UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE de Physique et Chimie Physique (ED182)

Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg

(UMR 7504 CNRS–Unistra)

THÈSE

présentée par :

Pier Andrea Berling

Soutenue le : **03 février 2022**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie-Physique des Matériaux

Conception d'un biocapteur SPR à base de nanoparticules à haut indice de réfraction déposées sur un film d'or

THÈSE dirigée par :

[M. PICHON Benoit]	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

[M. BARBILLON Grégory]	Professeur, EPF-Ecole d'Ingénieurs
[M. FRANCIUS Grégory]	Directeur de Recherche, Université de Lorraine

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

[Mme. PETIT Corinne]	Professeur, Université de Strasbourg

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE de Physique et Chimie Physique (ED182)

Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg

(UMR 7504 CNRS–Unistra)

THÈSE

présentée par :

Pier Andrea Berling

Soutenu le : **03 février 2022**

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

Discipline/ Spécialité : Chimie-Physique des Matériaux

Conception d'un biocapteur SPR à base de nanoparticules à haut indice de réfraction déposées sur un film d'or

THÈSE dirigée par :

[M. PICHON Benoit]	Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

[M. BARBILLON Grégory]	Professeur, EPF-Ecole d'Ingénieurs
[M. FRANCIUS Grégory]	Directeur de Recherche, Université de Lorraine

---

AUTRES MEMBRES DU JURY :

[Mme. PETIT Corinne]	Professeur, Université de Strasbourg

Remerciements

Je souhaiterai utiliser ces lignes à ma disposition pour remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse. En effet des travaux de thèse ne se mène pas seuls. Il est souvent nécessaire d'avoir le soutien scientifique, mais surtout moral des gens qui nous entourent.

Je remercie dans un premier temps M. Pierre Rabu et Mme. Nathalie Viart qui m'ont respectivement accueilli au sein de l'IPCMS et du DCMI.

Merci à Benoit, qui a permis d'effectuer cette thèse au sein de l'équipe nanoparticules. A toi qui as su me suivre pendant ces trois ans, aussi bien dans les moments où « tout marche bien » et qui a su me remotiver lorsque mon moral était bas. Merci pour les conseils et les explications concernant la chimie, matière que j'ai presque découvert au long de cette thèse. Je suis la personne avec le background moins le moins chimiste de l'équipe mais maintenant je sais faire des colonnes mieux que les autres. Tu m'as sorti des sentiers battus et de ma zone de confort.

Lorsque l'on parle de l'équipe nanoparticules on ne peut pas oublier Sylvie et Damien, merci à vous pour les conseils lors des réunions d'équipe. Et comment ne pas remercier Céline. Céline merci de m'avoir supporté au labo, le bordel sous la paillasse, les affaires qui trainent partout et j'en passe. Merci pour les synthèses de nanoparticules, les formations diverses (IR, UV, et même la RMN !). Promis, un jour je mettrai ma blouse, mais pas tout de suite.

Merci à Cédric pour les images MEB et qui m'a également appris à me servir du microscope. Est-ce que c'est parce que tu en avais marre de passer mes échantillons pourris ?

Merci à Fred (Tonic) et Alex avec qui j'ai partagé ces trois ans, à mes yeux on est un peu des « frères de thèse ». Merci de m'avoir toujours éclairé lorsque je venais vous poser des questions scientifiques. Mais surtout merci pour tous les moments sans rapport avec la science. Merci d'avoir supporté mes apparitions incessantes dans votre bureau pour vous demander tout et n'importe quoi.

Merci à Guillaume, l'un de mes collègues de bureau, avec qui j'ai partagé de nombreuses siestes après le repas de midi, on aura bien rigolé au bureau. J'espère pour toi que Daniele te ménagera un peu plus, mais à ta place je ne compterai pas là-dessus.

Barbara, merci à toi aussi pour les synthèses de nanoparticules, et la bonne humeur au labo. Fait gaffe, t'as un truc sur ta chaussure. Ah oui, au fait, est ce que tu as mes images TEM ? Ça fait un moment que je les attends.

Je tiens à remercier également Geoffrey, la liste est longue, je vais donc juste te dire merci pour les discussions et merci d'avoir motivé les troupes pour les sorties.

Merci à Fouzia pour m'avoir permis d'utiliser l'appareil SPR sans lequel je n'aurai pas pu conduire mes travaux. Appareil sur lequel je me suis arraché les cheveux plus d'une fois. Merci à Philippe et Anne pour m'avoir permis de travailler sur les iminosucres, malheureusement je n'ai pas pu faire tout ce que j'aurai voulu faire avec vos molécules.

En parlant de molécules, un grand merci aux deux Nicolas (du DMO et de SYBIO) pour m'avoir aidé avec les synthèses et la chimie. Grâce à vous deux j'ai pu faire mes synthèses, sans vous ça aurai été impossible.

Merci à tout les autres membres « permanents » du DCMI, Guillaume, François, Nathalie, Anne, Silviu, Christophe, Marc, Didier, Guido et Daniele. Et bien-sûr merci aux autres doctorants et post-doc, Lisa, Antonio, Laurianne, Steve, Irene, Théo, Joelle, Yihui, Juan, Angie, Varun et Joana

Pour conclure ces remerciements je remercie tous ceux qui m'ont apporté le soutien moral nécessaire en dehors du labo. Un énorme merci à Alexia, qui a corrigé aussi vite que possible les nombreuses, pour ne pas dire innombrables, fautes d'orthographe et de grammaire. Merci à mes parents et ma sœur. Merci à Thomas qui m'a soutenu sur la dernière ligne droite, et avec qui je partage de bons moments et de longues discussions depuis la licence, bonne chance pour ta thèse et n'oublie pas que « c'est pas sourcé ». Et évidemment merci à Michi, ma partenaire de vie depuis plus de deux ans, merci à toi qui a su me dire les choses honnêtement quand j'avais besoin de les entendre, merci de m'avoir soutenu au long de ces deux ans. Tu es passé par « la case » thèse un peu avant moi, j'ai vu ton soulagement lorsque c'était fini, c'est ça qui m'a permis de terminer.

..... 10
..... 12
1 L'or et ses propriétés 14
1.1 L'or sous forme massique 14
1.1.1 La structure cristallographique 14
1.1.2 Les propriétés conductrices et optiques 15
1.1.3 Les propriétés à l'échelle nanométrique 16
1.1.3.1 Propriétés conductrices 16
1.1.3.2 Propriétés optiques 17
2 Les Nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4) 18
2.1 Les propriétés de l'oxyde de fer 18
2.1.1 La structure cristalline 18
2.1.1.1 La structure à l'état de nanoparticule 18
2.1.2 Les propriétés magnétiques 19
2.1.2.1 Introduction aux propriétés magnétiques 19
2.1.2.2 Le magnétisme dans l'oxyde de fer 20
2.1.2.3 Le magnétisme dans les nanoparticules d'oxyde de fer 20
2.1.3 Les propriétés optiques 21
2.2 Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer 22
2.2.1 La synthèse par décomposition thermique 23
2.2.2 La stabilité colloïdale des nanoparticules en solution 24
3 L'assemblage de nanoparticules 26
3.1 Les différentes méthodes d'assemblages 26
3.1.1 Approche de la fonctionnalisation de surface, monocouches auto-assemblées de molécules (self assembled monolayers : SAMs) 27
3.1.1.1 Les différents types de substrats 27
3.1.1.2 Les groupements d'accroche 28
3.1.1.3 Les espaceurs 29
3.1.1.4 Les groupements fonctionnels 29
3.2 L'assemblage de nanoparticules par chimie click 30
3.2.1 La réaction de chimie click, principe et évolution 30
3.2.2 Les mécanismes réactionnels de la chimie click 31
3.2.3 L'utilisation de la réaction de CuAAC pour l'assemblage de nanoparticules 32
3.2.3.1 Généralités sur la CuAAC 32
3.2.3.2 La click CuAAC appliquée aux nanoparticules 33
4 Les biocapteurs 35

4.1 Histoire et généralités des biocapteurs 35
4.2 Définition et principe d'un biocapteur 36
4.2.1 Les bio-récepteurs 37
4.2.1.1 Bio-récepteurs d'affinité 37
4.2.1.2 Les bio-récepteurs catalytiques 39
4.2.2 Les transducteurs 40
4.2.2.1 Les transducteurs mécaniques 41
4.2.2.2 Les transducteurs électrochimiques 41
4.2.2.3 Les transducteurs thermiques 42
4.2.2.4 Les transducteurs optiques 42
4.3 Les biocapteurs basés sur l'effet de résonance plasmon de surface 43
4.3.1 Contexte historique 43
4.3.2 Principe et théorie 44
4.3.2.1 Les équations de Maxwell 44
4.3.2.2 Résolution des équations de Maxwell en milieu linéaire, homogène et isotrope 45
4.3.2.3 Plasmon de surface propagatif 47
4.3.2.4 Plasmon de surface localisé 48
4.3.3 La profondeur de pénétration du plasmon de surface (longueur de pénétration) 49
4.3.4 L'excitation du plasmon de surface propagatif 49
4.3.5 L'amélioré la réponse plasmonique 51
4.3.5.1 Les propriétés intrinsèques 51
4.3.5.2 Limite de détection 55
4.3.5.3 Les propriétés de surface 55
4.4 Biocapteurs SPR basés sur les nanoparticules d'oxyde de fer 56
5 Dénaturation des protéines, régénération des capteurs 58
5.1 Les protéines et leur structure 58
5.1.1 Généralités sur la structure des protéines 58
5.1.2 Les métalloprotéines 60
5.1.3 Les liaisons entre protéines et bio-récepteurs 61
5.1.4 La dénaturation des protéines 62
6 Conclusion 64
Chapitre 2 – Synthèse, fonctionnalisation et assemblage des nanoparticules d'oxyde de fer 66
1 Synthèse et caractérisation des nanoparticules 68
1.1 La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer 68
1.2 La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 10nm 68
1.2.1 Purification des nanoparticules 68

1.2.2 Les caractérisations structurales des nanoparticules 70
1.2.2.1 Taille et morphologie des nanoparticules 70
1.2.2.2 Stabilité colloïdale des nanoparticules par granulométrie 71
1.2.2.3 Caractérisation structurale des nanoparticules 72
2 La fonctionnalisation des nanoparticules et substrats 72
2.1 La fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm 73
2.1.1 Partie expérimentale 73
2.1.2 Caractérisations des nanoparticules fonctionnalisées 74
2.2 Fonctionnalisation du substrat 75
2.2.1 Fonctionnalisation des substrats et formation des SAMs 75
2.2.2 Caractérisation des SAMs 76
3 L'assemblage des nanoparticules par CuAAc 76
3.1 Partie expérimentale 77
3.2 Caractérisations par MEB des assemblages de nanoparticules 77
3.3 Cinétique d'assemblage 79
3.3.1 Variation des paramètres expérimentaux 81
3.3.1.1 Influence du catalyseur au cuivre [$CuBr(PPh_3)_3$] 81
3.3.1.2 Variation de la quantité de Et_3N 83
4 Conclusion 84
Chapitre 3 – Conception d'un biocapteur spécifique pour la détection de la streptavidine 86
1 Biotine/Streptavidine 88
1.1 Le design du biocapteur 88
2 Caractérisations des surfaces fonctionnalisées 89
2.1 Microscopie électronique à balayage 89
2.2 Spectroscopie infrarouge de réflexion-adsorption à modulation de phase 90
2.3 XPS 90
2.4 Résonance plasmon de surface (SPR) 92
3 L'influence des nanoparticules sur la détection 93
3.1 Facteur de sensibilité m 93
3.2 Longueur de décroissance ld 94
3.3 Surface spécifique 94
3.4 Distance inter particules 95
3.5 Nombre de streptavidine par nanoparticule 96
3.6 Détermination de la masse adsorbée en surface 97
4 La détection de la streptavidine 99
5 Insertion de molécules polyéthylènes glycols dans le système 100

5.1 Greffage des molécules OEG 101
5.1.1 Caractérisations 101
5.1.1.1 Spectroscopie infrarouge de réflexion-adsorption à modulation de phase 102
5.1.1.2 XPS 103
5.1.1.3 Résonance plasmon de surface (SPR) 104
5.2 Réduction de l'adsorption non spécifique 105
5.3 Détection par la technique SPR de la streptavidine 106
5.4 Mélange de protéines. 108
6 Etude cinétique du complexe biotine/streptavidine 109
6.1 Etude cinétique 110
6.1.1 Isotherme de Langmuir, constantes cinétiques à l'équilibre 110
6.1.2 Détermination des constantes cinétiques d'adsorption 112
6.1.3 Limite de détection du capteur 113
7 Dilution de la biotine en surface du capteur 113
7.1 Caractérisations 114
7.1.1 PM-IRRAS 114
7.1.2 XPS 115
7.1.3 Détection par SPR 117
8 Conclusion 119
Chapitre 4 – Conception d'un biocapteur spécifique pour la détection d'α-mannosidase 122
1 α-mannosidase/Iminosucres 124
1.1 Contexte de l'étude 124
1.2 Interaction entre le DNJ et l'α-mannosidase 127
1.3 Fonctionnalisation des surfaces avec les iminosucres 127
1.3.1 Partie Expérimentale 127
1.3.2 Caractérisations 129
1.3.2.1 XPS 129
1.3.2.2 SPR 130
2 Détection α-mannosidase par SPR 131
2.1 Extraction et préparation de l'α-mannosidase 131
2.2 Détection de l'α-mannosidase 132
2.2.1 Calcul de la longueur de décroissance ld et de la masse adsorbée en surface 133
2.2.1.1 Longueur de décroissance 133
2.2.1.2 Masse adsorbée en surface 133
2.2.2 Modèle de Langmuir, constantes cinétiques à l'équilibre 134
2.2.3 Détermination des constantes cinétiques par la méthode d'analyse des pentes 137

2.2.4 Limite de détection 138
2.3 Détection de l'enzyme dans le tampon HEPES 138
2.3.1 Masse adsorbée en surface. 139
2.3.2 Modèle de Langmuir, constantes cinétiques à l'équilibre. 140
2.3.3 Détermination des constantes cinétiques par la méthode d'analyse des pentes 141
3 Régénération du capteur par la dénaturation de l'α-mannosidase 142
3.1 Essais de dénaturation par le SDS 142
3.2 Essais de dénaturation par l'urée 146
4 Conclusion 148
Conclusion générale 150
Références 152
Annexes 164

Introduction

Les biocapteurs sont des appareils de détection d'éléments biologiques puissants. Leur domaine d'application sont très étendus, on retrouve des biocapteurs dans le domaine médical, agroalimentaire, dans l'industrie pharmaceutique mais aussi pour des usages militaires tels que la détection d'agents pathogènes. On retrouve différents types de biocapteurs utilisant des principes chimiques ou physiques. Une des techniques les plus utilisées est la résonance plasmon de surface. La résonance plasmon de surface offre une bonne sensibilité lors de faibles changements d'indices de réfraction des milieux analysés, ce qui est primordial lors de la (bio)-détection ainsi que la possibilité de travailler sans marqueurs (labels) mais surtout la possibilité d'effectuer de la détection rapide et en temps réel.

L'augmentation de la sensibilité des plateformes de bio-détection est importante pour augmenter la limite de détection des biocapteurs et ainsi détecter de très faibles concentrations d'analytes. Les analytes pouvant également être mélangés à d'autres espèces, il est également important de faire en sorte que le biocapteur soit spécifique à l'analyte choisi.

L'objectif de cette thèse est de développer une plateforme d'analyse basée sur l'effet plasmon de surface qui soit versatile, sensible et hautement spécifique. Des nanoparticules d'oxyde de fer assemblées sur une surface d'or par la réaction de CuAAc clic nous permettent d'augmenter la réponse SPR et donc la sensibilité du biocapteur. Cet assemblage nous permet d'avoir une base solide et versatile pour le greffage des récepteurs de notre choix. La spécificité de notre plateforme de bio-détection est augmentée à l'aide de molécules oligo éthylène glycol.

Le manuscrit est divisé en quatre chapitres :

- Le **chapitre 1** présente l'état de l'art sur l'assemblage de nanoparticules d'oxyde de fer mais surtout sur la bio-détection.

- Le **chapitre 2** présente la synthèse des nanoparticules de 10 nm, leur fonctionnalisation et leur assemblage sur des surfaces d'or. Nous étudierons la variation des paramètres expérimentaux lors de la réaction de CuAAc telle que les quantités de réactifs et le temps de réaction. Les conditions opératoires adaptées aux nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm seront identifiées.

- Le **chapitre 3** concerne la conception du biocapteur mis en place et démontre que les nanoparticules apportent un avantage au biocapteur. Il y est montré l'importance d'utiliser des molécules répulsives pour contrer l'adsorption non spécifique. Des mesures de détection et une étude cinétique du couple biotine/streptavidine est effectuée.

- Le **chapitre 4** montre que la plateforme conçue est versatile. La détection et la cinétique entre le DNJ (inhibiteur) et l'α-mannosidase (enzyme) a été effectuée en vue d'étudier plus en profondeur ce couple peu décrit dans la littérature. De plus, nous essayerons de régénérer le biocapteur en utilisant des surfactants connus pour avoir des effets dénaturants sur les protéines.

Chapitre 1 – Etat de l'art

1 L'or et ses propriétés

L'or est un métal noble connu et utilisé depuis des millénaires. Dans les mœurs depuis des milliers d'années, il attire le regard par sa couleur jaune caractéristique. Il est en effet le seul métal, excepté le cuivre, à ne pas être gris. On peut extraire l'or sous sa forme brute contrairement aux autres métaux qui sont extraits sous leur forme oxydée. L'or est un métal chimiquement stable, il garde donc ses propriétés au cours du temps. Initialement cette propriété a attiré les joailliers de tout temps qui ont su exploiter cette propriété. En 1990, 70% de l'or est utilisé pour la fabrication de bijoux. En moindre mesure, il est utilisé dans l'industrie électronique et dentaire. Ce n'est qu'aux alentours du XXI^{ème} que les scientifiques commencent réellement à s'intéresser à l'or. Initialement rejeté pour sa trop grande inertie, il s'avère que lorsqu'il est conditionné à l'échelle nanométrique, il présente des propriétés innovantes. Les phénomènes de surface sont en effet modifiés par la configuration de l'or. En temps normal, un atome d'or est entouré de 12 autres atomes dans un système cubique face centré (cfc). En surface un atome singulier est entouré de moins d'atomes, ce qui lui confère un nombre de voisins et donc des propriétés de surfaces différentes.

Il y a deux formes principales de l'or nanométrique, on retrouve les nanoparticules d'or et les couches minces. Les applications sont diverses, on retrouve des applications dans le domaine de la santé grâce à sa non-toxicité, il est dit biocompatible. L'or est notamment utilisé en catalyse[1] ou dans la micro-électronique ainsi que pour ses propriétés électromagnétiques et quantiques (résonance plasmon).

1.1 L'or sous forme massique

1.1.1 La structure cristallographique

L'or sous forme massique cristallise sous forme cubique face centrée (cfc) avec un paramètre de maille, noté a, de 4.08 Å. La cristallisation de l'or peut s'effectuer de trois manières différentes. On retrouve l'or sous forme (111), (100) ou (110) (Figure 1).

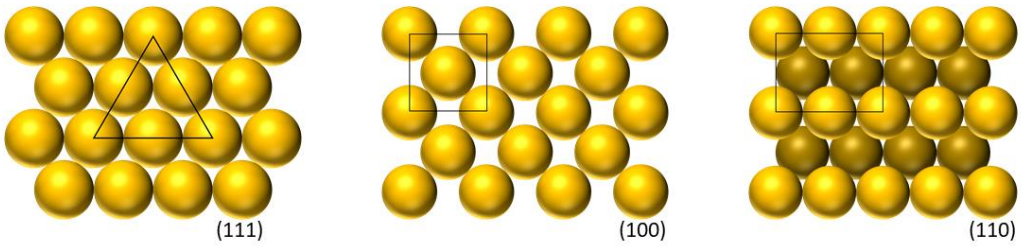

Figure 1. Représentation schématique des différentes formes possibles de cristallinité de l'or. De gauche à droite cfc (111), (100) et (110)

Bien qu'il soit possible pour l'or d'avoir ces trois configurations différentes, il reste assez rare pour un métal en configuration cfc de se construire selon l'orientation (111). Les orientations cristallines (110) et (100) sont les plus fréquentes et répandues. En fonction de la configuration, l'énergie de surface est modifiée, allant de 800 dyn/cm pour l'or (111) à 1600 dyn/cm pour l'or (100)[2]. Bien que l'or (111) soit celui avec l'énergie de surface la plus faible et donc la plus faible mouillabilité, c'est cette surface qui est la plus largement utilisée dans l'étude de monocouches auto-assemblées (« Self-assembled monolayer » : SAMs). En effet c'est la croissance selon le plan (111) que va préférer l'or sur des couches

de silicium (100). Ces couches minces sont généralement obtenues par évaporation thermique. La taille des grains pouvant varier de 200 à 10^6 nm. La taille et la morphologie des grains peuvent varier de petit et uniforme à grand avec beaucoup de terrasses[3].

1.1.2 Les propriétés conductrices et optiques

L'or possède des électrons libres du fait de sa configuration électronique ([Xe] $4f^{14}$ $5d^{10}$ $6s^1$). Ces électrons libres permettent une forte conductivité de l'électricité, il a une faible résistance ($22 \cdot 10^{-9}$ Ω·m). Il possède une énergie d'ionisation de 9,23 eV, ce qui lui confère une grande résistance à l'oxydation comparé à l'argent ou au cuivre (7,58 et 7,73 eV respectivement).

On décrit généralement les propriétés optiques d'un matériau à l'aide de son indice de réfraction. L'indice de réfraction complexe, ou indice optique, n^*, dépend directement de la permittivité ε par la relation suivante :

$$n^* = n + ik = \sqrt{\varepsilon} \quad (1)$$

Avec $\varepsilon = \varepsilon' + i\varepsilon''$ étant directement liée à l'absorbance du milieu, avec ε' la partie réelle et ε'' la partie imaginaire de la permittivité. Ces valeurs dépendent de la longueur d'onde appliquée (figure 2), et par conséquent l'indice de réfraction dépend de ce paramètre également.

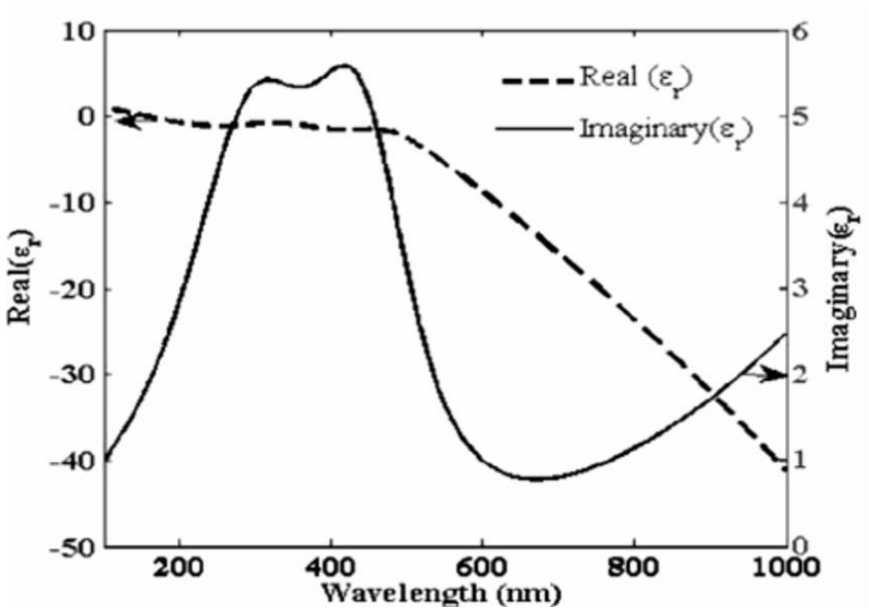

Figure 2. Partie réel et imaginaire de la permittivité de l'or en fonction de la longueur d'onde[4]

On observe une forte augmentation de la réflectivité de l'or à l'état massif à partir de 500 nm (figure 3) ce qui explique sa couleur jaune.

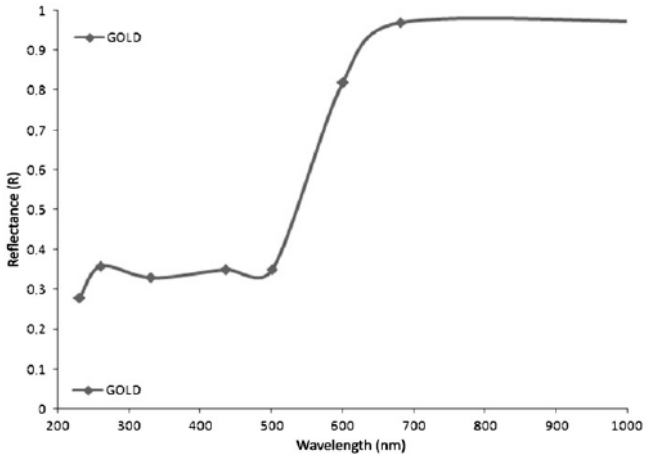

Figure 3.Réflectivité de l'or « massif » en fonction de la longueur d'onde[5].

Les propriétés de l'or à l'état massif sont bien connues depuis des années. En 1964 Payan et Rasigni avaient déjà remarqué et mesuré les changements entre l'or massif et l'or en couche mince[6].

1.1.3 Les propriétés à l'échelle nanométrique

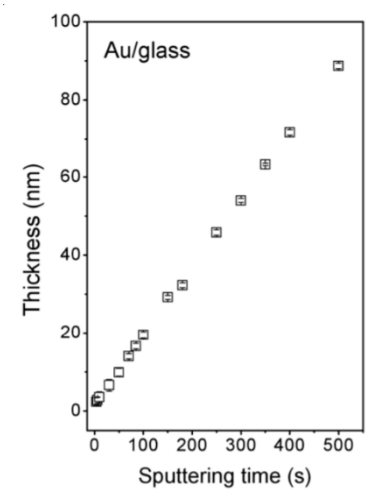

Figure 4. Epaisseur d'une couche mince d'or en fonction du temps de dépôt par pulvérisation cathodique sur du verre.

La méthode la plus utilisée pour la formation de couches d'or nanométriques est la pulvérisation cathodique. Cette technique permet un contrôle de manière linéaire en fonction du temps de l'épaisseur de la couche d'or (figure 4) pour des épaisseurs allant de quelques nanomètres à plusieurs dizaines de nanomètres[7,8]. Les substrats utilisés pour les dépôts sont généralement du silicium ou du verre.

1.1.3.1 Propriétés conductrices

Différentes couches minces d'or ont été étudiées avec des épaisseurs variant de quelques nanomètres à plus d'une centaine de nanomètres[9,10]. Il a été montré que les couches minces d'or (<6 nm) présentent des imperfections et sont donc moins conductrices. Pour une épaisseur supérieure à 6 nm

les films d'or commencent à être conducteurs. Il est suggéré par Alkhatib et al.[9] que la conductivité advient par effet tunnel entre 6 et 39 nm d'épaisseur du fait de la distance entre les joints de grain.

La résistance est également proportionnelle à l'épaisseur de la couche d'or étudiée. Siegel et al.[7] ont montré que pour des temps de pulvérisation compris entre 20 et 50 secondes, correspondants à une épaisseur de 5 à 10 nm (Figure 5), la résistance de la couche chute drastiquement. Ce qui corrobore la suggestion de Alkhatib et al.[9]que sous une certaine épaisseur les couches sont discontinues et donc peu conductrices (fortement résistantes).

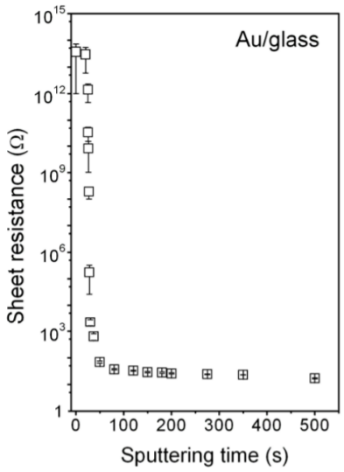

Figure 5. Résistance d'une couche mince d'or en fonction du temps de dépôt par pulvérisation cathodique[9].

1.1.3.2 Propriétés optiques

Les propriétés optiques des couches minces métalliques varient également avec l'épaisseur des films et avec leur morphologie. Doron-Mor et al.[11] ont étudié les propriétés optiques de couches minces allant jusqu'à 15 nm d'épaisseur. Ils ont observé un décalage du spectre optique vers le rouge et une augmentation de la densité optique proportionnelle à l'épaisseur. Yakubovsky et al.[12] ont étudié les propriétés optiques de couches minces d'or allant de 20 à 200 nm. Ils ont montré qu'indépendamment de la manière dont ont été produites les couches minces, les propriétés résultantes sont identiques et ne dépendent que de l'épaisseur. Leur étude montre que la partie imaginaire de la permittivité, responsable des pertes optiques, augmente rapidement pour des couches minces d'épaisseur inférieure à 80 nm. Cette observation permet donc une meilleure compréhension des propriétés des films minces d'or et leur utilisation pour des objets à visée applicative en nanophotonique et résonance plasmon de surface.

2 Les Nanoparticules d'oxyde de fer (Fe_3O_4)

2.1 Les propriétés de l'oxyde de fer

2.1.1 La structure cristalline

La magnétite (Fe_3O_4) a une structure de type spinelle. La formule générale pour un spinelle est AB_2X_4 avec A et B représentant respectivement les cations et X les anions. Les atomes associés à A occupent les sites tétraédriques (Td) de la structure, et les atomes B les sites octaédriques (Oh). La même structure cristalline est observée pour la forme oxydée de la magnétite : la maghémite (γ-Fe_2O_3) (figure 6).

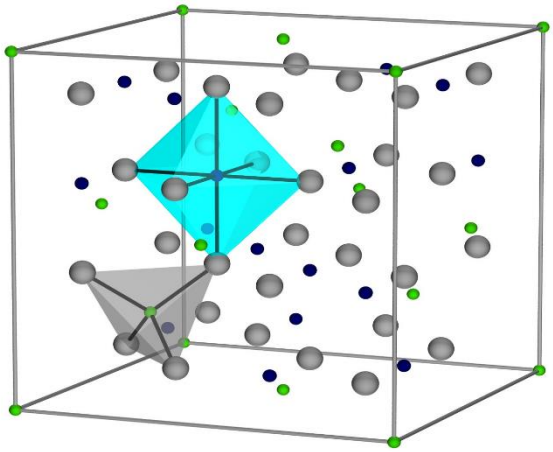

Figure 6. Représentation schématique de la structure spinelle de la magnétite.

La magnétite forme un réseau cubique face centrée formé par les ions O^{2-}. Les sites A sont occupés par les ions Fe^{3+} tandis que les sites B sont occupés par un mélange d'ions trivalents et divalents Fe^{3+} et Fe^{2+}. On note la structure spinelle de la magnétite avec la formule $[(Fe^{3+})^{Td}(Fe^{2+}Fe^{3+})^{Oh}]O_4$.

Dans le cas de la maghémite les cations bivalents sont oxydés et forment des cations trivalents Fe^{3+}, en conséquence on observe des lacunes cationiques dans les sites octaédriques que l'on note ☒. La maghémite a donc pour formule $(Fe^{3+})^{Td}[(Fe^{3+})_{5/3\boxtimes 1/3}]^{Oh}O_4$.

2.1.1.1 La structure à l'état de nanoparticule

La répartition des atomes entre le volume et la surface varie en fonction de la taille des objets. Pour de petits objets, la surface jouera un rôle plus impactant que pour un matériau massique. C'est également le cas pour l'oxyde de fer. Les ions bivalents Fe^{2+} sont sensibles à l'oxydation, cette oxydation est d'autant plus accentuée que les nanoparticules sont de petite taille[13]. Les nanoparticules de magnétite sont donc en partie oxydées en surface. Cette variation de structure surfacique a été montrée pour des nanoparticules ayant une taille aux alentours de 10nm[13]. Plus la particule est petite, plus son degré d'oxydation sera élevé (Figure 7), les particules de moins de 8 nm vont essentiellement être composées de maghémite, tandis que les nanoparticules de plus de 12 nm sont composées d'un cœur de magnétite et d'une surface oxydée.[13,14]

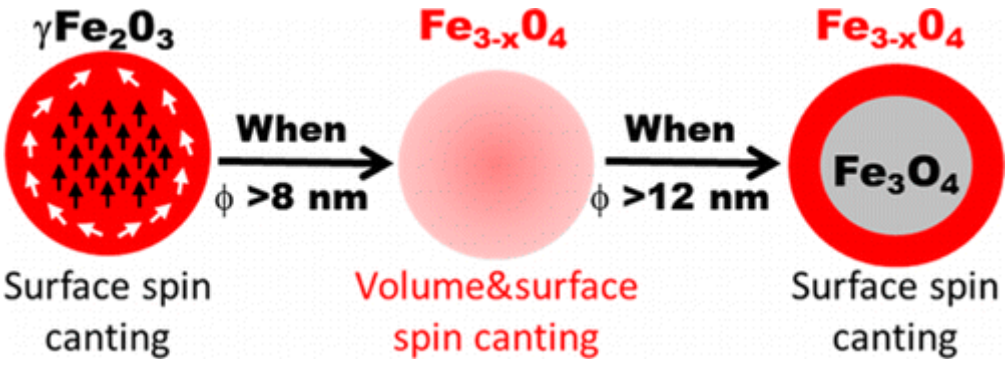

Figure 7. Représentation schématique du changement de composition de nanoparticules de magnétite en fonction de la taille.

Ces propriétés de surface sont expliquées par une couche désordonnée à la surface des nanoparticules appelée couche cantée. Ce phénomène (en anglais : spin canting) induit un désordre des spins en surface et réduit l'aimantation pour de petites nanoparticules.

2.1.2 Les propriétés magnétiques

2.1.2.1 Introduction aux propriétés magnétiques

Trois paramètres fondamentaux régissent les lois du magnétisme des matériaux : le moment magnétique, l'aimantation à saturation et la susceptibilité magnétique. On note respectivement ces trois paramètres$\vec{\mu}$, $\overrightarrow{Ms}$ et χ. Le moment magnétique et l'aimantation sont définis comme des vecteurs, la susceptibilité est une grandeur sans dimension.

Le moment magnétique est la capacité d'un corps à s'aligner avec un champ magnétique et décrit l'intensité d'un champ. Les moments magnétiques d'un corps s'alignent sous l'effet d'un champ magnétique, que l'on note généralement $\vec{H}$. Ce moment magnétique engendre l'aimantation notée M, on peut traduire l'aimantation par le moment magnétique par unité de volume. La grandeur χ est la capacité d'un corps à s'aimanter en présence d'un champ H. Cette grandeur correspond au ratio entre son aimantation M et le champ magnétique que l'on applique H :

$$\chi = \frac{M}{H} \tag{2}$$

On dénombre au total 5 comportements magnétiques différents sécables en 2 classes distinctes : les matériaux avec et sans aimantation spontanée.

La première classe de comportements magnétiques n'ayant pas d'aimantation spontanée est composée de 2 types de magnétisme :

- Le diamagnétisme : l'aimantation globale est nulle du fait que les moments magnétiques sont en opposition. La susceptibilité magnétique est faible et négative.
- Le paramagnétisme : les moments magnétiques sont aléatoirement orientés ce qui globalement engendre une aimantation nulle. Lorsqu'un matériau paramagnétique est plongé dans un champ il acquière une aimantation faible du fait que les moments magnétiques tendent à s'aligner avec le champ. La susceptibilité est faible et positive.

La seconde classe de matériaux magnétique présente quant à elle une aimantation spontanée sans application de champ magnétique externe :

- Le ferromagnétisme : apparait au-dessous d'une température critique, appelée température de Curie (T_C) propre aux matériaux, les moments magnétiques sont alors orientés de la même manière.
- L'antiferromagnétisme : les moments magnétiques sont en opposition et se compensent. Contrairement au ferromagnétisme les moments sont organisés de manière antiparallèle. Il n'y a donc pas de champ magnétique macroscopique. On observe l'antiferromagnétisme pour une température inférieure à la température de Néel (T_N). Lorsque l'on passe au-dessus de la T_N, le matériau devient paramagnétique.
- Le Ferrimagnétisme : comme pour l'antiferromagnétisme les moments magnétiques sont opposés, mais dans ce cas de figure ils ne se compensent pas, ce qui engendre une faible aimantation. Ce phénomène se manifeste au-dessous de la T_C.

2.1.2.2 Le magnétisme dans l'oxyde de fer

La magnétite, composant principal des nanoparticules d'oxyde de fer, est ferrimagnétique en dessous de la T_C assimilée à la température de Néel dans ce cas. En effet les cations Fe^{3+} et Fe^{2+} en site octaédriques dans le spinelle ont respectivement un moment magnétique équivalent à 5 μ_b et 4 μ_b. Les cations en site tétraédrique ont un moment dipolaire de -5 μ_b. Les moments magnétiques des cations Fe^{3+} s'annulent pour ne laisser place qu'à l'influence des cations Fe^{2+}. Ce phénomène engendre donc une aimantation constante liée aux cation Fe^{2+}. L'aimantation à saturation de la maghémite en tant que matériau massif est de 92 emu/g[15]. Pour la maghémite une aimantation à saturation inférieure de 74 emu/g a été observée[15], en effet les ions Fe^{3+} se trouvent partagés entre les sites octaédriques (5/3) et tétraédriques. Ce qui implique une aimantation théorique de 10/3 μ_b.

2.1.2.3 Le magnétisme dans les nanoparticules d'oxyde de fer

Un matériau massique n'a pas les mêmes propriétés qu'un matériau nanométrique. Les propriétés magnétiques peuvent donc varier avec les échelles de taille. Ce qui nous amène à nous intéresser aux propriétés magnétiques de l'oxyde de fer nanométrique.

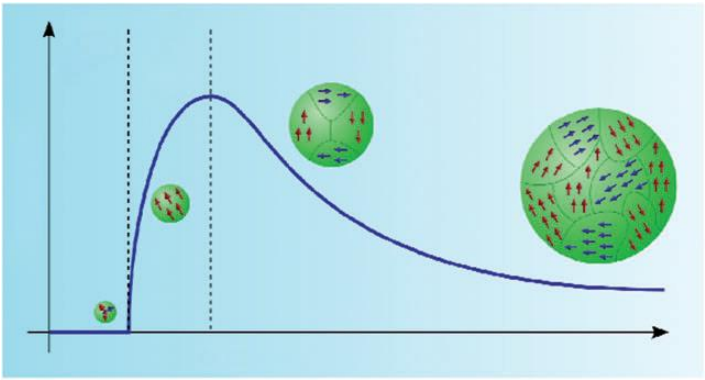

Figure 8. Représentation schématique de l'influence de la taille sur le nombre de domaine de Weiss d'une nanoparticule[16].

Un matériau magnétique massif peut être subdivisé en plusieurs domaines appelés domaines de Weiss. Un domaine de Weiss est une région d'un matériau où l'on retrouve des moments magnétiques orientés de la même manière pour minimiser l'énergie totale du matériau. Plus la taille du matériau va se réduire plus le nombre de domaines de Weiss sera également réduit (figure 8). Ce qui implique que pour des matériaux très petits nous pouvons observer des matériaux mono-domaines. Dans le cas de l'oxyde fer, lorsque la taille de la nanoparticule est inférieure à la taille d'un domaine de Weiss, la nanoparticule ne possède plus d'aimantation rémanente à température ambiante. Dans le cas d'un matériau massif de magnétite on observe une hystérésis ouverte, tandis que pour le même matériau de taille inférieure au domaine de Weiss, le cycle est fermé. Il ne présente pas d'aimantation rémanente à champ nul. On parle de superparamagnétisme (Figure 9).

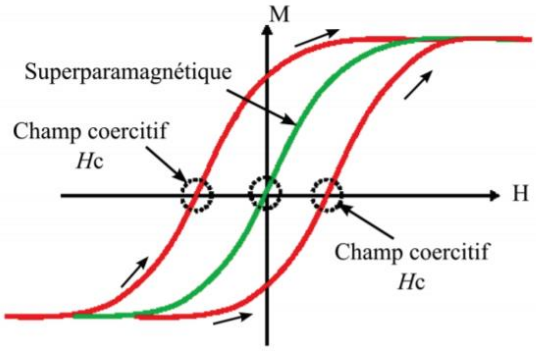

Figure 9. Représentation de la courbe d'aimantation d'un matériau ferrimagnétique (en rouge) et d'une nanoparticule superparamagnétique (en vert) [17].

Pour une nanoparticule de magnétite oxydée, l'aimantation à saturation est comprise entre 30 et 68 emu/g, soit parfois moins de 50% comparé aux matériaux sous forme massive. Ces différences notables sont liées au canting et à l'oxydation de surface ainsi qu'aux possibles défauts sur les nanoparticules liés aux synthèses[18].

2.1.3 Les propriétés optiques

Les propriétés optiques d'un matériau sont généralement associées à l'indice de réfraction de ce dernier. C'est donc aussi le cas pour l'oxyde de fer. L'indice de réfraction, noté n, d'un milieu est défini comme étant la vitesse de la lumière dans le vide sur la vitesse de la lumière dans le matériau étudié :

$$n = cv \tag{3}$$

D'après les équations de Maxwell on peut en déduire que la vitesse de la lumière dans le vide *c* est directement liée à la permittivité ε_0 et à la perméabilité magnétique μ_0 de la manière suivante :

$$c = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0}} \tag{4}$$

De manière analogue, la vitesse v dans un matériau diélectrique est donnée par sa permittivité et sa perméabilité :

$$v = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon \mu}} \tag{5}$$

En incorporant les équations 4 et 5 dans l'équation 3 on obtient

$$n = \sqrt{\varepsilon_r \mu_r} \quad (6)$$

Avec $\varepsilon_r = \frac{\varepsilon}{\varepsilon_0}$ et $\mu_r = \frac{\mu}{\mu_0}$ respectivement la permittivité et la perméabilité du matériau étudié.

La perméabilité est liée à la susceptibilité magnétique χ du matériau étudié par l'équation suivante :

$$\mu_r = 1 + \chi \quad (7)$$

Dans le cas de matériaux diamagnétiques ou paramagnétiques la susceptibilité est très faible, inférieure à 10^{-5}. Dans le cas de l'oxyde de fer, on a une susceptibilité magnétique faible ($\chi \simeq 10^{-3}$). En supposant que la susceptibilité soit négligeable, nous avons $\mu_r = 1$ d'après l'équation 6. Ce qui nous ramène à l'indice de réfraction n :

$$n = \sqrt{\varepsilon_r} \quad (8)$$

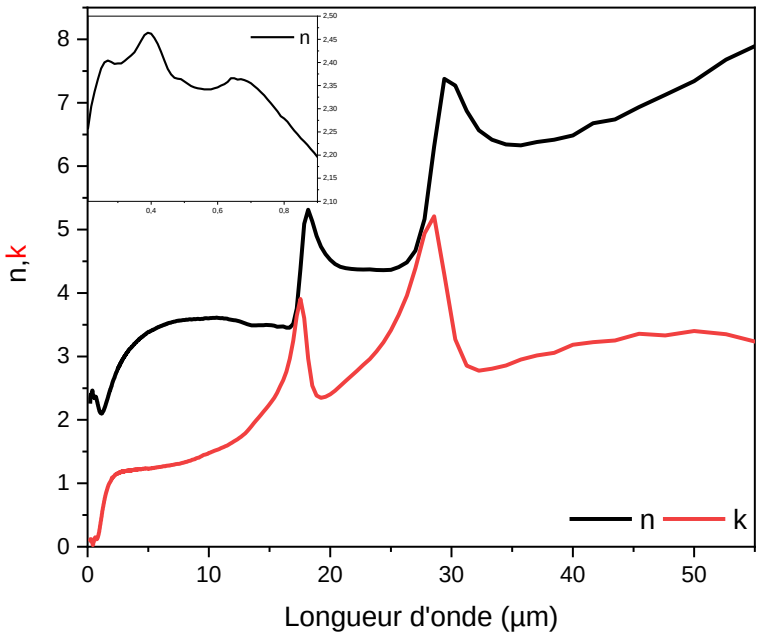

Figure 10. Indice de réfraction n (noir) et coefficient d'extinction k (rouge) pour l'oxyde de fer magnétite.

L'indice de réfraction de la magnétite dépend de la longueur d'onde à laquelle est étudié le matériau. Dans le spectre visible (400-800 nm) il a été montré que la partie réelle de l'indice de réfraction de la magnétite est $n \simeq 2{,}4$[19,20] (figure 10).

Le coefficient d'extinction k représente l'atténuation de l'énergie du rayonnement à travers le milieu parcourus.

