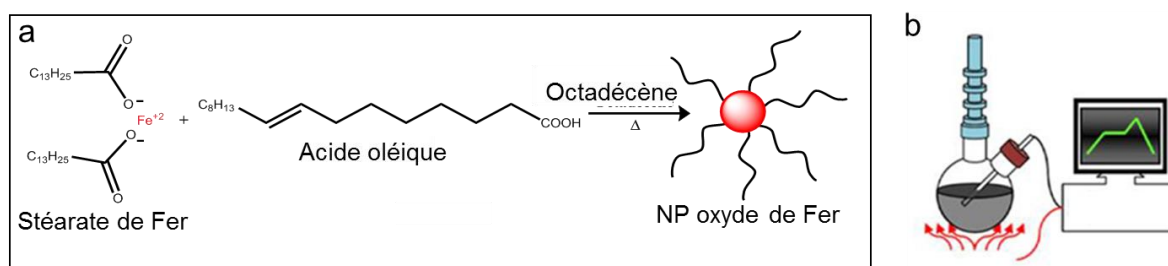


Figure 3 : (a) La réaction pour la formation de NPs d'oxydes de fer par la méthode de décomposition thermique du précurseur de stéarate de fer avec un surfactant d'acide oléique dans l'octadécène et (b) le montage de synthèse ex-situ.

La synthèse de nanoparticules d'oxyde de fer par ce procédé de décomposition thermique a connu un essor considérable après la publication de Park et al.,<sup>27</sup> car elle permet d'obtenir des NPs hautement monodispersés suivant une méthode relativement simple et évolutive. Dans une configuration typique présentée dans la figure 3, la réaction se déroule dans un ballon chauffant où un précurseur

organométallique, le stéarate de fer, est introduit dans un solvant à point d'ébullition élevé. Des tensioactifs d'acide oléique, sont ajoutés au mélange réactionnel pour affiner la cinétique de croissance et personnaliser la taille et la morphologie (figure 4).<sup>28</sup> Il a été démontré que le surfactant avait un effet sur le précurseur de stéarates de fer et pouvait orienter la croissance selon des directions bien définies permettant d'avoir un ou plusieurs types de morphologie, de plus ces études ont confirmé l'effet négatif de l'eau sur la forme par comparaison de précurseurs avant et après déshydratation. Lorsqu'il est introduit un mélange d'oléate de sodium avec l'acide oléique selon des rapports de concentration entre les deux (oléate de sodium/acide oléique) bien définis, cela a pour conséquence l'obtention de formes particulières. Par exemple avec un rapport de 1:1 la synthèse donne principalement des nanocubes.<sup>25</sup> De plus ces derniers n'ont été obtenus qu'avec des précurseurs déshydratés.<sup>25</sup> Avec un rapport de concentration oléate de sodium / acide oléique de 4:1 les réactions ont conduit préférentiellement à la formation de nanoplaquettes. Cette morphologie est plus rarement rapportée dans la littérature, elle a été confirmée par tomographie MET. Un autre effet a été rapporté, celui sur la taille et la dispersion des NPs ; en effet l'utilisation d'un tensioactif avec le précurseur a montré qu'il était possible de contrôler la taille des NPs.<sup>24</sup> En effet, l'évolution du rapport de concentration entre le stéarate de fer et le tensioactif a pour conséquence de faire évoluer la taille des NPs de ferrites.<sup>24</sup> Pour activer la nucléation et la croissance des nanoparticules, la température est montée de manière contrôlée jusqu'à la température de décomposition des précurseurs de stéarates de fer (250°C).

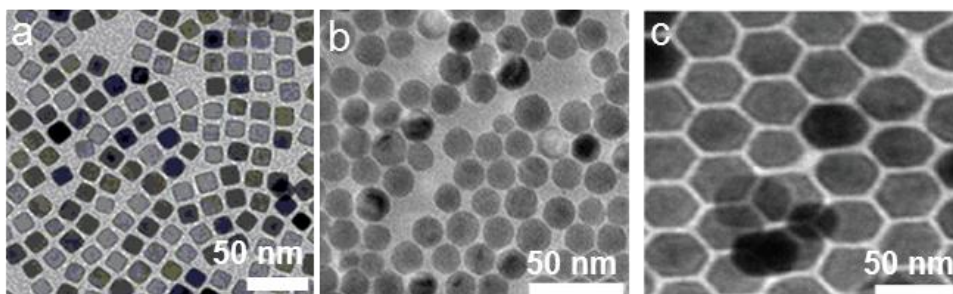


Figure 4 : différentes morphologies des NPs d'oxyde de fer obtenues par décomposition thermique avec différentes conditions de synthèse. (a) NPs cubiques, (b) NPs sphériques et (c) NPs plaquettes.

### V.2.2) Synthèse in-situ en milieu liquide des nanostructures d'oxyde de fer par décomposition thermique

Comme mentionné avant, l'étude post-mortem des mécanismes de synthèse a confirmé le rôle majeur du ligand, du surfactant et de la vitesse de montée en température dans la formation de nanoparticules de différentes formes et tailles.

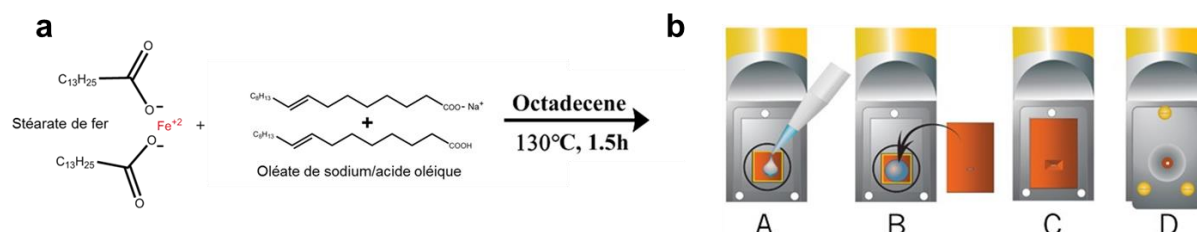


Figure 5 : (a) mélange réactionnel (stéarate de fer avec un mélange d'oléate de sodium/ acide oléique) dans l'octadécène, (b) étapes de préparation pour l'étude in-situ par TEM en utilisant la cellule environnementale liquide.

En ce qui concerne les études TEM in-situ, les mélanges réactionnels utilisés dans ces expériences ont été ceux déjà optimisés pour la synthèse par décomposition thermique de nanoparticules d'oxyde de fer en milieu organique dans notre laboratoire (en collaboration avec l'équipe de Sylvie Begin). Dans un premier temps, 2,32 mmol de stéarate de fer ont été mélangés à 3 mmol de surfactant, mélange d'acide oléique et d'oléate de sodium, dans 15 mL d'octadécène utilisé comme solvant. Le mélange a été agité et chauffé à  $130^\circ\text{C}$  pendant 90 min sans réfrigérant afin de dissoudre les réactifs et d'éliminer les résidus d'eau. Dans la figure 5b, nous présentons les différentes étapes de la préparation de la cellule environnementale fermée. Préalablement les deux membranes de la cellule environnementale (supérieure et inférieure) sont lavées dans de l'acétone, du méthanol et de l'éthanol de qualité HPCL successivement pour éliminer le revêtement protecteur. Ensuite, 1  $\mu\text{L}$  de la solution de mélange réactionnel est déposé sur la fenêtre d'observation en nitrure de silicium en mode statique. Après vérification de l'étanchéité par un système de pompage secondaire de la cellule fermée, le système PO est introduit dans le MET. Les expériences de nucléation et de croissance sont suivies par capture continue des images afin de produire des séquences de vidéo de leurs dynamiques. La dose d'électrons a été calculée comme décrit par Woehl et al.<sup>29</sup>

## V.2.2.1) Dose d'électron

Il est important de bien définir la dose d'électron, car c'est un paramètre clé dans la réalisation de nos expériences in-situ liquide MET opérando. En effet, l'utilisation de l'énergie des électrons nous permet d'activer la réaction de nucléation et de contrôler la croissance selon l'une de morphologies choisies. Les microscopistes expriment la dose d'électrons « d » par le nombre d'électrons par surface irradiée exprimé en nanomètre carré ramené à une seconde « e<sup>-</sup> /nm<sup>2</sup>s ». En mode STEM, cela correspond directement à la zone imagée (résolution de l'image). Alors que dans le mode MET, il faut prendre en considération la surface réelle de la cellule irradiée.

	Dose d'électron MET	Dose d'électron STEM
Formule de calcul de la dose d'électron « d »	$d = (i_e/e) \times (1/A_i)$	$d = i_e/eA$
$i_e$ : courant du faisceau (pA)	40	37,5
$e$ : charge élémentaire d'un électron	$1,602 \cdot 10^{-19} \text{ A.s/e}^-$	
$t_p$ : taille pixel nm/pixel	0,5	2
A: aire irradié en nm <sup>2</sup>	$1 \cdot 10^5$ (aire de la cellule irradié)	$1,05 \cdot 10^6$ (image 512*512 pixels)
<b>d : électron/nm<sup>2</sup>.s</b>	<b>2500</b>	<b>223</b>

Tableau 2 : exemple de calcul de la dose d'électrons et comparaison entre le mode MET et STEM.

Dans le tableau 2, on montre un exemple de calcul de la dose d'électrons dans les deux modes MET et STEM avec des courant de faisceau proches. On remarque que la dose d'électrons reçu par l'échantillon en STEM est presque 10 fois moins importante MET parallèle.

## V.2.2.2) Étude de la nucléation :

Pour activer la nucléation dans la réaction de décomposition thermique, il faut une élévation de la température, c'est-à-dire augmentation de cette dernière jusqu'à la température de décomposition des précurseurs qui a lieu à environ 250°C. Dans notre cas, nous ne pouvons pas chauffer notre système in-situ liquide donc la quantité d'énergie nécessaire au déclenchement de la décomposition est fournie par l'irradiation du faisceau d'électrons. Dans le procédé typique de la décomposition



thermique, il y a d'abord la formation de monomères dictée par l'augmentation de la température imposée au milieu réactionnel qui est à l'origine de la formation d'espèces oxygénées intermédiaires.<sup>30</sup> Nous avons identifiés trois processus qui peuvent avoir lieu, probablement au même moment : i) réduction induite par le faisceau d'électrons, ii) clivage direct du précurseur et iii) décomposition due à l'élévation de température du solvant par le faisceau. La réduction des ions de fer dans le précurseur organométallique due au faisceau d'électrons pourrait être la première source de monomère. Simultanément, le clivage direct du précurseur dû au faisceau d'électrons peut également contribuer à la présence d'espèces plus labiles pouvant ultérieurement participer à la nucléation. Enfin, la chaleur induite localement sur le support pendant l'observation pourrait être similaire à l'énergie thermique provenant du ballon chauffant. Cependant, comme vu précédemment, la montée de la température dépendra du pouvoir d'arrêt du support et de l'épaisseur du liquide. Nous pensons que l'approvisionnement en monomère provient principalement des deux premiers procédés, car l'augmentation de la température due au faisceau calculée pour l'octadécène est très limitée (inférieure à 4°C).

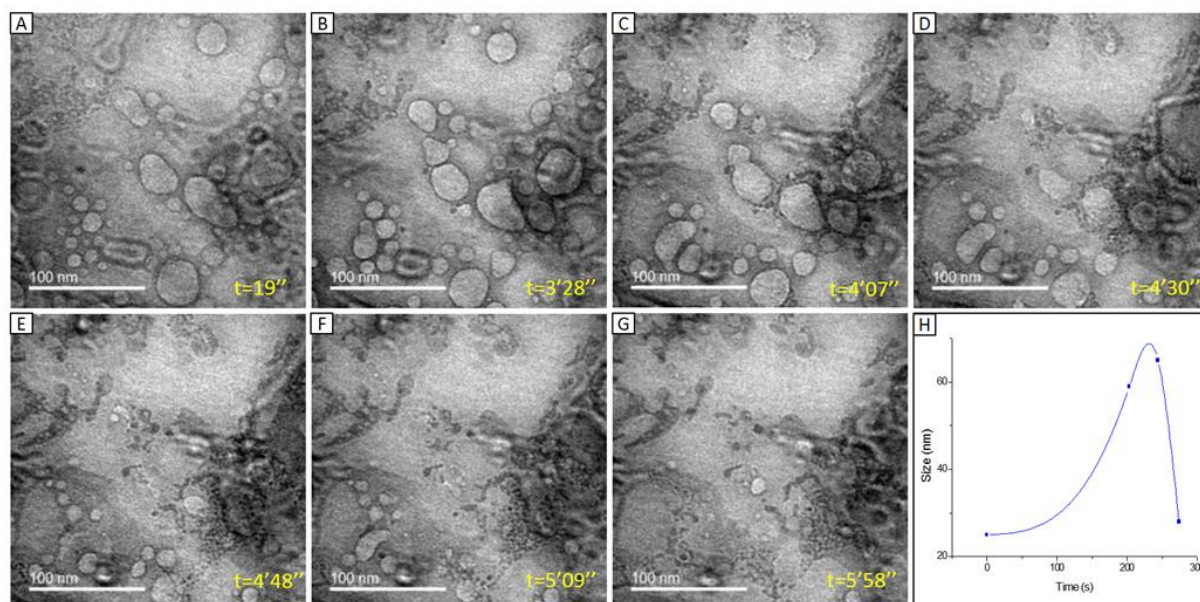


Figure 6 : (A-G) Séquence d'images enregistrées in-situ par MET en milieu liquide à partir du mélange réactionnel dans l'octadécène. (H) Évolution de la taille des globules avec le temps.

Dans la figure 6, l'analyse détaillée de la séquence d'images acquise au début de l'étude in-situ liquide a montré que la nucléation ne se produisait pas immédiatement au début de l'irradiation par les électrons. En effet, on observe préalablement à la nucléation la formation de structures semblables à des globules dans la solution. La figure 6 illustre le comportement général de ces structures particulières, en particulier la rapidité avec laquelle elles se déplacent dans le mélange et subissent une coalescence et une maturation semblables à celles d'Ostwald jusqu'à ce qu'elles



éclatent pour former les germes de nucléation et enfin les nanocristaux, comme illustré dans la figure 7.

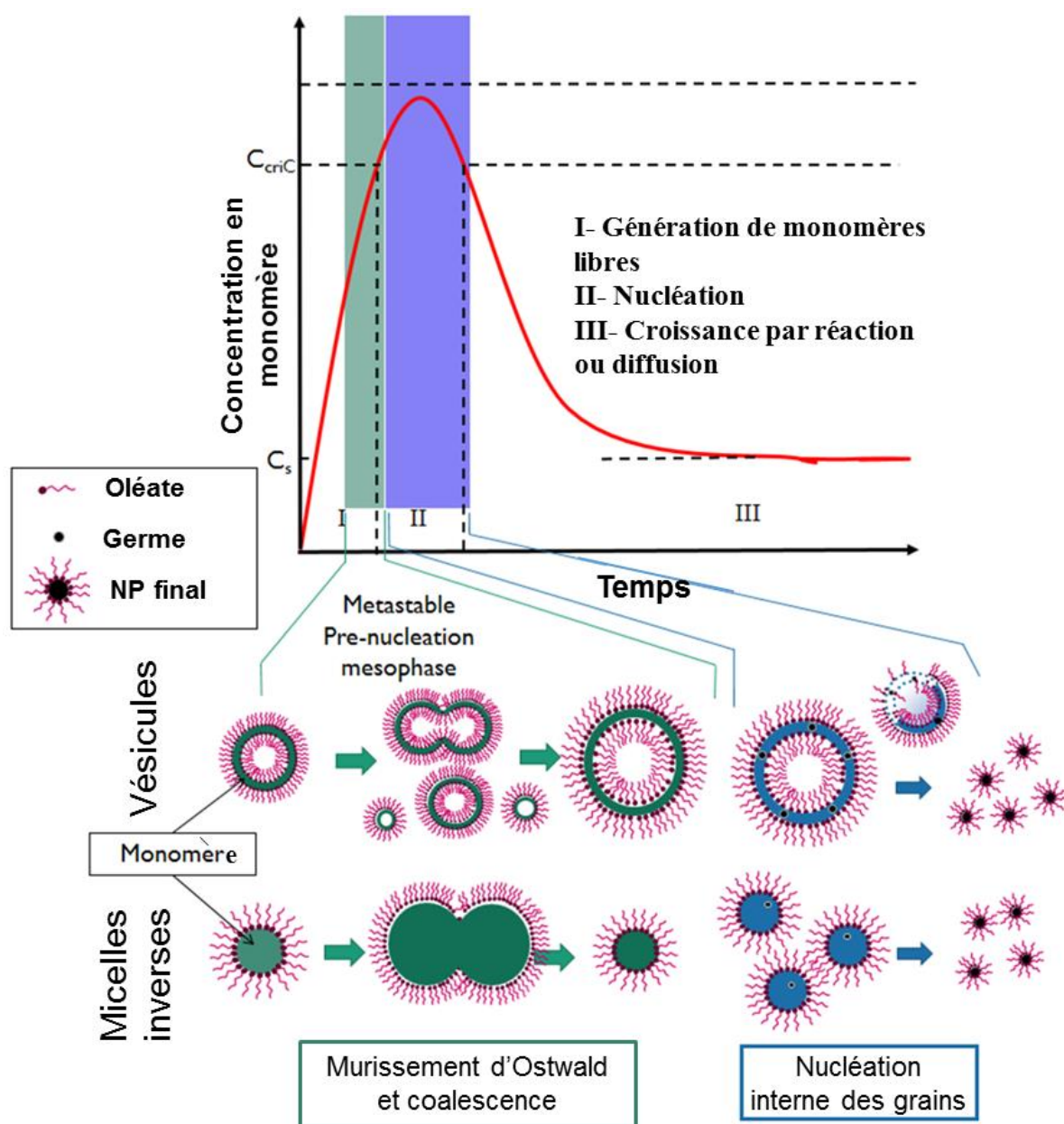


Figure 7 : schéma représentatif des processus de pré-nucléation et de nucléation. Dans la phase initiale de pré-nucléation, la présence de structures vésiculaires et micellaires métastables a été observée. De telles structures subissent des processus de coalescence et de maturation d'Ostwald qui donnent lieu à des germes d'oxyde de fer.

La présence de ce type de structures globulaires n'était pas du tout attendue dans la mesure où la nucléation des NPs de fer en solution a été décrite par le mécanisme de LaMer.<sup>31</sup> Selon ce mécanisme, le monomère, provenant de la décomposition du précurseur, circulerait librement et de manière aléatoire dans le milieu jusqu'à ce que

la nucléation soit déclenchée lorsqu'une concentration critique de monomères est atteinte (figure 8a).