2.2 Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

Les voies de synthèses des nanoparticules d'oxyde de fer sont multiples. Chaque technique de synthèse présente ses avantages et ses inconvénients. Le but de chaque méthode est de pouvoir contrôler la taille et la forme des nanoparticules. Colombo et al[21] ont recensé et comparé plusieurs

méthodes de synthèse. Il en résulte que la méthode la plus simple à mettre en œuvre et la plus répandue est la coprécipitation. Son principal avantage est le rendement important qu'engendre ce type de synthèse. Mais en parallèle l'homogénéité des nanoparticules issues de cette synthèse est discutable. D'autres méthodes ont été décrites, mais celle qui semble s'imposer comme étant la plus complète est la décomposition thermique. Cette voie de synthèse permet d'avoir un contrôle de la taille et de la morphologie des nanoparticules. De plus, la stabilité colloïdale en suspension est également un point positif. C'est cette méthode qui sera décrite et utilisée par la suite.

2.2.1 La synthèse par décomposition thermique

La synthèse par décomposition thermique a initialement été développée pour la synthèse de quantum dot[22] et de nanocristaux semi-conducteurs[23]. Par la suite, cette méthode a été appliquée à des complexes métalliques. La voie de synthèse par décomposition thermique consiste en la décomposition d'un complexe métallique dans un solvant à haute température d'ébullition en présence d'un tensioactif ayant pour rôle de stabiliser les particules en solution. Cette méthode nous permet donc d'obtenir des nanoparticules de taille et de formes contrôlée avec une bonne cristallinité et une bonne stabilité colloïdale dans des solvants organiques.

La théorie de LaMer énoncée en 1950[24] nous dit que la décomposition thermique s'effectue en trois étapes bien distinctes :

1. La phase de pré-nucléation : le précurseur organométallique se décompose en monomères. Ces monomères forment la base de la structure cristalline des nanoparticules.
2. La phase de germination a lieu dans un second temps. Cette seconde étape a lieu lorsque la concentration en monomère atteint et dépasse un seuil de saturation (C_{min}). S'ensuit une rapide augmentation de cette concentration à saturation qui atteint une valeur maximale (C_{max}), la germination commence.
3. La dernière étape advient lorsque la concentration en monomère diminue pour chuter en dessous de C_{min}. À partir de ce moment la germination prend fin et laisse place à la croissance des germes.

Les trois étapes expliquées plus haut sont schématisées sur la figure 11.

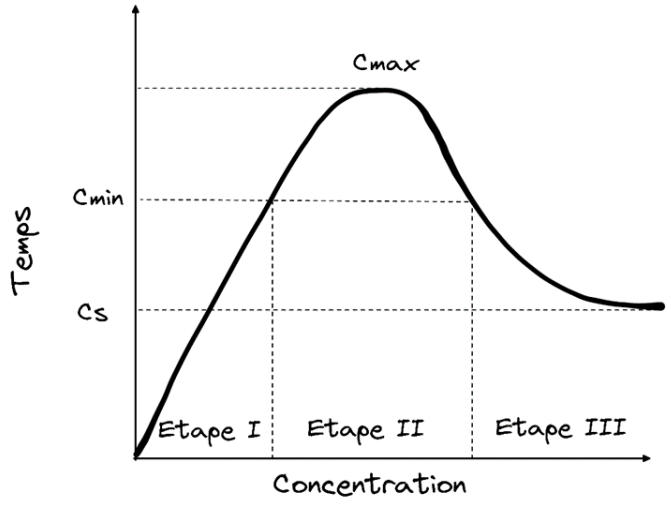

Figure 11. Représentation schématique de la synthèse par décomposition thermique d'un précurseur organométallique[24].

L'avantage de cette méthode est la séparation de la synthèse en plusieurs étapes distinctes. En effet, la séparation entre l'étape de nucléation et de germination est cruciale. La formation de ces deux espèces de manières distinctes permet d'avoir accès à une phase de croissance qui s'effectue sans éventuelle gêne causée par l'apparition d'autres germes. La croissance simultanée de ces germes de manière homogène conduit à la formation de nanoparticules de tailles très homogènes et contrôlées.

Au cours de la synthèse, des paramètres tels que la température, la nature du solvant et la quantité des précurseurs peuvent être modifiés pour jouer sur la taille et la morphologie des nanoparticules[13,25,26].

Les nanoparticules sont recouvertes post-synthèse d'un surfactant comme l'acide oléique. Ce surfactant permet une bonne stabilité colloïdale des nanoparticules et permet d'exécuter facilement des échanges de ligands sur les nanoparticules ainsi synthétisées.

Il a été constaté au cours du temps que les précurseurs organométalliques commerciaux pour la synthèse des nanoparticules posaient parfois des problèmes de reproductibilité et de contrôle de taille et de morphologie. Une étude sur ces précurseurs a été menée[27,28], ce qui a conduit à la synthèse des précurseurs au laboratoire.

2.2.2 La stabilité colloïdale des nanoparticules en solution

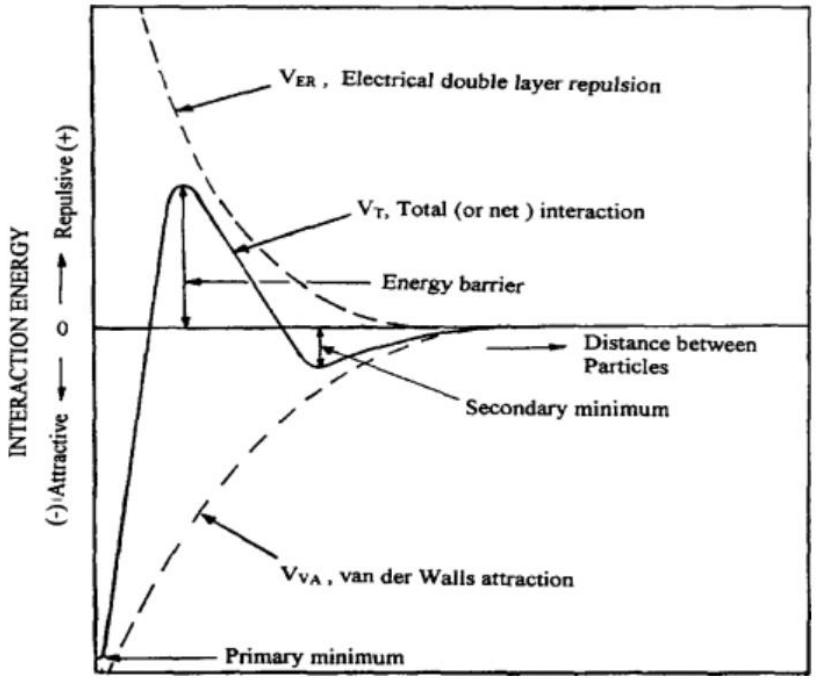

Figure 12. Schéma des forces d'attraction/répulsion en fonction de la distance séparant les objets nanoparticules[29].

La fonctionnalisation des nanoparticules est essentielle à leur stabilité colloïdale en solution. Cette stabilité provient d'un équilibre entre les forces attractives et répulsives des nanoparticules étudiées. Les forces attractives sont pour la plupart la conséquence des interactions faibles de Van der Waals et des interactions des dipôles magnétiques associés aux nanoparticules d'oxyde de fer. Les interactions entre deux dipôles magnétiques varient en suivant une loi en $1/r^3$ tandis que les forces de Van der

Waals varient en $1/r^6$, avec r la distance entre les objets étudiés. Quant aux forces répulsives entre nanoparticules, elles sont dues aux forces électrostatiques.

La figure 12 nous montre que pour garantir la stabilité colloïdale des nanoparticules et ainsi éviter leur agrégation, il faut maintenir une distance minimale entre les nanoparticules. Le premier minimum correspond à l'agrégation irréversible de nanoparticules. La barrière de potentiel est importante et la franchir demande une énergie très conséquente. Le second minimum (figure 12) permet aux nanoparticules éventuellement agrégées de se désagréger. L'énergie à apporter pour franchir la barrière de potentiel est bien plus faible que la première. Pour obtenir une suspension stable il faut donc franchir cette deuxième barrière de potentiel. Les interactions attractives sont d'autant plus importantes que la taille des nanoparticules augmente. Plus les particules sont de taille importante, plus il est important de garder une distance inter-particules élevée.

3 L'assemblage de nanoparticules

Les interactions entre nanoparticules dépendent entièrement de leur environnement proche comme énoncé dans le paragraphe précédent. Il est donc naturel de s'intéresser à l'arrangement spatial des nanoparticules. L'assemblage des nanoparticules est donc une manière d'étudier l'influence des nanoparticules sur les propriétés des surfaces sur lesquelles elles sont assemblées.

3.1 Les différentes méthodes d'assemblages

Les nanoparticules sont fonctionnalisées avec de l'acide oléique après la synthèse par décomposition thermique. Les ligands entourant les nanoparticules leur confèrent une stabilité colloïdale. En fonction du ligand qui entoure les particules ont une stabilité plus ou moins grande dans certains solvants. Il est possible de modifier le ligand des nanoparticules et donc les interactions qu'il aura avec les différentes surfaces. Il existe trois méthodes possibles d'assemblage résumées sur la figure 14.

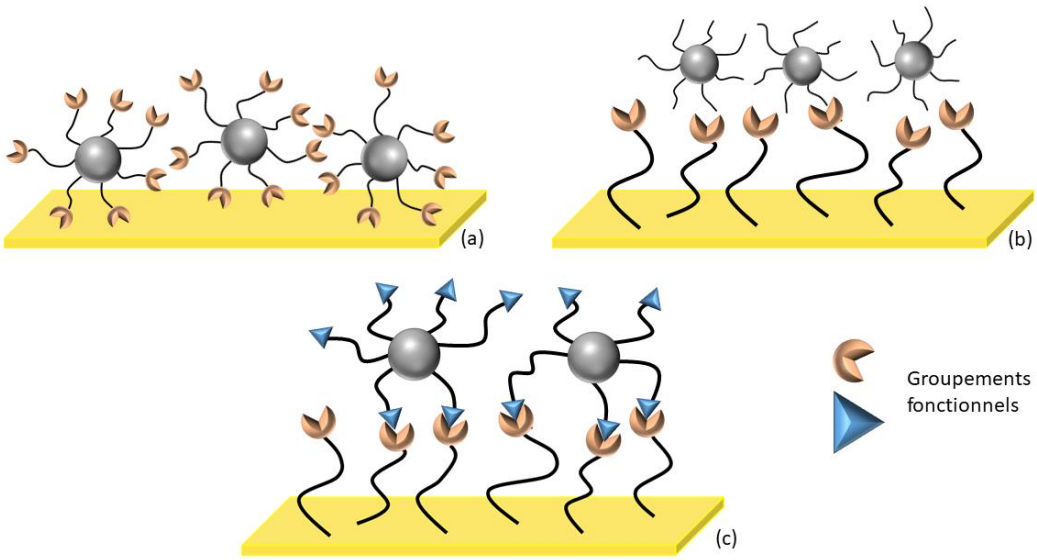

Figure 13. Représentation schématique des trois différentes stratégies d'assemblage. (a) fonctionnalisation des nanoparticules, (b) fonctionnalisation du substrat et (c) fonctionnalisation des nanoparticules et du substrat.

Dans la première méthode (figure 13 (a)) les nanoparticules ont des groupements fonctionnels pouvant directement interagir avec le substrat. Les deux techniques connues mêlant facilité et efficacité sont le drop casting (dépôt d'une goutte) et l'immersion du substrat dans une solution de nanoparticules (dipping)[30]. Le dip coating permet également ce genre d'assemblage. Il faut néanmoins veiller à ce que le substrat soit lentement retiré de la solution colloïdale. Il est également possible d'effectuer ce type de dépôt en utilisant des techniques telles que le dépôt en couche par couche (« layer by layer »)[31] ou encore la technique de Langmuir-Blodgett[32].

La seconde méthode (figure 13 (b)) consiste en l'assemblage de nanoparticules sur un substrat fonctionnalisé. Le substrat est préalablement fonctionnalisé avec des molécules pouvant interagir avec les nanoparticules de manière spécifique.

La troisième et dernière approche d'assemblage (figure 13 (c)) est un mélange des deux techniques précédentes. Dans ce troisième cas, c'est à la fois le substrat et la nanoparticule qui sont fonctionnalisés pour que les deux entités puissent interagir spécifiquement.

Cette troisième et dernière technique sera étudiée plus en détails car la spécificité des interactions entre nanoparticule et substrat fonctionnalisés peut apporter un meilleur contrôle de l'assemblage des nanoparticules en surface.

Pour pouvoir appliquer la technique énoncée il faut dans un premier temps fonctionnaliser les surfaces et les nanoparticules.

3.1.1 Approche de la fonctionnalisation de surface, monocouches auto-assemblées de molécules (self assembled monolayers : SAMs)

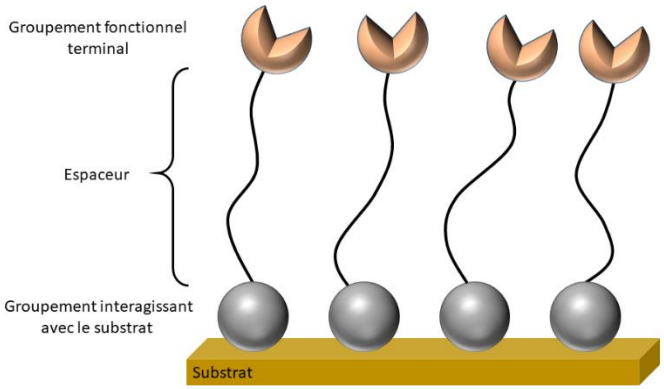

Figure 14. Représentation schématique d'une monocouche auto-assemblée.

La méthode des monocouches auto-assemblées est l'une des plus répandues du fait de la facilité de sa mise en œuvre, de sa versatilité et de sa simplicité[33–36]. Les SAMs sont des assemblages de molécules organiques sur une surface. Par la suite, la surface sur laquelle les molécules organiques s'auto-assemblent pour former une SAMs sera appelée substrat. De manière générale les molécules sont en solution, et du fait de leur affinité avec la surface, elles vont avoir tendance à s'assembler dans le plan de manière organisée (figure 14). Cette organisation est due aux interactions entre les molécules qui s'assemblent à la surface[37,38]. Certains types de molécules ont des affinités avec des substrats bien spécifique. Les substrats ont aussi des propriétés qui diffèrent entre eux, les propriétés optiques ou bien électroniques varient d'un type de matériaux à un autre. Le choix du matériau utilisé pour le substrat influe donc significativement sur la méthode de préparation des SAMs et des molécules utilisées.

3.1.1.1 Les différents types de substrats

Généralement les substrats utilisés sont des substrats métalliques tels que l'or, l'argent ou le cuivre. Les substrats semi-conducteurs tels que le silicium sont également très répandus. Certains oxydes métalliques tels que l'oxyde d'indium et d'étain ou l'oxyde de silicium sont couramment utilisés du fait de leurs propriétés physiques spécifiques.

Les substrats peuvent beaucoup varier entre eux, par leur composition ou bien par leur forme. Ils peuvent aussi bien être plats (verre, silicium, dépôt de film métalliques, monocristaux) qu'avoir été structurés avec des techniques plus poussées telles que la lithographie (nanocristaux, nanoparticules par exemple). La préparation de SAMs sur des substrats plans est privilégiée du fait de leur facilité de préparation et parce que les techniques de caractérisation de surface (spectroscopie Raman, XPS, diffraction des rayons X, résonance plasmon de surface ou l'ellipsométrie) s'effectuent plus facilement sur des surfaces planes. L'application pour laquelle la SAM doit être utilisée est donc dépendante de la sélection du type de substrat et de la méthode de préparation.

Les surfaces d'or ont fini par être les substrats les plus utilisés pour deux raisons, la première étant que les SAMs formées sur l'or sont de bonne qualité. La seconde étant que l'or est un matériau étudié depuis des décennies et connu pour sa résistance à des conditions extrêmes telles que l'oxydation ou un environnement acide.

D'après Love et al[3] voici cinq caractéristiques de l'or qui font de celui-ci un matériau de prédilection pour être utilisé comme substrat :

- Il est facile d'obtenir des couches minces d'or (pulvérisation cathodique, évaporation, ou électrodéposition).
- Il est facile de graver des motifs sur les surfaces d'or à l'aide de techniques de lithographie.
- L'or est un métal inerte, l'oxygène de l'air ambiant ne l'affectera pas. Contrairement à d'autres métaux, l'air ambiant ne pourra pas oxyder l'or avant son point d'ébullition. De plus, il est inerte à certains agents chimiques.
- L'or est utilisé pour de nombreuses techniques analytiques telles que la spectroscopie SPR, microbalance à cristal de quartz (QCM) ou encore l'ellipsométrie.
- Enfin, il ne présente aucune toxicité pour les cellules.

Il est également possible d'assembler des molécules sous forme de SAMs sur des oxydes tels que l'oxyde de silicium. En effet, c'est un matériau très peu couteux et qui présente une rugosité très faible. Les possibilités de fonctionnalisation sont diverses[39]. Les substrats de silicium sont adaptés pour des analyses d'ellipsométrie. Le désavantage par rapport aux métaux, et particulièrement à l'or, est que certaines techniques analytiques telles que le SPR ou la QCM ne sont pas adaptées à de tels matériaux.

3.1.1.2 Les groupements d'accroche

Les SAMs sont obtenues par un procédé d'adsorption en phase liquide ou gazeuse. Les groupements d'accroche des molécules sont spécifiques aux substrats utilisés. Pour l'or, ce sont les groupements thiols qui sont les plus répandus. En moindre mesure, on retrouve des molécules avec un groupement disulfure, ou encore des thioacetates. L'argent non-oxydé peut également être fonctionnalisé avec des thiols, qui sont également un moyen de protection contre l'oxydation[40]. Pour les surfaces d'oxydes tels que le dioxyde de silicium les molécules communément utilisées sont des silanes avec une chaine alkyle[39,41].

Les SAMs dérivées de composés organosulfurés (thiols, disulfites, sulfites) sont simples à mettre en œuvre. L'adsorption de la molécule se fait spontanément sur le substrat aussi bien en solution qu'en phase gazeuse. De plus, la liaison S-Au formée entre l'or et le soufre est relativement forte : une valeur exacte ne fait pas l'unanimité de la communauté scientifique mais il semblerait qu'elle soit de l'ordre de 40 à 50 kcal/mol[42–45]. La facilité de mise en œuvre est également un atout en faveur de l'utilisation

de l'or et des thiols. En effet, le solvant de prédilection pour la solubilisation des thiols est l'éthanol, très faiblement toxique. La réaction de fonctionnalisation s'effectue à température ambiante pour un temps d'immersion inférieur à 24h pour obtenir une SAMs dense.

Le problème majeur que l'on peut rencontrer avec des solutions de thiols est lié à leur stabilité en milieu oxydant. En effet, l'atome d'hydrogène lié au soufre est normalement libéré pour permettre la formation de la liaison S-Au entre l'or et le soufre. Mais si le milieu est trop oxydant le thiol peut se transformer en sulfonate ou en autre élément oxydé[46]. L'oxydation va donc venir perturber le greffage de la molécule sur l'or, voir l'empêcher complètement.

3.1.1.3 Les espaceurs

Les espaceurs (figure 15) jouent un rôle essentiel dans les SAMs. Les espaceurs moléculaires sont des bras flexibles faisant la jonction entres les groupements fonctionnels des molécules. De manière générale, cet espacement entre les deux groupements fonctionnels est effectué à l'aide de chaines alkyles ou d'autres groupements tels que les chaines polyéthylènes glycols ou des phénylènes. La nature des chaines alkyles est responsable de l'arrangement et de l'organisation des chaines et donc des molécules entre elles. Porter et al.[47] ont étudié les arrangements de molécules sur de l'or de n-alkyle thiol $CH_3(CH_2)_nSH$ avec n allant de 1 à 24. Il en résulte que plus la chaine est longue plus l'arrangement spatial entre les chaines est ordonné et la densité de la SAM augmente. Les chaines carbonées des thiols forment en effet des liaisons de Van der Waals entre elles ce qui leur confère une certaine stabilité. Ratner et al.[42] ont reporté que pour des thiols comportant entre 9 et 24 groupements méthylènes les assemblages sont stables et compacts. Si ces groupements sont trop rapprochés les uns des autres, ils peuvent interagir entre eux par des liaisons plus ou moins faibles ou encore provoquer des encombrements stériques.

Les espaceurs sont donc des objets puissants sélectionnés en fonction des applications des SAMs.

3.1.1.4 Les groupements fonctionnels

Les groupements fonctionnels choisis dépendent de l'application souhaitée pour la SAMs. On dénombre une grande quantité de groupements fonctionnels que l'on peut disposer de part et d'autre des espaceurs. Le tableau 1 donne une liste non-exhaustive de matériaux que l'on pourrait greffer sur une SAM avec le groupement fonctionnel correspondant.

Tableau 1. Récapitulatif de nanoparticules et groupements fonctionnels portés par les monocouches auto-assemblées pour différents types d'assemblages entre nanoparticules et monocouches.

Groupement fonctionnel de la SAMs	Matériaux sur la SAMs	Référence
-COOH	FePt	[48]
$-NH_2$	FePt	[48]
-SH	Au	[49–51]
-S-S-	Au	[52,53]
$-NH_2$	Au	[54]
-SH	Co	[55]
-COOH	Fe_3O_4	[56]
-OH	Fe_3O_4	[56]

On remarque que les fonction S-H sont propices à l'adsorption de matériaux métalliques, tandis que les groupements acides carboxyliques ont plus d'affinité avec les oxydes métalliques ou les alliages.

3.2 L'assemblage de nanoparticules par chimie click

3.2.1 La réaction de chimie click, principe et évolution

La chimie click (ou chimie clic) est un concept introduit en 2001 par Sharpless[57]. C'est un ensemble de réactions entre les groupements fonctionnels pouvant réagir entre eux et qui remplissent certains critères dont :

- La reproductibilité
- De hauts rendements
- La purification simple
- La création de liaisons fortes
- La reproductibilité
- La facilité de mise en œuvre

Ce type de réaction a été développé pour un usage dans les domaines pharmaceutiques ou médicales dans le but de développer une large gamme de composés.

L'une des réactions de chimie click la plus étudiée est la cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen[58,59] aussi appelée « Copper Catalyzed Azide-Alkyne cycloaddition » (CuAAC). C'est la réaction entre un dipolarophile comme les alcynes (C≡C) et un composé 1,3 dipolaire tel que les azoture (N_3).

Cette réaction est initialement découverte par Michael[60] à la fin du XIX^{ème} siècle et est ensuite reprise et développée par Huisgen en 1963[58]. Elle s'effectue à de hautes températures et n'est généralement pas stéréospécifique. La réaction de cycloaddition (2 + 3) en particulier entre un azoture et un alcyne conduit à des mélanges 1,4 et 1,5 du cycle triazole (figure 15).

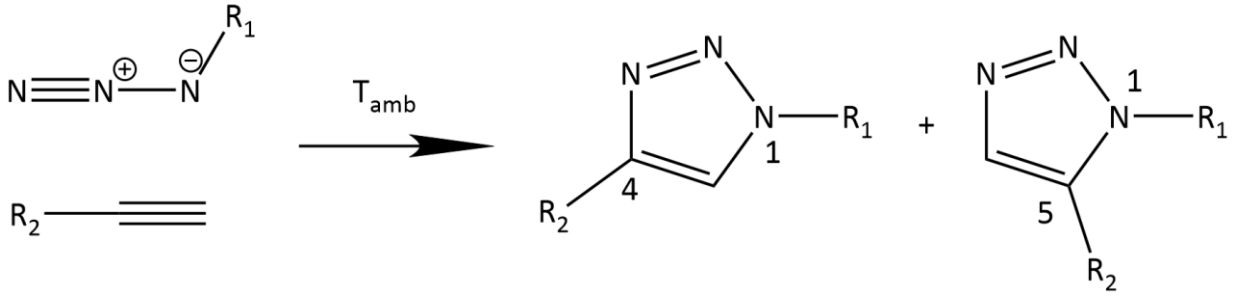

Figure 15. Schématisation de la cycloaddition 1,3 de Huisgen formant le mélange d'isomères 1,4 (à gauche) et 1,5 (à droite) du cycle triazole.

C'est donc en 2001 que Sharpless et son équipe utilisent cette réaction comme réaction type de chimie click. En 2002 Meldal et al.[61] utilisent des sels de cuivre pour catalyser cette réaction ce qui a permis la synthèse à température ambiante de composé 1,2,3-triazoles. La force de cette réaction est de pouvoir créer des liaisons covalentes par la formation de cycles triazoles issus de la réaction entre l'alcyne et l'azoture. Le catalyseur de la réaction est le cuivre (I), or ce composé n'est pas stable en milieu aqueux, ce qui rend l'utilisation du composé en tant que tel difficile. Le catalyseur est habituellement généré directement dans le milieu réactionnel en faisant réagir du cuivre (II) avec de l'ascorbate de sodium. Il

y a néanmoins des contraintes notables. Les solutions ne sont pas stables au cours du temps et il est nécessaire de les préparer juste avant utilisation[62].

Les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées dans l'équipe sont stables en milieu organique (THF, chloroforme). Le cuivre (I) est stable et soluble dans ce type de milieu. Ce qui permet de retirer certaines contraintes techniques de la réaction. La réaction click a été effectuée dans des solvants organiques à l'aide de catalyseurs de cuivre (I) stabilisés par des ligands divers dans plusieurs milieux réactionnels différents[62–65]. Il a été montré par Cattoen et al[66] que la réaction pouvait être catalysée par du cuivre (I) stabilisée par de la triphénylphosphine ($[CuBr(PPh_3)_3]$) et activée par de la triéthylamine (Et_3N). Par la suite nous nous concentrerons sur cette réaction.

3.2.2 Les mécanismes réactionnels de la chimie click

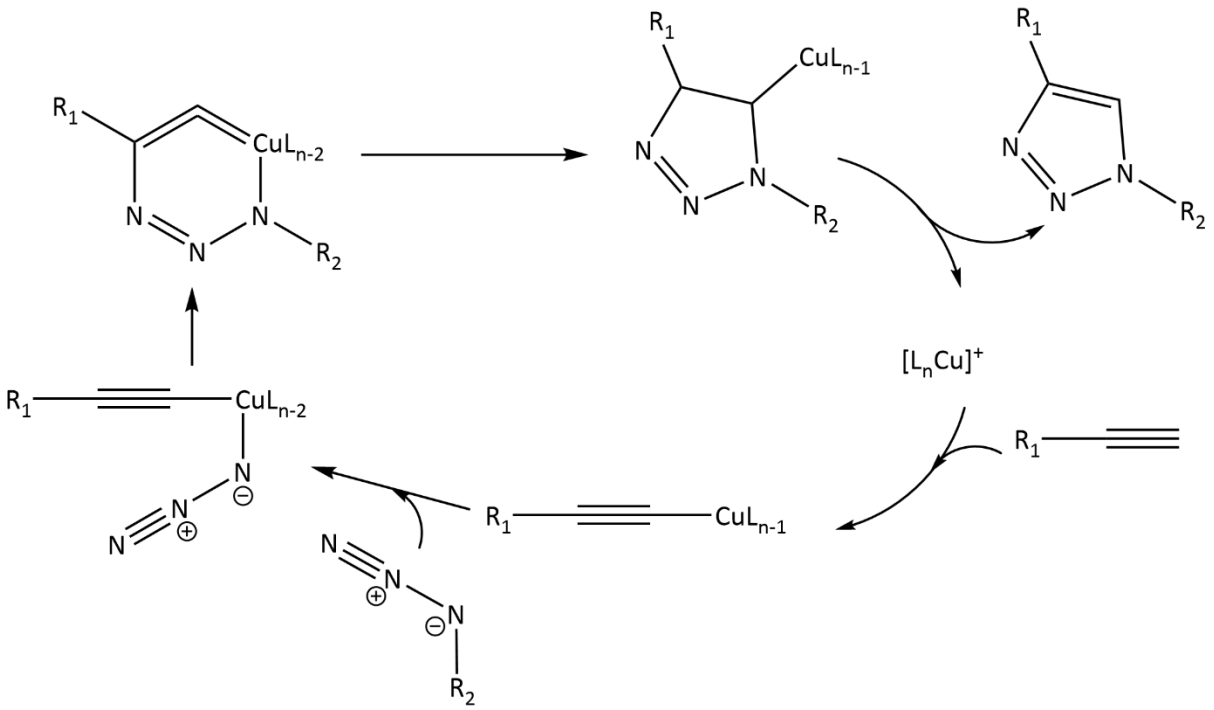

Figure 16. Schéma du mécanisme réactionnel de la cycloaddition 1,3 de Huisgen proposée par Sharpless[57].

Le cycle proposé par Sharpless[57] en 2002 débute avec la formation d'un complexe de cuivre acétylide suivi de la formation d'un complexe cuivre-acétylide-azoture qui se cyclise. Une fois le triazole obtenu le cuivre se régénère du fait que la liaison Cu-C se brise (figure 16).

Ce mécanisme a été précisé par Finn et al[67] qui ont montré la possible implication d'un second atome de cuivre jouant le rôle de catalyseur dans l'activation de l'azoture. Peu après, en 2007, Straub et al.[68] ont pu isoler un complexe intermédiaire de la réaction montrant que le mécanisme n'implique pas obligatoirement deux atomes de cuivre. Il est important de noter que les réactions de click ne nécessitent pas d'ajout d'une base, mais peuvent être accélérée par celle-ci.

3.2.3 L'utilisation de la réaction de CuAAC pour l'assemblage de nanoparticules

3.2.3.1 Généralités sur la CuAAC

Après la découverte de la réaction de CuAAC en 2002 par Sharpless et Meldal mettant en avant les avantages de cette cycloaddition, les scientifiques y ont rapidement prêté attention. Sharpless et son équipe ont notamment breveté la synthèse de réseaux polytriazoles assemblés à l'aide de la réaction de CuAAC pouvant former un revêtement adhésif pour surface métallique. Bien que présente dans plusieurs domaines, c'est dans la chimie macromoléculaire qu'elle est la plus utilisée et mise en avant. La chimie click est considérée maintenant comme un outil indispensable dans le domaine des macromolécules. Un grand nombre de possibilités s'offre à l'application de la chimie click dans le monde global de la chimie. Néanmoins le domaine d'application de prédilection est celui des biotechnologies. La compatibilité avec les systèmes vivants est un atout majeur et permet donc des applications à but médical et pharmaceutique[69–74].

La compatibilité entre la réaction de CuAAC et le vivant offre notamment des possibilités d'applications dans le domaine des polymères. Ce qui a conduit à la construction de biomatériaux dont les polymères bioconjugés[75,76], les nanoparticules fonctionnelles et les surfaces fonctionnelles pour les biocapteurs.

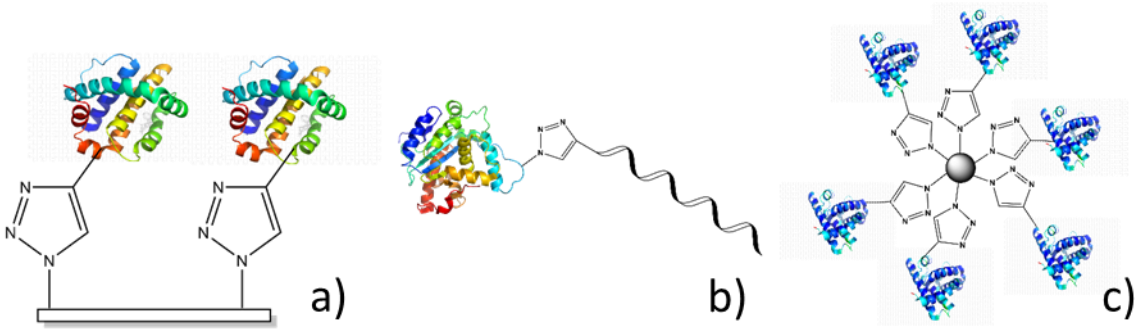

Figure 17. Exemples d'architectures biocompatibles à base de protéines obtenues par chimie click CuAAC. (a) surface fonctionnelle (b) polymère bio-conjugué (c) nanoparticule fonctionnelle.

La chimie click permet donc de fonctionnaliser des surfaces, des nanoparticules ou encore de polymères (figure 17). La fonction triazole permet la biocompatibilité entre l'objet et le vivant. Il est également possible d'utiliser la réaction de CuAAc pour d'autres applications telles que la construction d'objets plus complexes. L'exemple le plus fréquent est la conception de structures dendritiques. En effet, ces structures bien définies sont sensibles aux réactions impliquées dans le processus de synthèse. La réaction de CuAAC est donc un choix naturel pour former ce type de structures complexes car elle est connue pour ne pas réagir avec d'autres groupements fonctionnels que ceux impliqués dans la réaction, à savoir les alcynes et les azotures, c'est donc une réaction hautement spécifique. En 2004, Sharpless effectue la synthèse de diverses structures dendritiques avec une grande pureté et de très bon rendements[54]. La chimie click est donc un puissant outil rapidement adopté et utilisé par les chimistes car elle permet de jouer avec la structure des objets tels que les polymères, les substrats ou encore les nanoparticules[77].

3.2.3.2 La click CuAAC appliquée aux nanoparticules

On retrouve peu de travaux concernant les nanoparticules, les premiers à avoir effectué des assemblages de nanoparticules étant Reinhoudt et son équipe en 2011[78]. En partant de nanoparticules de FePt d'un diamètre de 5 nm fonctionnalisées post synthèse par une molécule contenant un groupement alcyne, ils ont pu assembler les nanoparticules sur des SAMs fonctionnalisées avec des azotures. La formation du groupement triazole est mise en avant par de la spectroscopie infrarouge montrant la disparition du signal de l'azoture. Néanmoins les surfaces sur lesquelles les nanoparticules de FePt ont été greffées sont très peu denses et homogènes (figure 18).

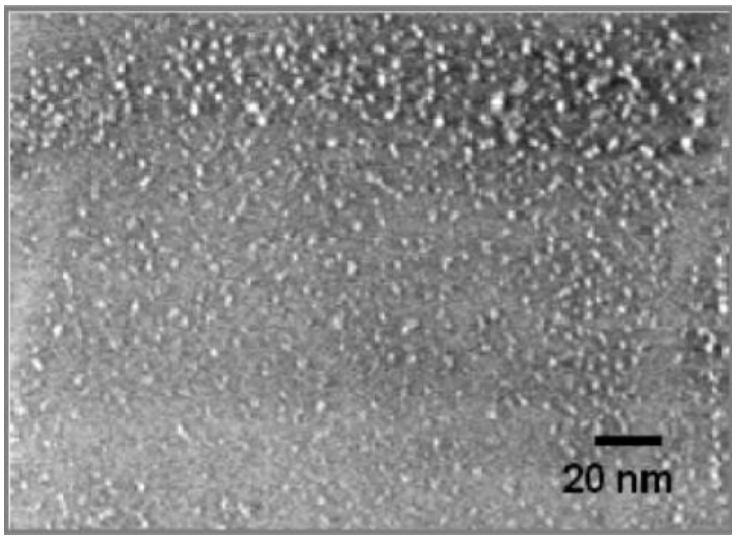

Figure 18. Image de microscopie électronique à balayage des assemblages de nanoparticules de FePt obtenus par Reinhoudt[79].

En 2017 l'équipe de Jésus et al. a publié des travaux sur l'assemblage de nanoparticules magnétiques sur des surfaces de silicium[80]. La technique utilisée n'est pas exactement la CuAAc clic, mais l'un de ses dérivés, la SPAAC (« Strain-promoted click azide-alkyne cycloaddition ») permettant de s'affranchir de l'utilisation de cuivre[81]. Cette technique est plus adaptée lorsque des biomolécules sont utilisées. On constate néanmoins de faibles densités de nanoparticules sur la surface (Figure 19).

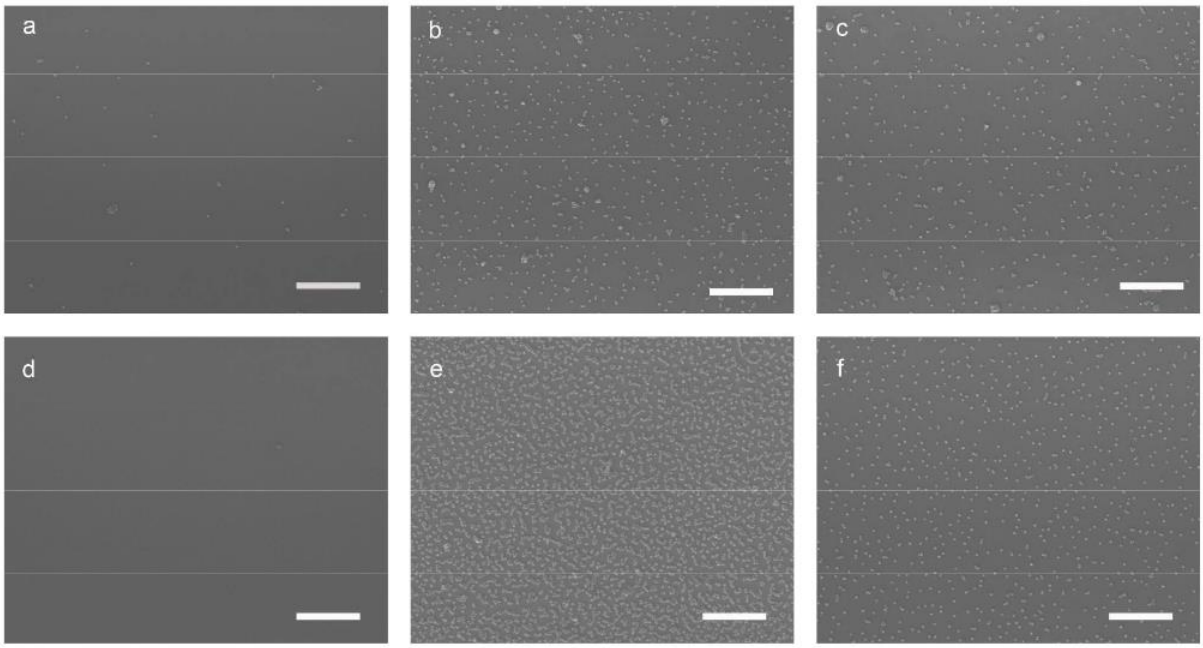

Figure 19. Images MEB tirées des assemblages de Jésus pour des nanoparticules fonctionnalisées avec différents ligands.

Dès 2011 notre groupe a travaillé sur l'assemblage de nanoparticules. Les travaux de Delphine Toulemon[82] ont mis en avant les multiples possibilités qu'offre la réaction de CuAAC dans l'assemblage de nanoparticules magnétiques. Des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer de différente taille et morphologie ont été assemblées sur des surfaces d'or par CuAAc click. Aussi bien par reflux[83] qu'en présence de microondes[84]. L'oxyde de fer présentant des propriétés magnétiques, il a été possible d'assembler les nanoparticules de manière ordonnée à l'aide d'un champ magnétique orienté[85]. Les assemblages de nanoparticules ont une densité pouvant être contrôlée grâce au temps de réaction et ils ne présentent pas de multicouches (figure 20).

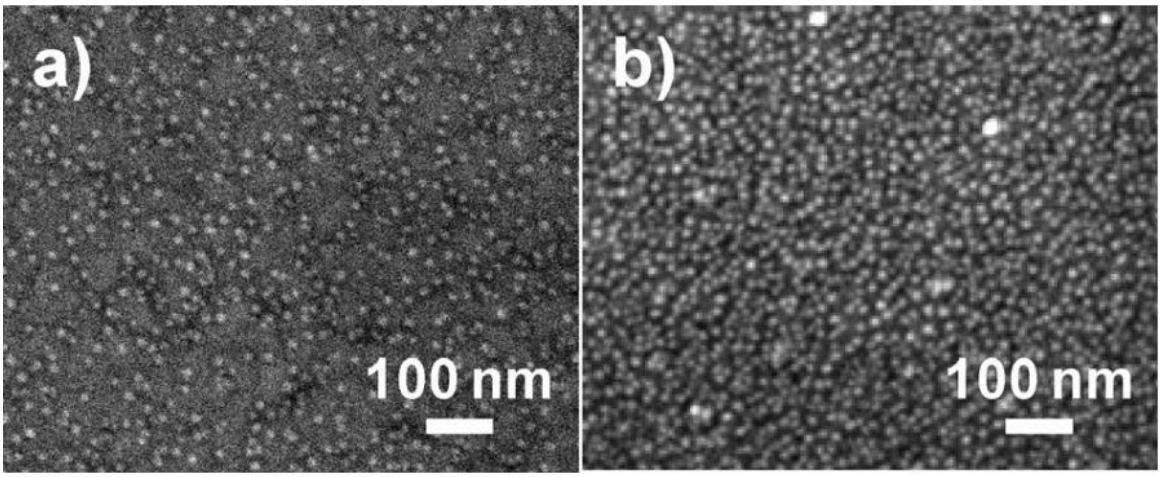

Figure 20. Images de microscopie électronique à balayage d'assemblages de nanoparticules d'oxyde de fer par réaction de CuAAC click après 1h (a) et 48h (b) de réaction.

Les nanoparticules sont fonctionnalisées avec des groupements azotures et les SAMs possèdent des terminaisons alcynes. Une fois les nanoparticules fonctionnalisées et assemblées par CuAAC click la face supérieure des nanoparticules possède des groupements azoture disponible, ce qui peut permettre de greffer des molécules possédant des groupements alcynes à la surface des nanoparticules.

4 Les biocapteurs

4.1 Histoire et généralités des biocapteurs

Les biocapteurs ont été imaginés et conçus dans un but précis : l'analyse en temps réel et sans traitement des échantillons au préalable. Les domaines d'application des biocapteurs sont vastes. On retrouve les biocapteurs dans l'agroalimentaire[86–89], l'analyse environnementale[87,90,91]et entre autre dans le domaine médical[92,93].

L'histoire des biocapteurs commence au début du XX^{ème} siècle avec Cremer[94] qui démontre que la concentration en acide dans un liquide est proportionnelle au potentiel électrique du fluide situé de part et d'autre d'une membrane en verre. Ce fut seulement quelques années plus tard en 1909 que le concept de pH fut introduit par le danois Soren Sorensen[95] tandis que la première électrode de pH fut réalisée en 1922 par Hughes[96]. Entre 1909 et 1922 Griffin et Nelson ont montré que l'immobilisation d'une enzyme (Invertase) sur de l'hydroxyde d'aluminium et du charbon était possible[97,98]. Mais le premier « vrai » biocapteur vit le jour quelques décennies plus tard en 1956 avec Clark[99] pour la détection de l'oxygène : donnant son nom à ce type d'électrode « Electrode de Clark ». S'ensuit dans les années 1960 le développement d'électrodes pour détecter les enzymes et notamment le glucose[100–102]. Après quoi le développement de biocapteurs à visée médicale pour la détection du glucose, des biocapteurs pour le cholestérol furent développés à partir des années 1980 à visées commerciales. De nos jours, le domaine des biocapteurs est devenu pluridisciplinaire et couvre plusieurs domaines de la recherche scientifique (chimie, physique, biologie) avec des fondements en micro et nanotechnologies et des applications en médecine. La base de données « Web of science » récence plus de 71000 résultats pour le terme « biosensors » entre les années 1980 et 2021.

Les biocapteurs constituent une famille de dispositifs analytiques plus spécifiques, plus rapides et sensibles dans certains domaines répertoriés dans la figure 21. Dans les dernières années, le domaine des biocapteurs a connu un grand essor sous la pression de plusieurs facteurs reliés à plusieurs domaines.

Les normes de l'industrie alimentaire sont de plus en plus strictes depuis l'adoption de la norme ISO 22000 depuis 2005 pour tous les pays. Ce changement a contribué au développement du monde des biocapteurs pour l'analyse poussée de produits. Les biocapteurs permettent de déterminer la qualité des aliments tels que la viande ou le poisson. Par exemple, pour détecter l'histamine, molécule pouvant causer des intoxications alimentaires présente dans certains poissons, des biocapteurs ont été mis au point[103,104]. Le domaine environnemental est aussi un secteur où le contrôle de la qualité est au centre de l'attention. Les biocapteurs environnementaux sont capables de communiquer des informations sur la pollution de l'eau comme les perturbateurs endocriniens[105] ou les métaux lourds[106]. Mais c'est dans le domaine médical et pharmaceutique que l'on retrouve le plus de recherches liées aux biocapteurs. Ils sont notamment utilisés pour la détection de biomarqueurs de santé comme le glucose ou le cholestérol. Dans le secteur médical, les biocapteurs permettent des détections rapides et en temps réel des analytes, ce qui représente un atout majeur.