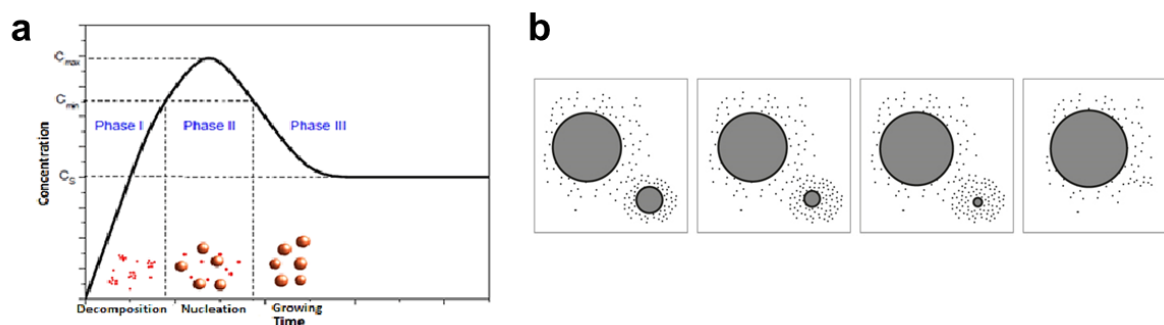


Figure 8 : représentation schématique du (a) mécanisme de LaMer et (b) murissement d'Ostwald.

Alors qu'en in-situ liquide nous observons en temps réel qu'il y a d'abord une organisation des monomères dans une sorte de structure globulaire avant la nucléation. Ce type de comportement pourrait s'expliquer par un processus de pré-nucléation expliqué précédemment, qui adopte un mécanisme en deux étapes.<sup>32</sup>

Le mécanisme en deux étapes suggère qu'il existe un état intermédiaire entre la solution homogène et le cristal final correspondant à une particule dans son état de croissance naissant. Un tel mécanisme a été principalement attribué à la cristallisation de protéines et de certaines molécules organiques.<sup>32,33</sup> Cet état serait une mésophase appelée « liquide dense » et serait formé par une goutte saturée à l'endroit où la graine de cristal commence à se développer. Cette mésophase peut être assez stable en fonction du support et des précurseurs. Dans la littérature nous trouvons des études qui expliquent des phénomènes semblables. Par exemple, Vivarès et al ont suivi in-situ, en microscopie confocale, la cristallisation du glucose isomérase dans des gouttelettes denses.<sup>34</sup> Le même type de comportement a été détecté lors de la nucléation de nanoparticules d'or en solution. En effet Mikhlin et al ont étudié la formation d'états intermédiaires lors de la synthèse de nanoparticules d'or avec du citrate. Ils ont observé par AFM in-situ dans un liquide la présence d'agrégats globulaires de 200 à 300 nm composés de globules de 30 à 50 nm. Par ailleurs, ils ont montré par des mesures DLS que le volume dynamique des globules était compris entre 60 et 125 nm, en fonction du rapport de concentration entre les citrates et l'or. Cependant, il est difficile de corréler la présence de ces structures globulaires aux nanoparticules synthétisées uniquement sur la base de ces études antérieures. Plus récemment, une étude en in-situ liquide MET a montré que la présence d'une matrice biomimétique, à savoir le polystyrène sulfonate, a conduit à la formation de globules amorphes de  $\text{CaCO}_3$  où la cristallisation de la vaterite n'avait lieu que sur la surface des globules et pas ailleurs dans la solution.<sup>36</sup> Cet état intermédiaire pourrait être un exemple de mécanisme de pré-nucléation en deux étapes activé par le milieu organique dans la matrice biomimétique. Cependant, aucune étude similaire n'a été réalisée sur un mélange réactionnel dans un milieu

organique avec des solvants à haut point d'ébullition dans le cas de la réaction de décomposition thermique. En revanche, d'autres études in-situ ont été réalisées par d'autres techniques, tel que celle de Lassenberger et al qui ont utilisé le SAXS pour suivre la nucléation et la croissance de NPs d'oxyde de fer par décomposition thermique ; cependant cette étude comme d'autres n'ont toujours pas permis de confirmer la présence d'un tel état intermédiaire.<sup>37</sup> Nos observations nous amènent à penser que les parois des globules vésiculaire sont formées par une matrice composée du monomère stabilisé par le tensioactif. Le monomère, très probablement, un réseau de grappes avec du fer reste stable jusqu'à ce que le régime de sursaturation soit atteint et que la nucléation commence. Ainsi, nos observations valident le mécanisme en deux étapes de la nucléation des nanoparticules d'oxyde de fer dans l'octadécène en fournissant des informations sans précédents sur la microstructure du milieu réactionnel sur pré-nucléation des particules, en relation avec la localisation et les caractéristiques des germes inorganiques. Ce mécanisme est décrit sur la figure 7 et comprend deux types différents de mésophases, « vésiculaire » et « micellaire inversée », qui ont été observés dans différents mélanges réactionnels.

#### V.2.2.2.1) Mésophase vésiculaire :

D'un point de vue quantitatif les vésicules décrites par la vidéo de la figure 9, met en évidence un processus de pré-nucléation avec un diamètre initial de telles structures de 10 à 20 nm. Ensuite, leur taille augmente à plusieurs dizaines de nanomètres une fois que les globules fusionnent entre eux.

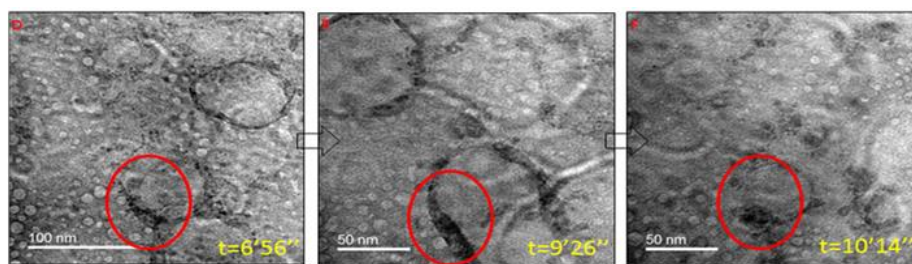


Figure 9 : (D-F) séquence d'images in-situ liquide MET à partir du mélange réactionnel dans l'octadécène. Image agrandie sur la paroi de la structure vésiculaire.

En regardant de plus près les parois de ces structures globulaires, nous pouvons observer des zones plus denses et plus contrastées à l'intérieur. On peut sans ambiguïté associer ces zones plus sombres aux germes de nucléation qui déclenchent plus tard la formation de nanoparticules plus grosses en suivant l'un des mécanismes de croissance typiques largement discutés dans plusieurs publications.<sup>39-43</sup>

## V.2.2.2.2) Mésophase micellaire inversée :

Sur la figure 10, on peut facilement observer qu'à l'intérieur des globules associés à des « micelles inversées » plusieurs zones contrastées (point noires) se forment qui subissent ensuite une coalescence entre eux et leur taille augmente tandis que les micelles fusionnent entre elles, mais leur taille reste presque identique.

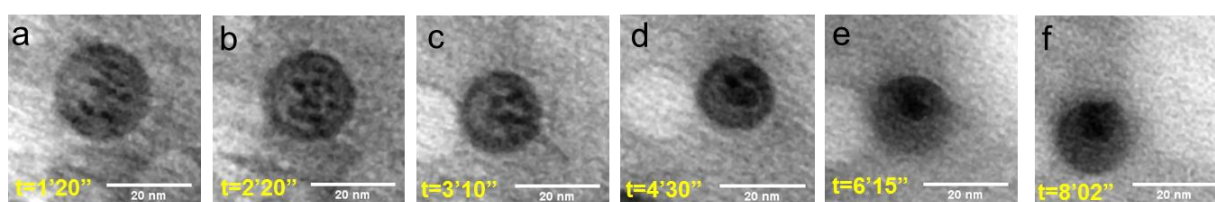


Figure 10 : (a-f) suivie d'un globule dit « micelle directe ». La taille de micelle reste assez stable alors qu'à l'intérieur de celle-ci on observe la formation de germes et de leurs coalescences pour donner une particule plus grande.

## V.2.2.2.3) Conclusion :

Ces observations révèlent un autre aspect remarquable du mécanisme, ce qui correspond à la coexistence d'entités vésiculaires et micellaires inverses dans le milieu réactionnel simultanément (figure 11). Dans la figure 9 des gouttelettes moins contrastées sont observées, où le « liquide dense » semble ne se situer que sur les parois des globules. Alors que dans la figure 10, le « liquide dense » semble être encapsulé à l'intérieur de globules de forme sphérique et plus contrastés. De plus, comme mentionné précédemment, même si les globules les plus sombres subissent un processus de coalescence, leur taille reste assez stable autour de leur taille initiale d'environ 15 nm (figure 11). Le fait qu'ils se combinent sans changer de taille implique que la concentration de monomère à l'intérieur augmente jusqu'à atteindre le point critique pour former le germe cristallin. De tels grains de nucléation peuvent en fait être observés à l'intérieur de la micelle inverse, comme le montre la figure 11 H. Les grains de nucléation de l'un, des vésicules ou des micelles inverses ont une taille d'environ 2 à 3 nm.

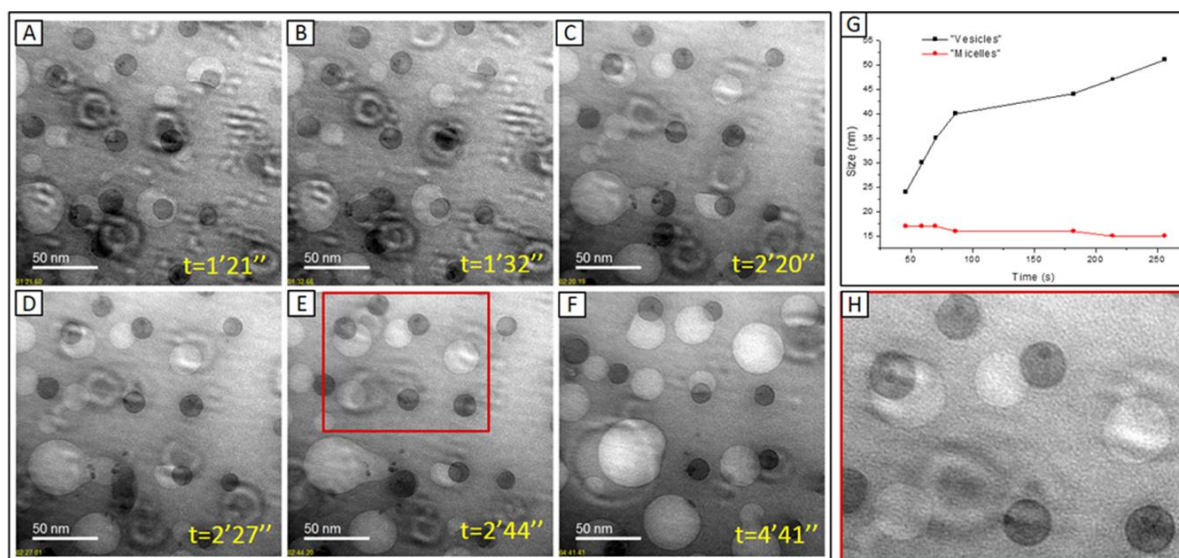


Figure 11 : (A-F) Séquence d'images in situ liquide TEM du mélange réactionnel. (G) Évolution des mésophases vésiculaires et micellaires. (H) Image agrandie des deux morphologies présentes simultanément.

### V.2.2.3) Étude de la croissance des oxydes de fer en fonction de la dose d'électrons :

Nous avons vu précédemment que la nucléation passe par deux états intermédiaires qui peuvent apparaître simultanément. Une fois que le « liquide dense » atteint une taille critique (rayon critique)<sup>31</sup> les globules (micelles inversées et vésicules) « explosent » pour libérer le germe cristallisé. Après cette étape de nucléation, nous avons suivi la croissance de ces germes pour former des nanoparticules d'oxyde de fer. On a remarqué que la dose d'électron a une influence importante sur la cinétique de formation et la morphologie des NPs. En effet, la croissance des nanoparticules d'oxyde de fer est simultanément dictée par des effets cinétiques et thermodynamiques difficile à distinguer. La dose d'électrons fournit un contrôle direct du taux de croissance qui permet de quantifier les effets cinétiques sur la formation de nanoparticules.

#### V.2.2.3.1) Mode MET : $d=9364 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}$ (dose élevée)



Dans le mode MET parallèle, la dose d'électrons peut être importante et le liquide est irradié en continu. Pour cette première étude nous commençons par une dose importante. En effet le courant de faisceau utilisé est de 150 pA ce qui correspond à une dose d'électron de  $9364 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}$ .

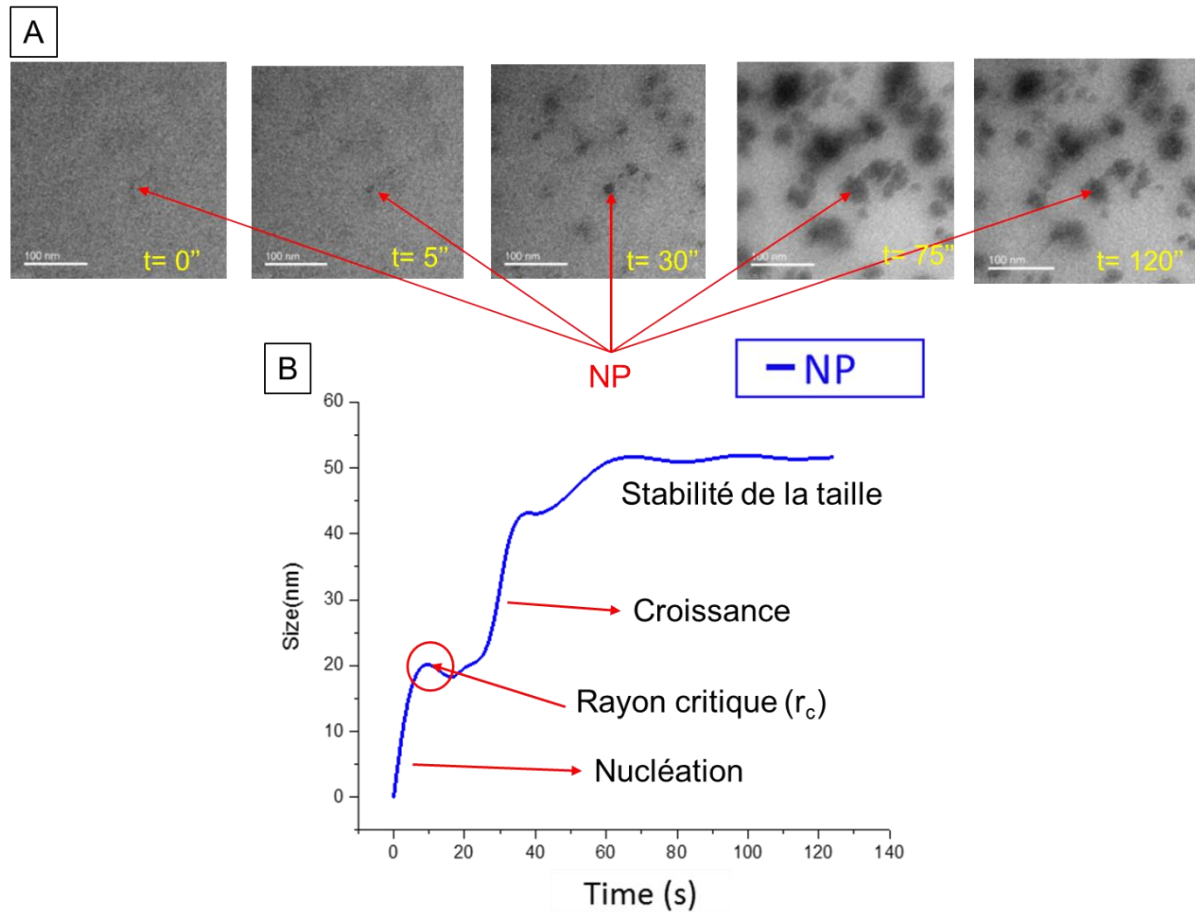


Figure 12 : (A) séquence d'images enregistrées par MET in-situ en milieu liquide du mécanisme de croissance de NPs d'oxyde de fer. (B) Évolution dans le temps de la taille d'une NP.

Avec cette dose d'électron la croissance est très rapide, l'étape de nucléation se déroule en moins de 10s. Rapidement les NPs croissent jusqu'à atteindre un rayon critique, c'est-à-dire le rayon à partir duquel il n'y a plus de croissance et il y a une stabilité de la taille des NPs ; ce phénomène est bien expliqué par LaMer<sup>31</sup> (voir figure 8a). En effet, l'énergie fournie au milieu réactionnel est très importante donc la cinétique de croissance est également rapide. Néanmoins, l'arrêt de la croissance peut également être due à un appauvrissement du milieu réactionnel en monomères.<sup>40</sup> On remarque qu'à ce niveau d'énergie on ne contrôle ni la morphologie et ni la dispersion en taille.



V.2.2.3.2) Mode MET :  $d=6870 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}$  (dose « moyenne »)

Dans la deuxième étude de croissance nous diminuons la dose d'électrons à une valeur de  $6870 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}$  presque un tiers de moins que précédemment. On remarque un fait intéressant, celui de l'augmentation du temps de nucléation.