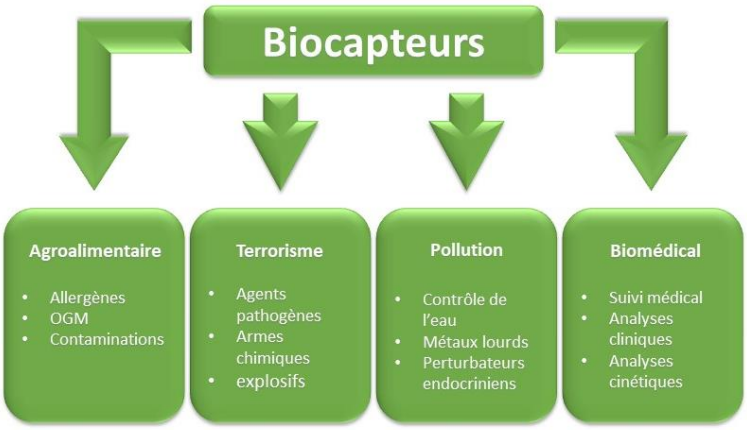

Figure 21. Liste représentative et non exhaustive des principales applications liées aux biocapteurs.

4.2 Définition et principe d'un biocapteur

Un biocapteur est défini comme un outil analytique qui convertit un signal donné par un élément biologique en un signal physique mesurable. C'est l'association entre un élément biologique immobilisé couplé à un transducteur permettant de transformer le signal biologique en un signal physique. L'élément biologique immobiliser (ADN, ARN ou vitamine) doit être capable de reconnaitre de manière spécifique une substance cible (enzyme, ADN complémentaire, antigène). Le transducteur traduit en signal physique les modifications apportées en surface (variation de pH, changement optique, variation de masse) dues à la reconnaissance entre l'élément biologique et la molécule cible (figure 22). D'après l'Union Internationale de la Chimie Pure et Appliquée (IUPAC) un biocapteur doit être petit et compact, avoir un signal réversible, donner des déterminations précises et établir une connexion réelle entre le matériel biologique et le transducteur.

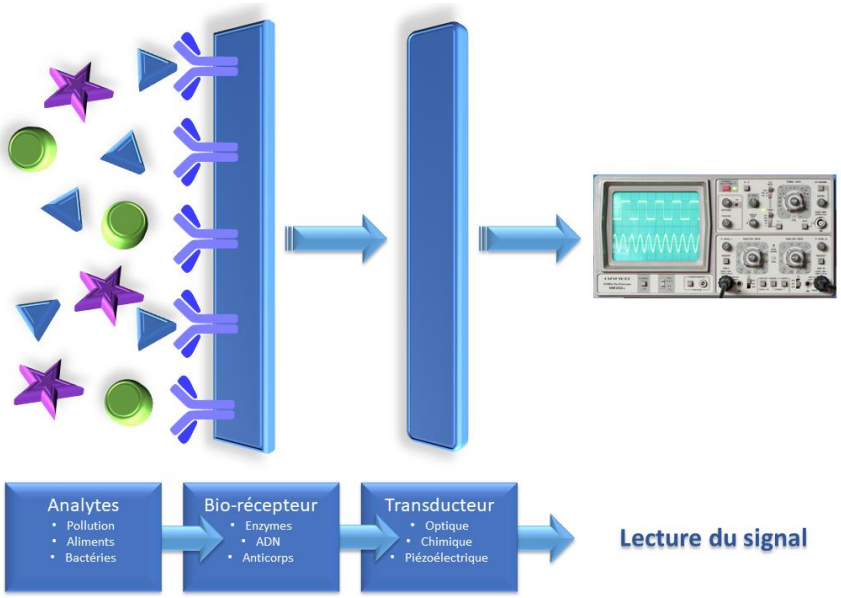

Figure 22. Schéma du mode de fonctionnement d'un biocapteur.

On choisit le bio-récepteur en fonction de l'analyte que nous souhaitons détecter. Depuis leur mise en œuvre différents bio-récepteurs ont été utilisés pour la détection d'analytes aussi diverses. Les bio-récepteurs les plus communs sont les anticorps, les enzymes, les cellules ou encore l'ADN. Les changements se passant au niveau du bio-récepteur sont transformés en signal quantifiable à l'aide du transducteur. Tout comme l'élément de reconnaissance le transducteur est choisi en fonction des éléments à détecter qui vont induire des changements biologiques spécifiques en surface. Le transducteur a pour rôle de convertir ces changements biologiques en signaux électriques mesurables, en dernier lieu l'interface électronique amplifie et traite le signal reçu pour qu'il soit utilisable. Parmi les transducteurs les plus utilisés, on retrouve les transducteurs électrochimiques, piézoélectriques ou bien optiques.

Les biocapteurs possèdent des caractéristiques bien précises, l'optimisation de ces propriétés est directement liée aux performances du biocapteur. On peut dénombrer un certain nombre de ces paramètres :

- Sélectivité : certainement l'un des paramètres les plus importants que doit avoir un biocapteur. La sélectivité est la capacité d'un biocapteur à détecter un analyte spécifique par le biais des biorécepteurs dans une solution contenant d'autres espèces. Le choix du bio-récepteur impacte la sélectivité.
- Sensibilité : la quantité minimale qui va générer un changement détectable.
- Reproductibilité : la capacité d'un capteur à fournir des réponses proches les unes des autres pour des mesures répétées avec une même quantité d'analyte dans le temps.
- Stabilité : le degré avec lequel le biocapteur et la mesure qu'il effectue vont réagir à des perturbation externes (température, pression).
- La limite de détection : la plus petite valeur pouvant significativement être mesurée.

4.2.1 Les bio-récepteurs

Les bio-récepteurs peuvent être catégorisés en deux grandes familles distinctes[107], à savoir les bio-récepteurs d'affinité et ceux métaboliques ou catalytiques.

4.2.1.1 Bio-récepteurs d'affinité

Ces biocapteurs sont basés sur des biomolécules sélectives. Lors de l'association de l'analyte et du récepteur il se forme une liaison forte. La haute spécificité du couple analyte/bio-récepteur et leur grande affinité permet à l'analyte de se fixer sur le bio-récepteur et de former de fortes interactions[108]. Ces fortes liaisons sont établies par des liaisons hydrogène ou de van de Waals, pouvant être couplées ou non, à des liaisons hydrophobes.

Ce type de bio-récepteur forme des complexes stables avec l'analyte. L'équilibre de ce complexe entre l'analyte (E) et le bio-récepteur (L) est régi par une constante, dite constante de dissociation K_D. La relation régissant cet équilibre est la suivante :

$$L + E \underset{k_D}{\rightleftharpoons} LE \qquad (1)$$

La constante de dissociation correspond à l'affinité que possède l'analyte avec le bio-récepteur. K_D étant définie comme la constante de dissociation, plus l'affinité entre les deux entités est élevée plus cette constante sera faible. Étant une constante d'équilibre on peut l'exprimer comme étant le produit des réactifs sur le complexe formé :

$$K_D = \frac{[E][L]}{[EL]} \tag{2}$$

D'une autre manière nous pouvons exprimer K_d avec les vitesses d'association et de dissociation, respectivement k_{on} et k_{off} :

$$L + E \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} EL \tag{3}$$

L'équilibre est atteint lorsque les vitesses d'association et de dissociation se compensent :

$$[E][L]k_{on} = [EL]k_{off} \tag{4}$$

$$K_D = \frac{[E][L]}{[EL]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \tag{5}$$

On peut définir la constante d'association à l'équilibre comme étant l'inverse de la constante de dissociation :

$$K_A = K_D^{-1} = \frac{[EL]}{[E][L]} = \frac{k_{on}}{k_{off}} \tag{6}$$

Dans ce cas de figure, la formation du complexe est réversible. L'analyte et le bio-récepteur ne sont pas modifiés au cours de la complexation, ils forment un complexe dissociable.

Pour un nombre donné de sites de bio-récepteurs (L) et d'analytes (E), le nombre de complexes (EL) et le signal fourni par le transducteur sont proportionnels à la concentration de l'analyte (E).

Pour une valeur de K_d très faible (inversement K_A élevé) il est difficile, ou très long, de dissocier le complexe formé bien que les liaisons intervenants dans ce processus ne soient pas covalentes, le grand nombre de liaisons mises en jeu est la cause de la force de cette liaison entre l'analyte et le bio-récepteur.

Dans cette classe de bio-récepteurs on retrouve trois grandes familles :

Les immunorécepteurs[109] : ils sont basés sur le couplage entre un anticorps et l'antigène correspondant. La constante de dissociation à l'équilibre dépend fortement du couple utilisé, les valeurs sont généralement comprises entre 10^{-8} et 10^{-12} M. L'association des deux éléments est très spécifique et forte. Il est donc possible de détecter ces entités dans des milieux complexes. Néanmoins du fait de la forte liaison entre l'anticorps et l'antigène, il est difficile de les dissocier. La régénération

des surfaces s'effectue par un changement radical du pH[110] ce qui nuit au reste de la surface et conduit à des dommages et donc à des problèmes de reproductibilité.

Les récepteurs membranaires : ce sont des protéines non catalytiques, c'est-à-dire qu'elles ne vont pas consommer l'analyte. Ce type de récepteur est localisé dans la membrane cytoplasmique. Les récepteurs membranaires vont détecter des hormones, des neurotransmetteurs, des facteurs de croissance ou des molécules odorantes. Ce type de récepteur est capable de reconnaitre uniquement un seul type de molécule spécifique ce qui permet de transmettre un signal bien précis à la cellule pour qu'elle l'interprète correctement. La constante de dissociation est de l'ordre de 10^{-8} M pour ce type de couple analyte/bio-récepteur. Il est difficile d'étudier ce type de capteur du fait que l'immobilisation sur des surfaces de ce type d'analyte est un défi technique[111,112].

Les acides nucleiques[113] : ce sont des fragments d'ARN ou d'ADN pour la plupart synthétiques (oligonucléotides) pouvant se lier spécifiquement à un ARN ou de l'ADN naturel. Ils sont assemblés sur des transducteurs sur forme de brins simples ou doubles. L'avantage de ce type de bio-récepteur est la facilité de synthèse. Ils sont capables de détecter différents types de molécules (ARN, ADN, anticorps)[114].

4.2.1.2 Les bio-récepteurs catalytiques

Aussi appelés bio-récepteurs métaboliques, les bio-récepteurs catalytiques sont basés sur une réaction catalysée par une macromolécule (par exemple une enzyme). Cela signifie que le bio-récepteur va consommer l'analyte au cours de la détection (figure 23). Ce type de bio-récepteur est spécifique et possède une grande activité à de faibles concentrations. Contrairement aux bio-récepteurs reposant sur l'affinité entre deux corps, celui-ci fonctionne différemment. La réaction de détection se déroule en deux étapes : une première où l'analyte (E) et le récepteur (L) vont former un complexe (EL), puis s'ensuit la transformation du complexe en un produit (P). Les bio-capteurs catalytiques permettent d'étudier les cinétiques de réaction du produit (P) ou l'inhibition de certaines réactions.

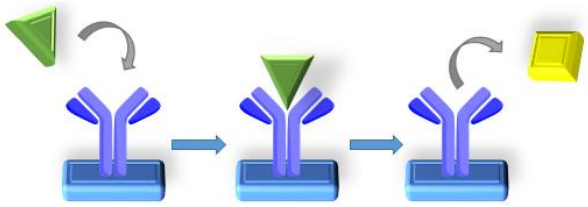

Figure 23. Schéma d'un bio-récepteur catalytique. De gauche à droite, le bio-récepteur (en bleu) avant d'avoir capté l'analyte (en vert) s'ensuit la formation du complexe analyte/bio-récepteur pour au final avoir un produit de catalyse (jaune).

Cette réaction suit la théorie de Michaelis-Meten[115] :

$$E + L \underset{k_{off}}{\overset{k_{on}}{\rightleftharpoons}} EL \xrightarrow{k_{cat}} P + L \qquad (7)$$

avec k_{on} et k_{off} les vitesses d'association et de dissociation et k_{cat} la vitesse de formation du produit par catalyse. Par définition la vitesse V à laquelle le complexe (EL) convertit l'analyte en produit par la constante k_{cat} est donnée par :

$$\frac{d[P]}{dt} = V = k_{cat}[EL] \quad (8)$$

La vitesse de formation et de déformation du complexe (EL) sont respectivement données par :

$$V_{formation} = k_{on}[E][L] \quad (9)$$

$$V_{déformation} = (k_{off} + k_{cat})[EL] \quad (10)$$

A l'équilibre nous avons donc les équations 9 et 10 qui sont égales :

$$k_{on}[E][L] = \left(k_{off} + k_{cat}\right)[EL] \quad (11)$$

Nous pouvons retransformer l'équation 11 pour obtenir une constante comme dans le cas de l'équation 6 :

$$K_m = \frac{k_{off} + k_{cat}}{k_{on}} = \frac{[E][L]}{[EL]} \quad (12)$$

La constante ainsi obtenue est la constante de Michaelis. Cette constante correspond à la demi-saturation de l'enzyme par l'analyte.

Il existe deux grandes espèces suivant ce type de réaction : les enzymes, souvent utilisées pour des analyses agroalimentaires, pour la défense ou l'environnement[116,117] et les microorganismes. Les microorganismes utilisés pour la bio-détection sont des bactéries et des champignons[118]. Les microorganismes présentent l'avantage de ne pas nécessiter l'extraction de l'enzyme et de sa purification. De plus, ces derniers s'adaptent plus facilement à des changements de pH brutaux. L'inconvénient est toutefois leur faible spécificité vis-à-vis des analytes.

4.2.2 Les transducteurs

Le transducteur est l'élément physique du biocapteur qui traduit le signal biochimique induit par la reconnaissance entre l'analyte et le bio-récepteur en signal électrique. Il existe deux grandes classes de transducteurs. La première utilise des marqueurs, le plus commun étant la fluorescence. Marquer les analytes permet d'avoir une sensibilité importante allant même jusqu'à la détection d'une seule et unique molécule[119]. Ce type de méthode, bien qu'efficace, ajoute des coûts supplémentaires et peut parfois interférer avec la détection. Une molécule fluorescente n'aura pas le même poids moléculaire ou parfois pas les mêmes propriétés que l'analyte. C'est pourquoi au fil du temps, les méthodes sans

marquages ont été privilégiées. Leurs applications sont répandues à plus d'analytes et sont plus simples à mettre en œuvre.

Une fois le type de bio-récepteurs choisi, il faut que celui-ci soit en accord avec le type de transducteur pour que l'ensemble fournisse un signal exploitable. Il y a quatre grandes familles de transducteurs, on retrouve les transducteurs thermiques, mécaniques, électrochimiques et optiques. L'accent sera mis sur les transducteurs optiques, et plus particulièrement sur la résonance plasmon de surface (SPR : « surface plasmon resonance »). En effet, dans la famille des transducteurs optiques c'est celui qui possède le plus d'avantages[120].

4.2.2.1 Les transducteurs mécaniques

On retrouve dans cette catégorie deux types de transducteurs basés sur l'effet piézoélectrique et ceux basés sur les microsystèmes électromécaniques.

Le premier transducteur basé sur l'effet piézoélectrique a été mis au point en 1972 par Shons et al.[121]. Comme son nom l'indique, il utilise l'effet piézoélectrique qui consiste dans l'apparition d'un potentiel électrique lorsque celui-ci subit une contrainte mécanique et inversement. Le plus connu parmi tous est la microbalance à cristal de quartz (QCM) (figure 24). Ce type de transducteur est capable de détecter des changements de masse de l'ordre de quelques ng/cm² [122]. Son principe est simple : on mesure l'oscillation d'un cristal de quartz sur lequel est déposé un matériau (métal, polymère). Lorsqu'un élément est déposé sur la surface, cela entraine un changement dans la fréquence de résonance ce qui permet de quantifier l'analyte en surface de la QCM.

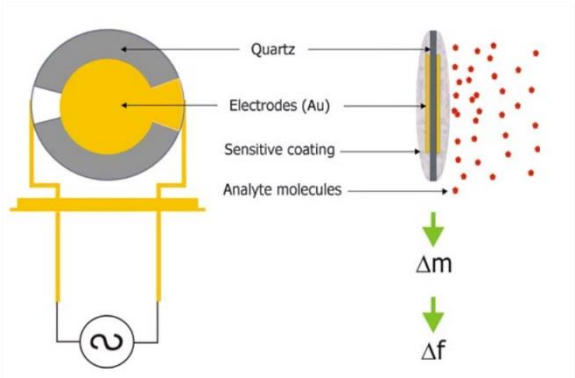

Figure 24. Représentation schématique de la QCM [122].

Le second type de transducteur de cette catégorie sont les microsystèmes biologiques électromécaniques ou « Biological Micro Electro Mechanical System » (Bio-MEMS). Le principe est semblable à celui de la QCM. Une membrane d'origine biologique (protéines) vibrant à une certaine fréquence est immergée dans une solution, les analytes se déposant en surface vont faire varier la fréquence de vibration de la membrane[123]. Les micro-leviers sont un exemple de Bio-MEMS statiques.

4.2.2.2 Les transducteurs électrochimiques

Pour de raisons historiques[100,101] les transducteurs électrochimiques sont populaires dans la bio-détection. Le fait que ces transducteurs aient été les premiers à être développés leur donne un

avantage, mais ils sont également simples à mettre en œuvre, ce qui est un atout majeur. Le principe des transducteurs électrochimiques repose sur des réactions d'oxydoréduction pouvant se traduire en une différence de potentiel à l'interface due à la fixation de l'analyte. Il existe cinq sous catégories de transducteurs dans cette famille :

- Ampérométriques : mesurant le changement de courant à un potentiel fixe.
- Potentiométrique : mesurant la différence de potentiel entre les électrodes.
- Conductimétriques : mesurant un changement de conductivité.
- Impédancemétrique : mesurant les changements d'impédance.
- Voltamétriques : mesurent un courant en fonction d'une variation de potentiel.

Pour les transducteurs ampérométriques, potentiométriques et conductimétriques : le courant, la différence de potentiel et la conductivité sont directement proportionnelles à la quantité d'analytes absorbées en surface. Pour ce qui est de l'impédance, le traitement est un peu plus complexe car il nécessite de traiter des signaux sinusoïdaux souvent accompagnés d'un déphasage.

Bien que ces transducteurs soient faciles à utiliser et que leur mise en œuvre reste simple, ils restent peu sélectifs.

4.2.2.3 Les transducteurs thermiques

Mis au point un peu plus de dix ans[124] après les transducteurs électrochimiques, les transducteurs thermiques (ou enthalpimètres) sondent les variations d'enthalpie provenant de réactions endothermiques ou exothermiques. Ils sont adaptés à des mesures longues dans le temps, produisent des réponses rapides et sont reproductibles. Mais sont très peu utilisés du fait de leur coût de mise en œuvre et parce qu'il est nécessaire de travailler avec des volumes élevés. Ils sont également peu sensibles.

4.2.2.4 Les transducteurs optiques

Les transducteurs optiques ont gagné en popularité depuis la commercialisation de l'instrument Biacore en 1990 mais surtout avec le développement des techniques optiques. Les phénomènes sur lesquels sont basés ces transducteurs sont l'ellipsométrie[125,126], les guides d'ondes[127,128], la fluorescence[129], mais surtout la résonance plasmon de surface[130]. Cette dernière technique est la base de l'appareil commercial Biacore (figure 25). L'avantage des transducteurs optiques est la possibilité de faire des mesures in situ, en temps réel et rapides couplées à une sensibilité élevée. Les systèmes optiques sont pour la plupart très miniaturisés.

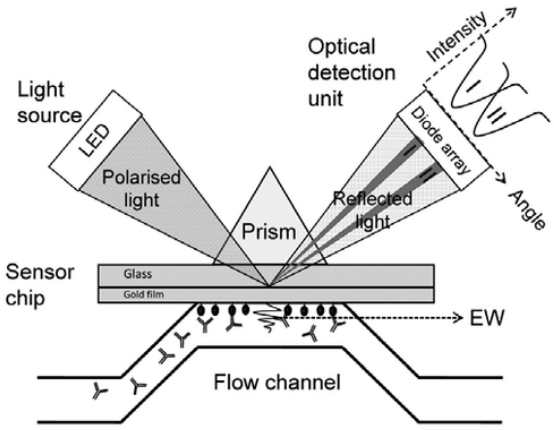

Figure 25. Représentation schématique d'un biocapteur SPR de type Biacore.

4.3 Les biocapteurs basés sur l'effet de résonance plasmon de surface

4.3.1 Contexte historique

Le phénomène de résonance plasmon de surface (SPR pour « Surface Plasmon resonance ») est un phénomène optique dans lequel la lumière interagit avec les électrons se trouvant à l'interface entre un métal et un diélectrique. Ce phénomène fut observé pour la première fois au IV^{ème} siècle avec la coupe de Lycurge. La coupe change de couleurs en fonction de son exposition à la lumière. Cette particularité est due aux nanoparticules d'or qui, sous l'effet de la lumière, montrent des propriétés plasmoniques. Mais ce n'est qu'en 1902 que R.W. Wood [131] observe et décrit ce phénomène lorsqu'il étudit la lumière diffractée par un réseau métallique. Il observe ce phénomène optique sous la forme de bandes anormales dans le spectre diffracté.

Il spécule sur l'interaction entre la lumière et le réseau métallique, une explication claire du phénomène physique n'est pas encore donnée. Ce n'est que 40 ans plus tard, en 1941, que Fano[132] donne une explication de ce phénomène. Il explique que ces anomalies de diffraction sont dues à des ondes de surface. Il faut attendre le début des années 1950 pour que le terme plasmon soit introduit par Pines et Bohm[133–135]. Ils suggèrent que ces pertes d'énergies proviennent des électrons de conduction excités par des ondes électromagnétiques créant ainsi un plasma oscillant : le plasmon. En 1968, Ritchie[136] introduit le terme de « résonance plasmon de surface ». En même temps, Otto[137] et Kretschmann[138] proposent deux dispositifs distincts pour exciter le plasmon de surface de films minces avec un couplage par prisme. C'est ensuite au début des années 1990 que les premiers biocapteurs plasmoniques voient le jour, et notamment avec un dispositif commercial : le Biacore.

4.3.2 Principe et théorie

4.3.2.1 Les équations de Maxwell

Lorsque l'on parle d'électromagnétisme dans le vide les équations de Maxwell sont toujours le point de départ. Elles permettent la description et justifient l'existence du plasmon de surface. Elles sont définies, dans le vide, de la manière suivante :

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{E}(r,t) = \frac{\rho(r,t)}{\varepsilon_0} \tag{13.1}$$

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{B}(r,t) = 0 \tag{13.2}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E}(r,t) = -\frac{\partial \vec{B}(r,t)}{\partial t} \tag{13.3}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{B}(r,t) = \mu_0 \left(\vec{j}(r,t) + \varepsilon_0 \frac{\partial \vec{E}(r,t)}{\partial t} \right) \tag{13.4}$$

Avec $\vec{E}$ le champ électrique, $\vec{B}$ le champ magnétique d'induction, ε_0 et μ_0 la permittivité et la perméabilité dans le vide, respectivement. $\vec{j}$ la densité de courant et ρ la densité de charge volumique.

On introduit le déplacement diélectrique $\vec{D}$ et le champ magnétique $\vec{H}$ qui permettent une réécriture des équations de Maxwell :

$$\vec{D}(r,t) = \varepsilon_0 \vec{E}(r,t) + \vec{P}(r,t) \tag{14.1}$$

$$\vec{H}(r,t) = \frac{\vec{B}(r,t)}{\mu_0} - \vec{M}(r,t) \tag{14.2}$$

Avec $\vec{M}$ et $\vec{P}$ les moments dipolaires magnétiques et électriques. Nous considérons des matériaux non magnétiques, ce qui implique $M = 0$.

Cela nous permet de réécrire les équation 13.1 et 13.4 de la manière suivante :

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{D}(r,t) = \rho_{ext} \tag{15.1}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{B}(r,t) = \mu_0 \left(\vec{j}_{ext} + \frac{\partial \vec{D}(r,t)}{\partial t} \right) \tag{15.2}$$

sachant que $\rho = \rho_{ext} + \rho_{int}$

4.3.2.2 Résolution des équations de Maxwell en milieu linéaire, homogène et isotrope

Nous allons considérer un matériau linéaire, nous permettant d'obtenir l'expression suivante pour le moment dipolaire électrique :

$$\vec{P} = \varepsilon_0 \chi_e \vec{E} \tag{16.1}$$

Cela nous permet de réécrire l'équation du déplacement diélectrique (14.1) sous la forme :

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \vec{E} \tag{16.2}$$

Avec $\varepsilon_r = 1 + \chi_e$ la constante diélectrique, ou permittivité.

Considérer le milieu comme homogène permet de retirer à ε sa dépendance en r. Le milieu étant considéré comme linéaire, homogène et isotrope, non magnétique, sans charge et courant externe on obtient :

$$\varepsilon_0 \varepsilon \vec{\nabla} \cdot \vec{E} = 0 \iff \vec{\nabla} \cdot \vec{D} = 0 \tag{17.1}$$

$$\vec{\nabla} \cdot (\mu_0 \vec{H}) = 0 \iff \vec{\nabla} \cdot \vec{B} = 0 \tag{17.2}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{E} = -\mu_0 \frac{\partial \vec{H}}{\partial t} \tag{17.3}$$

$$\vec{\nabla} \times \vec{H} = \varepsilon \varepsilon_0 \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \tag{17.4}$$

L'équation (17.3) peut s'exprimer sous la forme d'équation de d'Alembert lui appliquant l'opérateur rotationnel pour obtenir :

$$\Delta \vec{E} - \frac{\varepsilon}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{E}}{\partial t^2} = 0 \tag{18}$$

Le même résonnement peut être effectué sur l'équation (17.4) :

$$\Delta \vec{H} - \frac{\varepsilon}{c^2} \frac{\partial^2 \vec{H}}{\partial t^2} = 0 \tag{19}$$

Il est possible de résoudre l'équation (18) et (19) en utilisant comme solution une onde plane progressive de la forme :

$$\vec{A}(r,t) = \overrightarrow{A_0} e^{i(\vec{k}\vec{r} - \omega t + \varphi_0)} \tag{20}$$

avec $\vec{A}$ pouvant être à la fois $\vec{E}$ ou $\vec{H}$. Nous noterons $\omega = 2\pi f$ la fréquence angulaire, $\vec{r}$ le vecteur position,$\vec{k}$ le vecteur d'onde et φ_0 la phase que l'on considère comme nulle pour simplifier l'écriture et la résolution. En résolvant l'équation (18) ou (19) à l'aide de (20) on obtient rapidement :

$$k = \frac{\omega}{c} \tag{21}$$

En considérant $\varepsilon = 1$, c'est-à-dire, dans le vide.

En considérant que l'onde se propage selon l'axe x, qu'elle est invariante selon y et évanescente selon l'axe z (figure 26).

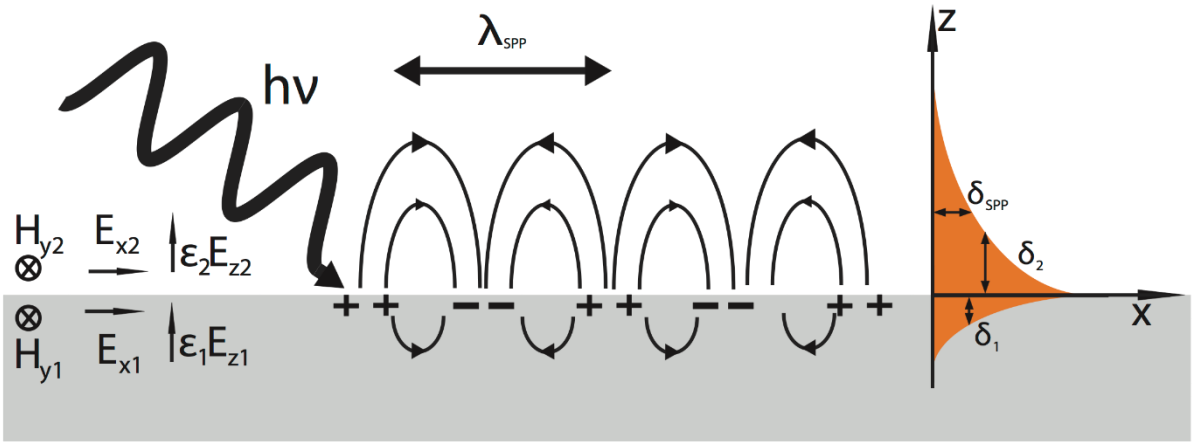

Figure 26. Schéma de l'oscillation collective des électrons à l'interface métal/diélectrique. Avec 1 représentant le métal et 2 le milieu diélectrique.

On peut ainsi réécrire la solution de l'équation de d'Alembert (Eq. 20) pour chaque cas de figure, à savoir dans le métal (milieu 1) et dans le diélectrique (milieu 2) sous la forme :

$$\begin{cases} \vec{A}_1 = \overrightarrow{A_{01}} e^{i(k_{x1}x - k_{z1}z - \omega t)} pour\ z < 0 \\ \vec{A}_2 = \overrightarrow{A_{02}} e^{i(k_{x2}x + k_{z2}z - \omega t)}\ pour\ z > 0 \end{cases} \quad (22)$$

La composante selon l'axe x reste inchangée ce qui nous permet de noter $k_{x,1} = k_{x,2} = k_{SP}$.

Pour une onde polarisée transverse magnétique, l'équation (17.4), qui annule la composante de $\vec{H}$ suivant l'axe z, nous permet d'écrire :

$$\begin{cases} H_{y1} k_{z1} = \omega \varepsilon_0 \varepsilon_1 E_{x1} \\ H_{y2} k_{z2} = \omega \varepsilon_0 \varepsilon_2 E_{x2} \end{cases} \quad (23)$$

En utilisant la continuité à l'interface diélectrique/métal, $z = 0$, on a donc $\overrightarrow{E_{x1}} = \overrightarrow{E_{x2}}$, $\varepsilon_1 E_{z1} = \varepsilon_2 E_{z2}$ et $\overrightarrow{H_{y1}} = \overrightarrow{H_{y2}}$, ce qui nous amène à pouvoir simplifier le système d'équations (23) :

$$\frac{\varepsilon_1}{k_{z1}} = -\frac{\varepsilon_2}{k_{z2}} \Leftrightarrow \frac{\varepsilon_1}{k_{z1}} + \frac{\varepsilon_2}{k_{z2}} = 0 \quad (24)$$

En utilisant l'équation de d'Alembert nous obtenons :

$$\begin{cases} k_{z,1} = \sqrt{\varepsilon_1 \frac{\omega^2}{c^2} - k_{SP}^2} \\ k_{z,2} = \sqrt{\varepsilon_2 \frac{\omega^2}{c^2} - k_{SP}^2} \end{cases} \quad (25)$$

La relation de dispersion de l'onde est obtenue en injectant les solutions dans l'équation (24) :

$$k_{SP} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_1 \varepsilon_2}{\varepsilon_1 + \varepsilon_2}} \quad (26)$$

La relation de dispersion ainsi obtenue décrit le vecteur d'onde en fonction de la fréquence d'excitation à l'interface entre un métal et un diélectrique suivant l'axe x. Nous pouvons écrire k_{SP} sous forme complexe tel que $k_{SP} = k'_{SP} + ik_{SP}''$ avec :

$$k'_{SP} = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_1{}'\varepsilon_2}{\varepsilon_1{}' + \varepsilon_2}} \tag{27}$$

$$k''_{SP} = \frac{\omega}{c}\left(\frac{\varepsilon_1{}'\varepsilon_2}{\varepsilon_1{}' + \varepsilon_2}\right)^{\frac{3}{2}} \cdot \left(\frac{\varepsilon_1''}{2(\varepsilon_1{}')^2}\right) \tag{28}$$

Pour satisfaire la condition $k'_{SP} \in \mathbb{R}$ il faut que $\varepsilon'_1 < 0$ et $|\varepsilon_1{}'| > \varepsilon_2$. Ces deux conditions sont généralement satisfaites dans le métal. Le vecteur k''_{SP} représente l'absorption interne du plasmon lors de la propagation selon l'axe x.

4.3.2.3 Plasmon de surface propagatif

Pour qu'il y ait excitation du plasmon de surface, il faut un couplage entre le vecteur d'onde du plasmon de surface k_{SP} et le vecteur d'onde de l'onde incidente.

En premier lieu, nous exprimons la permittivité du métal (ε_1) comme fonction de la pulsation ω. La permittivité fonction de la pulsation peut être donnée par le modèle de Drude[139] développé en 1900. Le modèle assimile les électrons de conduction du métal à un gaz d'électrons libres. Les électrons sont donc indépendants et libres. On exprime donc la permittivité du métal :

$$\varepsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + i\frac{\omega}{\tau}} \tag{29}$$

Avec ω_p la fréquence du plasma définie par :

$$\omega_p = \sqrt{\frac{n \cdot e^2}{m \cdot \varepsilon_0}} \tag{30}$$

Avec n la densité d'électrons libres, e la charge élémentaire et m la masse d'un électron. Ainsi que $\tau = \frac{1}{\gamma}$ le temps moyen de collision électronique, γ étant le temps de relaxation.

Dans le domaine du visible (400 à 800nm), utilisé dans la plupart des appareils de bio-détection, nous avons la condition $\frac{1}{\tau} \ll \omega < \omega_p$, ce qui ramène l'équation (29) à :

$$\varepsilon_1(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \tag{31}$$

De ce fait, pour $\omega = \pm\frac{\omega_p}{\sqrt{1+\varepsilon_1}}$ le vecteur d'onde du plasmon de surface k_{SP} tend vers l'infini. C'est donc la fréquence propre du système qui nous permet de déterminer l'asymptote de la relation de dispersion. En considérant un milieu ayant une constante diélectrique $\varepsilon_2 = 1$ (air) l'asymptote de la relation a pour équation $\omega_s = \frac{\omega}{\sqrt{2}}$.

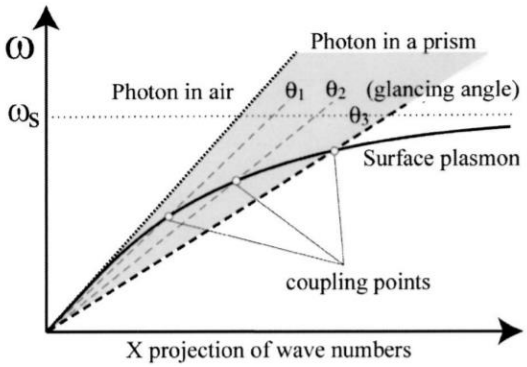

Figure 27. Représentation de la dispersion des plasmons de surface en fonction du milieu.

Le couplage entre l'onde incidente et le plasmon de surface advient donc lorsque la courbe représentant la relation de dispersion du plasmon de surface et celle de l'onde incidente se croisent (figure 27)[140]. Cette courbe démontre l'importance du milieu recevant l'onde incidente pour le couplage des vecteurs d'onde. Lors du phénomène de résonance nous avons donc $k_{SP} = k_{onde\ incidente}$.

4.3.2.4 Plasmon de surface localisé

Il existe un autre type de plasmon de surface : le plasmon localisé (LSPR : « Localized Surface Plasmon Resonance »). Ce second type de plasmon utilise les propriétés nanométriques des particules métalliques (figure 28). L'exemple le plus connu est la coupe de Lycurge[141], qui changeait sa couleur en passant du vert au rouge (ou inversement), en fonction de la lumière, absorbée ou transmise. Cette propriété vient de la taille des nanoparticules d'or et d'argent, d'une taille de 50 à 100 nm environ, qui composent la coupe.

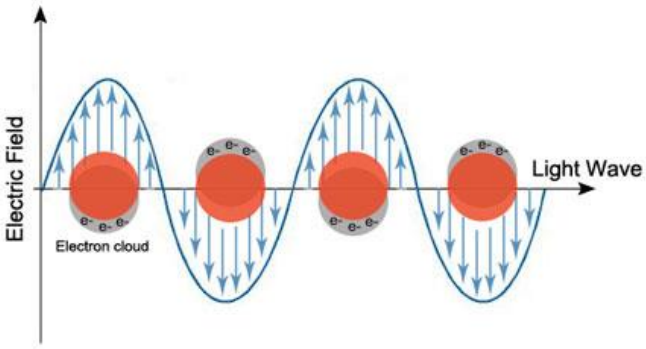

Figure 28. Représentation schématique du plasmon de surface localisé généré sur des particules métalliques par un champ électrique.

La théorie de Mie[142] est une solution particulière des équations de Maxwell, elle permet d'expliquer les propriétés des nanoparticules. Il est possible grâce à cette théorie de calculer les champs électromagnétiques absorbés et diffusés par une particule métallique ayant une forme sphérique soumise à une onde plane, le tout en milieu homogène. Il en résulte l'expression suivant pour la résonance :

$$\omega_{LSPR} = \frac{\omega_p}{\sqrt{1 + 2\varepsilon_2}} \tag{33}$$

Dans l'air ($\varepsilon_2 = 1$) nous avons $\omega_{LSPR} = \frac{\omega_p}{\sqrt{3}}$.

De nombreuses études ont été effectuées sur l'influence de la taille et de la forme des nanoparticules[143–145]. Dans le cadre de cette thèse nous ne détaillerons pas d'avantage le plasmon de surface localisé car il ne correspond pas au modèle développé.

4.3.3 La profondeur de pénétration du plasmon de surface (longueur de pénétration)

Le champ électrique du plasmon selon l'axe z (E_z) décroit exponentiellement dans le milieu 1 (métal) et 2 (diélectrique) suivant $E_z = e^{-(|k_z||z|)}$. La longueur de pénétration correspond donc à la profondeur (selon z) dans un matériau pour laquelle l'amplitude du champ électrique diminue jusqu'à la valeur de $\frac{1}{e}$. Ce qui définit donc la longueur maximale selon laquelle le champ E_z pénètre dans l'un des deux milieux. On peut donc définir la longueur de pénétration (selon z) $\delta_{1,2}$ dans les deux milieux de la manière suivante :

$$\delta_1 = \frac{c}{\omega}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_1' + \varepsilon_2}{(\varepsilon_1')^2}}\right) = \frac{\lambda}{2\pi}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_1' + \varepsilon_2}{(\varepsilon_1')^2}}\right) \quad (32)$$

$$\delta_2 = \frac{c}{\omega}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_1' + \varepsilon_2}{\varepsilon_2^2}}\right) = \frac{\lambda}{2\pi}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_1' + \varepsilon_2}{\varepsilon_2^2}}\right) \quad (33)$$

La longueur de pénétration augmente en proportion de la longueur d'onde et décroit lorsque la constante diélectrique augmente. C'est pourquoi nous avons une décroissance exponentielle du plasmon de surface en s'éloignant de la surface (figure 26). Cette longueur de pénétration varie également en fonction du matériau utilisé, elle peut grandement différer d'un métal à l'autre comme le montre Wang et al.[40] (figure 29). Les valeurs rapportées par Homola[146] sont semblables et varient en fonction de la longueur d'onde utilisée.

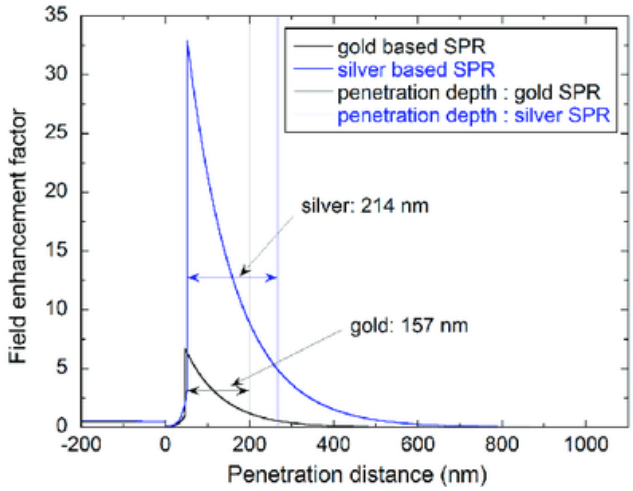

Figure 29. Longueur de pénétration pour un film d'or (45 nm) et un film d'argent (50 nm) pour une longueur d'onde de 632,8 nm.

4.3.4 L'excitation du plasmon de surface propagatif

Nous avons vu qu'il existe deux types de plasmons, le plasmon localisé sur une particule et le plasmon propagatif. Nous laisserons de côté l'excitation du plasmon localisé pour nous intéresser plus en profondeur au plasmon propagatif dont les effets seront utilisés tout au long de cette thèse. Dans cette partie nous nous intéresserons aux différents modes possibles permettant l'excitation de plasmon de surface.

Pour obtenir l'excitation du plasmon de surface nous avons vu dans la partie 4.3.3 qu'il est nécessaire d'avoir l'égalité entre le vecteur d'onde du plasmon k_{SP} et le vecteur d'onde de l'onde incidente $k_{onde\ incidente}$ que l'on notera k_{inc}.

L'égalité de ces deux vecteurs d'onde n'est pas possible dans l'air, comme montré dans la figure 27. Considérons une onde incidente monochromatique ayant un angle d'incidence θ_{inc}avec la surface. Le vecteur d'onde dans le vide correspondant est noté $k_0(\omega)$ tel que $k_0(\omega) = \frac{\omega}{c} = \frac{2\pi}{\lambda_0}$.

On peut donc écrire :

$$k_{inc} = nk_0 \sin(\theta_{inc}) \tag{34.1}$$

Dans l'air nous avons $n = 1$ ce qui implique :

$$k_{inc} = k_0 \sin(\theta_{inc}) \tag{34.2}$$

$$k_{inc} < k_0 \tag{34.3}$$

$$k_0 < k_{SP} \tag{34.4}$$

Dans l'air on a donc $k_{inc} < k_{SP}$. Comme nous devons avoir l'égalité des deux vecteurs d'ondes, il est nécessaire d'employer d'autres méthodes pour parvenir au couplage. Les méthodes les plus utilisées sont l'excitation par un réseau et par un prisme[146]. Nous détaillerons le couplage par prisme car c'est celui qui sera utilisé au cours de ce manuscrit.

Nous avons remarqué que dans l'air $k_{inc} < k_{SP}$ il faut donc trouver un moyen pour augmenter la valeur de k_{inc} pour que $k_{inc} = k_{SP}$ et qu'on ait le couplage des deux vecteurs d'onde. Un des moyens pour y parvenir est d'augmenter l'indice optique (n) du milieu de travail. Le verre étant un matériau à indice de réfraction élevé (n>1,4) il est fortement utilisé, souvent sous forme de prisme.

Il existe deux configurations bien connues pour le couplage du plasmon de surface via un prisme, la configuration de Kretschman (figure 30 a)) et celle de Otto (figure 30 b). Les deux configurations reposent sur le même principe, à savoir la réflexion totale atténuée à l'interface.

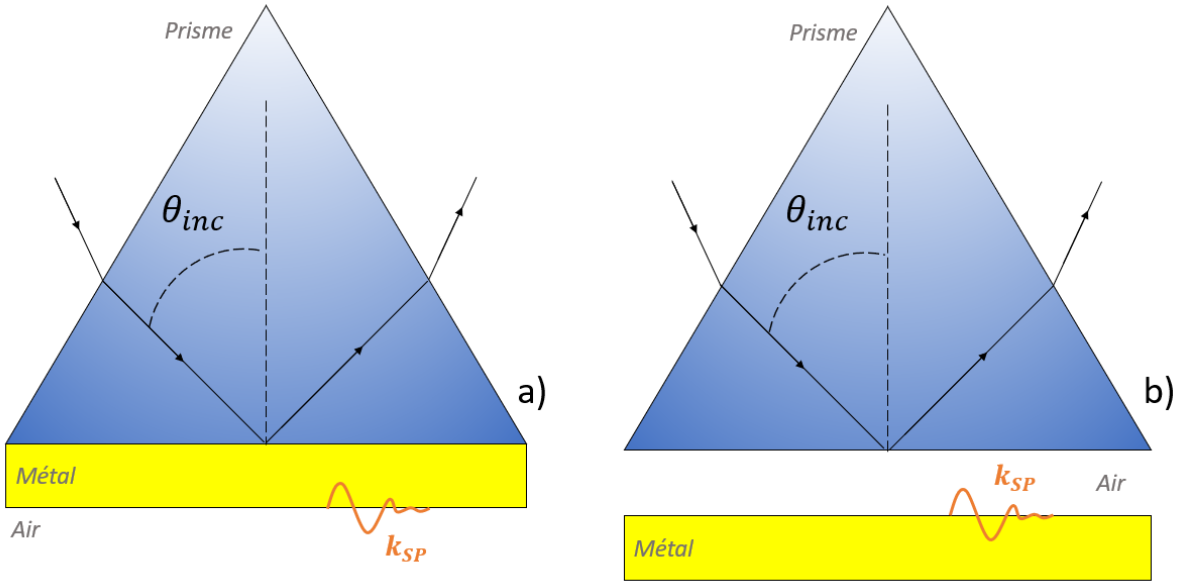

Figure 30. Représentation schématique de la configuration de Kretschmann (a) et Otto (b)

En utilisant la loi de Snell-Descartes qui décrit la propagation d'une onde à l'interface entre deux milieux nous pouvons déterminer un angle pour lequel l'onde incidente est totalement réfléchie. Pour un angle d'incidence (θ_{inc}) égal à l'angle de réflexion totale il y a la formation d'une onde évanescente à l'interface du milieu verre-air (Otto) ou verre-métal (Kretschmann) qui va exciter le plasmon de surface. On arrive donc dans une configuration où $k_{inc} > k_{SP}$ ce qui nous permet de trouver l'angle bien spécifique θ_{inc} pour lequel $k_{inc} = k_{SP}$.