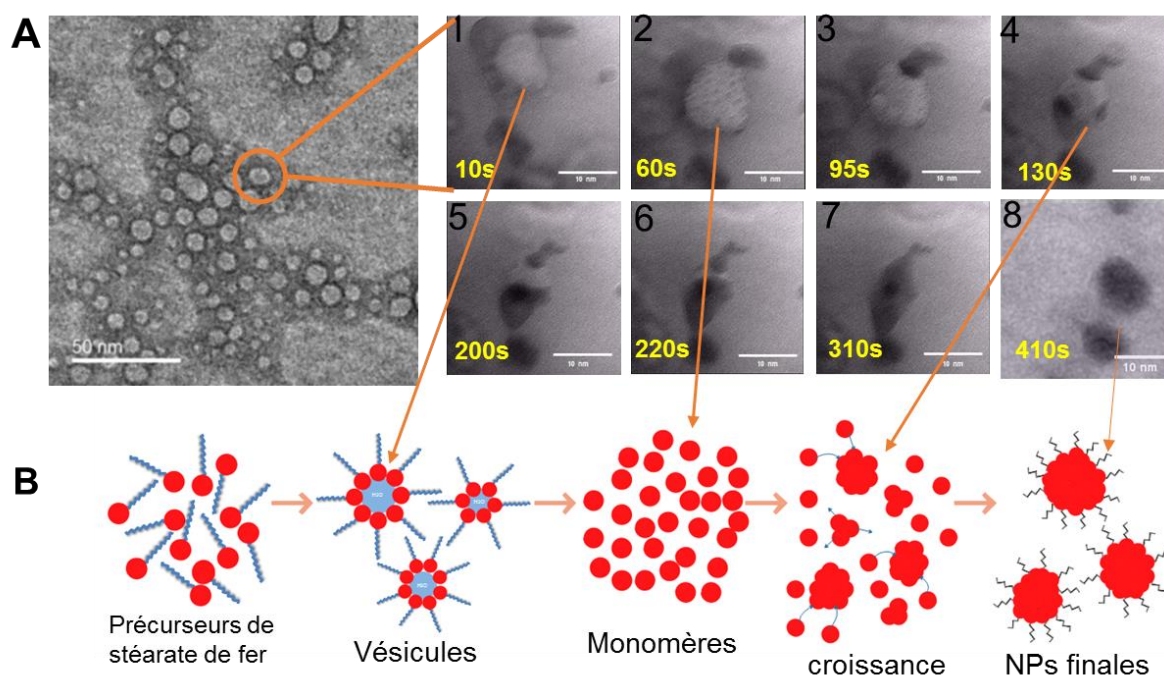


Figure 13 : (A) séquence d'images enregistrées par MET in-situ en milieu liquide de la croissance d'une NP à partir d'un globule (vésicule). (1-8). (B) représentation schématique du processus de croissance.

Cette expérience nous permet de mettre en évidence le mécanisme de LaMer. En effet, en partant d'un globule (une vésicule) on peut suivre en temps réel la formation de monomères qui coalescent pour former des particules plus grandes jusqu'à atteindre le rayon critique et puis on observe une diminution de la taille des NPs formées vers un diamètre stable.

V.2.2.3.3) Mode MET :  $d=2500 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}$  (dose faible)

Pour cette expérience, la dose d'électrons que nous utilisons est trois fois plus faible que précédemment. En effet, cette étude nous permet de mettre en évidence le murissement d'Ostwald.

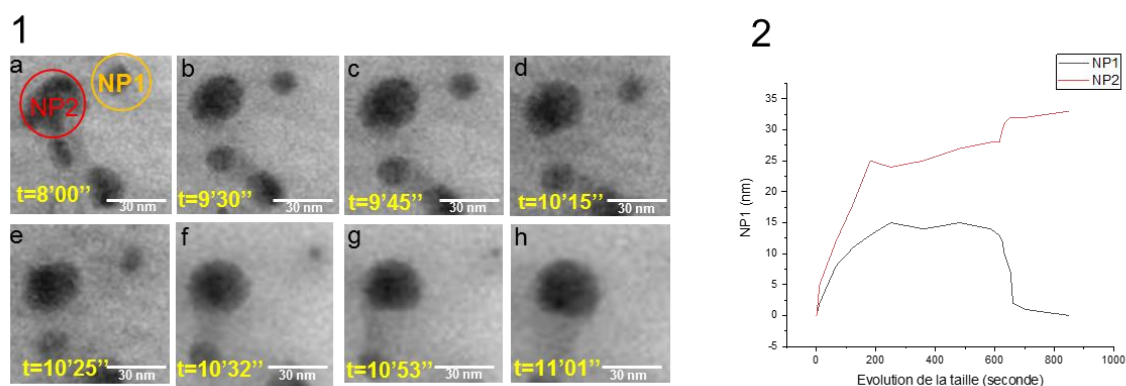


Figure 14 : (1) séquence d'images obtenues par MET in-situ en milieu liquide. (a-h) Suivie de l'évolution de deux nanoparticules (NP1 et NP2) et en (2) représentation graphique de cette évolution en taille de ces deux NPs en fonction du temps.

Dans la figure 14 on compare l'évolution de deux nanoparticules en fonction du temps. Les courbes qui représentent cette évolution montrent trois régimes. Dans la première période les deux NPs (NP1 et NP2) voient leurs tailles croître, cependant la NP2 plus vite que la NP1. La deuxième période fait état d'une relative stabilité alors que la dernière étape la NP1 voit sa taille décroître rapidement et au bénéfice de la NP2 dont le diamètre augmente. Ce comportement est typique d'un murissement d'Ostwald (voir figure 8b).

#### V.2.2.3.4) Mode STEM : comparaison entre deux doses d'électrons

Comme mentionné avant, le mode STEM permet en principe un meilleur contrôle de la dose d'électrons et est caractérisé par une meilleure résolution théorique (figure 2).<sup>19</sup> Cependant lors de l'utilisation du mode STEM directement, même après deux heures d'irradiation, la réaction n'a pas lieu. Car l'énergie apportée par la sonde lors du balayage est rapidement dissipée et donc insuffisante pour dépasser le seuil de la réaction de décomposition thermique du stéarate de fer. Pour débloquent ce verrou nous utilisons le mode spot, que nous positionnons pendant quelque seconde au centre de l'image. Ceci a pour conséquence de démarrer la réaction et de nous permettre de réaliser une étude in-situ en mode STEM de la croissance de nanoparticule d'oxyde de fer. En effet, nous réalisons deux expériences avec deux doses d'électrons différentes, une avec  $d=900 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}$  et la deuxième avec un  $d=230 \text{ e}^-/\text{nm}^2.\text{s}$ .

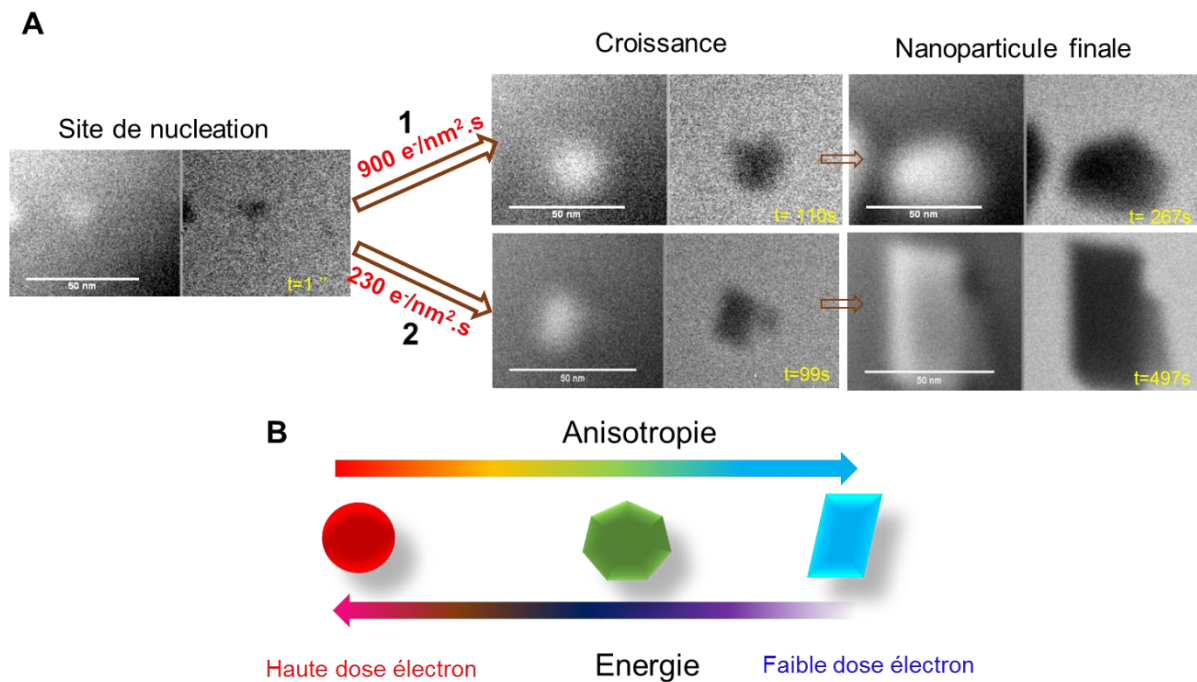


Figure 15 : (A) séquence d'image enregistrées par STEM in-situ en milieu liquide avec deux doses d'électron différentes. (A-1) La dose est de  $900 \text{ e}^-/\text{nm}^2 \cdot \text{s}$  et donne naissance à une NP sphérique alors que dans le cas du (A-2) la dose utilisée est de  $230 \text{ e}^-/\text{nm}^2 \cdot \text{s}$  et a pour conséquence l'obtention d'une NP de morphologie anisotrope. (B) représentation schématique de l'évolution de la morphologie en fonction de la dose d'électrons.