La configuration de Kretschmann est souvent favorisée par rapport à celle d'Otto car elle est plus simple à mettre en œuvre. En effet la configuration d'Otto nécessite de maintenir le métal à une distance inférieure à celle de la longueur d'onde d'excitation ce qui est plus compliqué à faire que de simplement accoler le métal au prisme.

4.3.5 Augmentation de la réponse plasmonique

Il existe plusieurs techniques pour utiliser le plasmon de surface à des fins applicatives telles que la biodétection. Dans ce domaine le but est de détecter avec le plus de précision de petites quantités d'analyte. Les quantités détectables varient énormément en fonction des systèmes utilisés et des analytes à détecter. C'est pourquoi il est nécessaire de réussir à améliorer la réponse d'un biodétecteur plasmonique. Pour ce faire il y a deux possibilités :

- L'amélioration des propriétés intrinsèques du capteur
- Changer les caractéristiques de la surface pour maximiser l'adsorption de molécules et faciliter leur accès au capteur.

4.3.5.1 Les propriétés intrinsèques

La réponse d'un système SPR peut être exprimée en fonction de la longueur d'onde ou de l'angle d'incidence et dépend entièrement du changement d'indice de réfraction à la surface du métal utilisé. Jung et al.[147] donnent une formule pouvant transcrire la réponse SPR notée R en fonction de la

variation de l'indice de réfraction (Δn) à l'interface en fonction du facteur de sensibilité du capteur m. La réponse R s'écrit donc :

$$R = m \cdot \Delta n = m \cdot (n_{eff} - n_s) \tag{35}$$

Pour un système SPR de type « double couche » (Figure 31)

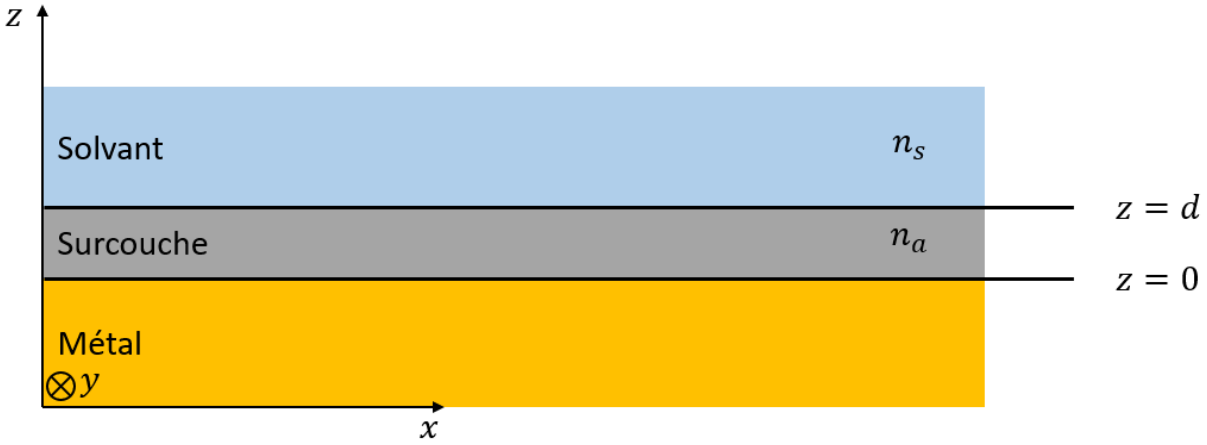

Figure 31. Schéma d'un système SPR bicouches. Une première (en gris) étant une couche au-dessus du métal, la seconde (en bleu) est le solvant contenant l'analyte. Chaque couche a son indice de réfraction respectif n_s et n_a. L'épaisseur entre le métal et le solvant est d.

Avec n_{eff} l'indice de réfraction moyen pondéré entre n_a et n_s étant quant à lui l'indice de réfraction du solvant analysé. L'onde évanescente décroit exponentiellement dans le milieu avec une longueur de décroissance (de l'anglais « decay lenght ») l_d. On a donc une décroissance selon l'axe z au-dessus du métal de la forme $[e^{-(\frac{z}{l_d})}]^2$. La longueur de décroissance est directement reliée à la longueur de pénétration δ par $\delta = 2l_d$.

L'indice de réfraction n_{eff} peut être calculé par l'intégrale :

$$n_{eff} = \left(\frac{2}{l_d}\right) \int_o^\infty n(z) e^{-\left(\frac{2z}{l_d}\right)} dz \tag{36}$$

Avec $n(z)$l'indice de réfraction pour une certaine hauteur z.

Pour un système bicouche comme représenté sur la figure 31 nous avons $n(z) = n_a$ pour $0 < z < d$ et $n(z) = n_s$ pour $d < z < \infty$. Dans ce cas l'intégrale (36) admet une solution du type :

$$n_{eff} = n_a + (n_a - n_s) \cdot \left[1 - e^{-\left(\frac{2d}{l_d}\right)}\right] \tag{37}$$

La réponse SPR R devient donc

$$R = m \cdot (n_a - n_s) \cdot \left[1 - e^{-\left(\frac{2d}{l_d}\right)}\right] \tag{38}$$

Nous pouvons donc augmenter la réponse SPR en jouant sur deux facteurs : $l_d$et m.

l_d étant directement reliée à la longueur de pénétration il est possible de l'augmenter en utilisant des matériaux avec une permittivité diélectrique ε_2 plus importante.

Jung et al.[147] présentent également la réponse SPR pour un modèle multicouche (Figure 32).

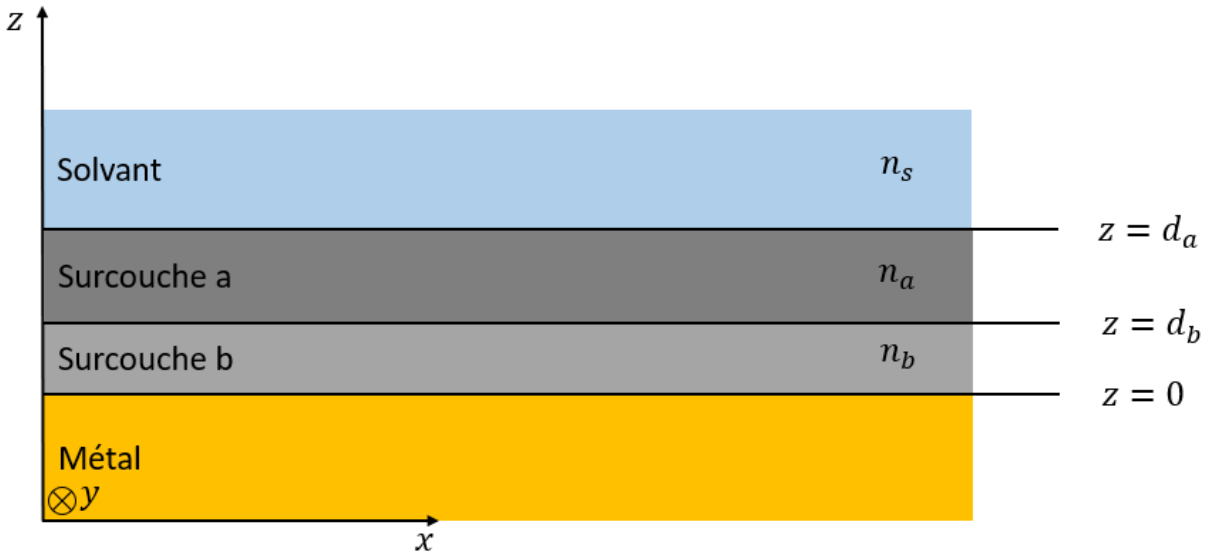

Figure 32. Schéma d'un système SPR tri-couches. Une première (en gris clair) étant une couche au-dessus du métal, la seconde (en gris plus foncé) est la deuxième couche et pour finir la troisième (en bleu) correspond aux solvants contenant l'analyte. Chaque couche a son indice de réfraction respectif n_s, n_a et n_b.

Les détails des équations sont transcrits dans les recherches de Jung et al.[147]. Nous avons une réponse SPR de la forme :

$$R = m \cdot (n_a - n_s) \cdot \left[1 - e^{-\left(\frac{2d_a}{l_d}\right)}\right] \cdot e^{-\left(\frac{2d_b}{l_d}\right)} \tag{39}$$

Les équations (38) et (39) sont semblables et différent uniquement du facteur $e^{-\left(\frac{2d_b}{l_d}\right)}$. La réponse est réduite par ce facteur. Si l'épaisseur de la surcouche b est nettement inférieure à celle de la surcouche a, son influence dans la réponse SPR est presque négligeable. Au contraire, si la surcouche b est grande on a une nette réduction de la réponse.

Aux vues de l'influence des surcouches déposées sur la surface du métal, plusieurs études ont été effectuées pour trouver des combinaisons entre métaux et surcouches pour avoir la meilleure sensibilité possible. Ici nous nous intéressons principalement aux systèmes utilisant la configuration de Kretschmann. Une liste non exhaustive est fournie dans le tableau 2.

Tableau 2. Récapitulatif des performances SPR pour différents types de surcouches déposées sur un métal plasmonique.

Métal	Caractéristiques	Indice de réfraction (n)	Angle de résonance (°)	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Sensibilité (m)	Référence
Au	$Ti_3C_2T_x$	1,33	72,5	633	198°/RIU	[148]
	SiO_x	1,48	72,28	NC	139°/RIU	[149]
	SnO_2	1,91	76,16	NC	151°/RIU	[149]
	Graphène	3	54,6-58,8	NC	121,67°/RIU	[150]
	Fe_2O_3-Au-Fe_2O_3	2,918+i0,029	37,98	633	171°/RIU	[151]
	ZnO	NC	NC	633	0,091°/ppm	[152]
Ag	Film organique	1,33	NC	633	127,26°/RIU	[153]
	TiO_2	2,5	NC	633	NC	[154]
GZO	graphène	1,33-1,34	64,54	NC	366,7°/RIU	[155]
Cu	Fe_2O_3-carbone	1,35	84	NC	434°/RIU	[156]
Al	MoS_2	5,08	NC	633	214,8°/RIU	[157]
	$MoSe_2$	4,62	NC	633	210,1°/RIU	
	WS_2	4,89	NC	633	315,5°/RIU	
	WSe_2	4,55	NC	633	286,30/RIU	

Le tableau 2 nous montre différents systèmes qui ont été expérimentés par différents auteurs pours lesquels on obtient une meilleure performance du capteur lorsqu'une ou plusieurs couche(s) sont déposées à la surface du métal plasmonique.

Il existe d'autres types de capteurs basés sur la nanostructuration de surface, mais également des biocapteurs utilisant des nanoparticules comme vecteur pour augmenter la sensibilité. La plupart de ces capteurs utilisent les nanoparticules pour concevoir des biocapteurs de type « sandwich ». Dans ce cas de figure le métal plasmonique est directement fonctionnalisé avec le récepteur, tout comme les nanoparticules qui sont dispersées en solution. L'analyte s'adsorbe ensuite sur la surface et les nanoparticules avec le récepteur viennent ensuite se greffer sur la surface et changer les propriétés optiques du système. Wang et al.[158] utilisent des nanoparticules magnétiques (MNP) pour la détection d'hormones chorioniques gonadotropes humaines. Leur système semble complexe à mettre en place, il inclut également un aimant pour attirer les MNP à la surface pour engendrer une détection. Ferreira et al.[159] utilisent un système semblable mais avec des nanoparticules d'or. Ce type de système est bien plus complexe à mettre en place que le dépôt d'une surcouche sur un métal plasmonique. Mais les nanoparticules ont un intérêt tout particulier. Outre l'augmentation de la sensibilité du capteur, elles augmentent également la surface spécifique accessible aux analytes. Il y a donc des avantages à concevoir des bio-capteurs basés sur des nanoparticules à indice de réfraction élevé. C'est notamment ce que Mathias Dolci a effectué au cours de sa thèse[160] et ce sont sur ces travaux que nous nous baserons par la suite.

4.3.5.2 Limite de détection

La limite de détection (« LoD : Limit of detection) est définie comme étant la concentration la plus faible pouvant être détectée par une méthode analytique. C'est un facteur important pour déterminer de l'efficacité d'un biocapteur. Il y a une large différence entre les limites de détection en fonction du type de capteur mais également des analytes. Il existe deux grandes familles de biocapteurs, celle utilisant des labels et celle sans label. Un label est une molécule qui est chimiquement attachée à la molécule cible. Un des exemples les plus connus sont les marqueurs fluorescents. D'après la littérature les biocapteurs utilisant des labels ont une limite de détection plus faible du fait de la taille des objets détectés. En effet, un objet de taille plus importante va modifier l'indice de réfraction du milieu et donc la réponse SPR. Certains biocapteurs peuvent détecter des analytes très dilués en solution, de l'ordre du femto molaire (fM). Le tableau 3 donne quelques exemples de limite de détection pour des biocapteurs visant à détecter de la streptavidine.

Tableau 3. Liste non exhaustive de certains types de biocapteurs de streptavidine avec leur limite de détection.

Type de capteur	LoD	Utilise des label ?	Référence
Au nanoparticules	5 nM	Non	[161]
Au nanorods	2 nM	Non	[161]
Au nanorods unitaire	1 nM	Non	[162]
Gold surface	10 nM	Non	[163]
Au nanoparticules (sandwich)	6-7 nM	Non	[164]
Au nanorods	0,42 nM	Oui	[165]
Au nanoparticules	1 ng/mL	Oui	[166]
Au nanoparticules	0,83 nM	Oui	[167]
Au nanoparticules	211-989 fM	Oui	[168]
Au nanoparticules	pg/mL	Oui	[169]
Au nanoparticules (sandwich)	0,1 nM	Oui	[170]
Au nanoclusters	5 pg/mL	Oui	[171]

Nous pouvons remarquer que pour des biocapteurs utilisant des nanoparticules d'or la limite de détection peut varier de plusieurs ordres de grandeur passant du nano molaire au femto molaire. Cela est dû à la labélisation des analytes et à la taille des analytes qui peuvent être très différentes.

Pour des capteurs sans label, ce qui est notre cas, la limite de détection est entre 1 et 10 nM.

4.3.5.3 Les propriétés de surface

Nous avons vu dans la partie précédente que nous pouvions jouer sur les propriétés des matériaux et donc les propriétés intrinsèques du capteur pour augmenter sa sensibilité de détection des analytes. Il est également possible de jouer sur la nanostructuration du bio-capteur par voie chimique pour augmenter l'accessibilité de la surface des nanoparticules. En effet la détection de grosses molécules (plusieurs dizaine de kDa) telles que les protéines ou les enzymes engendre de l'encombrement stérique[172–174].

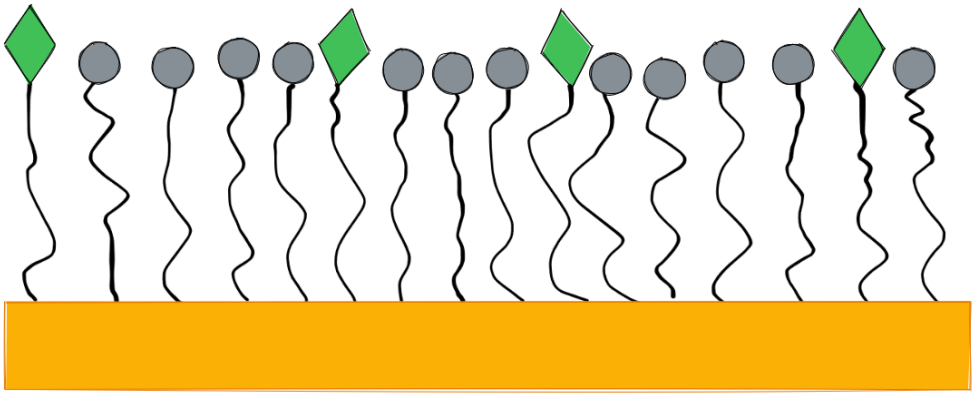

Figure 33. Représentation schématique d'une SAM avec les récepteurs (en vert) et les espaceurs (en gris). Le métal plasmonique est représenté en jaune.

Perez-Luna et al.[175] ont montré que dans le cas du couple biotine/streptavidine il fallait espacer la biotine pour que la streptavidine puisse accéder à la surface plus facilement (figure 33). L'ajout d'espaceurs limite la gêne stérique entre les molécules réceptrices et permet aux analytes d'accéder plus facilement à la surface. Wang et al[176] ont montré que rallonger les espaceurs pouvait également réduire l'encombrement stérique.

4.4 Biocapteurs SPR basés sur les nanoparticules d'oxyde de fer

Nous avons vu que les matériaux non plasmoniques couplés aux métaux plasmoniques excités par une onde électromagnétique augmente fortement les capacités de détection des biocapteurs. L'oxyde de fer en couche mince a été expérimenté pour la détection[151,177]. Les nanoparticules sont également utilisées pour la détection mais surtout couplées avec l'utilisation de labels[158,178–180]. En effet, lorsque l'analyte n'est pas couplé avec une nanoparticule, le changement d'indice perçu n'est pas assez élevé pour générer une réponse suffisante. Les nanoparticules à haut indice de réfraction sont là pour palier à ce problème et augmenter la sensibilité.

Les travaux antérieurs au sein de l'équipe ont pu mettre en avant l'influence positive des nanoparticules sur la résonance plasmon de surface[167] (figure 34).

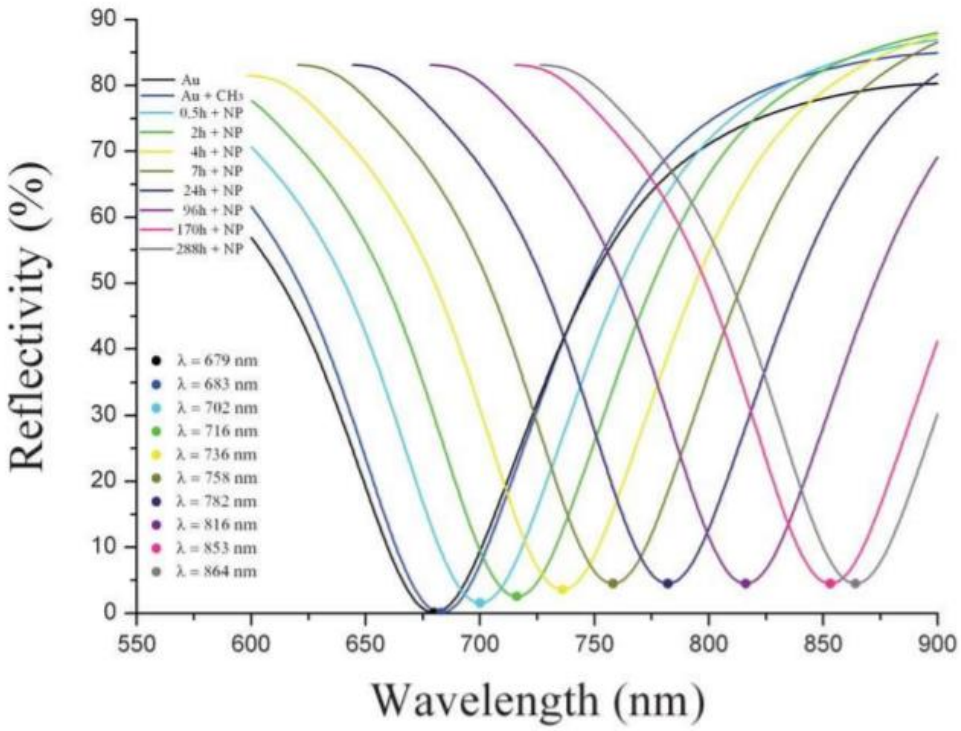

Figure 34. Mesures SPR sur des SAMs après une exposition à des nanoparticules d'oxyde de fer[167].

Plus la surface est recouverte de nanoparticules plus la longueur d'onde de résonance plasmonique est décalée vers des longueurs d'ondes élevées ce qui va jouer positivement sur la réponse du biocapteur.

Au cours de sa thèse Mathias Dolci a repris ce principe pour concevoir un bio-capteur plasmonique en utilisant la stratégie d'assemblage CuAAc clic pour immobiliser les nanoparticules à la surface de l'or. Il a étudié l'influence de la densité des assemblages pour la détection de biomolécules et a montré que la meilleure était obtenue avec des films denses de nanoparticules.

Les nanoparticules ainsi greffées donnent une base solide pour le greffage d'autres molécules. Les premiers essais de bio-détection ont été effectués avec le couple biotine/streptavidine. Les résultats étaient prometteurs. Cependant la détection spécifique n'avait pas été étudiée dans ces travaux la détection spécifique est l'un des points clés d'un biocapteur.

Au cours de cette thèse nous essayerons de palier aux problèmes d'adsorption non spécifiques pour le couple biotine/streptavidine. Nous utiliserons la BSA (« Bovine serum albumine ») pour tester la spécificité du biocapteur conçu avec la biotine comme bio-récepteurs.

5 Dénaturation des protéines, régénération des capteurs

La conception des biocapteurs peut être longue et couteuse. Les différentes étapes de synthèse peuvent durer plusieurs heures. Si l'on ajoute à cela le coût des matériaux utilisés il semble avantageux de régénérer les biocapteurs en désorbant les analytes adsorbées sur le bio-capteur. Le tableau 4 donne l'estimation du prix pour la conception de l'un des capteurs réalisés au cours de cette thèse.

Tableau 4. Exemple du cout estimé de revient pour la conception d'un biocapteur pour l'α-mannosidase. L'estimation prend en compte les couts des précurseurs lors des synthèses et du travail humain. Les couts d'infrastructures et de caractérisation ne sont pas pris en compte.

Produit	Cout (€)
Substrat d'or	40 €
Nanoparticules	5 €
Thiols	5 €
AP12N3	5 €
OEG N3	5 €
DNJ	20 €
Main d'œuvre	50 €
Total	**130 €**

En désorbant la protéine adsorbée à l'aide d'une molécule peu couteuse cela permettrait non seulement de réduire la valeur pécuniaire du capteur mais permettrait également d'avoir un impact environnemental positif. En effet les solvants utilisés lors des réactions de CuAAc clic et lors des purifications des composés synthétisés sont pour la plupart des solvants organiques comme le THF ou le chloroforme.

Pour trouver le meilleur moyen de désorber les protéines des biocapteurs, il est important de comprendre comment sont formées les protéines et quelles sont les liaisons qui lient la protéine au bio-récepteur.

5.1 Les protéines et leur structure

5.1.1 Généralités sur la structure des protéines

Les protéines sont définies comme étant des macromolécules biologiques présentes dans l'organisme et plus précisément dans toutes les cellules vivantes. Une protéine est composée d'une suite d'acides aminés reliés entre eux par des liaisons peptidiques. Il existe 20 acides aminés[182] différents chez l'homme participant à la structure des protéines. Chaque acide aminé adopte des fonctions différentes en fonction de ses propriétés. Les acides aminés peuvent être acide ou basique, hydrophobe ou polaire. Ils sont généralement abrégés avec trois lettres, ou une seule[182].

Les acides aminés se lient les uns avec les autres par des liaisons peptidiques, cette liaison s'effectue entre la fonction amine et l'acide carboxylique du carbone α de l'acide aminé (figure 35).

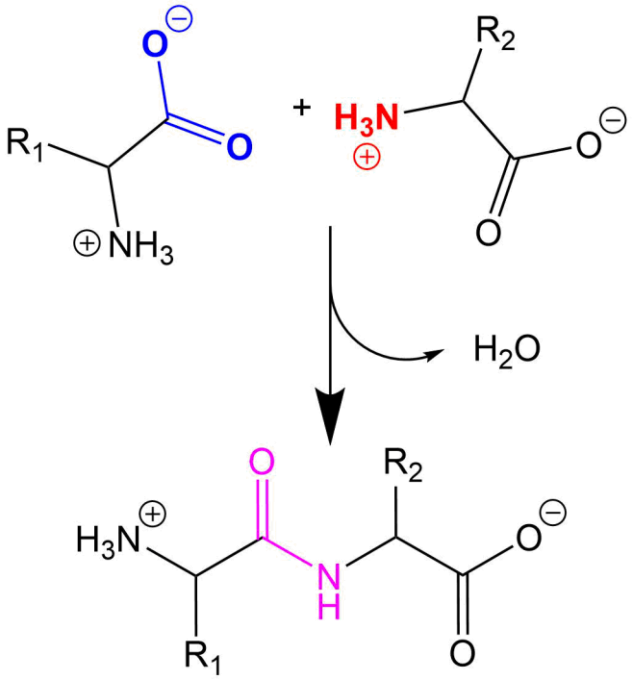

Figure 35. Schéma de la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés.

Une protéine est définie comme une entité avec au moins 100 liaisons peptidiques. Les enchainements des acides aminés ont un impact direct sur la structure en trois dimensions de la protéine et sa fonction. Les liaisons peptidiques vont arranger les acides aminés pour former deux types de configurations que l'on appelle les hélices α et les feuillets β, on appelle cela la structure secondaire. Ces deux types d'enchainements vont eux-mêmes s'assembler en une autre structure que l'on qualifie de tertiaire. Les sous-unités protéiques peuvent elles aussi s'assembler pour former des structures quaternaires. Les structures quaternaires permettent l'incorporation d'autres molécules biologiques ou d'ions métalliques (Figure 36).

Les protéines sont fortement présentes dans les organismes vivants, elles sont le constituant majeur des cellules. Ce qui permet aux protéines de réaliser leurs fonctions biologiques et leur capacité de se lier à d'autres molécules de façon spécifique. Les protéines se lient à d'autres molécules par une région appelée « poche ». Ces poches sont responsables de la fonction de la protéine. C'est la structure tertiaire de la protéine ainsi que la nature des chaines latérales des résidus d'acides aminées qui déterminent la particularité des liaisons.

Les protéines les plus actives dans le domaine du vivant sont les enzymes. Le rôle de cette classe de protéines est de catalyser des réactions chimiques. Dû à la conformation des cavités et donc à la spécificité des résidus d'acides aminés, les enzymes sont très spécifiques et n'interagissent qu'avec peu d'éléments chimiques, ce qui en fait des entités très sélectives. Bien qu'il existe plus d'une centaine des d'acides aminés, seulement quelques-uns interagissent directement avec le substrat et sont donc impliqués dans la catalyse. Les régions des enzymes impliquées dans les réactions catalytiques sont appelées sites actifs.

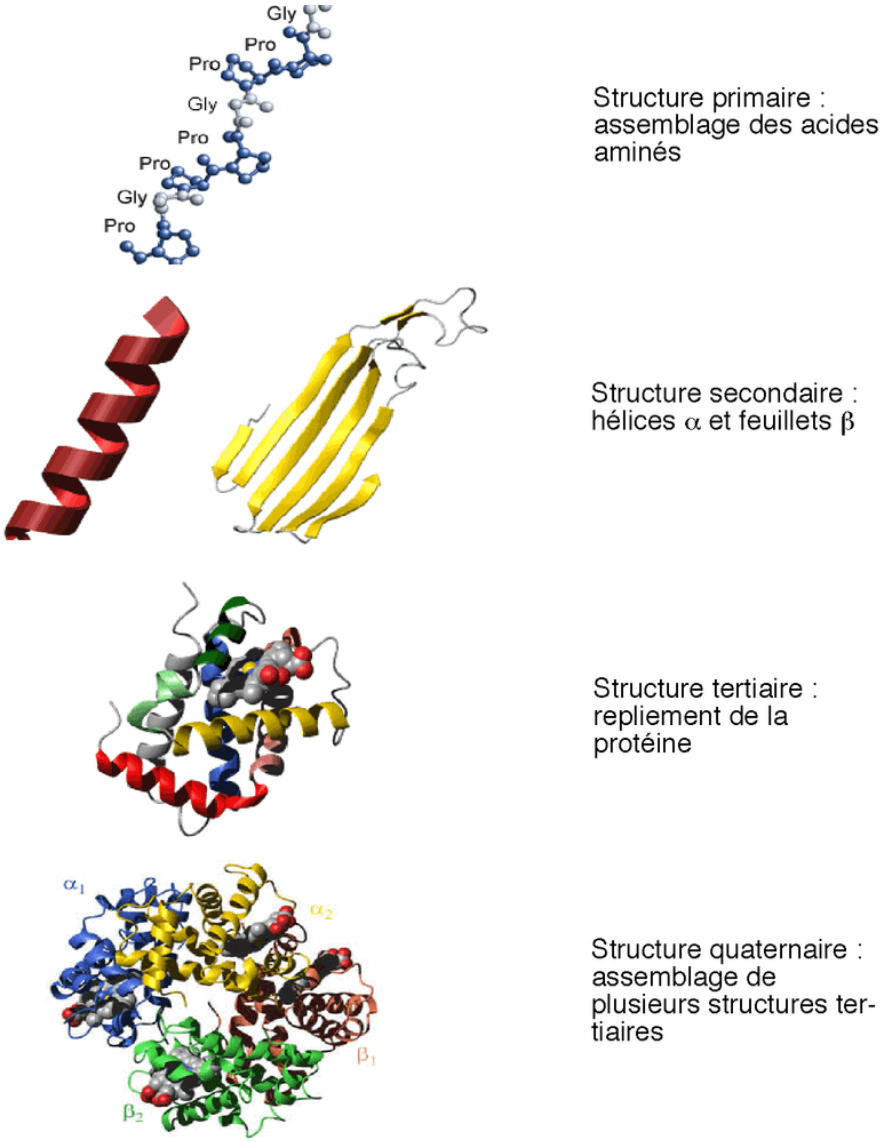

Figure 36. Schéma des structures des protéines[183].

5.1.2 Les métalloprotéines

Une métalloprotéine est une protéine comportant un ou plusieurs cofacteurs métalliques. Ces cofacteurs métalliques jouent parfois un rôle dans la réaction de catalyse de l'enzyme. Les cofacteurs métalliques sont des ions liés aux résidus d'acides aminés des chaines polypeptidiques. Les ions métalliques peuvent jouer deux rôles différents en fonction de leur nature. Les éléments possédant plusieurs états d'oxydation tels que le fer, le cuivre ou bien le manganèse sont présents dans les enzymes et jouent le rôle de catalyseur dans les sites actifs. Certaines fonctions telles que la photosynthèse sont gérées par des metalloenzymes catalysant les composés nécessaires à ces réactions. Ils catalysent les réactions d'oxydo-réduction (oxydoréducatase). Les ions métalliques ont la particularité de stabiliser certains intermédiaires réactionnels lors des réactions catalytiques

Par exemple, le fer présent dans la protéine superoxyde réductase (SOR), intervient dans le processus de catalyse de superoxydes (O_2^-) en composés moins toxiques tel que l'eau oxygénée. (Figure 37)

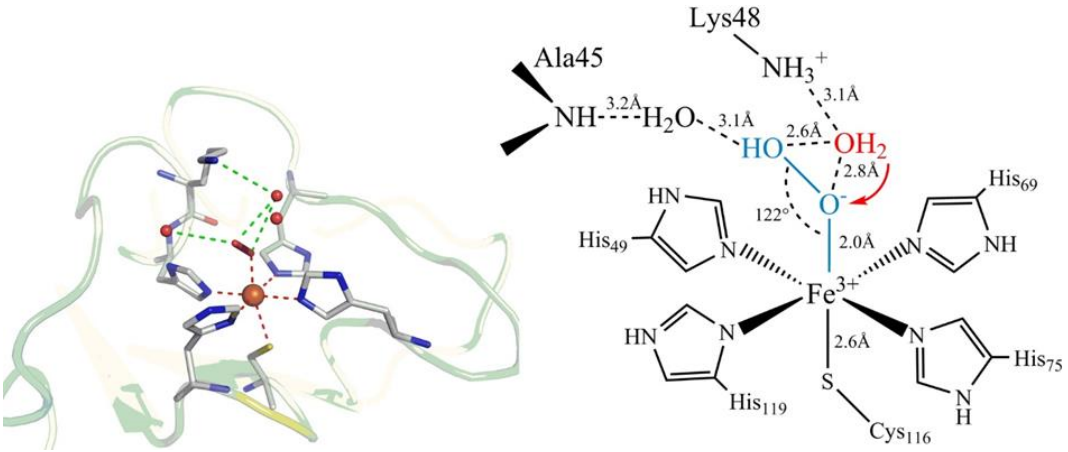

Figure 37. Schéma du site actif de l'enzyme SOR lors du processus intermédiaire de catalyse.

Les ions de fer sont très présents dans les procédés de catalyse dans les systèmes biologiques, c'est par exemple grâce à eux que l'oxygène peut se lier à l'hémoglobine.

Les cations métalliques peuvent avoir une fonction structurale de la protéine. Par exemple les cations de zinc sont capables d'ordonner les chaines polypeptidiques, l'exemple le plus connu est le « doigt de zinc »[184] (figure 38).

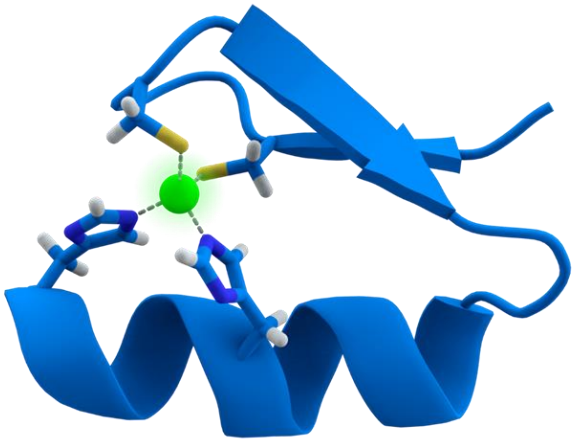

Figure 38. Représentation schématique d'un « doigt de zinc ».

5.1.3 Les liaisons entre protéines et bio-récepteurs

De manière générale, les protéines vont se lier à un ligand (récepteur) grâce aux liaisons ioniques, liaisons hydrogène, et aux forces de van der Waals[185,186]. Les sites actifs vont créer des liaisons spécifiques avec les récepteurs lorsqu'ils sont facilement accessibles. Lorsque les sites actifs sont plus profonds et difficiles d'accès, des liaisons non spécifiques risquent de se former entre le récepteur et la protéine. Dans le cas d'une liaison spécifique entre protéines (ou enzymes), des liaisons non spécifiques peuvent venir renforcer la liaison entre le récepteur et le site actif[187] (figure 39).

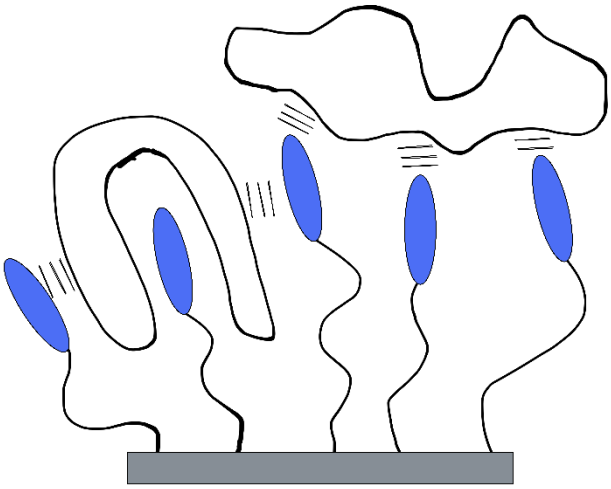

Figure 39. Deux modes de liaisons possibles entre la protéine (objet difforme) et les récepteurs (en vert). A gauche la liaison entre la protéine et le récepteur est renforcée par des liaisons hydrogène (en pointillés). A droite la protéine n'est pas liée spécifiquement aux récepteurs.

L'association entre la protéine et le ligand est souvent réversible et plus ou moins forte suivant le nombre et la nature de liaison. La force de cette interaction est donnée par la constante de dissociation (K_D). Cette force d'interaction varie entre 10^{-6} et 10^{-9} M pour un couple antigène/anticorps. Les couples ayant une affinité très élevée peuvent avoir une constante de dissociation K_D allant jusqu'à 10^{-12} M.

5.1.4 La dénaturation des protéines

On parle d'une protéine dénaturée lorsque celle-ci perd sa conformation tridimensionnelle. Son changement de structure engendre donc un dysfonctionnement de la protéine en elle-même. En effet c'est grâce à sa structure qu'elle possède ses propriétés.

Nous cherchons à régénérer le capteur sur lequel nous avons effectué des mesures pour économiser du temps et également de l'argent. La solution la plus simple semble donc de dénaturer les protéines liées à notre surface pour les désorber et ainsi régénérer notre surface.

Il existe une multitude d'agents dénaturants que nous pouvons classer en deux catégories : les agents physiques et les agents chimiques.

Parmi les agents physiques nous retrouvons la température. Une température élevée cause une agitation thermique de la matière, les liaisons hydrogènes (1-10 kcal.mol^{-1}) essentielles au maintien de la structure tridimensionnelle sont directement impactées. A partir d'une température de 60°C les liaisons hydrogènes les plus faibles commencent à se rompre. Les liaisons hydrogènes ne jouant plus leur rôle la protéine perd sa configuration spatiale et donc son activité.

Dans la catégorie des agents chimique nous retrouvons l'urée, qui a forte concentration à un impact sur les liaisons hydrogènes des protéines. L'urée va former de nouvelles liaisons hydrogènes avec la protéine et ainsi changer sa structure tridimensionnelle. Les acides et les bases changent le pH et influent également sur la structure des protéines. La dénaturation par changement brutal de pH apparait généralement entre 2 et 5 et au-dessus de 10[188]. Les surfactants tels que le SDS (sodium dodecyl sulfate), le polysorbate 80 ou le Triton X-100 vont fortement altérer les milieux aqueux et provoquer des anomalies qui vont faire se dénaturer les protéines. Ils agissent sur les liaisons hydrophobes et électrostatiques des protéines.

L’appareil SPR que nous utilisons (BioNavis) est basé sur un système micro fluidique. Il est donc impossible d’utiliser la température comme moyen pour dénaturer les protéines après leur adsorption, cela pourrait causer des dommages au système. De plus, le faible diamètre des tuyaux ne permettrait pas de garder la solution chaude jusqu’à ce qu’elle rentre en contact avec le biocapteur.

Utiliser des solutions acides n’est pas possible, car une exposition supérieure à quelques minutes de notre surface à une solution acide risquerait de dégrader les nanoparticules d’oxyde de fer très sensible à l’acidité.

Les agents dénaturants privilégiés seront donc les surfactants, et en particulier le SDS connu pour casser les liaisons hydrophobes de la structure tertiaire des protéines[189] et donc changer la structure tridimensionnelle de la protéine.

6 Conclusion

Nous avons vu que l'or possède des propriétés optiques particulières lorsqu'il est sous sa forme nanométrique : la résonance plasmon de surface. Il est possible d'utiliser cette propriété de surface de l'or pour des applications telles que la bio-détection. De plus, l'or est un matériau que nous pouvons fonctionnaliser facilement. Les thiols permettent de former des SAMs à la surface de l'or. En choisissant les groupements fonctionnels adéquats il est possible de greffer d'autres objets à la surface des thiols. Les nanoparticules sont un choix intéressant. En effet, leur forme sphérique augmente la surface spécifique sur laquelle s'adsorbent les analytes. Les nanoparticules d'oxyde de fer, en plus d'apporter un changement topographique de la surface possèdent un indice de réfraction important. La combinaison des différents facteurs tels que l'augmentation de la surface spécifique et le changement d'indice de réfraction combinés augmentent la réponse SPR. L'augmentation de la réponse permet donc une détection de quantités plus faibles.

La réaction de chimie clic CuAAc semble être une bonne solution pour assembler des nanoparticules sur une surface et obtenir un assemblage robuste. La chimie clic est un outil versatile offrant un large choix de molécules que nous pouvons greffer de manière covalente.

Chapitre 2 – Synthèse, fonctionnalisation et assemblage des nanoparticules d'oxyde de fer

1 Synthèse et caractérisation des nanoparticules

1.1 La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules (NPs) ont été synthétisées par la méthode de décomposition thermique[190]. Cette méthode consiste en la décomposition d'un précurseur métallique dans un solvant à haute température d'ébullition (environ 300°C) en présence d'un agent stabilisant. L'agent stabilisant permet : (i) de contrôler la cinétique de décomposition du complexe métallique, (ii) d'obtenir des suspensions de nanoparticules stables dans des solvants. Il est important de notifier que la stabilité colloïdale en milieu organique va jouer un rôle clé lors des assemblages des NPs sur des surfaces en tant qu'objet individuel.

En jouant sur les paramètres de synthèse tels que le solvant, la température ou bien la quantité d'agent stabilisant, il est possible de modifier la taille et l'aspect des nanoparticules. Il est ainsi possible d'obtenir des NPs sphériques allant de 5 à 20 nm, des particules cubiques de 10 à 20 nm[191,192] ou encore de particules cœur coquille[193]. Par la suite nous utiliserons uniquement des particules sphériques de 10 nm.

1.2 La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 10nm

Les NPs de 10 nm de diamètre ont été très largement étudiées dans le laboratoire, conférant ainsi au protocole une nette reproductibilité. [13,14,194,195] Elles ont été synthétisées en décomposant un précurseur de stéarate de fer 2 (2,2 mM). Le stéarate de fer est composé d'un ion de Fe^{2+} coordonné à deux molécules de stéarates $CH_3(CH_2)_{16}COOH$. La décomposition thermique s'effectue dans 20 ml de dioctyl éther, un solvant à haute température d'ébullition (T_b=288°C). Le tout en présence d'acide oléique (4,44 mM) jouant le rôle de stabilisant pour réguler les étapes de nucléation et de croissance des nanoparticules[196]. Le mélange est placé dans un ballon chauffé à 120°C pendant 30 minutes pour enlever les éventuelles traces d'eau ou d'autres solvants et pour permettre la dissolution des réactifs. À la suite de cette première étape le milieu réactionnel est ensuite placé sur un montage à reflux. Il est chauffé par le biais d'un chauffe ballon à 320°C avec une rampe de 5°C/min pendant 2 heures. Nous noterons le passage d'une couleur orangée à noire lors de la réaction. L'étape finale de la réaction consiste simplement à laisser refroidir la solution. Nous obtenons au final de cette synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm stabilisées par l'acide oléique adsorbé à leur surface (NP@AO).

1.2.1 Purification des nanoparticules

Il est nécessaire de passer par une étape de purification des nanoparticules pour retirer l'excès d'acide oléique, le stéarate de fer n'ayant pas réagi et d'éventuels produits secondaires se sont formés lors des différentes phases de la décomposition thermique. L'acide oléique conférant aux nanoparticules leur stabilité colloïdale en solution il doit néanmoins demeurer en quantités suffisantes.

La purification des nanoparticules est simple à mettre en œuvre, elle consiste à centrifuger le produit de la réaction pour faire précipiter les nanoparticules. Pour favoriser la séparation des nanoparticules

de la solution un mélange de solvants avec des polarités différentes a été utilisé. D'une part, le chloroforme est utilisé pour son affinité avec les nanoparticules couvertes d'acide oléique, d'autre part pour solubiliser l'acide oléique libre et les précurseurs nous utilisons un solvant tel que l'acétone. Les nanoparticules sont diluées dans ¼ de chloroforme, nous complétons avec ¾ d'acétone (équivalents volumiques). Le mélange est ensuite centrifugé 5 minutes à 14000 tour/minute pour séparer les nanoparticules du reste de la solution. Cette étape est répétée plusieurs fois et son évolution est suivie par spectroscopie infra-rouge.

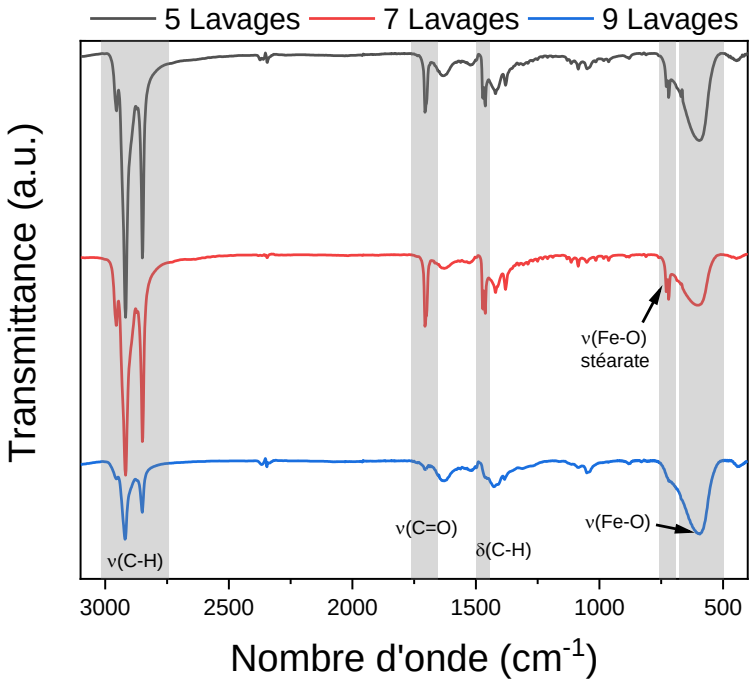

Figure 40. Spectre infrarouge des échantillons obtenus après différents lavages successifs opérés par centrifugation.

Le suivi par infra-rouge nous montre les bandes caractéristiques des différentes étapes de lavages (figure 40). Le spectre infrarouge des nanoparticules après 3 lavages est caractéristique des nanoparticules avec de l'acide oléique en surface. La bande étalée entre 400 et 800 cm^{-1}, centrée à 600 cm^{-1}, est caractéristique des liaisons ν(Fe-O) de l'oxyde de fer. Les deux bandes fines situées à 2920 et 2850 cm^{-1} correspondent aux liaisons C-H dans les groupements CH_2 (ν_{as}(C-H) et ν_s(C-H) respectivement). Les liaisons C-H sont dues à l'acide oléique (libre ou non) ou bien au stéarate de fer résiduel. Nous pouvons apercevoir aux alentours de 720 cm^{-1} un épaulement de la bande correspondante à la liaison ν(Fe-O). Cette bande correspond au Fe-O du stéarate de fer non décomposé[197]. Nous pouvons observer la présence de l'acide carboxylique greffé sur les nanoparticules via les bandes ν_s($CO\text{-}O^-$) et ν_{as}($CO\text{-}O^-$) à 1380 et 1640 cm^{-1} respectivement. Les molécules d'acide oléique libre en solution sont reconnues grâce à la bande à 1700 cm^{-1} correspondant au liaisons ν_{as}(C=O).

Pour confirmer la purification des nanoparticules d'oxyde de fer par centrifugation nous suivons l'évolution du rapport entre les bandes caractéristiques des liaisons C-H à 2920 et 2850 cm^{-1} par rapport à celle des liaison Fe-O qui est centrée à 600 cm^{-1}. De plus nous, contrôlons également l'évolution du rapport entre la bande ν_{as}(C=O) de l'acide oléique libre par rapport à la bande ν(Fe-O) à 600 cm^{-1} et le rapport entre la bande à 720 cm^{-1} du stéarate de fer et la liaison ν(Fe-O) des

nanoparticules. Les bandes ν_{as}(C=O) de l'acide oléique libre et ν(Fe-O) du stéarate perdent en intensité après chaque lavage.

Tableau 5. Rapport des bandes obtenues par spectroscopie IR entre les liaisons ν(C-H), ν(Fe-O) du stéarate et ν(C=O) par rapport à la liaison ν(Fe-O) des nanoparticules à 600 cm-1.

Nombre de lavages	ν(C-H)/ν(Fe-O)	ν(Fe-O)stearate/ν(Fe-O)NP	ν(C=O)/ν(Fe-O)
5	3,03	0,52	0,66
7	4,52	0,88	1,41
9	0,89	0,08	0,11

On peut remarquer que, plus le nombre de lavages augmente plus le rapport ν(C-H)/ν(Fe-O) et ν(C=O)/ν(Fe-O) tend à diminuer. La purification des nanoparticules est considérée comme effective lorsque le ratio entre les bandes C-H (2920 et 2850 cm^{-1}) et Fe-O (centré à 600 cm^{-1}) avoisine 1. On constate généralement que les nanoparticules sont propres après 10 lavages. Dans le cas présent 9 lavages sont suffisants. Lorsque le nombre de lavages est trop important la stabilité colloïdale des nanoparticules est compromise du fait du retrait de l'acide oléique.

1.2.2 Les caractérisations structurales des nanoparticules

1.2.2.1 Taille et morphologie des nanoparticules

La microscopie électronique en transmission (en anglais « transmission electron microscopy » : TEM) nous a permis d'imager et de déterminer la distribution en taille des nanoparticules (figure 41-b) qui a été calculée en mesurant plus de 300 nanoparticules avec le logiciel ImageJ (figure 41 a).

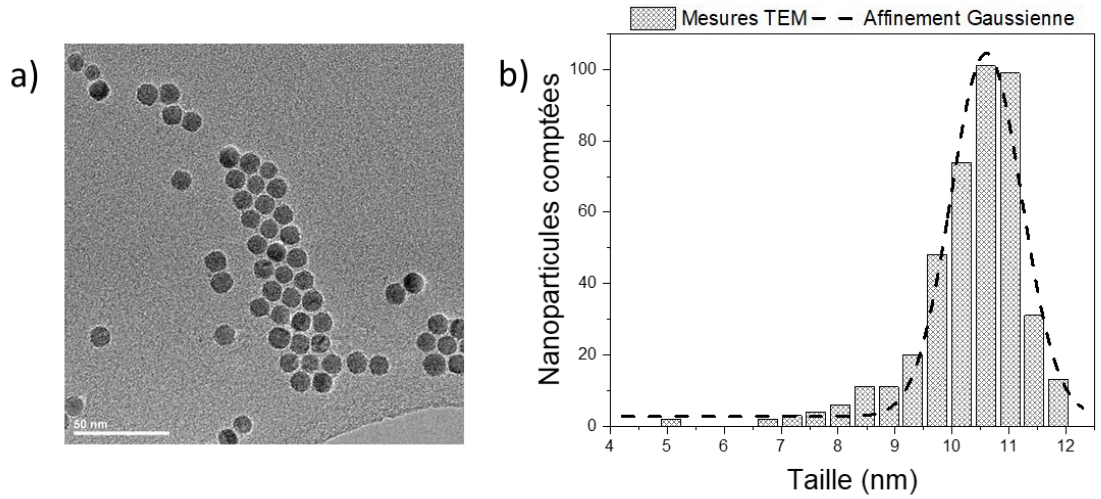

Figure 41. Images TEM de nanoparticules d'oxyde de fer avec de l'acide oléique en surface (a). La distribution en taille mesurée par TEM des nanoparticules affinée avec une gaussienne (b).

Les nanoparticules ont une distribution en taille de 10,3 ± 1 nm et présentent une morphologie sphérique. Nous pouvons néanmoins observer la présence de légères facettes en raison de la croissance des nanoparticules s'effectue selon des plans cristallins.

1.2.2.2 Stabilité colloïdale des nanoparticules par granulométrie

L'obtention de solution de nanoparticules colloïdales stables dans le temps est essentielle pour les utiliser en tant qu'objet individuel notamment pour contrôler la structure de leur assemblage sous la forme de monocouche. La stabilité colloïdale a été étudiée par granulométrie (DLS : « Diffraction Light Scattering ») pour déterminer la distribution de leur diamètre hydrodynamique, qui est le diamètre comprenant le ligand autour des nanoparticules (figure 42).

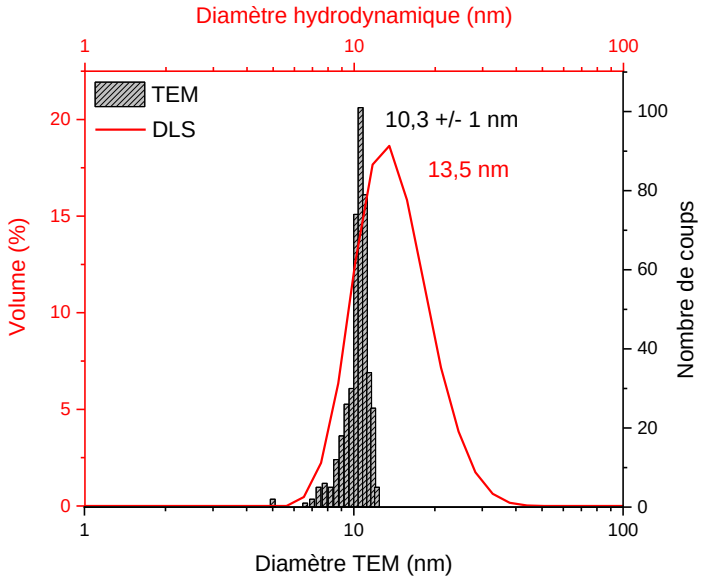

Figure 42. Diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'oxyde de fer avec acide oléique superposé à la taille mesurée avec les images TEM.

Le diamètre hydrodynamique a été mesuré dans les THF (tétrahydrofurane) car c'est le solvant dans lequel nous conservons les nanoparticules en vue de leur assemblage. On remarque que la distribution hydrodynamique est centrée à 13,5 nm. Cette faible disparité est en accord avec les mesures TEM précédentes indiquant une seule population de nanoparticules mono-disperses. Nous constatons une légère augmentation du diamètre comparé aux mesures TEM. Cette faible différence est due au fait que le diamètre hydrodynamique inclus également les molécules d'acide oléique à la surface des nanoparticules, contrairement aux mesures TEM qui permettent de voir que la nanoparticule d'oxyde de fer. Nous avons donc une différence d'environ 3 nm entre les mesures TEM et DLS correspondant aux molécules d'acide oléique (1,5 à 2 nm) de part et d'autre de la nanoparticule. Toutefois la faible distance entre les nanoparticules d'oxyde de fer observées sur la figure 41 a) permet d'attester de la présence d'acide oléique à la surface des nanoparticules.

1.2.2.3 Caractérisation structurale des nanoparticules

La structure des nanoparticules a été caractérisée par diffraction des rayons X (RX) afin de déterminer leur composition chimique et leur phase cristalline ainsi que les paramètres de maille de l'oxyde de fer formé et la taille moyenne des domaines de diffraction.

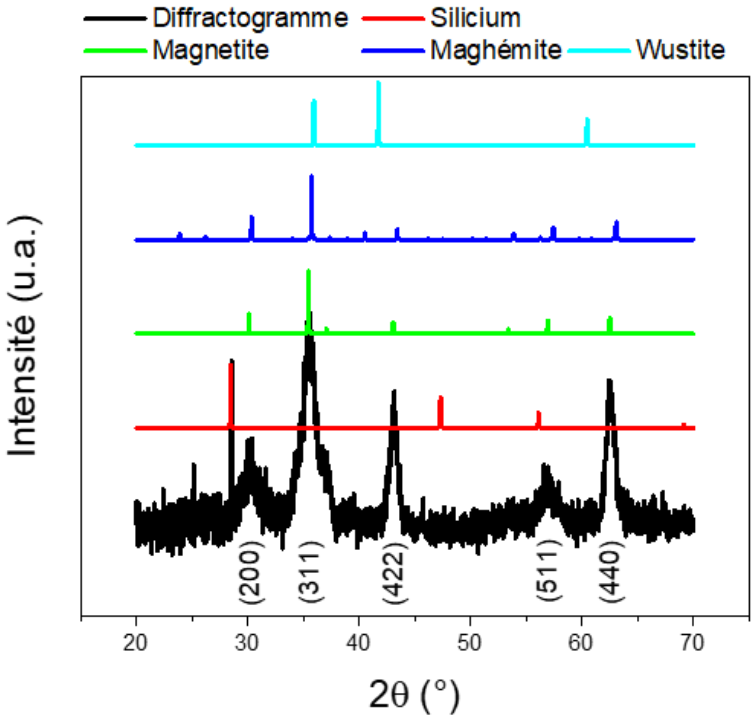

Figure 43. Diffractogramme RX des nanoparticules d'oxyde de fer de 12 nm

Les pics fins sont dus au silicium utilisé pour calibrer le diffractogramme (figure 43 courbe rouge). Les raies de diffraction correspondent à la structure spinelle. Afin de différencier les raies de diffraction de la magnétite (Fe_3O_4) et de la maghémite (γ-Fe_2O_3) nous devons calculer le paramètre de maille. En effet les deux raies sont très proches comme nous pouvons le voir sur la figure 4 et le paramètre de maille de ces deux phases est similaire, a=8,338 Å et a=8,396 Å pour la maghémite et la magnétite respectivement. Le paramètre de maille calculé est a = 8,388 Å. Il est intermédiaire à celui de la maghémite et de la magnétite. Il est néanmoins plus proche de celui de la magnétite car les nanoparticules de petite taille sont plus sensibles à l'oxydation.

2 La fonctionnalisation des nanoparticules et substrats

La méthode d'assemblage utilisée dans cette thèse a été développée et perfectionnée dans notre laboratoire au cours des dernières années[198–200]. Elle se base sur l'interaction de groupements fonctionnels spécifiques à la surface des nanoparticules et d'un substrat. Les substrats sont fonctionnalisés par des monocouches auto-assemblées (SAMs en anglais « Self-assembled monolayers »). L'approche consiste en l'ancrage des nanoparticules fonctionnalisées avec des azotures terminaux et des SAMs avec une terminaison alcyne pour effectuer la réaction de clic CuAAc[57] entre un azoture et un alcyne catalysé par le cuivre (figure 44).

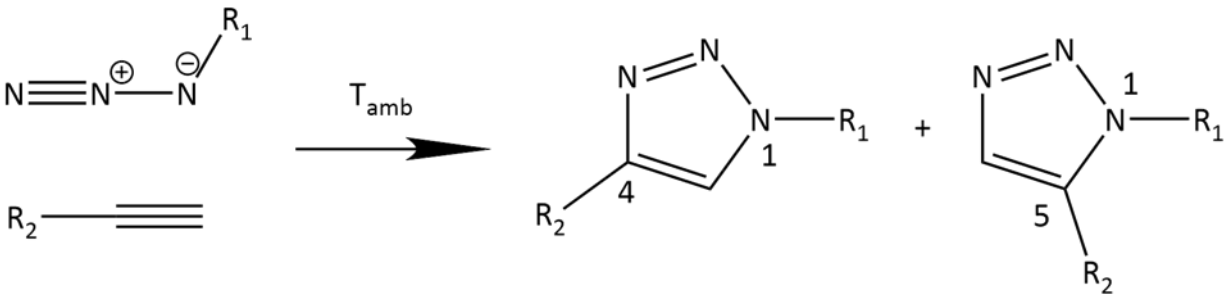

Figure 44. Représentation schématique de la réaction de CuAAc clic.

Nous rappelons néanmoins que cette réaction forme des liaisons covalentes fortes grâce à la formation d'un cycle triazole entre une fonction alcyne et azoture.

2.1 La fonctionnalisation des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm

Les nanoparticules de 10 nm sont fonctionnalisées par de l'acide oléique comme ligand (comme détaillé dans la partie 1.2). Pour pouvoir effectuer la réaction de CuAAc clic sur une surface avec des alcynes il faut les fonctionnaliser avec un ligand comprenant un azoture terminal. Le ligand choisi est le 12-azido-dodecyl-phosphonic acid (abrégé : AP12N3). En effet les liaisons entre l'oxyde de fer et l'acide phosphonique sont plus robustes que celles entre l'oxyde de fer et l'acide oléique[201,202] cela constitue la force motrice pour effectuer le changement de ligand en solution. Du fait que l'acide oléique ne forme pas de liaison forte avec l'oxyde de fer, le changement de ligand est simple à effectuer : l'AP12N3 remplace spontanément l'acide oléique en solution (figure 45). Ce changement de ligand permet d'avoir à la surface des nanoparticules une terminaison azoture pour effectuer des réactions de CuAAc clic (NP@N3). De plus les longues chaines alkyles permettent de stabiliser les nanoparticules dans le THF.

2.1.1 Partie expérimentale

La molécule d'AP12N3 a été synthétisée au laboratoire en suivant le protocole décrit en annexe.

L'échange de ligand est effectué dans le THF. À une solution de nanoparticules nous ajoutons 0,5 mg d'AP12N3 par mg de nanoparticules. La solution est placée sous agitation mécanique pour au moins 24 heures pour s'assurer que l'échange de ligand a bien eu lieu. Les nanoparticules sont ainsi fonctionnalisées avec l'AP12N3. La solution doit être purifiée pour enlever l'acide oléique libre et les éventuel excès d'AP12N3 en solution. Pour ce faire nous utilisons la méthode d'ultrafiltration où la solution est placée dans une chambre pressurisée avec un gaz inerte. La solution est directement filtrée par une membrane en cellulose (30 kDa). Les étapes de purification sont suivies par spectroscopie infrarouge.

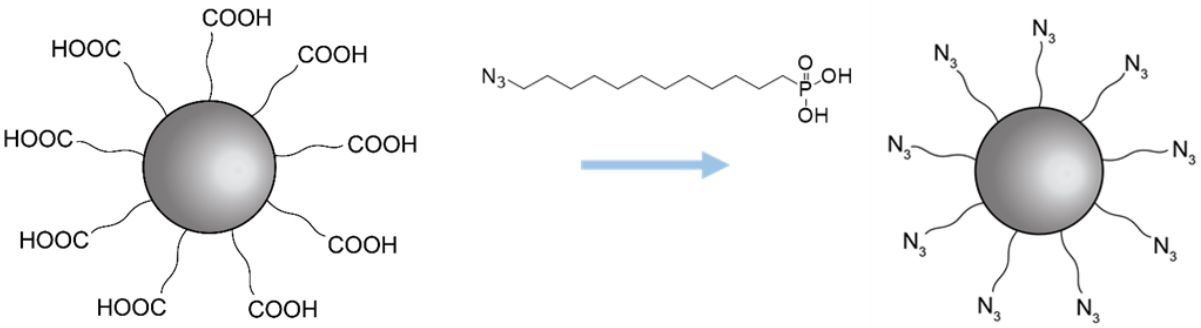

Figure 45. Schéma du changement de ligand des nanoparticules d'oxyde de fer. Passage de l'acide oléique (gauche) à l'AP12N3 (à droite).

2.1.2 Caractérisations des nanoparticules fonctionnalisées

Pour s'assurer que le changement de ligand a bien été effectué, la filtration est suivie par spectroscopie infrarouge (figure 46).

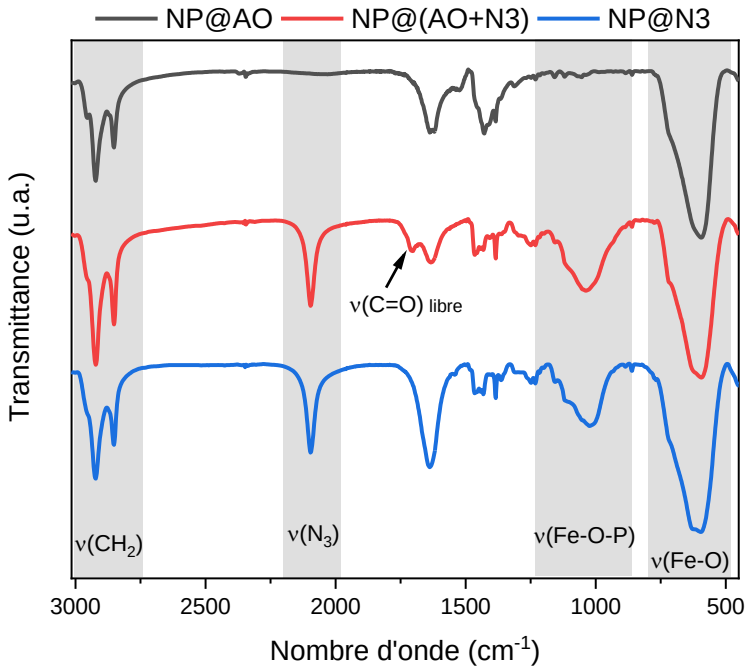

Figure 46. Spectre infra-rouge des nanoparticules propres après synthèse (courbe noire), des nanoparticules fonctionnalisées avec l'AP12N3 avant purification (courbe rouge) et des nanoparticules fonctionnalisées avec l'AP12N3 après ultrafiltration (courbe bleu).

Les trois courbes présentent la liaison ν(Fe-O) (600 cm^{-1}) ainsi que les liaisons ν_s(C-H) ν_{as}(C-H) à 2850 et 2920 cm^{-1}. On remarque une différence notoire entre la courbe rouge et les courbes rouge et violette, nous avons l'apparition d'une bande bien marquée à 2100 cm^{-1} correspondant à la fonction azoture $\nu(N_3)$. Nous constatons l'apparition d'une bande à 1700 cm^{-1} correspondant à la liaison ν(C=O) de l'acide oléique libre en solution. L'acide oléique initialement à la surface des nanoparticules est maintenant en solution car l'AP12N3 forme des liaisons plus fortes avec l'oxyde de fer. La liaison entre

l'oxyde de fer et l'AP12N3 est confirmée par la bande ν(Fe-O-P) à 1020 cm^{-1} que l'on retrouve lors de l'insertion de l'AP12N3 dans la suspension de nanoparticules.

Pour s'assurer de la stabilité colloïdale des nanoparticules après la fonctionnalisation avec l'AP12N3 nous avons effectué des mesures de granulométrie. La granulométrie nous permet de savoir si les nanoparticules restent bien individuelles en solution. Nous pouvons observer sur la figure 47 que nous avons une dispersion monomodale des nanoparticules. Les nanoparticules fonctionnalisées avec l'AP12N3 sont donc stables dans le THF. La valeur moyenne du diamètre hydrodynamique est de 11,7 nm. Cette valeur est légèrement plus faible que celle des nanoparticules avec l'acide oléique obtenue précédemment 13,5 nm, ce qui est dû à la différence entre la longueur de chaine de l'AP12N3 (12 carbones) et l'acide oléique (18 carbones).

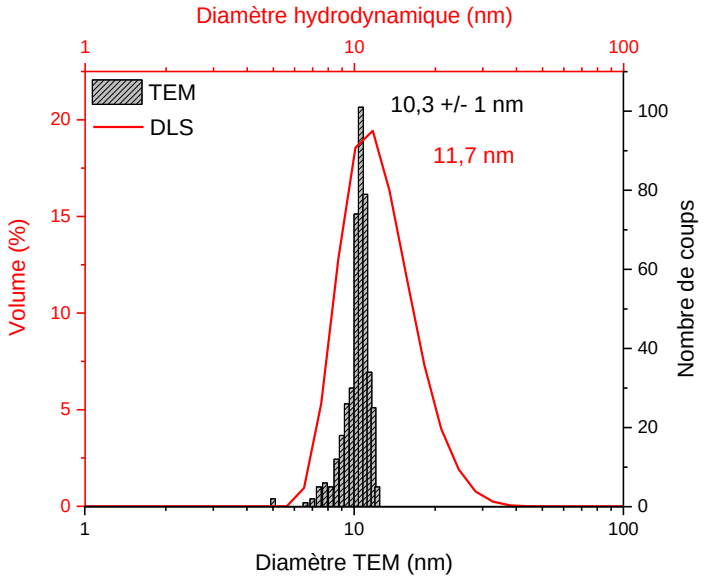

Figure 47. Diamètre hydrodynamique des nanoparticules avec AP12N3 superposé à la taille mesurée avec les images TEM

2.2 Fonctionnalisation du substrat

Une fois les nanoparticules fonctionnalisées avec des azotures il faut s'assurer que les substrats soient à leur tour fonctionnalisés avec des alcynes afin de pouvoir effectuer la réaction de CuAAc clic. Nous avons vu dans la partie 3.1.1 de l'introduction que les molécules comprenant des thiols sont favorisées par leurs interactions avec l'or. De plus, l'or possédant des propriétés plasmoniques, il est très intéressant de l'utiliser pour la suite. Pour ce faire nous avons synthétisé au laboratoire, la molécule nécessaire à la fonctionnalisation des substrats : le undec-10-yne-1-thiol. Par la suite cette molécule sera appelé thiol alcyne. La synthèse est détaillée en annexe.

2.2.1 Fonctionnalisation des substrats et formation des SAMs

Les surfaces d'or sont fonctionnalisées avec le thiol alcyne. Il faut au préalable s'assurer de la propreté de la surface d'or et de sa réactivité avec la molécule de thiol alcyne. Pour cela il existe deux grandes méthodes connues et employées pour nettoyer et activer une surface d'or. La première consiste à

tremper le substrat d'or dans une solution d'acide sulfurique et d'eau oxygénée (mélange piranha). Cette méthode a néanmoins été écartée pour sa dangerosité. La seconde méthode consiste a utiliser un nettoyeur plasma (plasma cleaner) avec un plasma d'oxygène[203]. En effet le plasma d'oxygène va nettoyer la surface et la rendre active et réceptive au molécules thiol de par son oxydation. Nous préparons une solution à 20 mM de thiols alcyne dans de l'éthanol dans laquelle les substrats sont immergés pendant 24h. Après 24 heures l'or est rincé à l'éthanol et passé au bain à ultrasons pendant quelques secondes pour retirer les molécules de thiols alcyne physisorbée en surface. Nous obtenons une surface dense avec des terminaisons alcynes (figure 48).

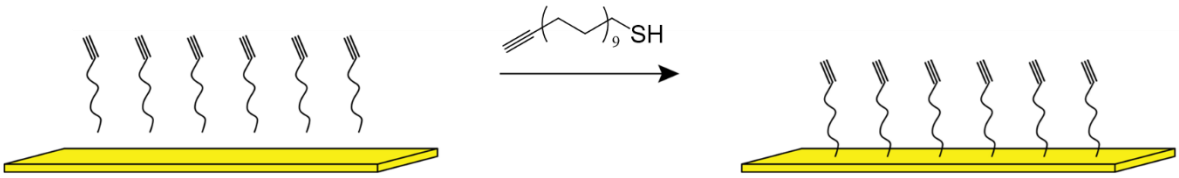

Figure 48. Schéma de l'assemblage des thiols sur la surface d'or.

2.2.2 Caractérisation des SAMs

Nous avons caractérisé les SAMs par ellipsométrie en modélisant la couche avec un modèle à plusieurs couches. Nous avons pris en compte la composition du substrat d'or composé avec une base de silicium, une couche d'accroche de titane de 20 nm et une épaisseur d'or de 80 nm sur laquelle est déposée une couche de undec-10-yne-1-thiol. Les valeurs des indices de réfraction sont répertoriées dans le tableau 6. Il en résulte que la couche de thiols est d'épaisseur de 1,2 ± 0.1 nm correspondant à la longuer de la molécule utilisée. La mesure a été effectuée sur des substrats différents avec dix mesures par substrat.

Tableau 6. Modèle utilisé pour les mesures d'ellipsométrie.

Couche	**Indice de réfraction**	**Epaisseur (nm)**
Silicium	3,8717 + i0,0158	∞
Titane	2,1523 + i2,9238	20
Or	0,1228 + i3,5549	80
SAMs thiols	1.475[204]	1,2 ± 0.1 (mesuré)

3 L'assemblage des nanoparticules par CuAAc

Comme nous l'avons énoncé à plusieurs reprises la méthode qui sera utilisée au long de cette thèse pour l'assemblage de nanoparticules sur un substrat d'or est la réaction de chimie clic CuAAc (Cycloaddition 1,3 dipolaire de Huisgen). Pour simplifier nous appellerons par la suite cette réaction « réaction de chimie clic », « réaction clic », « réaction de CuAAc » ou simplement « clic ». Cette méthode permet le greffage de nanoparticules sur un substrat de manière covalente via une liaison triazole se formant entre le substrat et les nanoparticules. La méthode que nous allons utiliser a été décrite par Moitra et al.[66]. Normalement les réactions de CuAAc clic se passent dans l'eau. Pour conserver la stabilité colloïdale des nanoparticules d'oxyde de fer nous devons travailler dans un

solvant organique (ici le THF). Dans notre cas le catalyseur au cuivre est stabilisé par des ligands triphenylphosphine : [$CuBr(PPh_3)_3$].

Les substrats étant fonctionnalisés avec des alcynes terminaux, et les nanoparticules ayant été fonctionnalisées avec l'AP12N3 il faut maintenant assembler ces deux éléments afin d'obtenir des nanoparticules d'oxyde de fer liées de façon covalente à une surface d'or.

3.1 Partie expérimentale

Les nanoparticules ayant une taille de 10,3 ± 1 nm sont colloidalement stables dans le THF. De plus leur distribution en taille est étroite. C'est donc un bon modèle à étudier pour l'assemblage de nanoparticules sur une surface d'or fonctionnalisée. Le protocole d'assemblage est basé sur les travaux réalisé dans l'équipe[200]. Nous partons d'une suspension stable de nanoparticules d'oxyde de fer (env.10 nm) fonctionnalisée avec l'AP12N3 dans un erlenmeyer rodé. Cette solution de nanoparticules de 7 mg (environ 1mg/mL) est mélangé à un équivalent de 3% de la masse des nanoparticules de [$CuBr(PPh_3)_3$]. Nous ajoutons ensuite de la triméthylamine (0,5 mL) servant d'activateur de la réaction.

Dans cette suspension de nanoparticules dans laquelle nous avons ajouté le catalyseur et l'activateur nous ajoutons un substrat préalablement fonctionnalisé avec des alcynes. L'erlenmeyer est placé sous reflux sous argon dans un bain d'huile à 70°C pour une durée pouvant varier d'une heure à 48 heures.

Il en ressort un substrat d'or recouvert d'une monocouche de nanoparticules (figure 49)

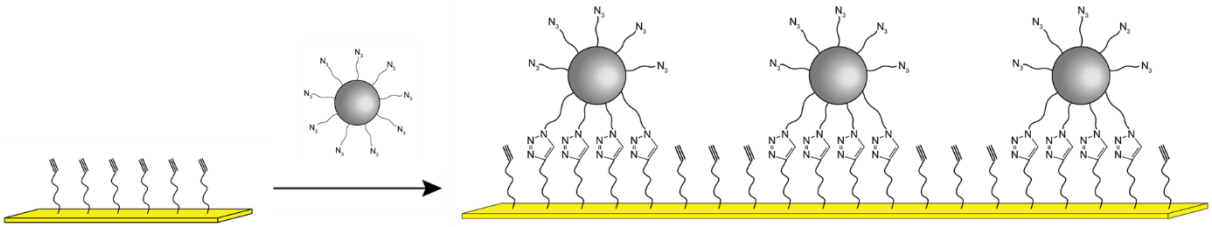

Figure 49. Schéma de l'assemblage des NP@N3 sur la surface de thiols alcynes.

3.2 Caractérisations par MEB des assemblages de nanoparticules

Tous les assemblages de nanoparticules d'oxyde de fer sont caractérisés par MEB. Cette technique nous permet d'avoir un visuel sur nos assemblages de nanoparticules.

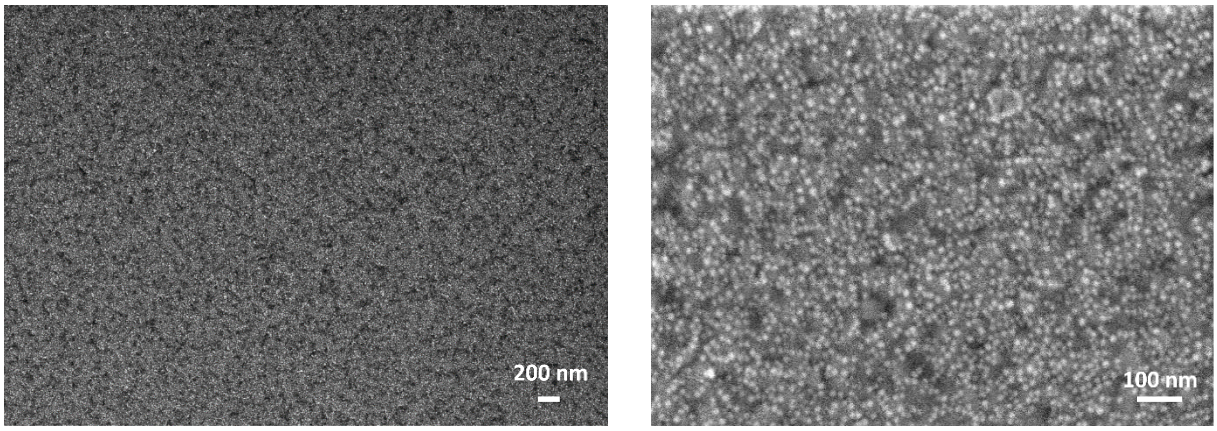

Figure 50. Images MEB d'une monocouche de nanoparticules d'oxyde de fer sur de l'or. À droite avec un grandissement x100000, à droite grandissement x50000

Les deux images MEB (figure 50) nous montrent que les assemblages de nanoparticules sont denses et homogènes.

Lors des synthèses les nanoparticules de 10 nm n'ont pas toujours la même taille. De petites variations de 1 à 2 nm sont observées pour le même mode opératoire. Il faut donc mettre en place un moyen pour normaliser la densité de particule et cela quelle que soit la taille des nanoparticules.

Nous avons choisi d'utiliser la méthode de l'adsoprtion séquentielle aléatoire (« Random sequential adsoprtion », RSA). Ce qui permet de normaliser la valeur théorique maximale du recouvrement en nanoparticules en fonction de leur taille, ligand organique compris. Lors de l'adsorption nous supposons que les nanoparticules se déposent de manière aléatoire à la surface et qu'elles ne peuvent pas se superposer les unes aux autres. Cette méthode permet, d'après les simulations [205–208], de recouvrir 54,7% d'une surface plane de particules. La figure 51 nous montre le nombre de particules que nous pouvons greffer par µm² en fonction de leur taille. Pour des nanoparticules de 11,7 nm il est possible d'en déposer 5040 sur 1 µm² en suivant le modèle RSA. Cette valeur maximale nous permet d'obtenir un pourcentage de recouvrement de la surface et donc de comparer des assemblages de nanoparticules fait à partir de lots différentes.

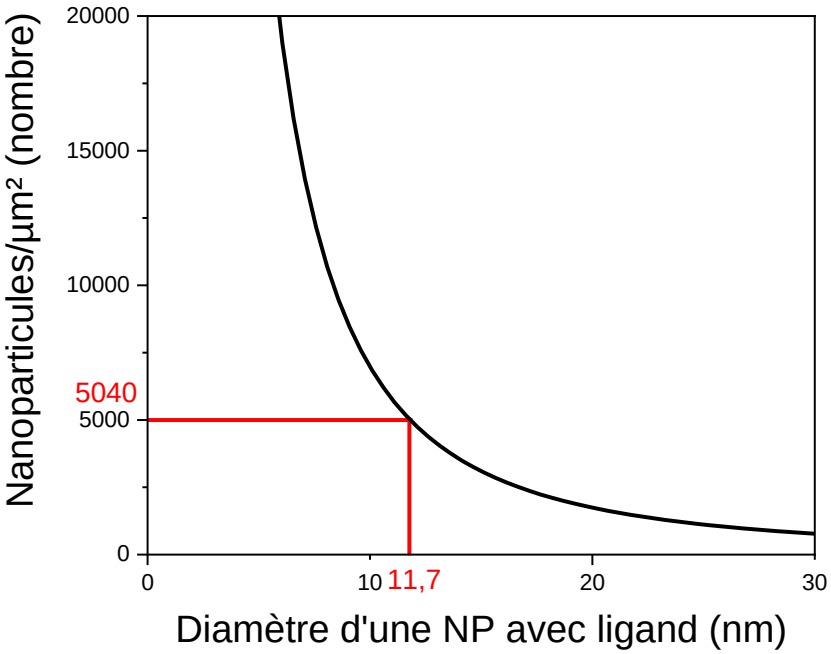

Figure 51. Valeur théorique maximale du nombre de nanoparticules par µm² en fonction de leur diamètre calculé avec la méthode RSA.

3.3 Cinétique d'assemblage

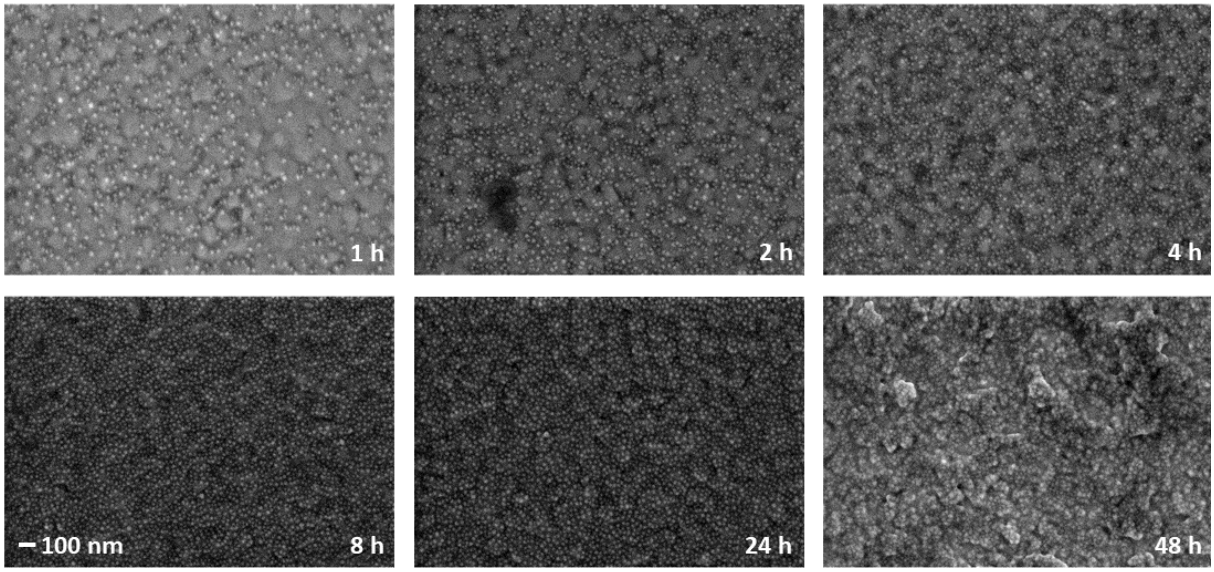

Figure 52. Image MEB de nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm déposées sur une surface d'or par CuAAc clic à temps de réaction différent. Grandissement x100000.

L'épaisseur et la densité de la couche diélectrique à la surface de l'or va influencer le signal plasmonique. C'est pourquoi il est important de contrôler la densité de l'assemblage par CuAAc clic des nanoparticules sur la surface d'or. Nous avons fait varier les temps de réaction entre 1 heure et 48

heures (figure 52) . Nous avons calculé la densité en nanoparticules sur les substrats en fonction du temps.

Nous voyons qu'après une heure de réaction la surface commence à être recouverte de nanoparticules. Les nanoparticules semblent être localisées d'une manière préférentielle dans les joints de grain de l'or. Les joints de grain facilitent l'assemblage des nanoparticules du fait de leur énergie de surface plus faible. La densité de nanoparticules augmente avec le temps de réaction jusqu'à atteindre une monocouche après 8 heures de réaction (figure 53). Après 24 heures la monocouche ne semble pas beaucoup plus dense que pour 8 heures de réaction. Après 48 heures nous observons des agrégats de nanoparticules sur la surface, nous n'avons plus de monocouche.

La densité a été mesurée conformément au maximum de la valeur théorique obtenue par le modèle RSA pour des nanoparticules de 11,7 nm, à savoir 5040 nanoparticules par µm². Nous avons tracé la densité en fonction du temps (figure 54). L'affinement a été effectué avec la formule suivante :

$$D(t) = D_{MAX}\left(1 - e^{-kt}\right) \quad (1)$$

Cette équation décrit la densité de l'assemblage D en fonction du temps (t). D_{MAX} correspondant à la densité maximale à savoir 100%. k est la constante cinétique de l'assemblage. Cette équation est obtenue de la manière suivante :

$$NP_{susp} + E_{libre} \overset{k}{\rightarrow} NP_{ads} \quad (2)$$

Avec NP_{susp} le nombre de nanoparticules en suspension, E_{libre} les emplacements libres sur la surface d'or, NP_{ads} le nombre de nanoparticules adsorbées à la surface et k la constante cinétique de la réaction. L'équation dépendante du temps pour l'obtention du nombre de nanoparticules adsorbée en surface est :

$$\frac{dNP_{ads}}{dt} = NP_{susp} * E_{libre} * k \quad (3)$$

La solution de cette équation différentielle d'ordre un est bien l'équation 1.

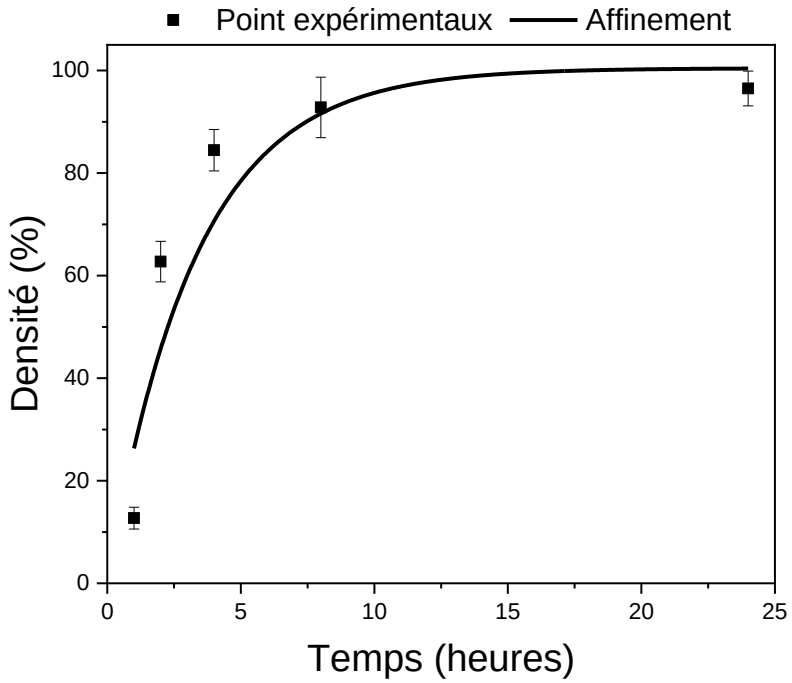

Figure 53. Densité des nanoparticules d'oxyde de fer recouvrant un substrat d'or en fonction du temps de réaction de chimie clic d'après les images MEB.

3.3.1 Variation des paramètres expérimentaux

Toulemon et al.[200] obtiennent des assemblages monocouche de nanoparticules d'oxyde de fer après 48 heures de réaction. Nous allons faire varier les paramètres expérimentaux pour essayer d'obtenir des monocouches en moins de temps pour pouvoir accélérer le processus d'assemblage. Pour ce faire nous allons faire varier les paramètres expérimentaux tel que la quantité de catalyseur et/ou d'activateur.

3.3.1.1 Influence du catalyseur au cuivre [$CuBr(PPh_3)_3$]

Nous avons étudié l'influence de la quantité de catalyseurs en fonction du temps de réaction. Nous avons regardé ce qu'une augmentation ou diminution de la quantité de catalyseur pouvait avoir comme influence sur les temps d'assemblage. Sachant que pour une certaine quantité de nanoparticules connue au début de la réaction il faut un équivalent de 3% en masse de catalyseur [$CuBr(PPh_3)_3$] nous avons étudié la réaction avec des quantités de catalyseurs allant de 1.5% à 6% (figure 54).

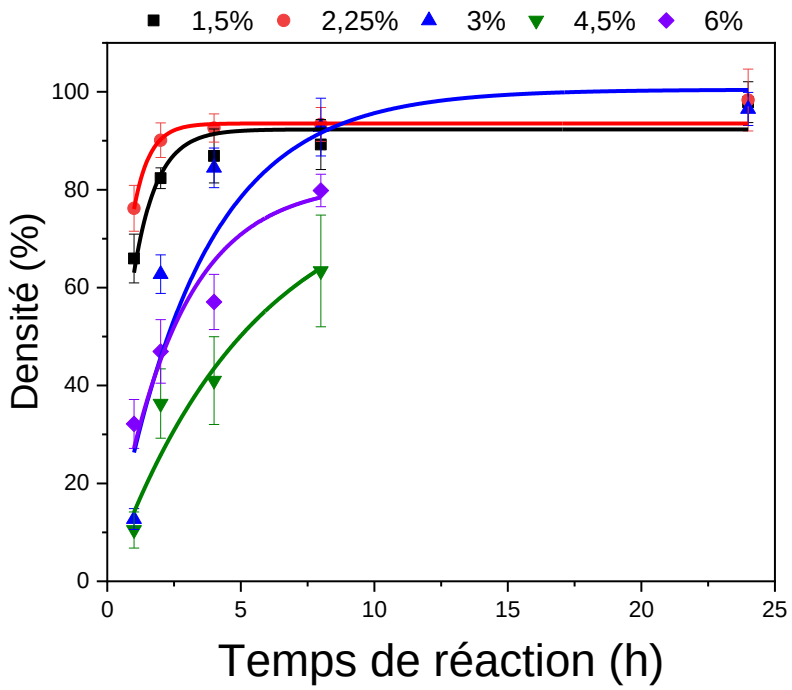

Figure 54. Densité de nanoparticules assemblées déduites par MEB en fonction du temps pour différentes quantités de catalyseur variant de 1.75 à 6% en masse.