Cette étude montre que le mode STEM permet d'étudier l'influence des paramètres de réaction sur la morphologie. Effectivement, dans notre cas lorsque nous utilisons une dose d'électrons de  $900 \text{ e}^-/\text{nm}^2 \cdot \text{s}$  nous orientons la croissance des NPs d'oxyde de fer vers une morphologie sphérique. Alors que quand nous abaissons cette dose à  $230 \text{ e}^-/\text{nm}^2 \cdot \text{s}$  une croissance anisotrope est favorisée comme le montre la figure 15 B. Un fait intéressant est que dans ce mode nous observons presque uniquement la croissance d'une seule NP. Par conséquent, la taille de la particule est stabilisée lorsque le milieu réactionnel devient pauvre en monomère. Il est important de signifier que lorsque la réaction démarre au point choisi, seul le germe crée en ce lieu croît et selon la dose d'électron la morphologie peut être choisie. De plus, nous pensons qu'une dose d'électron importante a une influence sur la création rapide de monomères donc le taux critique d'approvisionnement en monomères de fer peut avoir un effet sur la formation de NP et favoriser une morphologie plutôt sphérique. Alors qu'à faible dose d'électrons, la croissance est gouvernée plutôt par la thermodynamique d'où la formation de NPs anisotropes tel que les nano-bâtonnets.

### V.2.2.3.5) Analyse ex-situ : vérification par HRTEM et diffraction des électrons

Finalement, après avoir arrêté la synthèse en cessant l'irradiation, nous avons récupéré les échantillons avec leur support pour les analyser par HR-TEM. Des nanoparticules d'oxyde de fer d'environ 7 nm ont pu être visualisées. Les distances des plans mesurés mettent en évidence la présence de la magnétite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), mais nous avons également observé des NPs métallique de Fe (figure 16). Probablement, la présence de nanoparticules de fer métalliques provient du manque d'oxygène dans le milieu réactionnel, car la cellule environnementale est fermée et confinée. Donc, lorsque l'oxygène contenu initialement dans le solvant est consommé, la nucléation et la croissance continuent à ne former que des nanoparticules métalliques.

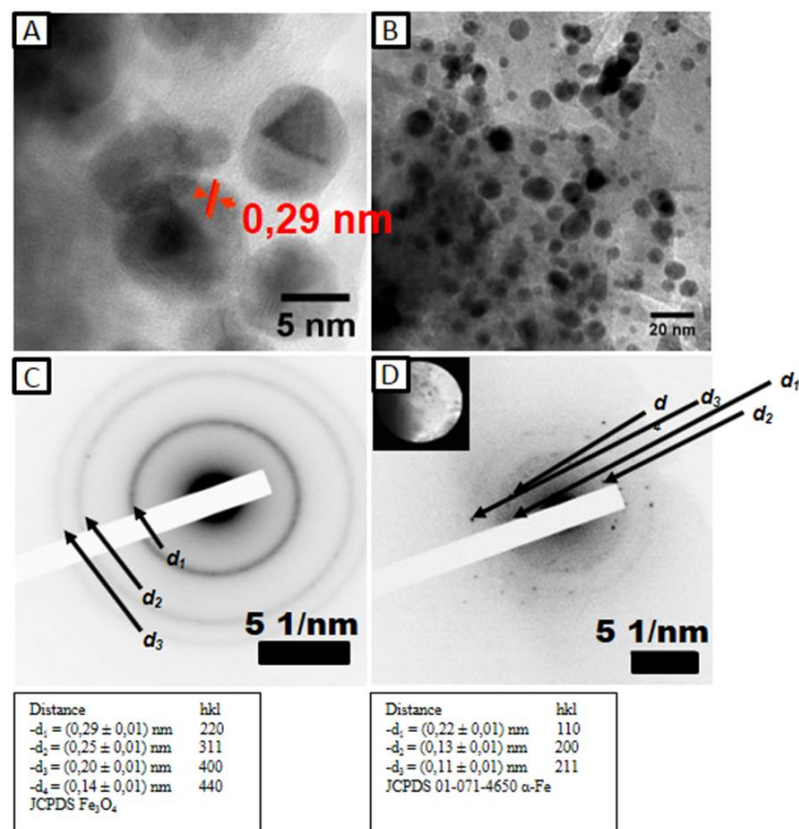


Figure 16 : Images HRTEM post-mortem de nanoparticules à base de fer produites lors de la synthèse in-situ en cellule liquide MET (A-B). Diffraction électronique de nanoparticules de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  et de  $\alpha\text{-Fe}$  métallique indexée avec la base de données JCPDS (C et D, respectivement)

### V.3) Conclusion :

L'étude de la nucléation et de la croissance d'oxyde de fer en se basant sur la réaction de décomposition thermique fournit un aperçu dynamique direct sans précédent du mécanisme de pré-nucléation en deux étapes pour la cristallisation de nanoparticules à base d'organométallique dans un milieu organique. Nous avons montré que le processus de nucléation passe par la formation de globules sursaturés ou de gouttelettes constituées par un arrangement des monomères, où des germes cristallins commencent à se développer. Ces résultats inédits dans la formation de nanoparticules d'oxyde de fer dans des milieux organiques expliqueraient la similitude des produits finaux issus de la méthode de la synthèse par décomposition thermique qui n'est que partiellement comprise jusqu'à présent. Ces résultats saisissants confirment le grand avantage de la microscopie électronique à transmission in-situ liquide pour élucider certains processus dynamiques dans les étapes naissantes de la croissance ou de synthèse de structures inorganiques et même hybrides. En outre, cette technique ouvre la voie à un meilleur contrôle des propriétés des nanoparticules par une compréhension plus aboutie de leurs mécanismes de croissance complexes qui impliquent des processus physiques et chimiques tels que la dissociation, la diffusion et l'arrangement des molécules.

D'un point de vue plus général, le développement de la microscopie environnementale dans notre laboratoire nous permet d'étudier et de comprendre l'évolution structurale de matériaux dans leurs environnements de synthèse ou d'application. Par exemple en collaboration avec l'université fédérale de Rio, dans le cadre d'un laboratoire international associé (LIA), nous étudions à l'aide de la microscopie en milieu liquide les processus de minéralisation de l'hydroxyapatite ou encore la synthèse de la calcite. Ceci nous permettra de comprendre les phénomènes de nucléation, de croissance et d'agrégation de ces nanoparticules minérales avec ou sans l'action de molécules organiques qui peuvent intervenir dans ces processus de minéralisation. De plus, dans un cadre plus applicatif, on étudie l'effet de l'hydratation du ciment pour mettre en évidence grâce aux observations in-situ les processus de transformation et de formation des feuillets de silicates pour en comprendre les effets et proposer des solutions d'amélioration. Dans un cadre différent, nous réalisons des études in-situ d'électrochimie en mode opérando, pour comprendre et améliorer l'activité d'électrocatalyseurs. Il est donc devenu impératif de créer des milieux artificiels reproduisant au plus près les environnements naturels, synthétiques ou même biologiques.



## REFERENCES CHAPITRE V

- 1- Ross, F. M. Opportunities and Challenges in Liquid Cell Electron Microscopy. *Science* (80). 2015, 350 (6267), aaa9886.
- 2- De Jonge, N., & Ross, F. M. (2011). Electron microscopy of specimens in liquid. *Nature Nanotechnology*, 6(11), 695–704.
- 3- F. M. Ross, “Growth processes and phase transformations studied by *in situ* transmission electron microscopy”. *IBM J. Res. Develop.* 44 , (2000), pp. 489–501.
- 4- A. Radisic, F. M. Ross, P. C. Searson, “*In situ* study of the growth kinetics of individual island electrodeposition of copper”. *J. Phys. Chem. B* 110 (15), (2006), pp. 7862–7868.
- 5- N. M. Schneider, M. M. Norton, B. J. Mendel, J. M. Grogan, F. M. Ross, H. H. Bau, “Electron–water interactions and implications for liquid cell electron microscopy”. *J. Phys. Chem. C* 118 (38), (2014), pp. 22373–22382.
- 6- M. J. Williamson, R. M. Tromp, P. M. Vereecken, R. Hull, F. M. Ross, “Dynamic Microscopy of Nanoscale Cluster Growth at the Solid-Liquid Interface,” *Nat Mater* 2, no. 8 (2003), pp. 532–36.
- 7- Møller Nielsen, R., Canepa, S., Yesibolati, M. N., Nielsen, C. P., Bruus, H., Sun, H., & Mølhave, K. (2018). In Situ Liquid SEM Studies of Electrochemical and Radiolytic Processes. *Microscopy and Microanalysis*, 24(S1), 338–339.
- 8- Jun, Y. S.; Kim, D.; Neil, C. W. Heterogeneous Nucleation and Growth of Nanoparticles at Environmental Interfaces. *Acc. Chem. Res.* 2016, 49 (9), 1681.
- 9- Ramesh, G. V; Sreedhar, B.; Radhakrishnan, T. P. Real Time Monitoring of the in Situ Growth of Silver Nanoparticles in a Polymer Film under Ambient Conditions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2009, 11 (43), 10059.
- 10- Creemer, J. F., Helveg, S., Kooyman, P. J., Molenbroek, A. M., Zandbergen, H. W., & Sarro, P. M. (2010). A MEMS Reactor for Atomic-Scale Microscopy of Nanomaterials Under Industrially Relevant Conditions. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 19(2), 254–264.
- 11- Garrett, B. C., Dixon, D. A., Camaioni, D. M., Chipman, D. M., Johnson, M. A., Jonah, C. D., ... Zwier, T. S. (2005). Role of Water in Electron-Initiated Processes and Radical Chemistry: Issues and Scientific Advances. *Chemical Reviews*, 105(1), 355–390.
- 12- Zheng, H., Smith, R. K., Jun, Y. -w., Kisielowski, C., Dahmen, U., & Alivisatos, A. P. (2009). Observation of Single Colloidal Platinum Nanocrystal Growth Trajectories. *Science*, 324(5932), 1309–1312.