On peut constater que pour des quantités plus faibles de catalyseurs (1 ,5 et 2,25 %) les nanoparticules s'assemblent de manière similaire. La densité de nanoparticules sur le substrat est proche de 70% après une heure de réaction, contre une valeur de 15% pour 3% de catalyseurs. La densité arrive sur un plateau autour de 90% après 8 heures de réaction. La densité maximale obtenue est de l'ordre de 95% pour 1.5, 2,25 et 3% de catalyseur. Pour 3% de catalyseurs nous remarquons une cinétique plus lente aux temps court, la densité finale est quelque peu supérieure à celle des réactions effectuées avec des quantités de catalyseurs plus faible. Il est néanmoins surprenant d'observer qu'avec des quantités de catalyseurs supérieures à 3%, la densité arrive à un maximum de 63% pour 4.5% de catalyseurs et 79% pour 6% de cuivre(I) après 8 heures de réaction. Pour des quantités de catalyseurs supérieures à 3%, au-delà de 8 heures de réaction les nanoparticules ne s'assemblent plus sous forme de monocouche mais d'agrégats (figure 55).

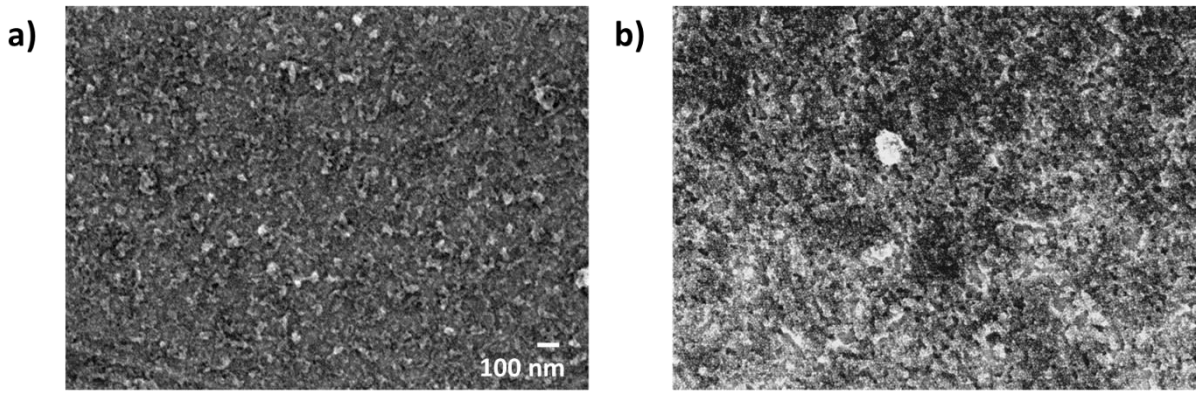

Figure 55. Images MEB de la réaction de CuAAc clic pour 4,5 (a) et 6% (b) de catalyseurs après 24 heures de réaction.

On pourrait croire qu'avec une quantité de catalyseurs plus importante la réaction devrait arriver à un rendement similaire plus rapidement, ou bien ne subir aucune modification (Loi de le Chatelier).

Néanmoins nous observons une diminution de la densité d'assemblage (correspondant au produit réactionnel) pour des quantités de catalyseurs plus élevées. L'explication la plus simple pour décrire ce phénomène est que le surplus de cuivre en solution vient se déposer sur la surface d'or recouverte d'alcyne ce qui empêche les azotures des nanoparticules de réagir avec la surface.

3.3.1.2 Variation de la quantité de Et_3N

La triéthylamine joue le rôle d'activateur dans la réaction lors de l'assemblage des nanoparticules. Elle va déprotoner l'alcyne pour laisser place au catalyseur [$CuBr(PPh_3)_3$]. Augmenter la quantité de triéthylamine lors de la réaction de CuAAc devrait donc l'accélérer. La quantité de référence de triéthylamine est de 0,5 mL. Nous avons regardé l'influence de cette dernière sur la densité des assemblages (figure 56).

On remarque que pour une quantité de triéthylamine de 0.25 mL, la réaction est très nettement ralentie. Après 48 heures de réaction la surface d'or n'est recouverte de nanoparticules qu'à 41% sans aucun agrégat. Pour 0.375 m L de Et_3N la réaction s'apparente à celle avec 0,5 mL de triéthylamine. Pour des quantités supérieures à 0,5 mL (0,75 et 1 mL) on remarque qu'après une heure de réaction les films sont plus denses de 20% environ en comparaison aux autres quantités de triethylamine. Mais la réaction semble se ralentir pour arriver à un plateau proche des 70% de couverture. Au-delà de 24 heures de réaction nous observons des agrégats da nanoparticules.

Nous aurions pu imaginer l'inverse, mais il s'avère qu'augmenter la quantité de triéthylamine au-delà de 0,5 mL déstabilise la réaction.

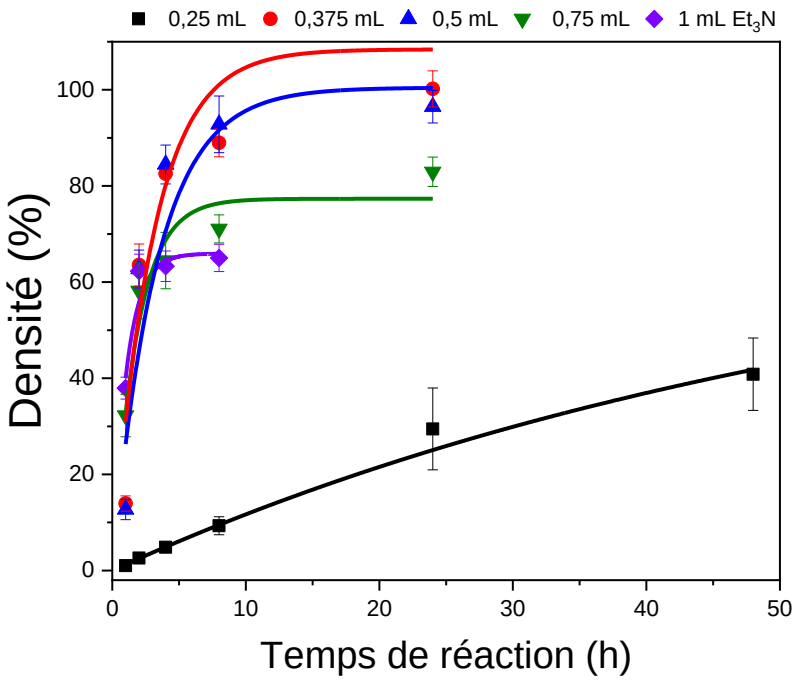

Figure 56. Densité de nanoparticules assemblées déduites par MEB en fonction du temps pour différentes quantités de triéthylamine pour 3% de catalyseur.

La réaction avec peu de triéthylamine donne lieu à un équilibre de la clic CuAAc :

$$C \equiv \mathrm{C} - \mathrm{H} + \mathrm{Et_3N} \rightleftharpoons C \equiv \mathrm{C} - \mathrm{CuL_{n-2}} + \mathrm{Et_3N\,H^+}$$

Or lorsque nous ajoutons un excès de triéthylamine nous avons un déséquilibre chimique, ce qui implique que la réaction penche plus du côté des produits que des réactifs :

$$C \equiv \mathrm{C} - \mathrm{H} + \mathrm{Et_3N} \rightarrow C \equiv \mathrm{C} - \mathrm{CuL_{n-2}} + \mathrm{Et_3N\,H^+}$$

Les protons captés par la triéthylamine ne sont pas relachés pour libérer le cuivre du cycle triazole, ce qui engendre un arrêt de la réaction par absence de catalyseur.

4 Conclusion

La méthode de décomposition thermique nous a permis de synthétiser des nanoparticules de fer de 10 nm colloidalement stables en solution. Ces nanoparticules ont été fonctionnalisées par l'AP12N3 pour pouvoir les greffer sur des substrats par clic CuAAc. La réaction de clic a été étudiée pour trouver les conditions optimales et répétables. La variation du temps de réaction nous permet de contrôler la densité de l'assemblage des nanoparticules sur la surface.

Nous avons vu qu'il était possible de jouer sur les temps de réaction et les quantités de catalyseurs ou de base pour accélérer ou ralentir la réaction de CuAAc clic. Des quantités supérieures à 3% de catalyseurs déstabilisent la réaction d'assemblage par clic des nanoparticules. En dessous de 3% nous avons une formation rapide de l'assemblage ce qui empêche de contrôler la quantité de nanoparticules assemblées à la surface du substrat.

Afin d'avoir un bon contrôle sur la réaction et d'éviter les agrégats de particules nous utiliserons par la suite 0,5 mL de triethylamine et l'équivalent de 3% massique de catalyseur.

Les assemblages de nanoparticules sont stables et robustes, ils permettent, grâce aux azotures disponibles à la surface des nanoparticules de procéder au greffage d'autres molécules en surface.

Chapitre 3 – Conception d'un biocapteur spécifique pour la détection de la streptavidine

1 Biotine/Streptavidine

Dans le chapitre qui suit nous allons étudier l'adsorption d'une protéine bien connue : la streptavidine. Cette protéine a une affinité particulièrement forte avec la biotine.[209] Ce couple est un modèle fréquemment utilisé dans les études biologiques[209].

Les précédents travaux de Mathias Dolci[199] menés au sein de l'équipe ont porté au développement d'un biocapteur basé de résonance à plasmon de surface (SPR : « surface plasmon résonance) basé sur une monocouche de nanoparticules déposées sur un film d'or. Néanmoins il restait un point non négligeable en suspend à clarifier : l'adsorption non spécifique des analytes à la surface du capteur.

1.1 Le design du biocapteur

Comme expliqué dans le chapitre précédent, la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm a été effectuée par la méthode de décomposition thermique du stéarate de fer dans un solvant à haute température d'ébullition : le dioctyl ether. L'acide oléique est utilisé pour stabiliser les nanoparticules en solution lors de cette synthèse. Un échange de ligand est effectué pour remplacer l'acide oléique en surface des nanoparticules. L'acide oléique est ainsi remplacé par l'AP12N3, ce qui nous donne la possibilité d'effectuer des réactions de CuAAc clic à la surface des nanoparticules pour les assembler sur une surface avec des alcynes terminaux. Par la suite nous emploierons les termes « réaction de chimie clic », « chimie clic » ou simplement « clic » pour désigner la réaction de CuAAc clic (cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen) décrite dans les chapitres précédents.

En amont un substrat de verre recouvert d'un fine couche d'or de 48 nm et d'une couche de chrome de 2 nm servant de couche adhérente pour l'or est fonctionnalisé avec le dodec-10-yne-1-thiol. La surface d'or est nettoyée au préalable au « plasma cleaner » 2 minutes sous athmosphère d'O_2 pour l'activer[210]. Le substrat est ensuite plongé dans une solution de thiols alcyne pendant 48 heures. Une monocouche de thiols est formée à la surface du substrat. Les thiols ayant une terminaison alcyne ils permettent le greffage par chimie clic des nanoparticules fonctionnalisées avec l'acide phosphonique ayant comme groupement terminal un azoture. La réaction de chimie clic est effectuée en présence d'un catalyseur de cuivre (I) et est activée par la triméthylamine. Après 8 heures de réaction nous obtenons une monocouche dense de nanoparticules sur un substrat d'or. Cette monocouche de nanoparticules possède en surface des groupements azotures qui permettent d'effectuer une autre réaction de chimie clic pour y greffer une autre molécule servant de récepteur pour la détection de biomolécules.

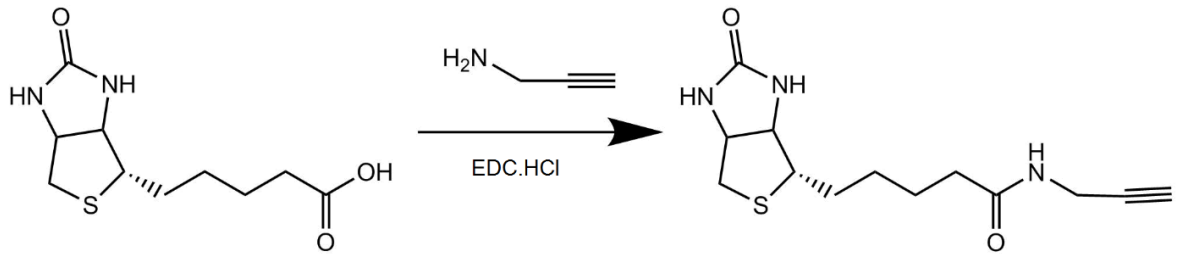

Figure 57. Schéma de la réaction de couplage entre la biotine et la propargylamine pour obtenir une biotine avec un alcyne terminal.

La molécule que nous souhaitons greffer en surface est un dérivé de la biotine. Pour pouvoir greffer par chimie clic la biotine en surface des nanoparticules, il a fallu synthétiser un dérivé de la biotine avec une terminaison alcyne. La synthèse de la biotine alcyne a été effectuée en couplant de la

propargylamine avec l'acide carboxylique de la biotine à l'aide d'une réaction de couplage utilisant de l'EDC.HCl pour former une liaison amine stable (Figure 57).

En utilisant le même protocole de chimie clic que pour l'assemblage des nanoparticules il est possible de greffer la biotine ainsi fonctionnalisée sur la monocouche de nanoparticules avec les azotures (figure 58).

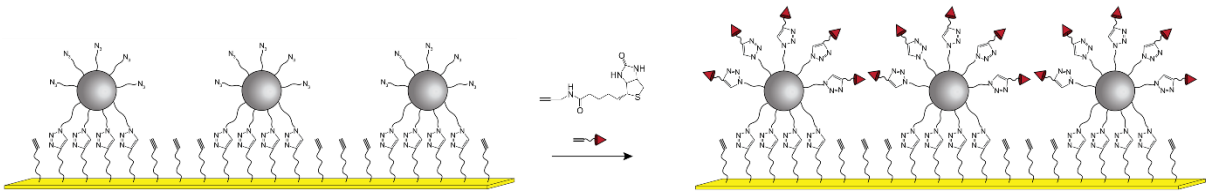

Figure 58. Schéma représentant le greffage par chimie clic de la biotine alcyne à la surface des nanoparticules d'oxyde de fer.

2 Caractérisations des surfaces fonctionnalisées

2.1 Microscopie électronique à balayage

De mesures de microscopie électronique à balayage ont été effectuées pour déterminer si les nanoparticules d'oxyde de fer ont bien été greffées sur notre surface d'or. Il en résulte qu'après 8 heures de réaction, nous obtenons un film de nanoparticules caractérisé par une densité élevée de 3500 ± 178 nanoparticules par µm² (figure 59).

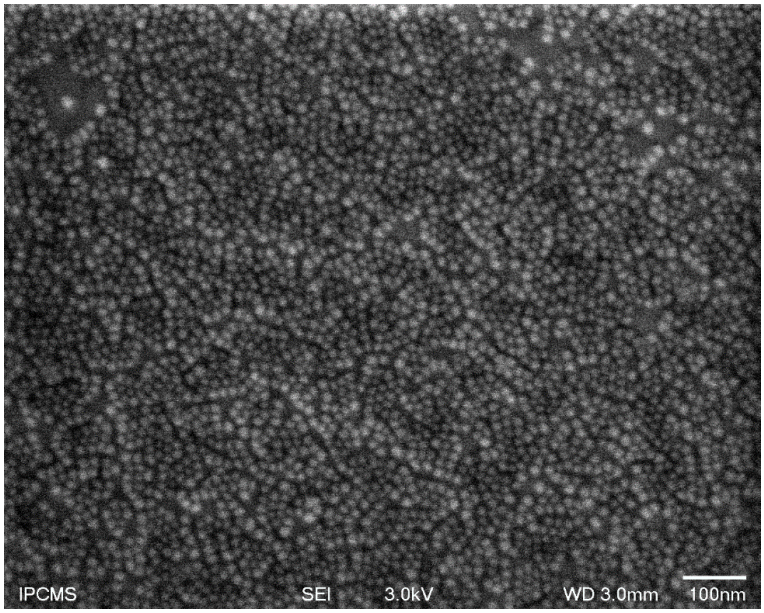

Figure 59. Image obtenue par microscopie électronique à balayage d'une monocouche dense de nanoparticules d'oxyde de fer obtenue par chimie clique. Grossissement 100000x.

2.2 Spectroscopie infrarouge de réflexion-adsorption à modulation de phase

Nous avons effectué des mesures de spectroscopie infrarouge de réflexion-adsorption à modulation de phase (PM-IRRAS) pour déterminer les changements entre une surface de nanoparticules avant et après avoir greffé le dérivé de la biotine (figure 60).

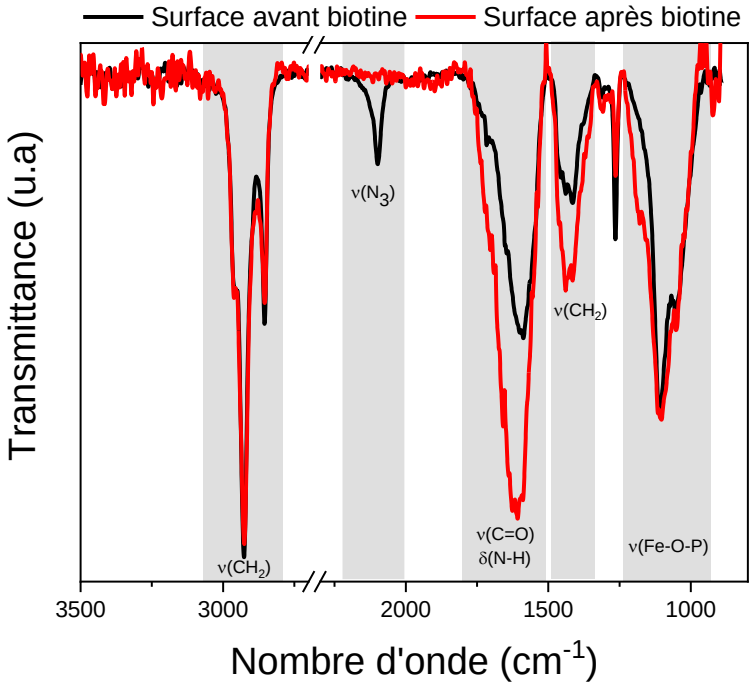

Figure 60. Spectre PM-IRRAS avant (noir) et après (rouge) le greffage d'un dérivé de la biotine à la surface des nanoparticules.

Nous avons normalisé le spectre par rapport à la bande à 1100 cm^{-1} correspondant à la liaison ν(Fe-O-P) car la densité de nanoparticules en surface est identique pour les deux substrats. Nous notons la disparition de la bande à 2100 cm^{-1} correspondant à la liaison $\nu(N_3)$ en surface des nanoparticules qui montre que la biotine a été correctement greffée à la surface des nanoparticules.

De plus, l'augmentation de l'intensité de la bande ν(C=O) centrée à 1600 cm^{-1} confirme la présence de la biotine[211]. L'intensité de cette bande est deux fois plus importante lorsque la biotine est greffée en surface. Nous pouvons constater l'apparition d'un épaulement à 1170 cm^{-1} après greffage correspondant au mode de vibration δ(C-N) de la biotine. Un second épaulement lié à δ(N-H)[211] apparait à 1660 cm^{-1} correspondant au groupe amide de la biotine.

2.3 XPS

Nous avons caractérisé par XPS un assemblage de nanoparticules sur lequel nous avons greffé de la biotine pour identifier les liaisons chimiques présentes à la surface de nos assemblages après réaction de CuAAc clic. Les éléments sur lesquels nous avons focalisé notre attention sont le fer, l'azote, le soufre et le carbone (figure 61). Le but de cette analyse est de compléter les mesures de PM-IRRAS effectuées.

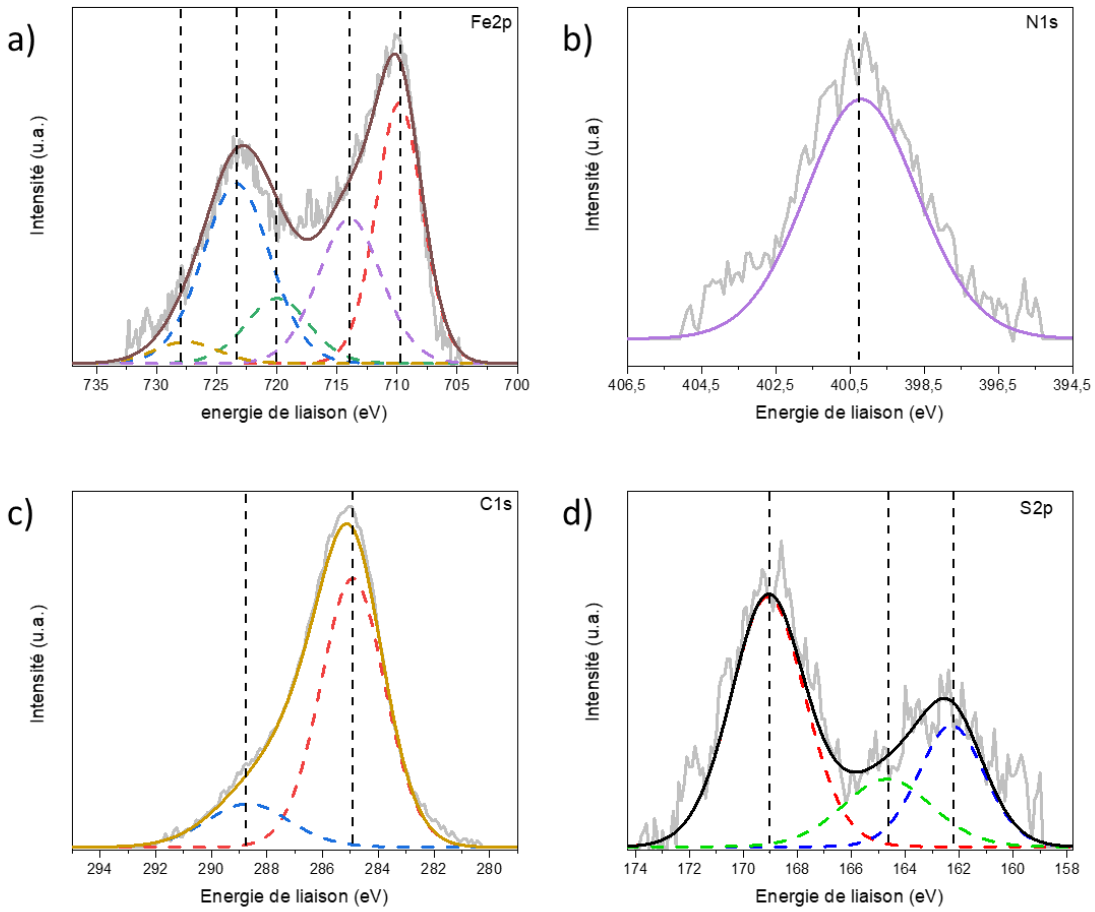

Figure 61. Mesures XPS Fe2p (a), N1s (b), C1s (c) et S2p (d) d'un assemblage de nanoparticules avec de la biotine greffée sur leur surface.

Le spectre d'analyse du fer (Fe2p) montre plusieurs régions. Les deux contributions principales sont attribuées aux niveaux d'énergie Fe2p1/2 et Fe2p3/2 respectivement centrés à 722,5 et 710,5 eV. Chacun de ces pics peut être déconvolués en deux composantes correspondant à Fe^{2+} et Fe^{3+} de la magnétite[212,213]. Le pic satellite à 720 eV peut être attribué à Fe^{3+} contenu dans la maghémite qui indiquerait l'oxydation des nanoparticules[213]. Le graphique N1s montre un pic centré autour de 400,3 eV correspondant au signal des liaisons (C-N) des triazoles qui se sont formées après la réaction de CuAAc[214]. Les deux contributions du carbone C1s à 285 et 288,5 eV correspondent respectivement aux liaisons (C-H) et aux liaisons (C=O) des groupements carbonyle de la biotine[215]. La contribution du soufre S2p possède trois composantes centrées à 162,5, 164,7 et 169 eV. Les composantes principales à 162,5 et 169 eV correspondent respectivement aux liaisons qu'effectue le soufre avec l'or[216] et aux groupements sulfates[217], soit aux soufres oxydés. Quant à la contribution satellitaire centrée à 164,7 eV, elle correspondrait à la biotine[215].

Les analyses XPS montrent bien la présence de biotine covalemment liée à la surface des nanoparticules par des liaisons triazoles.

2.4 Résonance plasmon de surface (SPR)

Les mesures SPR ont été effectuées dans la configuration de Kretschmann. La longueur d'onde de la source lumineuse est fixe (785 nm). Nous faisons varier l'angle d'incidence pour trouver l'angle de résonance plasmonique correspondant à la surface. Le débit circulant dans l'appareil est fixé à 50 µl/min. La streptavidine est reçue sous forme solide et est ensuite solubilisée dans l'eau.

Un suivi de l'assemblage couche par couche a été effectué (Figure 62). Notre couche d'or de 48 nm possède un angle de résonance plasmonique à 65,58°. Lors de l'ajout des thiols en surface, cet angle de résonance augmente de 0,4°. La réussite de l'assemblage des nanoparticules par chimie clic est associée à une augmentation de l'angle à 68,13° soit de plus de 2°. La réaction de chimie clic de la biotine provoque un décalage angulaire de 0.3°, de l'ordre de celui des thiols sur la surface d'or. Nous constatons une augmentation croissante de l'angle de résonance plasmonique ce qui est cohérent avec l'augmentation de l'indice de réfraction du milieu et donc de la quantité de matière à la surface de l'or. L'écart le plus important est dû à l'assemblage des nanoparticules du fait de leur haut indice de réfraction.

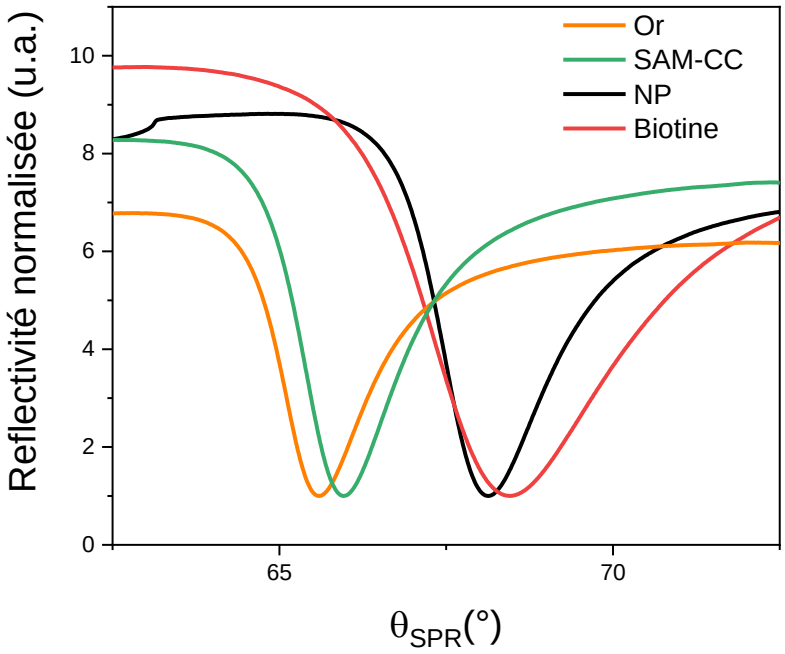

Figure 62. Réflectivité normalisée en fonction de l'angle de résonance plasmonique sur les différents assemblages à la surface de l'or.

La conception du capteur a été confirmée avec différentes techniques de caractérisations tels que l'XPS et le PM-IRRAS. Les mesures SPR confirment également l'augmentation de matière à la surface de l'or. Ces trois analyses couplées nous permettent d'affirmer le bon déroulement des différentes étapes correspondant à la construction du capteur et de la présence de la biotine. La biotine étant présente à la surface des nanoparticules, il est maintenant possible d'effectuer des mesures de détection de la streptavidine en temps réel.

3 L'influence des nanoparticules sur la détection

Nous avons vu dans l'introduction (4.3.7) qu'il est possible d'exprimer la réponse SPR par la formule suivante :

$$R = m \cdot (n_a - n_s) \cdot \left[1 - e^{-\left(\frac{2 \cdot d}{l_d}\right)}\right] \quad (1)$$

Ce qui implique, que l'amélioration de la réponse SPR est dépendante de plusieurs facteurs et particulièrement de l'augmentation du facteur de sensibilité m et la diminution de la longueur de décroissance l_d. Les nanoparticules d'oxyde de fer permettent d'influencer sur ces deux facteurs.

Les nanoparticules ont également le rôle de pouvoir augmenter la surface spécifique du substrat dû à leur forme sphérique. L'augmentation de la surface accessible par les analytes permet également l'augmentation de la réponse SPR du fait de l'adsorption d'une quantité de matière plus importante en surface qui va impacter l'indice de réfraction du milieu.

3.1 Facteur de sensibilité m

Le facteur de sensibilité est mesuré à l'aide de solution d'éthanol. Pour ce faire, nous avons préparé des mélanges d'eau/éthanol et mesuré leur indice de réfraction à l'aide d'un réfractomètre. Nous avons ensuite mesuré par SPR le décalage angulaire produit par ces solutions à différentes concentrations sur un film mince d'or vierge et un autre recouvert de nanoparticules sans biotine. Le facteur de sensibilité m est donc la pente de ces courbes de calibrations (figure 63).

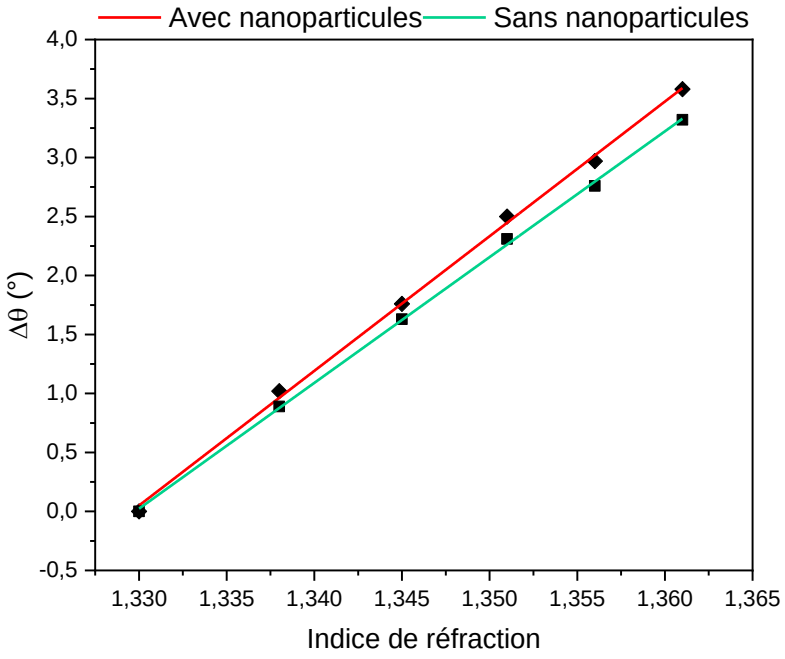

Figure 63. Courbe de calibration pour la détermination du facteur de sensibilité m sur un film d'or vierge (vert) et un film d'or sur lequel sont assemblées des nanoparticules d'oxyde de fer (rouge).

Les courbes de calibration présentent deux pentes différentes. Pour un film d'or vierge le facteur de sensibilité m est de 106,6 ± 1,28°/RIU tandis que la surface recouverte de nanoparticules a une pente de 114,2 ± 2°/RIU. On constate une augmentation de 8% du facteur de sensibilité lorsque la surface d'or est recouverte de nanoparticules d'oxyde de fer.

3.2 Longueur de décroissance l_d

Nous avons vu dans la partie 4.3 de l'introduction la définition de la longueur de pénétration et comment la calculer :

$$\delta = \frac{c}{2\omega}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_1' + \varepsilon_2}{\varepsilon_1^2}}\right) \quad (2)$$

Cette valeur est égale à la moitié de la longueur de décroissance :

$$l_d = 2\delta = \frac{\lambda}{2\pi}\left(\sqrt{\frac{\varepsilon_1' + \varepsilon_2}{\varepsilon_1^2}}\right) \quad (3)$$

La longueur de pénétration dépend exclusivement de deux facteurs, à savoir la longueur d'onde du laser utilisé (785 nm) et l'indice de réfraction du diélectrique en surface du métal. Le diélectrique déposé sur l'or est composé de nanoparticules d'oxyde de fer ainsi que d'un ensemble de molécules organiques. Pour simplifier les calculs nous allons définir l'indice de réfraction global du milieu qui est la somme des indices de réfraction de chaque matériau multiplié par le volume occupé sur le volume total du milieu étudié[218].

$$n_{global} = \frac{\sum n_i \cdot V_i}{V_{milieu}} \quad (4)$$

Sachant que l'oxyde de fer a un indice de réfraction de 2,42, et que nous assimilons l'indice de réfraction d'un milieu organique à 1,5[219] nous pouvons calculer l'indice de réfraction moyen du milieu en fonction de la fraction volumique des différents constituants. L'indice de réfraction moyen calculé est de 1,64. La longueur de décroissance associée à une surface recouverte de 3500 NP/µ² est de 204 nm. Pour une SAM (n=1,5) la longueur de décroissance est de 188 nm, près de 10% inférieure.

L'augmentation de la longueur de pénétration (ou de décroissance) de 10% entre la surface avec et sans nanoparticules nous permet de sonder plus en profondeur le milieu étudié.

3.3 Surface spécifique

Aux paramètres intrinsèques du capteur peuvent s'ajouter la structuration du capteur pour augmenter sa sensibilité. Comme nous l'avons décrit plus haut, le fait d'augmenter la surface spécifique influe sur la quantité de matière en surface et donc sur le décalage angulaire. La densité de nanoparticules va augmenter l'indice de réfraction et donc la longueur de décroissance.

3.4 Distance inter particules

La distance inter-particules est un facteur essentiel à prendre en compte car c'est de cette information que découle la surface accessible aux analytes.

Pour simplifier nous considérons la répartition homogène des nanoparticules à la surface du substrat. Cette approximation nous permet d'exprimer la distance inter-particules moyenne (D_{IP}) de la manière suivante[220] :

$$D_{IP} = \sqrt{\frac{S}{N}} - D \tag{5}$$

Avec S la surface utilisée pour le calcul de la densité, à savoir 1µm ² dans notre cas. N étant le nombre de nanoparticules sur la surface S et D le diamètre d'une nanoparticule. La fonction à deux variables a été tracée (figure 64).

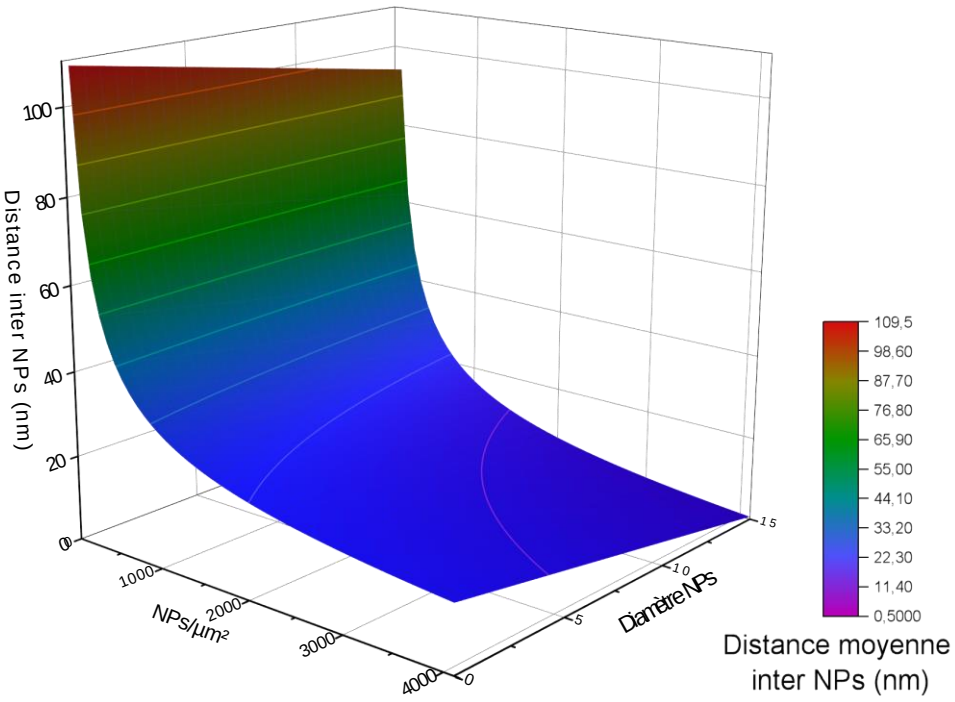

Figure 64. Distance inter-nanoparticules en fonction du diamètre et de la densité de nanoparticules sur une surface de 1 µm².

Pour les nanoparticules que nous utilisons, à savoir d'un diamètre (ligand organique inclus) de 13,1 nm nous obtenons le graphique en deux dimensions suivant (figure 65) :

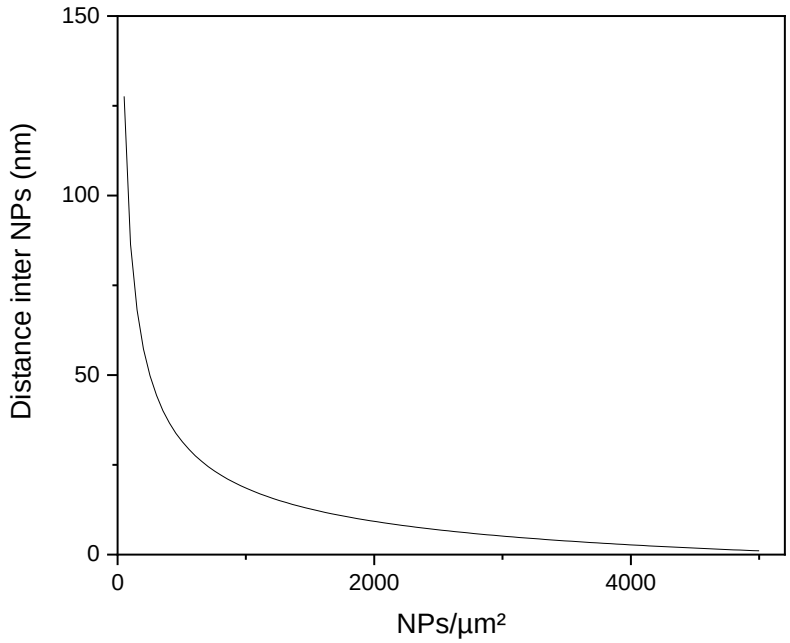

Figure 65. Distance inter-particules en fonction de la densité pour des nanoparticules de 13,1 nm.

Dans le cas de nanoparticules de 13,1 nm avec une densité de 3500 NP/µm² nous avons une distance inter-particules de 3,8 nm. Avec cette information nous pouvons maintenant calculer le nombre de streptavidine que nous pouvons mettre à la surface de chaque nanoparticule en connaissant la surface d'une streptavidine (20.58 nm²).

3.5 Nombre de streptavidine par nanoparticule

Nous pouvons exprimer sous la forme d'une fonction à deux variables (diamètre d'une nanoparticule et distance inter-particules) le nombre de streptavidine qui peuvent s'adsorber à la surface d'une nanoparticule[199] (figure 66).

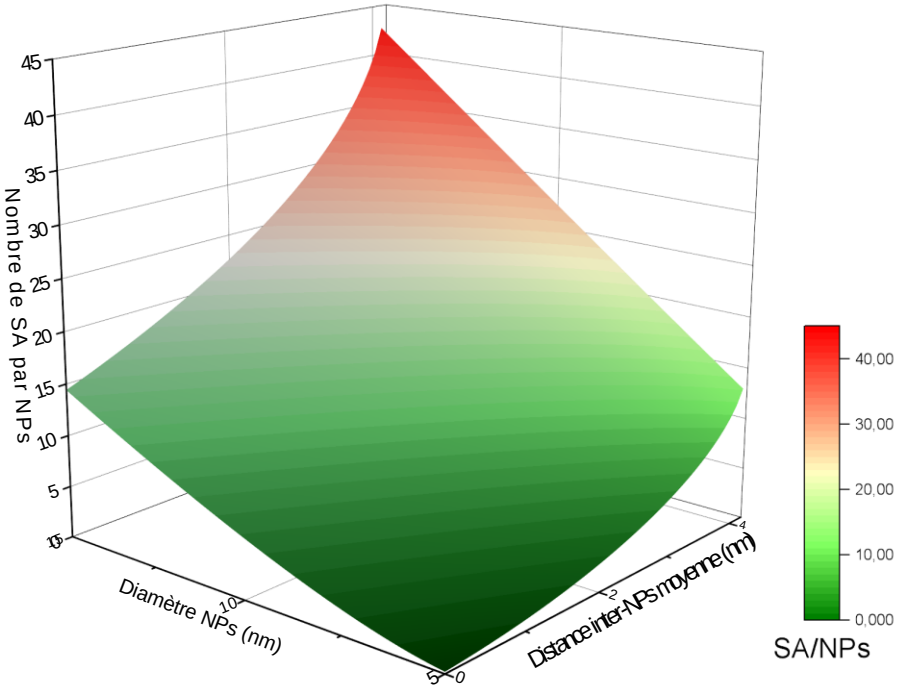

Figure 66. Nombre de streptavidine par nanoparticule en fonction de la taille et de la distance inter-particule.

Nous avons un monocouche de nanoparticules de 13,1 nm avec une distance inter-particules moyenne de 3,8 nm. Il est possible de disposer 13,2 streptavidine au maximum sur une nanoparticule. En sachant que l'aire d'une streptavidine est de 20,58 nm² [221] au maximum l'aire disponible sur une nanoparticule est de 270 nm² ce qui correspond à environ la moitié de l'aire totale d'une nanoparticule de 13,1 nm de diamètre. Cette information nous permet également de savoir qu'il serait possible de recouvrir les nanoparticules avec une faible quantité de biotine. En théorie 13,2 de molécules de biotine réparties de façon homogène sur la nanoparticule seraient suffisantes pour adsorber le maximum de streptavidine. De plus séparer les molécules réceptrices les unes des autres pourraient éventuellement empêcher des interactions non souhaitées entres elles qui pourrait empêcher l'adsorption de l'analyte tel que l'encombrement stérique.

3.6 Détermination de la masse adsorbée en surface

L'épaisseur d'analyte d à la surface du capteur peut être déterminée l'équation 6 :

$$d = -\frac{l_d}{2}\ln\left(1 - \frac{R}{m \cdot \Delta n}\right) \quad (6)$$

Avec $\Delta n = n_{analyte} - n_{solvant} = 0{,}14$ pour la streptavidine[222].

Les sensorgrammes indiquant les décalages angulaires vont nous permettre de remonter à l'épaisseur de la couche de streptavidine adsorbée en surface par le biocapteur.

En sachant que la streptavidine est une protéine ayant une taille de 4,2 nm x 4,2 nm x 5,6 nm[221] cela nous permet d'obtenir au maximum une monocouche de taille comprise entre 4,3 et 4,8 nm[223] moyennée à 4,5 nm. La BSA est quant à elle une protéine de taille supérieure : 7 nm[224].

De la même manière, il est possible de déterminer l'épaisseur de BSA à la surface du capteur avec cette fois $\Delta n = n_{analyte} - n_{solvant} = 0{,}19$ [225].

Il est possible de relier l'épaisseur à une masse adsorbée en surface grâce aux travaux de Feijter[226]. Avec cette équation, nous pouvons donc faire un rapprochement entre la réponse angulaire donnée par le sensorgramme et la masse de protéine adsorbée en surface (figure 67) :

$$\Gamma = \frac{\Delta n \cdot d}{\partial n / \partial c} \tag{7}$$

Avec Δn la variation d'indice de réfraction à la surface, d l'épaisseur à la surface du capteur calculée précédemment et $\frac{\partial n}{\partial c}$ la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration de la protéine. Pour la strepatvidine on reporte une valeur de 0,212 $cm^3 \cdot g^{-1}$ [222].

Par la suite nous serons amenés à utiliser de la BSA (« Bovine Serum Albumine ») pour effectuer des essayer d'adsorption non spécifique. Il est donc important de savoir la quantité de BSA que nous absorbons lorsque la détection n'est pas spécifique.

La valeur de l'incrément de l'indice de réfraction de la BSA est de 0,185 $cm^3 \cdot g^{-1}$ [227]. Cette valeur correspond à la variation de l'indice de réfraction en fonction de la concentration de protéines en général[227–229].