- 13- Schneider, N. M. (n.d.). Electron Beam Effects in Liquid Cell TEM and STEM. *Liquid Cell Electron Microscopy*, 140–163.
- 14- M. E. Holtz, Y. Yu, J. Rivera, H. D. Abruña and D. A. Muller., “*In Situ* TEM for Quantitative Electrochemistry of Energy Systems” *Microscopy and Microanalysis*, Vol. 21, Supplement S3, (2015), pp 1509-1510.
- 15- Fenter, P., Lee, S. S., Zhang, Z., & Sturchio, N. C. (2011). In situ imaging of orthoclase–aqueous solution interfaces with x-ray reflection interface microscopy. *Journal of Applied Physics*, 110(10), 102211.
- 16- Lacroix, M. (1993). Numerical simulation of a shell-and-tube latent heat thermal energy storage unit. *Solar Energy*, 50(4), 357–367.
- 17- Schuh, T., & de Jonge, N. (2014). Liquid scanning transmission electron microscopy: Nanoscale imaging in micrometers-thick liquids. *Comptes Rendus Physique*, 15(2-3), 214–223.
- 18- G. Dupouy, “Electron microscopy at very high voltages, in *Advances in optical and electron microscopy*”, ed. by R. Barer, V.E. Coslett, vol. 2 (Academic Press, London, 1968), p. 167
- 19- De Jonge, N., Browning, N. D., Evans, J. E., Chee, S. W., & Ross, F. M. (n.d.). Resolution in Liquid Cell Experiments. *Liquid Cell Electron Microscopy*, 164–188.
- 20- Lartigue, L.; Hugounenq, P.; Alloyeau, D.; Clarke, S. P.; Lévy, M.; Bacri, J. C.; Bazzi, R.; Brougham, D. F.; Wilhelm, C.; Gazeau, F. Cooperative Organization in Iron Oxide Multi-Core Nanoparticles Potentiates Their Efficiency as Heating Mediators and MRI Contrast Agents. *ACS Nano* 2012, 6 (12), 10935.
- 21- Boni, A.; Basini, A. M.; Capolupo, L.; Innocenti, C.; Corti, M.; Cobianchi, M.; Orsini, F.; Guerrini, A.; Sangregorio, C.; Lascialfari, A. Optimized PAMAM Coated Magnetic Nanoparticles for Simultaneous Hyperthermic Treatment and Contrast Enhanced MRI Diagnosis. *RSC Adv.* 2017, 7 (70), 44104.
- 22- Espinosa, A.; Di Corato, R.; Kolosnjaj-Tabi, J.; Flaud, P.; Pellegrino, T.; Wilhelm, C. Duality of Iron Oxide Nanoparticles in Cancer Therapy: Amplification of Heating Efficiency by Magnetic Hyperthermia and Photothermal Bimodal Treatment. *ACS Nano* 2016, 10 (2), 2436.
- 23- Martinez-Boubeta, C.; Simeonidis, K.; Makridis, A.; Angelakeris, M.; Iglesias, O.; Guardia, P.; Cabot, A.; Yedra, L.; Estradé, S.; Peiró, F.; et al. Learning from Nature to Improve the Heat Generation of Iron-Oxide Nanoparticles for Magnetic Hyperthermia Applications. *Sci. Rep.* 2013, 3, 1.
- 24- Baaziz, W.; Pichon, B. P.; Fleutot, S.; Liu, Y.; Lefevre, C.; Greneche, J. M.; Toumi, M.; Mhiri, T.; Begin-Colin, S. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *J. Phys. Chem. C* 2014, 118 (7), 3795.

- 25- Evans, J. E.; Jungjohann, K. L.; Browning, N. D.; Arslan, I. Controlled Growth of Nanoparticles from Solution with in Situ Liquid Transmission Electron Microscopy. *Nano Lett.* 2011, 11 (7), 2809.
- 26- Hufschmid, R.; Arami, H.; Ferguson, R. M.; Gonzales, M.; Teeman, E.; Brush, L. N.; Browning, N. D.; Krishnan, K. M. Synthesis of Phase-Pure and Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles by Thermal Decomposition. *Nanoscale* 2015, 7 (25), 11142.
- 27- Park, J.; An, K.; Hwang, Y.; Park, J.-G.; Noh, H.-J.; Kim, J.-Y.; Park, J.-H.; Hwang, N.-M.; Hyeon, T. Ultra-Large-Scale Syntheses of Monodisperse Nanocrystals. *Nat. Mater.* 2004, 3 (12), 891.
- 28- Hufschmid, R.; Arami, H.; Ferguson, R. M.; Gonzales, M.; Teeman, E.; Brush, L. N.; Browning, N. D.; Krishnan, K. M. Synthesis of Phase-Pure and Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles by Thermal Decomposition. *Nanoscale* 2015, 7 (25), 11142.
- 29- Woehl, T. J.; Evans, J. E.; Arslan, I.; Ristenpart, W. D.; Browning, N. D. Direct in Situ Determination of the Mechanisms Controlling Nanoparticle Nucleation and Growth. *ACS Nano* 2012, 6 (10), 8599.
- 30- Kwon, S. G.; Hyeon, T. Formation Mechanisms of Uniform Nanocrystals via Hot-Injection and Heat-Up Methods. *Small* 2011, 7 (19), 2685.
- 31- LaMer, V. K.; Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* 1950, 72 (8), 4847
- 32- Vekilov, P. G. Nucleation. *Cryst. Growth Des.* 2010, 10 (12), 5007.
- 33- Sauter, A.; Roosen-Runge, F.; Zhang, F.; Lotze, G.; Jacobs, R. M. J.; Schreiber, F. Real-Time Observation of Nonclassical Protein Crystallization Kinetics. *J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137 (4), 1485.
- 34- Vivarès, D.; Kaler, E. W.; Lenhoff, A. M. Quantitative Imaging by Confocal Scanning Fluorescence Microscopy of Protein Crystallization via Liquid-Liquid Phase Separation. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2005, 61 (6), 819.
- 35- Mikhlin, Y.; Karacharov, A.; Likhatski, M.; Podlipskaya, T.; Zubavichus, Y.; Veligzhanin, A.; Zaikovski, V. Submicrometer Intermediates in the Citrate Synthesis of Gold Nanoparticles: New Insights into the Nucleation and Crystal Growth Mechanisms. *J Colloid Interface Sci* 2011, 362 (2), 330.
- 36- Smeets, P. J. M.; Cho, K. R.; Kempen, R. G. E.; Sommerdijk, N. A. J. M.; De Yoreo, J. J. Calcium Carbonate Nucleation Driven by Ion Binding in a Biomimetic Matrix Revealed by in Situ Electron Microscopy. *Nat. Mater.* 2015, 14 (4), 394.
- 37- Lassenberger, A.; Grünwald, T. A.; Van Oostrum, P. D. J.; Rennhofer, H.; Amenitsch, H.; Zirbs, R.; Lichtenegger, H. C.; Reimhult, E. Monodisperse Iron Oxide Nanoparticles by Thermal Decomposition: Elucidating Particle Formation by Second-Resolved in Situ Small-Angle X-Ray Scattering. *Chem. Mater.* 2017, 29 (10), 4511.

- 38- Soon, G. K.; Piao, Y.; Park, J.; Angappane, S.; Jo, Y.; Hwang, N. M.; Park, J. G.; Hyeon, T. Kinetics of Monodisperse Iron Oxide Nanocrystal Formation By “heating-Up” process. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129 (41), 12571.
- 39- Baumgartner, J.; Dey, A.; Bomans, P. H. H.; Coadou, C. Le; Fratzl, P.; Sommerdijk, N. A. J. M.; Faivre, D. Nucleation and Growth of Magnetite from Solution. *Nat. Mater.* 2013, 12 (4), 310.
- 40- Alloyeau, D.; Dachraoui, W.; Javed, Y.; Belkahla, H.; Wang, G.; Lecoq, H.; Ammar, S.; Ersen, O.; Wisnet, A.; Gazeau, F.; et al. Unravelling Kinetic and Thermodynamic Effects on the Growth of Gold Nanoplates by Liquid Transmission Electron Microscopy. *Nano Lett.* 2015, 15 (4), 2574.
- 42- Dinh, C. T.; Nguyen, T. D.; Kleitz, F.; Do, T. O. *Shape-Controlled Synthesis of Metal Oxide Nanocrystals*; Stanford, P., Ed.; Singapore, 2012; Vol. 3.
- 43- Mehranpour, H.; Askari, M.; Ghamsari, M. S.; Farzalibeik, H. Study on the Phase Transformation Kinetics of Sol-Gel Driven TiO Nanoparticles. *J. Nanomater.* 2010, 2010, 1.

# Conclusion générale et perspectives

Le travail présenté dans ce manuscrit a permis de mettre en évidence l'importance du développement méthodologique et technique pour débloquer les verrous empêchant l'analyse de certains matériaux se dégradant sous irradiation par un faisceau d'électrons et difficiles à préparer à cause de leur grande fragilité. Nous avons vu que des dégâts sur l'échantillon produits par le faisceau d'électrons n'apparaissent qu'au-dessus d'un certain seuil de densité de courant électronique qui dépend de la nature du matériau et de ses caractéristiques morphologiques et structurales. Cette dégradation dépend à la fois de la dose instantanée et de la dose accumulée. Il est donc nécessaire de connaître les différentes interactions et les énergies mises en œuvre dans l'interaction électron-matière avant de développer et d'appliquer des techniques spécifiques de préparation et d'observation minimisant la dégradation de l'échantillon étudié en microscopie électronique en transmission.

L'étude du chapitre 2 nous a permis de mettre en place la Cryo-EM par vitrification. Dans la première partie de ce chapitre nous avons réussi à préparer un modèle multifonctionnel, le système "His<sub>6</sub>-tagSWNT", construit par fonctionnalisation chimique non-covalente de nanotubes de carbones monoparoi (SWNTs). Puis nous avons caractérisé la structure par Cryo-EM. L'analyse de ce système hybride dans un état proche de son milieu natif a fourni des informations directes sur la présence de molécules organiques intactes sur l'architecture de l'ensemble. Au moyen de la fonctionnalisation chimique non-covalente et non-destructive des SWNTs, nous avons démontré grâce à la Cryo-EM que His<sub>6</sub>-tagSWNT représente un modèle unique doté de propriétés chimiques remarquables et polyvalentes induites par les propriétés du polypeptide. Les observations à haute résolution à froid ont montré la formation d'auto-assemblages induits soit par des liaisons hydrogènes, soit par des liaisons de coordination avec le nickel ou encore des liaisons covalentes. La deuxième partie de ce chapitre concerne le développement d'une nouvelle approche d'élaboration et de caractérisation de systèmes fonctionnels basés sur la chimie cavitationnelle (ultrason) en utilisant des conditions douces. Pour leur analyse, nous avons montré que la Cryo-EM est indispensable pour échapper à la grande fragilité du marqueur Hexahistidine-pyrène. Avec cette technique, on a mis en évidence la fonctionnalisation et l'exfoliation du graphène avec la molécule hexahistidine-pyrène. De plus, elle nous a permis de mesurer statistiquement le nombre de feuillets de graphène et de démontrer que le processus de fonctionnalisation mis en place est efficace. En effet, en utilisant des conditions douces basées sur l'utilisation des ultrasons à faible fréquence, nous avons réussi à exfolier le graphite pour l'obtention de monofeuillets de graphène. De manière générale, cette étude nous a permis l'optimisation de la technique de préparation de différents systèmes architecturaux et de son couplage avec les analyses par Cryo-EM. La vitrification a permis de conserver l'échantillon dans son état naturel « figé » durant l'analyse TEM et par la suite de mettre en évidence les architectures des matériaux hybrides et des nanocomposites.

Dans le chapitre 3, il est question du développement de protocoles spécifiques de préparation des échantillons et d'observation ainsi que de l'utilisation de la technique Cryo-EM en mode STEM pour la réalisation de cartographies chimiques. Ce chapitre porte sur l'étude de deux types de matériaux. Dans la première partie, nous avons mis en évidence la structure de l'espacement inter-lamellaire, composé d'une matrice et d'une zone intermédiaire, ainsi que son épaisseur pour différents échantillons de pérovskites Aurivillius. De plus nous avons montré que seule la distance de la zone intermédiaire changeait lors de l'introduction de cuivre. Par la suite, l'analyse quantitative des résultats obtenus nous a permis de déduire le positionnement des différents éléments chimiques composant le matériau, surtout la localisation des atomes de cuivre. En perspective, il reste à réaliser des expériences supplémentaires de haute résolution et à utiliser la diffraction électronique pour le positionnement des atomes bismuth. Ensuite, il reste à terminer les analyses pour l'échantillon poudre « bleu » (cuivre avec une polyamine), pour lequel il faudra mettre en place une approche de cartographie chimique à basse tension (80kV) pour préserver encore plus la structure du matériau. Dans la seconde partie, le développement des techniques de préparation a permis de mettre en œuvre les études par Cryo-STEM couplées à la cartographie chimique pour avoir accès à la morphologie, à l'organisation, à la structure et à l'arrangement des différents éléments constituant des matériaux de type « cristaux moléculaires ». Dans cette partie, nous avons dû résoudre deux problèmes. Le premier, le plus difficile, était le développement de protocoles de préparation spécifiques permettant l'obtention d'une couche mince de l'interface entre cristaux de fer et de ruthénium. D'où le développement d'une méthode nouvelle, relativement facile à mettre en œuvre, la méthode à la membrane, qui a permis d'obtenir des sections ultrafines (70 nm) et de garder l'échantillon intact. La caractérisation par Cryo-EM en mode STEM a permis d'obtenir des cartographies chimiques du cristal moléculaire. En effet, nous avons réussi à mettre en évidence l'interface entre le Fe et Ru sans détériorer le matériau. De plus, nous avons montré que la diffusion du Ru dans la matrice de Fe était plus importante que sa réciproque ; enfin, nous avons réalisé la mesure de la largeur de cette interface. Grâce à ces développements, en perspective il sera plus facile, par la suite, de réaliser des études sur des cristaux moléculaires plus complexes avec plusieurs étages de monocristaux et de différentes compositions.

Dans le chapitre 4, nous avons montré la possibilité de réaliser des études en tomographie électronique en transmission sur des matériaux fragiles. Cela a nécessité de développer une méthodologie pouvant être appliquée pour tout type d'échantillon présentant une sensibilité aux électrons. Dans notre étude, la Cryo-ET nous a permis d'accéder à la quantification, à la localisation de chaque partie du matériau hybride étudié, constitué ici des nanoparticules et d'un réseau de type « MOF » ; ainsi qu'aux caractéristiques structurales dans les trois directions de



l'espace. Cette analyse nous a permis d'accéder à plusieurs données numériques de chaque NP, comme le volume, la surface, le positionnement et l'interaction avec le MOF. De manière générale, la Cryo-tomographie nous a permis de compléter notre savoir-faire dans l'utilisation des techniques de tomographie. Jusque-là essentiellement utilisée dans le domaine de la biologie, sa transposition au domaine des matériaux ouvre de nombreuses perspectives d'application aux échantillons sensibles difficiles à étudier par tomographie électronique conventionnelle, comme par exemple la matière molle et les nanostructures hybrides qui sont de plus en plus développées dans notre institut ou dans les laboratoires partenaires.

Le dernier chapitre a porté sur l'étude in-situ de la nucléation et de la croissance d'oxyde de fer en se basant sur la réaction de décomposition thermique. Il fournit un aperçu dynamique direct sans précédent du mécanisme de pré-nucléation en deux étapes pour la cristallisation de nanoparticules à base d'organométalliques dans un milieu organique. Nous avons montré que le processus de nucléation passe par la formation de globules sursaturés ou de gouttelettes constituées par un arrangement des monomères, où des germes cristallins commencent à se développer. Ces résultats inédits dans la formation de nanoparticules d'oxyde de fer dans des milieux organiques expliqueraient la similitude des produits finaux issus de la méthode de synthèse par décomposition thermique qui n'est que partiellement comprise jusqu'à présent. Ces résultats saisissants confirment le grand avantage de la microscopie électronique à transmission in-situ liquide pour élucider certains processus dynamiques dans les étapes naissantes de la croissance ou de synthèse de structures inorganiques et même hybrides. En outre, cette technique ouvre la voie à un meilleur contrôle des propriétés des nanoparticules par une compréhension plus aboutie de leurs mécanismes de croissance complexes qui impliquent des processus physiques et chimiques tels que la dissociation, la diffusion et l'arrangement des molécules.



# Étude par les techniques avancées de microscopie électronique en transmission de matériaux fragiles

## Résumé

Le travail présenté dans ce manuscrit a montré l'importance du développement méthodologique et technique pour identifier et débloquent les verrous empêchant l'analyse de matériaux hybrides et complexes qui se dégradent sous irradiation par un faisceau d'électrons. Nous avons mis en évidence que des dégâts sur l'échantillon produits par les électrons n'apparaissent qu'au-dessus d'un certain seuil de densité de courant électronique qui dépend de la nature du matériau et de ses caractéristiques morphologiques et structurales. Ces développements couplés à la Cryo-EM, nous ont permis de mettre en évidence l'architecture des matériaux hybrides à base de carbone, la variation de la distance lamellaire dans une pérovskite en fonction de la molécule insérée et le positionnement du métal, d'identifier les interactions à l'interface entre deux cristaux moléculaires et la quantification 3D de la fonctionnalisation d'un MOF. Dans la dernière partie, nous avons mis en évidence les processus de nucléation et de croissance d'oxyde de fer par MET *in-situ* en phase liquide.

**Mots clés :** Microscopie électronique en transmission, matériaux sensibles, irradiation, développement méthodologie et techniques, Cryo-EM, Cryo-Tomographie, environnemental, in-situ

## Abstract

The present manuscript shows the importance of methodological and technical development to identify and to unblock locks preventing the analysis of hybrid and complex materials that undergo degradation under electron beam irradiation. We have shown that beam-induced damage to the sample only appears above some specific threshold of current density. Such a threshold depends on the nature of the material and on its morphological and structural characteristics. These developments in synergy with the use of Cryo-EM, allowed us to expose the architecture of carbon-based hybrid materials, measure the variation of the lamellar distance in a perovskite according to the molecular spacer and to the positioning of the metal, identify the interactions at the interface between two molecular crystals, and the 3D quantification of the functionalization within a MOF. Lastly, we brought to light the processes of nucleation and growth of iron oxide by *in-situ* liquid phase TEM.

**Keywords:** Transmission electron microscopy, sensitive materials, irradiation, methodology and techniques development, Cryo-EM, Cryo-Tomography, environmental, in-situ