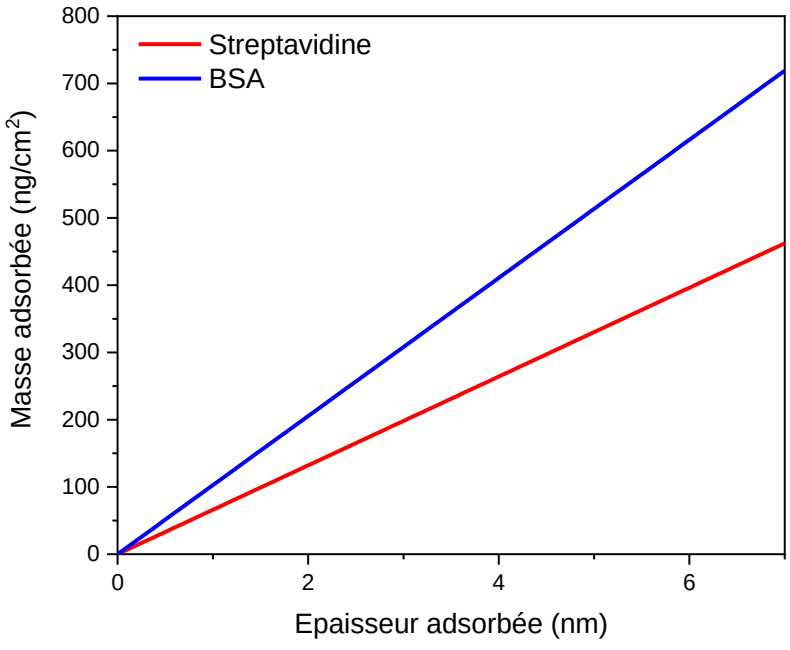

Figure 67. Masse adsorbée en fonction de l'épaisseur de streptavidin et de BSA en surface déduit de l'équation de Feijter.

4 La détection de la streptavidine

La détection SPR s'effectue via un appareil de mesure du fournisseur Bionavis. L'appareil fonctionne avec un système de fluidique composé d'une boucle d'injection que nous pouvons basculer entre deux positions. La première est la boucle de « chargement » où l'on va introduire l'analyte dans l'appareil sans le mettre en contact du capteur (figure 68 a)). La seconde position est la position d'injection où la solution contenant l'analyte est poussée à la surface du biocapteur par le tampon circulant dans la boucle (figure 68 b)).

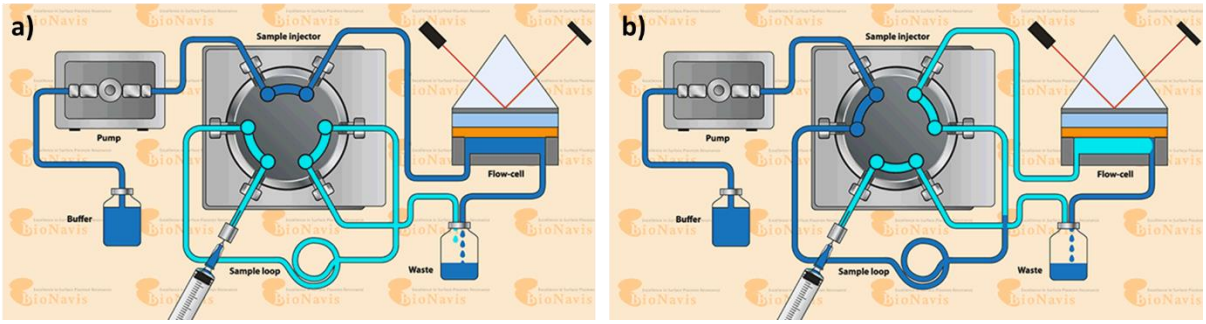

Figure 68. Représentation schématique de la boucle d'injection de l'appareil BioNavis. Avec a) la boucle de chargement et b) la boucle d'injection.

L'adsorption de la streptavidine s'effectue en moins de 3 minutes dès lors que la procédure d'injection est lancée (injection à 1,5 minute, figure 69). Après moins de 4 minutes de mesures, le décalage angulaire se stabilise à 0,254°. Ce décalage angulaire reste stable dans le temps. Un rinçage à l'eau est effectué après 5 minutes, aucune variation de l'angle de résonance n'est observée. Nous pouvons ici supposer que la streptavidine s'est adsorbée à la surface du biocapteur et ne se désorbe pas. Ce qui nous intéresse est de savoir si la streptavidine est liée à notre récepteur de manière spécifique ou non. Pour ce faire nous avons effectué un contre-test avec une protéine souvent utilisée comme référence pour déterminer si l'adsorption sur un capteur est spécifique ou non : l'albumine de sérum bovin (« Bovine serum albumin » BSA)[230] car elle s'adsorbe facilement sur les surfaces. Une solution aqueuse de BSA (4 mg/mL) a été injectée sur la surface d'un autre biocapteur.

La figure 69 nous montre l'adsorption de la streptavidine (courbe rouge) et de la BSA (courbe bleu) sur le biocapteur. Dans les deux cas nous observons un décalage de l'angle SPR signifiant une adsorption des protéines à la surface du capteur. Dans le cas de la streptavidine, un décalage angulaire de 0,254° est observé tandis que pour la BSA un décalage dix fois moins important est mesuré (0,023°).

Le décalage angulaire de 0,254° de la streptavidine correspond à une épaisseur adsorbée en surface de 1,67 nm. Cette épaisseur correspond à moins d'une monocouche (environ 4,2 nm). De cette épaisseur on en déduit la masse adsorbée en surface qui est de 110 ng/cm². Pour la BSA (0,023°), l'épaisseur de la couche de protéine en surface est de 0,11 nm ce qui correspond d'après l'équation de Feijter à 11 ng/cm².

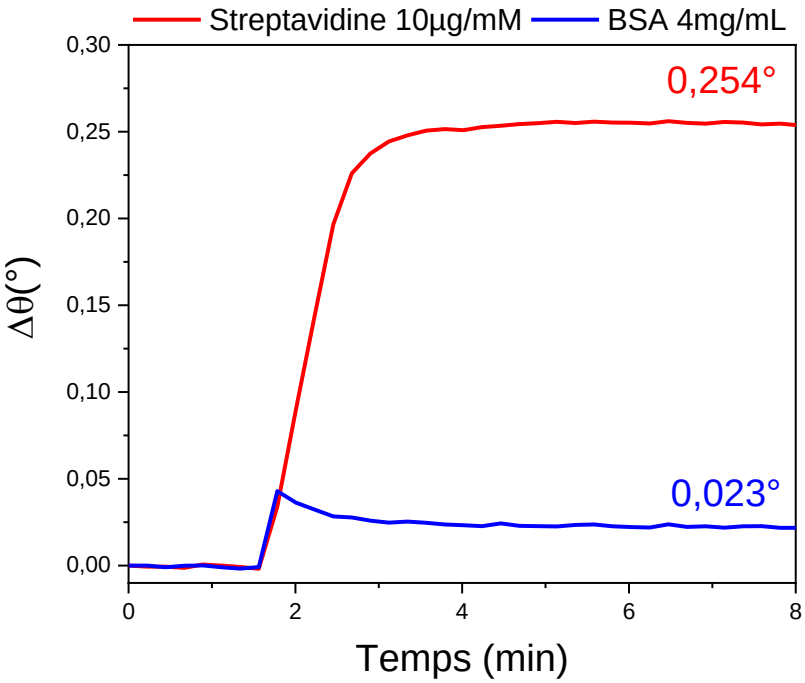

Figure 69. Sensorgramme d'une injection de 10µg/mL de streptavidine et de 4 mg/mL de BSA sur une surface de nanoparticules recouverte de biotine.

Notre capteur est exposé à une solution de BSA environ 400 fois plus concentrée que celle de streptavidine mais en adsorbe une quantité 10 fois plus faible. Ce résultat nous laisse imaginer que le capteur possède une certaine spécificité vis-à-vis de la streptavidine. Nous pouvons nous demander si l'adsorption de la streptavidine est entièrement spécifique car la BSA s'adsorbe également sur le biocapteur. En effet, les protéines vont se réarranger pour exposer leurs zones hydrophobes sur les zones hydrophobes de la surface et leur zones hydrophiles vers le tampon. Les protéines sont dénaturées et ne peuvent plus être retirées de la surface. Notre film de nanoparticules n'étant pas compact il reste de la place entre les nanoparticules. Cet espace inter-nanoparticules est occupé par des groupements alcynes, fortement hydrophobes, ce qui va être propice à l'adsorption non spécifique des protéines, comme le montre le décalage angulaire de la BSA (figure 69).

5 Insertion de molécules polyéthylènes glycols dans le système

Les molécules d'oligo éthylène glycol (OEG) sont connues pour être de bons agents pour réduire l'adsorption non spécifique[231]. Li et al.[232] ont montré que des OEG de longueur de chaine 4 et 6 réduisent fortement l'adsorption non spécifique sur les surfaces. Notre système présente un problème majeur, bien que les assemblages de particules soient dense, toutes les terminaisons alcynes des thiols ne sont pas occupées. Ces sites sont propices à l'adsorption non spécifique de protéines car ils sont hydrophobes. Pour lutter contre l'adsorption non spécifique nous avons greffé des molécules OEG sur les alcynes libres. De plus, nous avons opté pour une biotine avec un bras OEG pour limiter l'adsorption non spécifique et augmenter la taille de la molécule (figure 70).

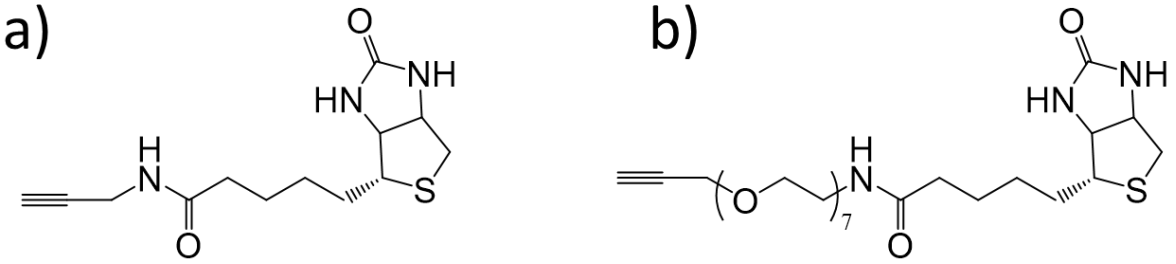

Figure 70. Représentation schématique de la biotine (a) et de la biotine-OEG (b).

5.1 Greffage des molécules OEG

Les molécules OEG ont étés greffées à la surface du capteur par chimie clic de la même manière que précédemment. La figure 71 représente schématiquement la nouvelle stratégie d'assemblage à la surface du substrat d'or.

En partant d'une surface densément recouverte de nanoparticules (3500 NP/µm²) nous avons dans un premier temps greffé la molécule de biotine-OEG7-Alkyne (Biotine-OEG) par chimie clic sur les nanoparticules suivant le même protocole que pour la biotine sans chaine OEG. Dans un second temps, nous avons greffé sur la surface la molécule O-(2-azidoethyl)heptaethylene glycol (OEG_N_3) pour remplacer les alcynes entre les nanoparticules et ainsi essayer d'éviter l'adsorption non spécifique de protéines (figure 71 (ii)).

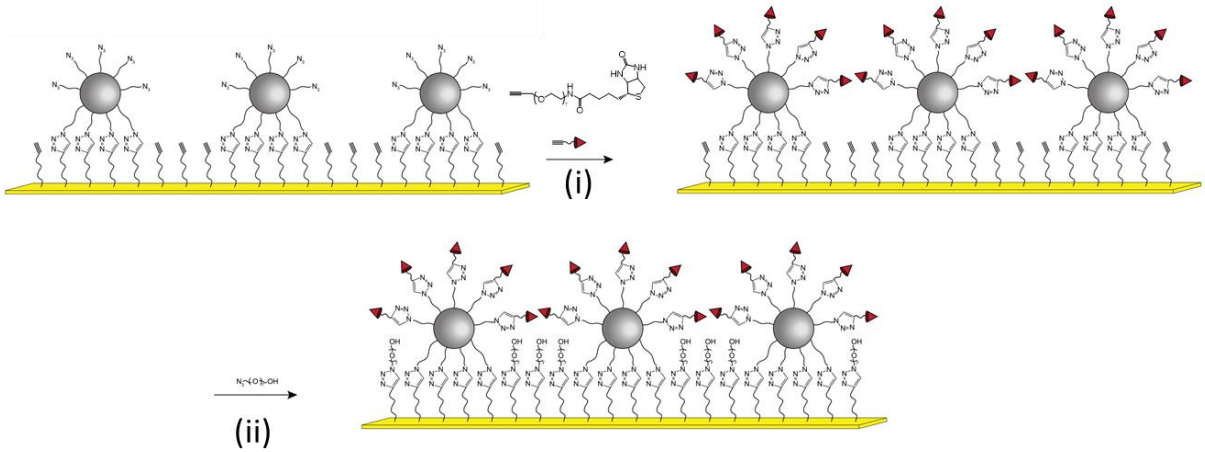

Figure 71. Représentation schématique du greffage de la biotine-OEG par chimie clic sur une surface de nanoparticules (i) suivi du greffage de OEG_N3 sur les alcynes libres (ii).

5.1.1 Caractérisations

Pour contrôler le bon déroulement de l'assemblage nous avons caractérisé par PM-IRRAS, XPS et SPR le greffage des molécules à la surface des nanoparticules.

5.1.1.1 *Spectroscopie infrarouge de réflexion-adsorption à modulation de phase*

Nous avons effectué des mesures de PM-IRRAS sur une surface composée uniquement de nanoparticules et par la suite sur une surface de nanoparticules avec des molécules OEG_N3 entre les particules et de la biotine-OEG sur les nanoparticules (figure 72).

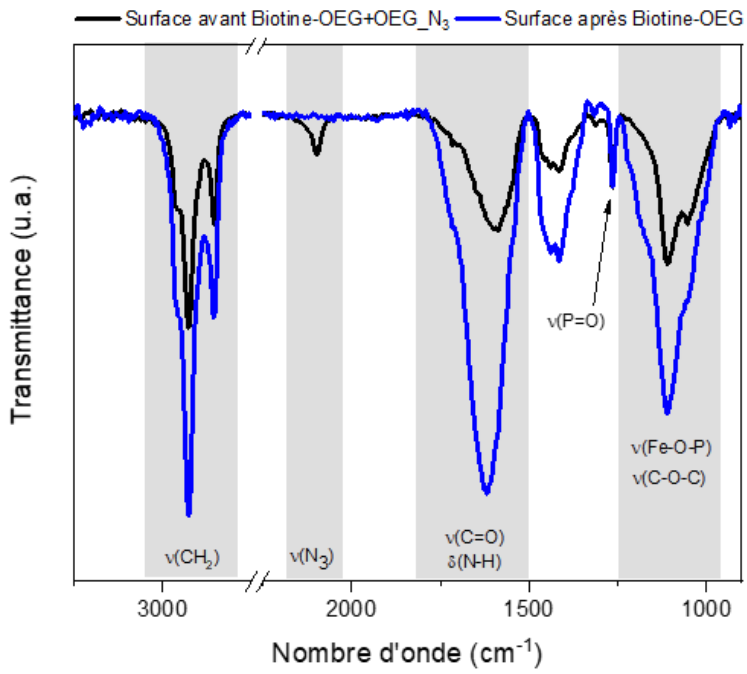

Figure 72. Spectre PM-IRRAS de la surface avant et après greffage de la biotine-OEG+OEG_N3 par CuAAc clic normalisé par la bande P=O.

Le spectre a été normalisé par rapport à la bande à 1260 cm^{-1} correspondant à la liaison (P=O)[233] qui devrait être équivalente pour tous les assemblages au vu des densités très proches.

La présence de la biotine est confirmée par l'intensité de la bande à 1617 cm^{-1} correspondant à la présence de liaisons ν(C=O) et δ(N-H)[211]. Nous pouvons constater que la bande centrée à 1100 cm^{-1} augmente grandement en intensité lorsque nous greffons les molécules OEG_N3 et Biotine-OEG sur la surface. Les bandes des chaines alkyles à 2850 et 2920 cm^{-1} s'intensifient également du fait de l'augmentation de la quantité de chaines OEG à la surface des nanoparticules. De plus la disparition de la bande à 2100 cm^{-1} correspondant à $\nu(N_3)$ nous montre que la surface ne présente plus d'azotures et que la réaction de chimie clic a eu un rendement de 100%.

L'augmentation de l'intensité des bandes associées aux chaines OE ainsi que la disparition de celles correspondantes aux azotures $\nu(N_3)$, confirme le greffage de la biotine-OEG et des chaines OEG_N3 à la surface des nanoparticules sans résidus d'azotures.

5.1.1.2 XPS

Un assemblage de nanoparticules sur lequel le greffage de biotine-OEG et de OEG_N3 a été analysé par XPS. Les éléments sondés sont le fer, l'azote, le carbone et le soufre (figure 73).

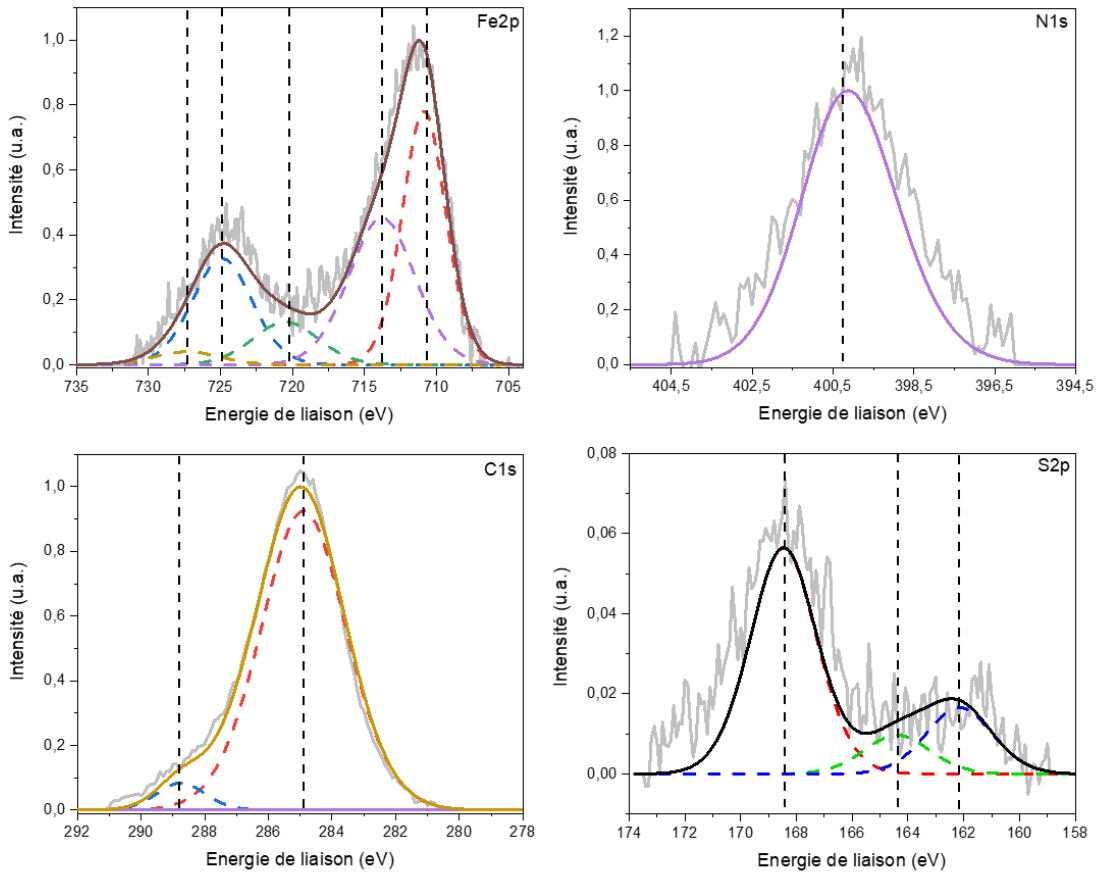

Figure 73. Spectres XPS des énergies de liaison Fe2p, N1s, C1s et N1s après greffage de la biotine-OEG+OEG_N3.

Le spectre d'analyse du fer (Fe2p) montre deux contributions principales attribuées au niveau d'énergie Fe2p1/2 et Fe2p3/2 respectivement centrées à 722,5 et 710,5 eV. Chacun de ces pics peut être déconvolués en deux composantes correspondant à Fe^{2+} et Fe^{3+} de la magnétite[212,213]. Le pic satellite à 720 eV peut être attribué à Fe^{3+} contenu dans la maghémite qui indiquerait l'oxydation des nanoparticules[213]. Le graphique N1s montre un pic centré autour de 400,2 eV correspondant au signal des liaisons (C-N) des triazoles qui se sont formées après la réaction de chimie clic[214]. Les deux contributions du carbone C1s à 285 et 288,5 eV correspondent respectivement aux liaisons du carbone avec l'hydrogène (C-H) et aux liaisons (C=O) des groupements biotine[215]. Les liaison (C-O) des chaines OEG ne sont pas clairement identifiables. La contribution des chaines OEG est normalement visible autour de 288 eV. La contribution du soufre S2p possède trois composantes centrées à 162,2, 164,4 et 168,5 eV. Les composantes principales à 162,2 et 168,5 eV correspondent respectivement aux liaisons entre le soufre et l'or[216] et aux groupements sulfates[217], indiquant que certains soufres sont oxydés. Quant à la contribution satellitaire centrée à 164,4 eV, elle correspondrait à la biotine[215] et montre ainsi que le greffage par chimie clic de la biotine-EOG s'est bien effectuée.

5.1.1.3 Résonance plasmon de surface (SPR)

Un suivi de l'assemblage couche par couche a été effectué (Figure 74) comme pour la biotine simple. L'or possède un angle de résonance plasmonique à 65,58°. Lors de l'ajout des thiols en surface cet angle de résonance augmente de 0.4°. L'assemblage des nanoparticules par chimie clic est associé à une augmentation de l'angle à 68,13° soit de plus de 2°. La clic de la biotine-OEG provoque un décalage angulaire de 0,32°, de l'ordre de celui des thiols sur la surface d'or. Il n'y a pas de différence significative avec le décalage angulaire de la biotine sans chaine OEG (0,2°), ce qui est normal au vu de la faible différence entre les deux molécules et donc de la variation de l'indice de réfraction. L'ajout des chaines OEG_N3 entre les particules provoque une augmentation quasi insignifiante de 0.02° de l'angle de résonance.

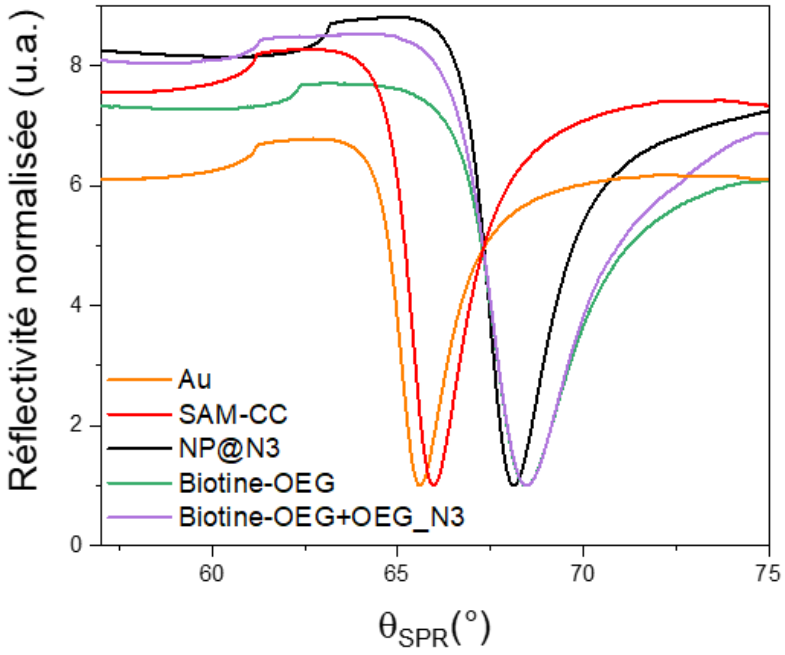

Figure 74. Angle de résonance SPR des différentes étapes de la construction du bio-capteur.

Les mesures SPR des étapes de construction du capteur complètent les mesures XPS et PM-IRRAS.

5.2 Réduction de l'adsorption non spécifique

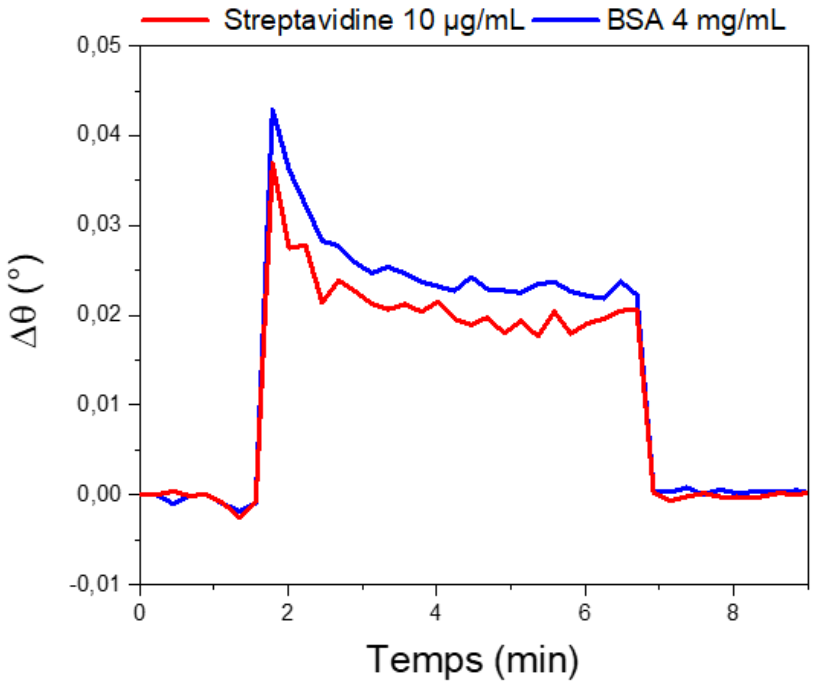

Figure 75. Sensorgramme après l'injection de streptavidine (rouge) et BSA (bleu) d'une surface entièrement recouverte de OEG.

Pour ce qui est de l'adsorption non spécifique nous avons pu constater que la BSA ne s'accroche pas sur les surfaces avec des molécules OEG. Pour confirmer l'effet des OEG en surface nous avons remplacé les molécules de biotine par une molécule de OEG alcyne (OEG_CC) afin d'avoir une surface recouverte entièrement avec du OEG.

La réaction de chimie clic est effectuée dans les mêmes conditions que les autres réactions.

On constate clairement qu'aucune des deux molécules ne s'adsorbent en surface (figure 75). Dans les deux cas nous observons un décalage angulaire à 0,04° dû aux molécules en solution. Ce décalage se résorbe après 6,5 minutes de mesure.

Pour confirmer le greffage des molécules nous avons effectué une analyse PM-IRRAS (figure 76).

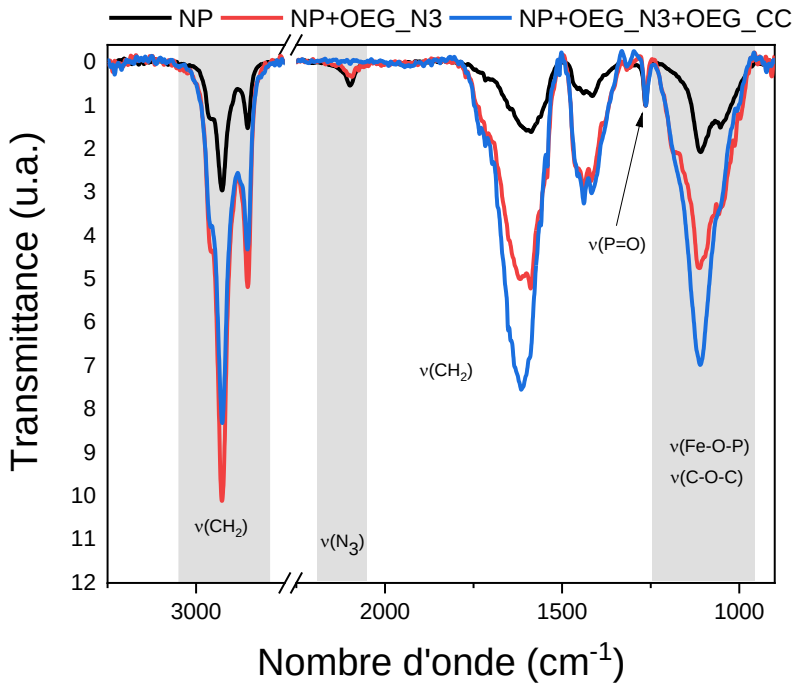

Figure 76. Spectre PM-IRRAS d'une surface de nanoparticules, d'une surface de nanoparticules recouverte de OEG_N3 et surface de nanoparticules recouverte de OEG_N3 et OEG_CC. Normalisé avec la bande P=O.

L'analyse PM-IRRAS montre une nette augmentation de la bande correspondante aux chaines OEG ν (C-O-C) à 1100 cm^{-1} qui se superpose avec la bande ν (Fe-O-P). Plus la quantité de OEG en surface augmente plus son intensité est importante. On observe alors une disparition totale de la bande à 2100 cm^{-1} correspondant aux azotures ν(N_3) lors de la greffe des OEG_CC sur les nanoparticules. La surface est donc bien recouverte entièrement de OEG, aussi bien entre les nanoparticules que sur les nanoparticules.

Par la suite toutes les surfaces auront des molécules OEG greffées entre les nanoparticules pour éviter l'adsorption non spécifique des analytes. La Biotine avec un bras OEG sera la molécule de référence du fait qu'elle augmente la capacité de détection de notre capteur de par la mobilité des chaines OEG.

5.3 Détection par la technique SPR de la streptavidine

Nous avons modifié la surface initialement décrite (Partie 1.1 : Design du biocapteur) en ajoutant des molécules OEG pour limiter l'adsorption non spécifique. La biotine a été modifiée avec un bras OEG pour augmenter sa mobilité et des OEG_N_3 ont été greffé sur les alcynes libre pour limiter l'adsorption des protéines sur une surface hydrophobe.

Nous avons mesuré le décalage angulaire de l'angle de résonance du plasmon de surface pour la streptavidine et la BSA sur un biocapteur avec (figure 15 (ii)) et sans (figure 15 (i)) OEG_N_3 sur les alcynes (figure 18).

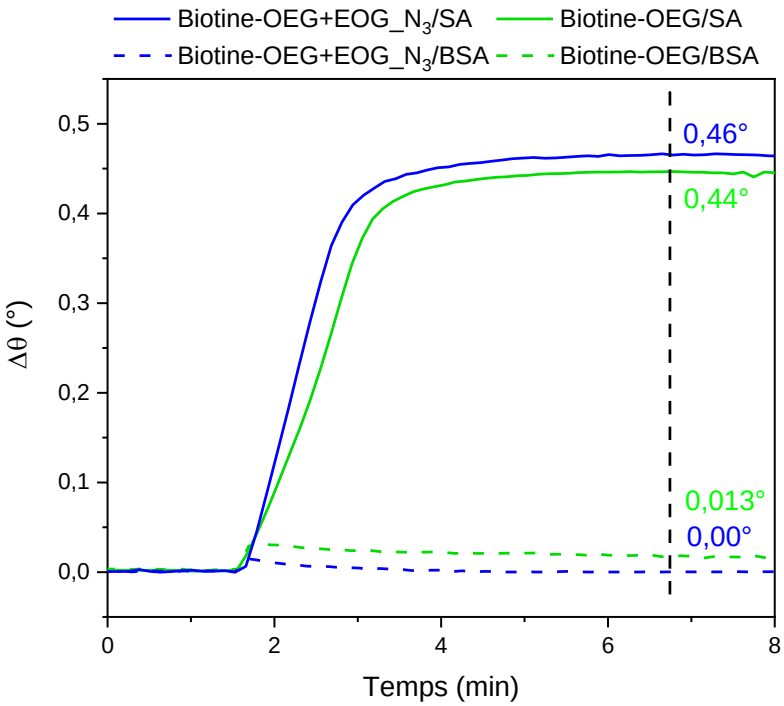

Figure 77. Sensorgramme après l'injection de streptavidine (traits pleins) et BSA (traits hachés) sur une surface avec (bleu) et sans (vert) OEG_N_3 greffés sur les alcynes.

Nous pouvons observer sur la figure 18, une rapide adsorption de la streptavidine (figure 77, courbes pleines, verte et bleu) pendant 1 minute. Les décalages angulaires restent ensuite constants à 0,44° et 0,46°. Le décalage angulaire (0,02°) entre les deux surfaces peut s'expliquer par la densité locale en nanoparticules qui est probablement différente et/ou par les molécules OEG greffées sur les alcynes qui viennent légèrement changer l'indice de réfraction de la surface.

L'adsorption de la BSA (figure 77, traits hachés) est moins importante. Pour la surface sans OEG_N_3 nous observons un léger décalage angulaire rapide restant constant à 0,013°. Lorsque nous greffons des OEG_N_3 sur les alcynes nous pouvons observer un faible décalage angulaire de l'angle de résonance lié à la BSA qui retombe à 0 après moins de 2 minutes. Les OEG greffés sur les alcynes semblent empêcher l'adsorption non spécifique de la BSA sur les alcynes libres.

Par la suite nous grefferons toujours des OEG_N_3 sur les alcynes libres.

Si nous comparons les décalages angulaires de la surface avec biotine sans OEG (figure 69) et avec OEG (figure 77) nous remarquons une différence notable entre la surface avec les OEG et la surface sans les OEG. Pour la streptavidine sur la surface sans OEG nous avons un décalage angulaire de 0,254°, tandis que pour la surface avec les OEG le décalage est de 0,46°. La réponse du capteur a augmenté de plus de 55%. Le décalage angulaire plus important lors de la détection de la streptavidine sur les surfaces OEG peut être expliqué par le fait que la biotine comporte également un groupement OEG. Ces molécules sont connues pour leur grande solubilité dans l'eau et augmente la solubilité des corps auxquels ils sont accroché[234]. De plus, l'augmentation de la longueur de chaine augmente leur mobilité. La biotine est donc plus accessible. Ce qui facilite l'adsorption et donc la détection de la streptavidine. Dans le cas de la biotine les chaines sont plus courtes, ce qui peut engendrer une gêne stérique et donc limiter l'adsorption de la streptavidine par la biotine.

De la même manière que pour la biotine (sans molécules OEG), nous avons effectué un contre-test avec la BSA (figure 77, courbe bleu). Nous pouvons constater qu'au moment de l'injection un faible décalage angulaire est observé (0,01°). Ce faible décalage devient nul après environ 3 minutes. Le faible décalage angulaire est dû au changement d'indice de réfraction lié à la solution de BSA qui entre dans le champ de détection du capteur. La BSA ne restant pas accrochée à la surface du capteur, le décalage angulaire retourne lentement à l'angle de résonance initial lorsque la BSA est retirée du champ de détection par le flux continu.

Nous avons vu qu'il était possible de quantifier la matière à la surface du capteur grâce à l'équation de Feijter. Nous avons observé un décalage angulaire de 0,46° pour 10 µg/mL de streptavidine. Ce décalage correspond à une épaisseur de 3 nm sur notre surface équivalent à une masse de 200 ng/cm². Nous avons vu que la taille d'une streptavidine est aux alentours de 4,5 nm (300 ng/cm²). En supposant que nous pouvons déposer en surface 300 ng/cm² nous n'avons pas recouvert entièrement la surface de streptavidine. Nous avons vu que nous pouvons théoriquement déposer 13,2 streptavidine par nanoparticule. Dans le cas présent cela nous ramène à 9 streptavidine par nanoparticule, ce qui est en dessous de la valeur théorique.

5.4 Mélange de protéines.

Nous avons vu que notre capteur détecte de manière spécifique la streptavidine et que la BSA n'adhère pas sur la surface. Nous avons essayé un mélange de ces deux protéines en solution. Pour ce faire un mélange d'une solution à 10 µg/mL de streptavidine a été mélangé avec une solution de BSA à 4 mg/mL (figure 78). La densité de nanoparticules reste inchangée (3500 NP/µm²).

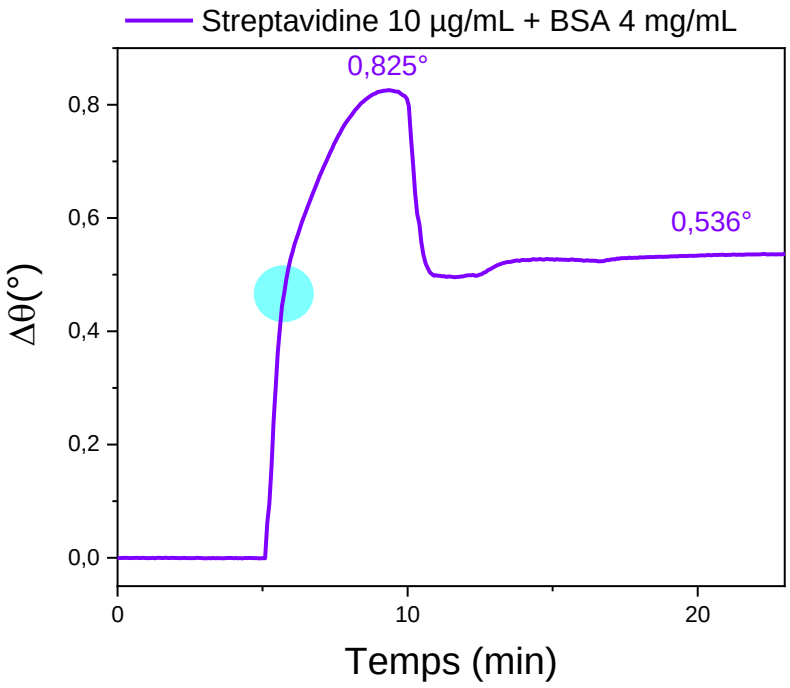

Figure 78. Sensorgramme après l'injection d'un mélange de streptavidine et de BSA à 10 µg/mL et 4 mg/mL respectivement.

Nous observons une réponse angulaire de 0,825° qui décroit rapidement après que la solution mélange ait été remplacée par l'eau (10 minutes). Le décalage angulaire se stabilise ensuite à 0,536°, ce décalage est similaire à celui de la streptavidine vu précédemment (figure 77). Cette chute correspond probablement à la BSA en surface qui a été retirée par le flux d'eau visant à rincer la surface.

Lors de la détection nous pouvons remarquer un léger changement de régime autour de 0,46±0,05° (cercle bleu, figure 78). Les pentes associées à ces deux parties de la courbe sont nettement différentes. De 5 à 6 minutes, la pente lors de l'adsorption des protéines en solution est de 0,76 °/min, tandis que la pente associée à la seconde partie, entre 6 et 9 minutes, est de 0.12 °/min. L'hypothèse mise en avant est que la streptavidine s'adsorbe sur la biotine et que la BSA viendrait ensuite s'adsorber sur la streptavidine. Après adsorption de la BSA à la surface de la streptavidine elle est retirée par l'eau venant nettoyer la surface du biocapteur.

Le décalage de l'angle de résonance devrait être proche de 0,45° pour la streptavidine en solution à 10 µg/mL. Ici nous observons un décalage de 0,536°. Il se peut que de la BSA reste adsorbée à la surface de la streptavidine provoquant ainsi ce décalage supérieur à celui envisagé.

6 Etude cinétique du complexe biotine/streptavidine

Pour essayer de comprendre les mécanismes d'adsorption. Nous avons effectué des essais de détection avec des solutions de streptavidine à différentes concentrations allant de 0,1 à 10 µg/mL (figure 79). Les conditions expérimentales restent inchangées. La vitesse du flux circulant est fixée à 50 µl/min pour toutes les mesures.

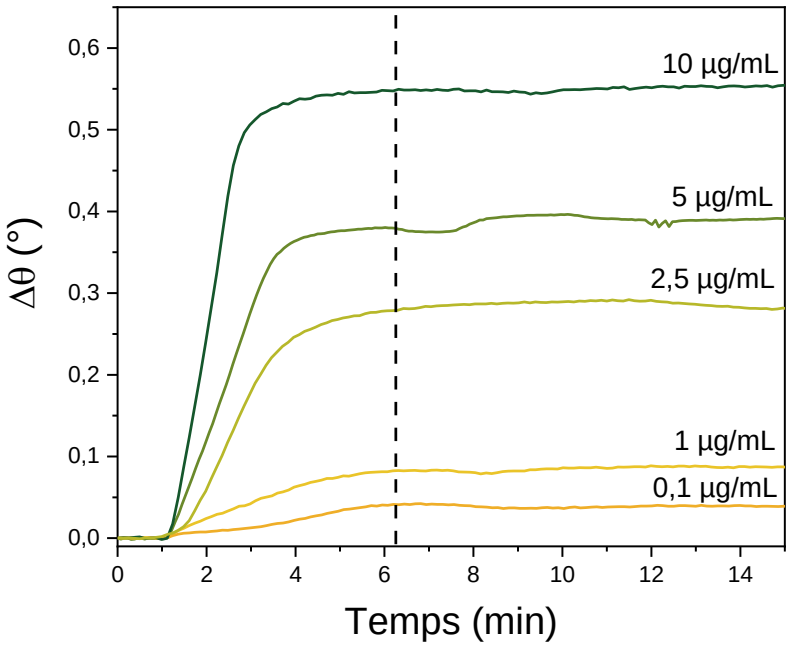

Figure 79. Sensorgramme après l'injection à différentes concentrations allant de 0,1 à 10 µg/mL de streptavidine. En trait haché l'injection de l'eau.

Pour toutes les concentrations, l'injection de la streptavidine est suivie d'un décalage de l'angle de résonance rapide et d'une stabilisation après 5 minutes. Nous avons rincé la surface avec de l'eau pour retirer toute molécule qui ne serait pas adsorbée spécifiquement. Le rinçage ne semble pas avoir d'impact sur la surface du capteur. Le décalage de l'angle de résonance ne semble pas changer significativement. La protéine est donc liée aux molécules de biotine en surface des nanoparticules.

Les quantités massiques, ainsi que l'épaisseur des couches adsorbées, en fonction des angles sont croissantes.

Tableau 7. Valeur du décalage de l'angle SPR (Δϑ), de l'épaisseur (d) et de la masse (m) en fonction de la concentration de streptavidine.

Streptavidine (µg/mL)	**Δθ(°)**	**Epaisseur d (nm)**	**m (ng/cm²)**
0,1	0,039	0,3	17
1	0,088	0,6	37
2,5	0,281	1,9	122
5	0,39	2,6	169
10	0,473	3,1	205

6.1 Etude cinétique

6.1.1 Isotherme de Langmuir, constantes cinétiques à l'équilibre

Nous pouvons observer des variations de l'angle SPR (Δθ) allant de 0,039° à 0,473° pour des concentrations de 0,1 à 10 µg/mL respectivement. La variation de l'angle et sa stabilisation, et donc l'adsorption de la streptavidine avec le capteur, survient 3 minutes après l'injection de la protéine sur le capteur pour les concentrations les plus élevées. Pour les concentrations faibles la stabilisation de la variation d'angle survient 5 minutes après injection. Il est possible d'expliquer l'adsorption plus lente à des concentration plus faibles par la diffusion des protéines.

La variation de l'angle SPR a été tracée en fonction de la concentration (Figure 80). Nous avons effectué un affinement des points avec comme modèle l'isotherme de Langmuir, modèle utilisé pour étudier la cinétique des protéines. L'isotherme de Langmuir a été extrapolé à des concentrations plus élevées pour avoir une vue d'ensemble de la cinétique d'adsorption.

L'équation utilisée pour l'affinement est la suivante :

$$\Delta\theta = \frac{[C]}{[C] + K_D}\Delta\theta_{\max} \qquad (8)$$

$\Delta\theta$ étant la réponse du système en degrés, [C] la concentration de la streptavidine, $\Delta\theta_{\max}$ la réponse maximale du système et K_D la constante de dissociation. L'affinement avec l'équation 1 nous donne accès aux valeurs de $\Delta\theta_{max}$ et K_D. La constante d'association K_A en est déduite par la suite, c'est l'inverse de K_D ($K_D=1/K_A$).

Les valeurs de l'affinement sont résumées dans le tableau 8 :

Tableau 8. Valeur des constantes d'affinité extraites par l'équation de l'isotherme de Langmuir appliqué aux points expérimentaux.

K_D (M)	K_A (M^{-1})	$\Delta\theta_{max}$ (°)
(4,1±0,034) x10^{-8}	(2,45±0,02) x10^{7}	0,68 ± 0,09

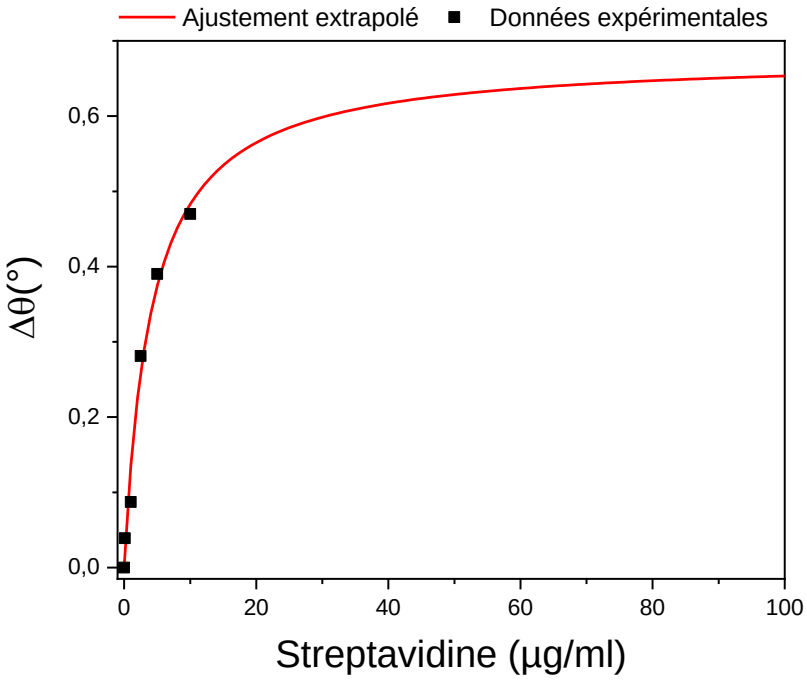

Figure 80. Décalage de l'angle SPR en fonction de la concentration de streptavidine en solution affinée avec l'isotherme de Langmuir extrapolée à des concentrations plus élevées.

L'isotherme de Langmuir nous montre que nous avons une valeur de $\Delta\theta_{max}$ de 0,68°, lorsque l'on calcule la masse et l'épaisseur correspondante à ce décalage angulaire nous devrions adsorber 300 ± 39 ng/cm² ce qui correspond à une épaisseur de 4,5±0,6 nm. Les valeurs de l'épaisseur adsorbée en surface correspondent bien à l'épaisseur d'une surface totalement recouverte de streptavidine qui est autour de 4,5 nm.

La masse théorique maximele adsorbée nous permet de remonter au nombre de streptavidine par nanoparticule. En théorie avec un décalage angulaire de 0,68° nous adsorbons 13,2 streptavidines par nanoparticule, ce qui nous ramène à la valeur théorique calculée pour des nanoparticules de 13,1 nm (ligand inclut) pour une distance inter particule de 3,8 nm.

Les constantes d'affinités sont en accord avec les valeurs de la littérature[163,235–237]. Il est néanmoins difficile de convenablement comparer notre système avec la littérature, car les nanoparticules sur des capteurs plasmoniques ne sont pas utilisés pour augmenter le signal lors de la détection de streptavidine par la biotine. La streptavidine ou la biotine sont généralement utilisées pour labéliser d'autres molécules tel que des anticorps.

6.1.2 Détermination des constantes cinétiques d'adsorption

Nous avons extrait les constantes d'adsorption (K_A) et de désorptions (K_D) grâce au décalage angulaire à l'équilibre. Une seconde méthode permet d'avoir accès à ces constantes. Cette méthode consiste en l'analyse des pentes des sensorgrammes lors de l'adsorption de la protéine. Le taux d'adsorption expérimental (k_{obs}) peut être tracé en fonction de la concentration de streptavidine (figure 81). Ce taux, est fonction de k_{on} et k_{off}, les constantes cinétiques d'adsorption et de désorption (équation 9).

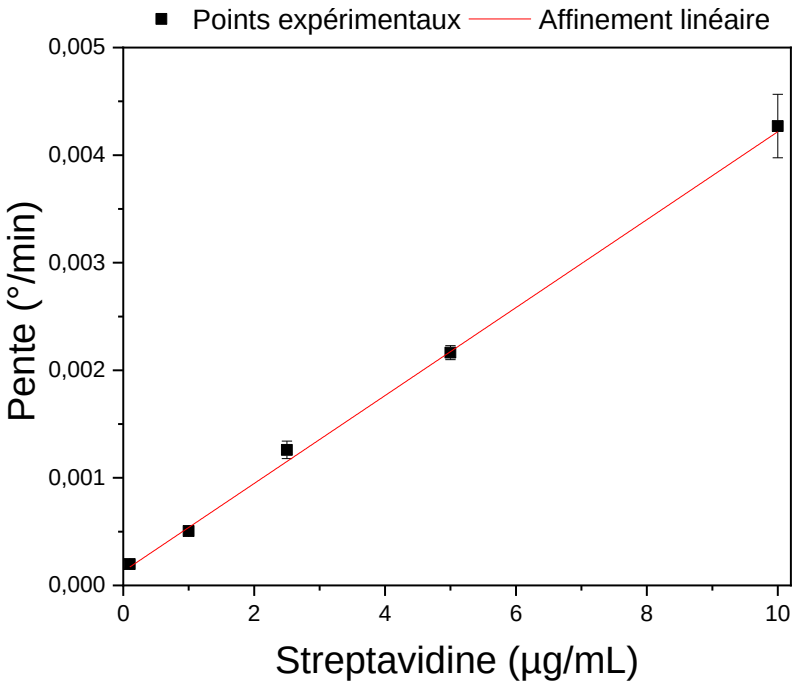

Figure 81. Pentes en fonction de la concentration de la streptavidine.

$$k_{obs} = k_{on}\,[A] + k_{off} \qquad (9)$$

Les pentes extraites des données expérimentales lors de l'adsorption ont été tracées en fonction de la concentration. Un affinement linéaire a été effectué sur ces points pour en ressortir la pente et l'ordonnée à l'origine, correspondant à k_{on} et k_{off} respectivement (figure 25).

Les valeurs des constantes extraites de la courbe grâce à l'équation 9 sont présentées dans le tableau 9.

Tableau 9. Constantes cinétiques d'adsorption et de désorption issues de l'affinement linéaire.

k_{on} (°.s-1)	**k_{off} (°.s-1.M-1)**	**K_D (M)**	**K_A (M^{-1})**
(2,16 ± 0,06) x10^4	(1,39 ± 0,024) x10^{-4}	(6,42± 0,3) x10^{-9}	(1,56 ± 0,33) x10^8

La valeur de K_A calculée avec les pentes est un ordre de grandeur plus élevé que celle issue de l'isotherme de Langmuir. Il en découle également une valeur de K_D d'un ordre de grandeur de différence. Cette différence notable est due au fait que la valeur en statiques est calculée à l'équilibre, tandis que les valeurs cinétiques sont en phase d'adsorption de la protéine. Ce qui comme son nom

l'indique, est plus propice à la formation d'un complexe bitoine/streptavidine qu'à sa dissociation. Dans le cas où le complexe n'est pas encore formé, la streptavidine se diffuse sur les bio-récepteurs pour former des complexes stables. La streptavidine a une quantité de mouvement, et donc une vitesse non nulle de diffusion, qui va lui permettre de former des complexes rapidement. La formation de ces complexes est traduite par la constante k_a.

Les valeurs des constantes de dissociation recensées dans la littérature pour le couple biotine/streptavidine pour des surfaces d'or, sont entre 10^{-7} et 10^{-9} M [235–237]. Tang et al.[236] obtiennent une valeur de k_{off}, un ordre de grandeur en dessous de notre valeur ($0{,}81.10^{-4}$) lorsqu'ils captent de la streptavidine sur une SAM de biotine. La valeur de K_a déduite est donc également plus faible ($7{,}3 \pm 0{,}2.10^{6}$).

6.1.3 Limite de détection du capteur

La limite de détection (LoD) de notre capteur est calculée selon la formule suivante :

$$LoD = \frac{3\sigma}{k} \tag{3}$$

avec σ l'erreur de la mesure (0,001°)et k la sensibilité correspondant à la pente de la courbe d'adsorption à de faibles concentrations (k=$2{,}7.10^{6}$). Ce qui nous ramène à une limite de détection de 1,1 nM correspondant à 57 ng/mL pour la streptavidine. La limite de détection pour notre système est plus basse que celle pour des systèmes semblables aux nôtres, à savoir sans labels. Sheppard et al.[163] reportent une LoD de 10 nM pour l'adsorption de la streptavidine sur une surface d'or fonctionnalisée avec un dérivé de la biotine. Les capteurs avec labels ont des limites de détection plus faibles dû à la taille importante (et donc un indice de réfraction plus conséquent) des analytes.

Une limite de détection aussi faible pour un capteur sans labels est probablement due à la combinaison entre la topographie apportée par les nanoparticules et la mobilité apportée par les chaines OEG.

7 Dilution de la biotine en surface du capteur

Il a été montré que pour un assemblage compact de nanoparticules de 10 nm, un maximum de 13,2 streptavidines peut être adsorbé par nanoparticule. Ce qui signifie qu'une nanoparticule n'a pas besoin d'être entièrement recouverte avec de la biotine. Une faible quantité de récepteur pourrait être suffisante pour détecter la biotine. Pour capter environ 13 streptavidines par nanoparticule de 10 nm, il est nécessaire d'avoir uniquement 13 récepteurs équitablement répartis à la surface d'une nanoparticule. De plus, si les molécules de biotine sont trop rapprochées les unes des autres cela provoque une gêne stérique entre elles. L'effet de gêne stérique apparait lorsque deux molécules sont trop rapprochées l'une de l'autre (superposition des nuages électroniques) ce qui engendre un coût énergétique. Ce coût énergétique peut amener à modifier la conformation de la molécule et donc ses propriétés chimiques. Si la conformation de la biotine est modifiée il se peut que la streptavidine ne reconnaisse pas la biotine.

Une nanoparticule de 10 nm peut contenir un maximum d'environ 40 biotine-OEG sur la moitié de sa surface[238]. Il serait donc suffisant d'avoir une couverture de 30% en biotine-OEG à la surface des

nanoparticules Pour cela nous allons diluer la biotine à la surface des nanoparticules à l'aide de molécules OEG comportant un groupement alcyne (OEG_CC). Nous avons choisi de diluer la biotine-OEG par des OEG_CC jusqu'à un ratio molaire de 5% de biotine-OEG pour avoir une vue d'ensemble de l'impact de la dilution sur la détection de la streptavidine. Nous avons préparé des solutions avec des mélanges des deux molécules avec des pourcentages molaires différents.

Nous partons d'une surface dense de nanoparticules de 10 nm assemblées par chimie clic sur un substrat d'or sur laquelle nous greffons la biotine-OEG et le OEG alcyne (figure 82 (i)), nous avons ensuite greffé des OEG_N3 (figure 82 (ii)) sur les alcynes libres.

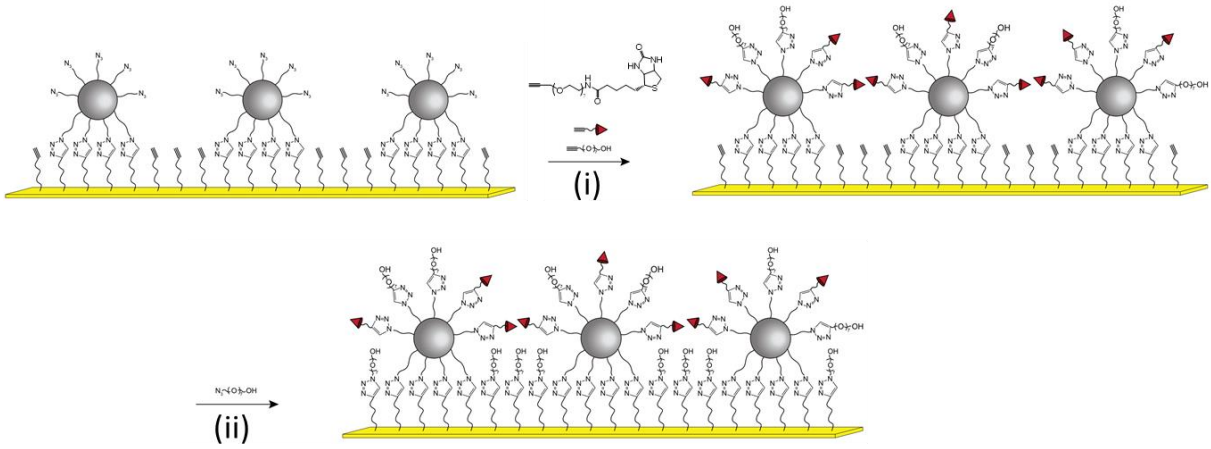

Figure 82. Représentation schématique des étapes de chimie clic effectuées sur le substrat de nanoparticules. De gauche à droite : greffe de la biotine OEG diluée avec un OEG alcyne (i), greffe de la molécule OEG azoture sur les alcynes libres (ii).

7.1 Caractérisations

7.1.1 PM-IRRAS

Nous avons effectué des mesures de spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase (PM-IRRAS) pour confirmer le greffage de la biotine OEG alcyne sur notre surface avec différentes proportions (figure 83).

Le PM-IRRAS permet de mesurer de faibles quantités de composés organiques en surface. Ce qui varie d'une surface à l'autre est ce qui est greffé sur les nanoparticules. Nous avons essayé de greffer différentes quantités de biotine-OEG et OEG_CC en surface afin de diluer la quantité de biotine-OEG à la surface de notre capteur. Nous noterons les bandes caractéristiques des modes de vibration ν(C-H) visibles à 2930 et 2850 cm^{-1}. Caractéristique des chaines carbonées sur notre surface. Nous pouvons observer un pic présent sur tous les spectres autour de 1100 cm^{-1}, cette bande correspond principalement au mode d'élongation ν(Fe-O-P). Autour de 1100 cm^{-1} nous avons également les modes d'élongation ν(C-O-H) et ν(C-O-C) caractéristiques des chaines OEG. La bande correspondant aux chaines OEG est donc cachée par le mode d'élongation ν(Fe-O-P). A 1620 cm^{-1} nous observons le pic correspondant à la liaison ν(C=O) de la biotine. Ce même pic (1750-1500 cm^{-1}) comprend également d'autres pics caractéristiques de la biotine à savoir δ(N-H). La seule différence notable entre les différents spectres est l'apparition d'un épaulement du pic à 1100 cm^{-1}, cet épaulement apparait autour de 1180 cm^{-1} lorsque nous augmentons la quantité de biotine OEG alcyne en surface. Nous

pouvons attribuer cette bande au mode de vibration δ(C-N) qui devrait être plus intense lorsque la quantité de biotine OEG alcyne augmente. Le pic caractéristique des azotures à 2100 cm^{-1} n'est présent sur aucun spectre ce qui confirme le succès de la réaction de CuAAc.

Nous pouvons conclure sur la présence de la biotine-OEG et des OEG_CC en surface qui sont correctement greffés sur les nanoparticules. Mais les mesures PM-IRRAS ne permettent pas de conclure sur les proportions des molécules du chevauchement des pics principaux ν(C-O-C) et ν(Fe-O-P).

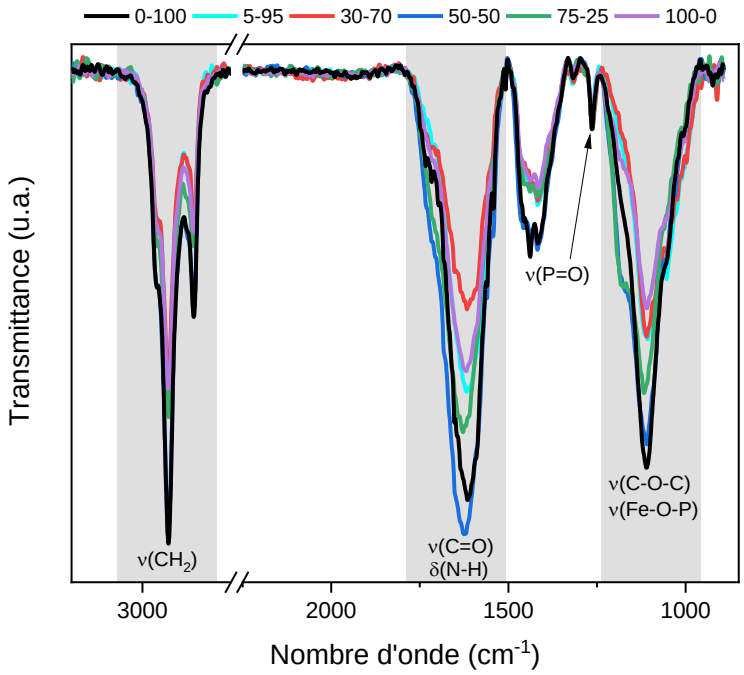

Figure 83. Spectre PM-IRRAS des surfaces recouvertes avec des équivalents molaires de Biotine-OEG et OEG_CC allant de 0 à 100% normalisées par la bande P=O.

7.1.2 XPS

Pour confirmer que le greffage de la Biotine OEG alcyne et OEG alcyne s'effectue dans les bonnes proportions, nous avons effectué des mesures de spectrométrie photoélectronique X en complément du PM-IRRAS. Cette technique permet d'analyser les surfaces sur une dizaine de nanomètres de profondeur de manière très précise. L'élément sondé sera le soufre. En effet, le soufre est aussi bien présent à la base du substrat à cause des thiols et sur la biotine. Et c'est, en notre opinion, le seul élément vraiment discriminant. Le ratio entre le soufre et le fer sera déterminé pour des substrats comprenant des ratios de biotine-OEG et OEG_CC différents. Nous prenons ce ratio en compte car entre les substrats la densité de nanoparticules d'oxyde de fer varie très peu, tout comme celle des thiols greffés sur l'or.

Nous avons mesuré par XPS des surfaces avec des ratios Biotine/OEG différents, allant de 0% de Biotine en surface à 100%. Le substrat sans biotine nous permettra de déterminer l'influence des soufres liés aux molécules thiols.

Les intensités des graphiques S2p ont été normalisées par rapport à l'intensité du fer (figure 84). Ce choix a été effectué car la densité en nanoparticules, et donc en fer, est équivalente pour tous les substrats.

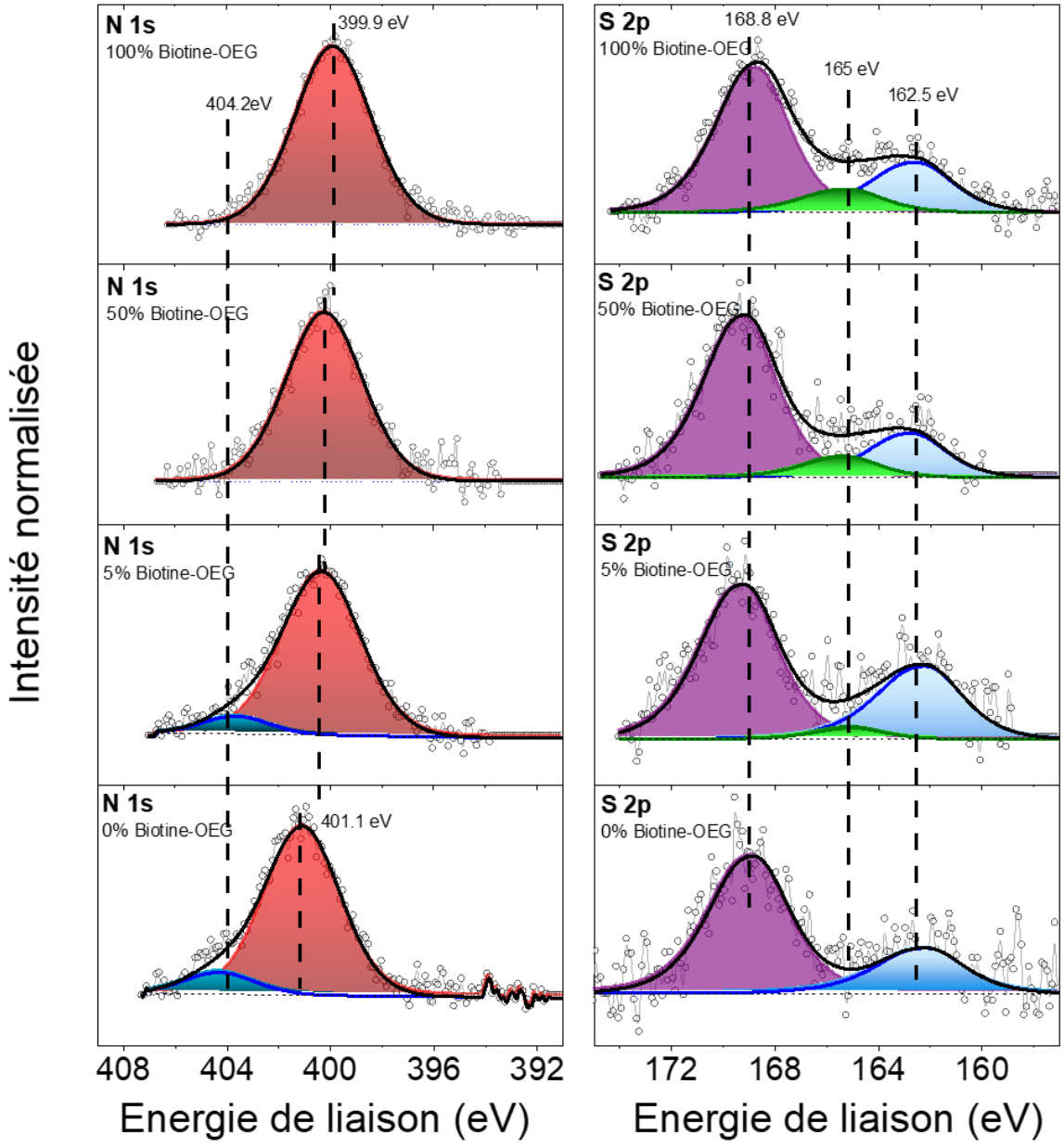

Figure 84. Mesures XPS des liaisons N1s (à gauche) et S2p (à droite) des assemblages de nanoparticules avec différentes densités de biotine OEG en surface allant de 0 à 100% normalisée par rapport au fer.

La figure 84 nous montre les spectres correspondant aux énergies de liaisons N1s et S2p mesurées sur les assemblages normalisés par rapport à la contribution du fer (710 eV). L'énergie de liaison à 162,5 eV correspond aux thiols liés au substrat d'or et confirment la liaison des molécules sur la surface. Le pic prédominant à 168,8 eV correspond à la fonction sulfonate[239]. Ces deux liaisons sont présentes pour les quatre substrats. Les intensités pour ces deux liaisons ne sont pas prises en compte, nous ne cherchons pas à déterminer la quantité de thiols liés ou oxydés en surface. De plus, il est possible que les intensités de ces énergies de liaison soient faussées du fait de la profondeur de ces liaisons par rapport à la pénétration du rayon sondant la surface. Nous cherchons à regarder la quantité de biotine

à la surface des particules et pour cela il faut observer le pic caractéristique de la biotine correspondant au soufre que nous avons attribué au pic à 165 eV[215]. Nous constatons l'absence du pic caractéristique de la biotine pour le substrat sans biotine en surface, ce qui est cohérent. Les intensités normalisées sont reportées dans le tableau 10.

Tableau 10. Intensité du pic S2p à 165 eV correspondant à la contribution de la biotine.

Biotine_OEG/OEG_CC (% mol. En solution)	Ratio du pic S2p à 165 eV et Fe2p (710 eV)	% molaire de Biotine-OEG
100/0	0.022	100
50/50	0.017	77
5/95	0.004	18
0/100	0	0

Nous pouvons noter la décroissance de l'intensité lorsque la quantité de biotine en surface diminue. Lorsque nous passons de 100% à 50% de biotine-OEG en surface nous avons une diminution de l'intensité du pic S2p de 30%. Si nous effectuons la réaction de clic avec 5% de biotine-OEG nous avons une perte de 80% du signal par rapport au maximum. Bien que les ratios des intensités ne suivent pas exactement les ratios molaires en solution nous avons une diminution notable de l'intensité du pic à 165 eV associé au soufre de la biotine. Nous n'expliquons pas le fait que les ratios donnés par l'XPS ne soient pas ceux en solution bien que nous constatons une nette diminution de la quantité de biotine sur les nanoparticules.

Le graphique de l'azote N1s nous montre une contribution intense à 400/401 eV correspondant aux ponts triazoles et une seconde plus faible à 404,2 eV pouvant être attribué à des groupements nitrites[240] résultant d'une possible oxydation du triazole ayant déjà été reportée[240].

7.1.3 Détection par SPR

Comme indiqué précédemment il n'est en théorie pas nécessaire que la surface soit entièrement recouverte de biotine. Une particule de 10 nm de diamètre entièrement recouverte de biotine ne pourrait, au vu de la taille de la streptavidine, capter que 13,2 protéines. C'est pourquoi nous avons dilué le nombre de biotines en surface du capteur pour observer l'impact sur la détection.

Nous avons effectué des greffages de biotine allant de 0% à 100% avec 6 valeurs intermédiaires (figure 85). Nous pouvons remarquer que pour les surfaces comprenant des OEG, en plus de la biotine, nous avons une réponse angulaire lorsque la BSA entre en contact avec notre capteur. Pour une surface recouverte à 100% de biotine OEG alcyne nous n'avons pas de réponse liée à la BSA. De plus, pour cette même surface c'est là que nous avons la réponse angulaire la plus importante, à savoir 0,46°.

La tableau 11 résume les décalages angulaires pour les différentes quantités de biotine-OEG à la surface des nanoparticules ainsi que les masses et épaisseurs correspondantes. Le nombre de streptavidine par nanoparticule correspondant aux masses y est également indiqué.

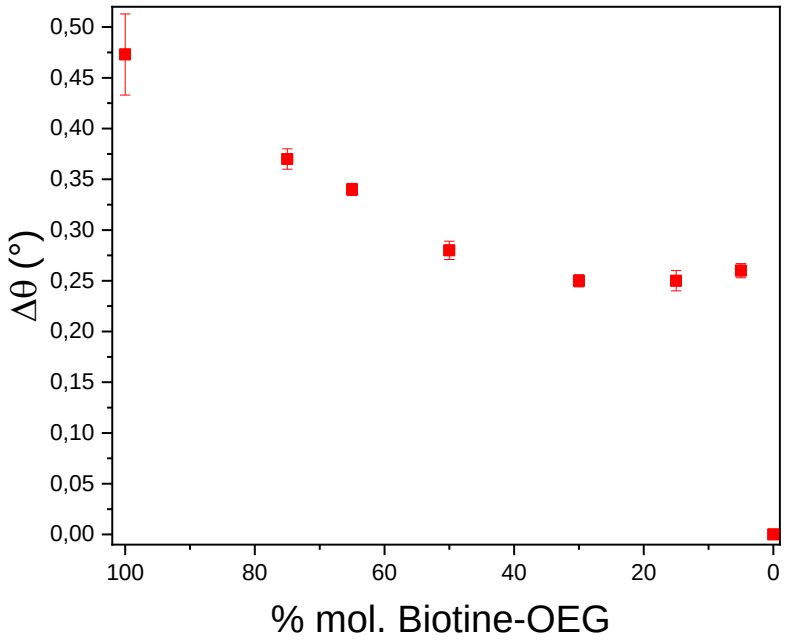

Figure 85. Décalage angulaire lors de la détection de la streptavidine (10µg/ml) pour différentes quantités de biotine-OEG en surface.

Tableau 11. Valeur du décalage de l'angle SPR (Δϑ), de l'épaisseur (d), de la masse (m) et du nombre de streptavidine par nanoparticule en fonction du % molaire de biotine-OEG greffées à la surface des nanoparticules.

% Mol. Biotine-OEG	Mol. % OEG_CC	Δθ (°)	d (nm)	masse (ng/cm²)	SA/NP
0	100	0	0	0	0
5	95	0,26	1,7	113	5.1
15	85	0,25	1,6	108	4.8
30	70	0,25	1,6	108	4.8
50	50	0,28	1,8	121	5.4
65	35	0,34	2,2	148	6.6
75	25	0,37	2,4	161	7.2
100	0	0,46	3,1	205	9.2

Pour une surface entièrement recouverte de OEG (sans biotine-OEG) nous n'avons pas de décalage angulaire, ce qui montre encore une fois l'efficacité des OEG comme agent répulsif. Entre 5 et 50% de couverture, nous avons un décalage angulaire stable d'environ 0,25° qui commence à augmenter lorsque la surface est recouverte avec plus de OEG. L'augmentation semble linéaire à partir de 50% de biotine-OEG. Un tel résultat n'était pas attendu, dans la littérature[241–243] la dilution devrait limiter l'encombrement stérique des molécules de biotine. Un maximum d'adsorption devrait être observé autour de 20% de biotine-OEG à la surface des nanoparticules. Néanmoins ces études ont été effectuées sur des surfaces planes et non courbées comme le sont les nanoparticules.

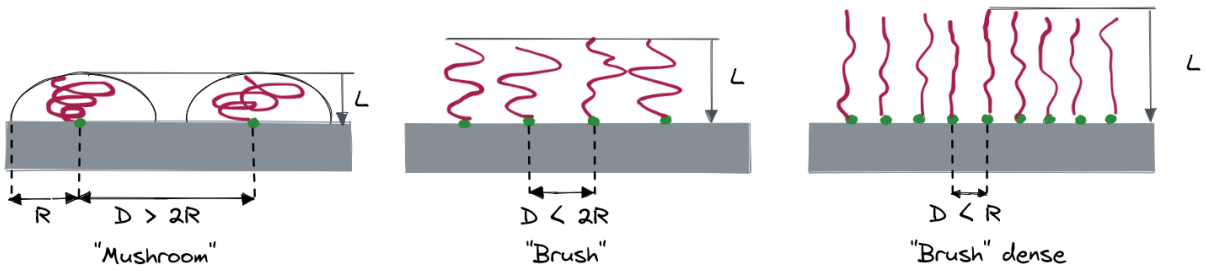

Figure 86. Différentes configurations des chaines OEG en fonction du rayon de giration (R). En rouge la chaine OEG, en vert leur fonction d'accroche sur le substrat (gris)

Nous pouvons supposer que la dilution de la biotine-OEG par des molécules OEG a eu un impact négatif sur la conformation des molécules à la surface des nanoparticules. En effet, des chaines OEG peu denses vont former une conformation dite « mushroom » tandis que des chaines densément assemblées vont se conformer en mode « brush » ou « dense brush » (figure 86)[238].

Nous pouvons supposer que lorsque nous avons plus de 50% de biotine-OEG à la surface les molécules de biotine sont plus densément arrangées tout en étant suffisamment espacés, grâce au rayon de courbure des nanoparticules, pour limiter l'encombrement stérique car il y a moins de OEG_CC qui les séparent. Nous aurions pu penser que le rayon de courbure aurait légèrement décalé la dilution optimale (env. 20%) mais il semblerait que ne pas diluer la biotine-EOG soit plus efficace. Alors que, lorsque nous insérons des OEG_CC pour diluer la biotine-OEG, nous avons les groupements récepteurs qui vont peut-être former des « mushroom ».

Les assemblages entièrement recouverts de biotine-OEG sont donc plus efficients, aussi bien pour la quantité d'analyte perçue que pour la vitesse à laquelle les analytes sont captées du fait du couplage limitant l'encombrement stérique et l'augmentation du rayon de courbure lié au nanoparticules.

8 Conclusion

Nous avons étudié les interactions de la streptavidine avec un capteur recouvert de biotine dans un premier temps. Nous avons constaté grâce à la BSA que le capteur sembler adsorber non spécifiquement des protéines sur les alcynes en surface. La non spécificité du capteur nous a amené à utiliser des molécules OEG connues pour leurs propriétés répulsives. En effet, l'augmentation de la taille des chaines ainsi que leur mobilité semble avoir augmenter la sensibilité du capteur. Le décalage angulaire pour une même quantité de streptavidine a augmenté de plus de 55%.

La dilution des récepteurs en surface pour limiter la gêne stérique semble avoir eu l'effet inverse de ce que nous désirions observer. La courbure des nanoparticules aide certainement déjà à réduire la gêne stérique des récepteurs sans besoin de diluer les récepteurs.

La combinaison entre la topographie de notre capteur et sa structure moléculaire nous a permis d'augmenter la valeur constante d'affinité (K_A=2.45.10^7 M^{-1}) du couple biotine/streptavidine par rapport à des systèmes qui greffent directement la biotine sur une surface d'or. La limite de détection a également été diminuée (1,1 nM), comparé à ce type de système et se rapproche de certains systèmes utilisant des labels.

La clic CuAAc offre donc la possibilité de concevoir un capteur modulable, que nous pouvons modifier en fonction d'analytes spécifiques que nous voudrions détecter.

Chapitre 4 – Conception d'un biocapteur spécifique pour la détection d'α-mannosidase

1 α-mannosidase/Iminosucres

Dans le chapitre précédent nous avons constaté l'efficacité des OEG pour contrer les phénomènes d'adsorption non spécifique. Le modèle choisi précédemment était celui de la Biotine/Streptavidine car nous retrouvons de nombreuses études liées à ce couple, ce qui nous offre des points de comparaison. Dans ce chapitre nous nous intéresserons à un autre couple récepteur/analyte : le couple iminosucre/α-mannosidase (Jack Bean). En effet, nous avons étudié en premier lieu un système modèle qui nous a permis de mettre en place une stratégie d'assemblage et de fonctionnalisation des nanoparticules. Nous allons appliquer cette stratégie à un modèle concret : la détection et l'inhibition de l'α-mannosidase.

1.1 Contexte de l'étude

Les sucres sont l'une des familles de molécules organiques les plus abondantes dans la nature. Ce qui en fait un sujet d'étude intéressant. Ils peuvent être présents sous différentes formes que ce soit sous forme de polymères ou de monomères.

On retrouve les sucres sous formes polymériques, telles que les polysaccharides. Un des principaux polysaccharides est par exemple l'amidon, servant de réserve d'énergie et de nutriment pour les végétaux. De la même manière nous pouvons retrouver chez les animaux le glycogène, jouant le même rôle de réserve énergétique que l'amidon.

Les sucres sous forme monomérique, quant à eux, peuvent se retrouver dans les cellules bien que liés à d'autres molécules, ils sont dits glycoconjugués. Ils sont les constituants d'éléments biologiques essentiels tel que l'ADN, l'ARN ou bien l'ATP.

Les glucides constituent une partie de la membrane plasmique cellulaire (figure 87). La couche de glucides d'une cellule est appelée glycolalyx. Les principaux glucides (glycolipides et glycoprotéines) jouent un rôle important dans la reconnaissance intercellulaire chez les organismes uni et multi cellulaires du fait de leur exposition à la surface de la cellule.

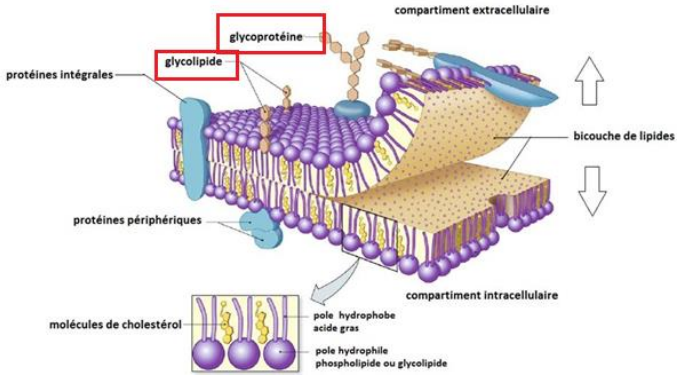

Figure 87. Schéma de la paroi cellulaire.

Un des exemples notables de l'importance de la reconnaissance intercellulaire est son rôle dans le fonctionnement de notre système immunitaire.

L'importance des sucres dans l'organisme ne s'arrête pas là. Les sucres fournissent à l'organisme l'énergie nécessaire à son fonctionnement : c'est le « carburant » de nos cellules.

L'hydrolyse des sucres permet de les isoler d'autres éléments (protéines, sucres, …) pour qu'ils se retrouvent sous forme de monomère. Cette dissociation peut s'effectuer via la glycosidase (enzyme) Ce qui permet de décrocher les sucres des nutriments pour faciliter leur adsorption à travers la paroi intestinale pour rejoindre notre sang qui va les diffuser dans notre organisme.

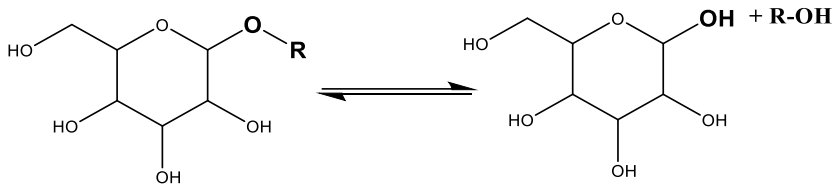

Figure 88. Hydrolyse de la liaison glycosidique

Les sucres ont donc diverses fonctions en biologie. Ce qui a naturellement mené à l'étude de ces derniers. Il s'avère que les sucres sont impliqués dans les processus biologiques de plusieurs maladies. Un des exemples les plus connus est le diabète où le taux de glucose (glycémie) est supérieur à 1,26 g/L[244]. D'autres exemples s'en suivent, les cellules cancéreuses sont avides de sucres et en consomment en grandes quantités. Il existe également des maladies lysosomales, généralement génétiques, qui entrainent un dysfonctionnement des lysosomes des cellules. Ce dysfonctionnement entraine une accumulation des déchets cellulaires au sein même de la cellule et donc de l'organisme. Tous ces phénomènes sont liés à un dysfonctionnement lors de la catalyse du sucre. Il est donc intéressant d'étudier les mécanismes liés au fonctionnement des sucres.

Les iminosucres ont un fort potentiel pour le traitement de certaines maladies (diabètes, infections virales) car ils sont de bons inhibiteurs de la glycosidase. Le challenge étant la synthèse de composés ciblant spécifiquement la glycosidase. Un des candidats retenus pour l'inhibition de la glycosidase est le 1-deoxynojirimycine (DNJ)[245–247]. En effet, les iminosucres sont caractérisés par leur hétérocycle contenant un atome d'azote (figure 89). mimant les monosaccharides (par exemple le glucose ou le fructose)[245].

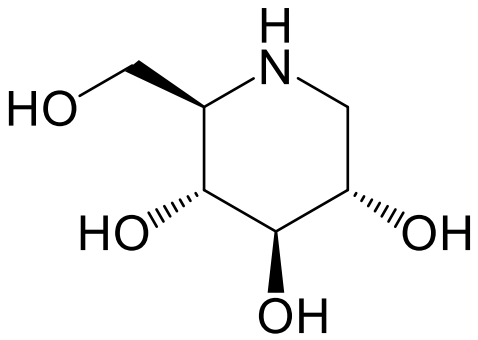

Figure 89. Représentation schématique de l'iminosucre 1-deoxynojirimycine (DNJ).

Nous pouvons donc tirer parti de ces forts inhibiteurs d'enzymes que sont les iminosucres pour la détection d'enzymes spécifiques. En nous basant sur les travaux de l'équipe de P. Compain[248] nous avons étudié les interactions entre un iminosucre et une enzyme, l'α-mannosidase, qui possède deux sites de reconnaissance spécifique[249].

Les travaux de P. Compain portent sur des systèmes multivalents de DNJ ayant une valence comprise entre 1 et 48[248]. Le but du système est de synthétiser des composés avec plusieurs molécules de DNJ

pour augmenter le nombre d'inhibiteurs. Une première stratégie consiste à greffer sur des cycles peptidiques (figure 90 a)) des dérivées de la molécule de DNJ par CuAAc clic, la seconde stratégie consiste à greffer des dérivées de la DNJ sur des fullerènes (figure 90 b)).

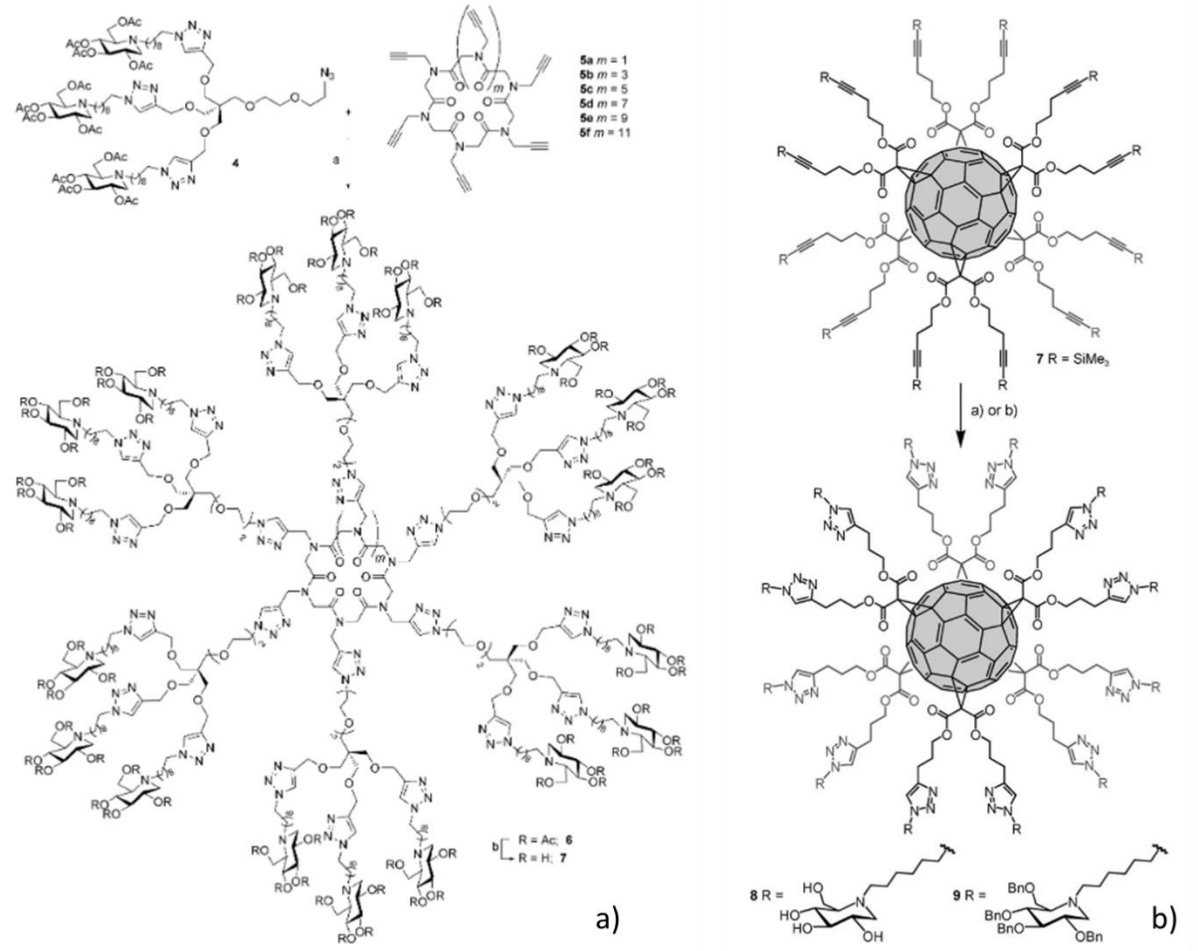

Figure 90. Représentation schématique des assemblages de DNJ pour former des groupements multivalents grâce à des cycles polypeptidiques (a) et des fullerènes (b).

Les travaux de son équipe montrent que l'inhibition est décuplée lorsque la valence des composés est augmentée. Une inhibition maximale est atteinte pour le composé 36 valents. Lorsque la valence est augmentée, jusqu'à 48, aucune augmentation de la constante d'inhibition n'est constatée. Des composés avec une valence supérieure n'ont néanmoins pas été synthétisé et ne semblent pas répertoriés dans la littérature car ils sont difficiles a réaliser. Grâce aux nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm, pouvant s'apparenter au système avec les fullerènes, nous pouvons atteindre une valence nettement supérieure à 48. Ce qui nous permettra de comprendre si nous pouvons augmenter la constante d'inhibition (K_i) pour avoir une meilleure reconnaissance entre le DNJ et la Jack Bean

Comme nous l'avons décrit précédemment nous avons mis au point une plateforme de détection versatile. A l'aide de la réaction de CuAAc clic nous avons pu modifier la surface des nanoparticules pour y greffer des iminosucres.

L'objectif de cette plateforme est de détecter spécifiquement l'α-mannosidase. Cette enzyme est en effet déficitaire chez les patients ayant l'α-mannosidose, une maladie génétique rare provoquant des problèmes dans de nombreux organes suite à une surcharge lysosomale.

1.2 Interaction entre le DNJ et l'α-mannosidase

Nous avons vu que les imminosucres tel que le DNJ sont des inhibiteurs bien connus de l'α-mannosidase[250,251] ce qui fait de cet imminosucre une solution pour ralentir ou annihiler certaines maladies. Un autres exemple de l'utilisation du DNJ et ses dérivées est le traitement de la maladie de Gaucher[252–254].

Le DNJ va venir se fixer sur le site actif de l'α-mannosiade par liaisons hydrogène (figure 91). Les hydroxyles en position 3 vont se fixer aux résidus Asp472 et Asp92. Ces mêmes groupes vont interagir avec l'atome de Zn^{2+}. L'atome de zinc a pour rôle de stabiliser la configuration du DNJ, il agit de la même manière avec d'autres dérivés d'imminosucres[255]. L'hydroxul en position 4 interagit avec le résidu Tyr727 mais également avec le résidu Asp472. Une liaison hydrogène est formée entre l'amine du DNJ et le résidu Asp204 relié également au zinc.

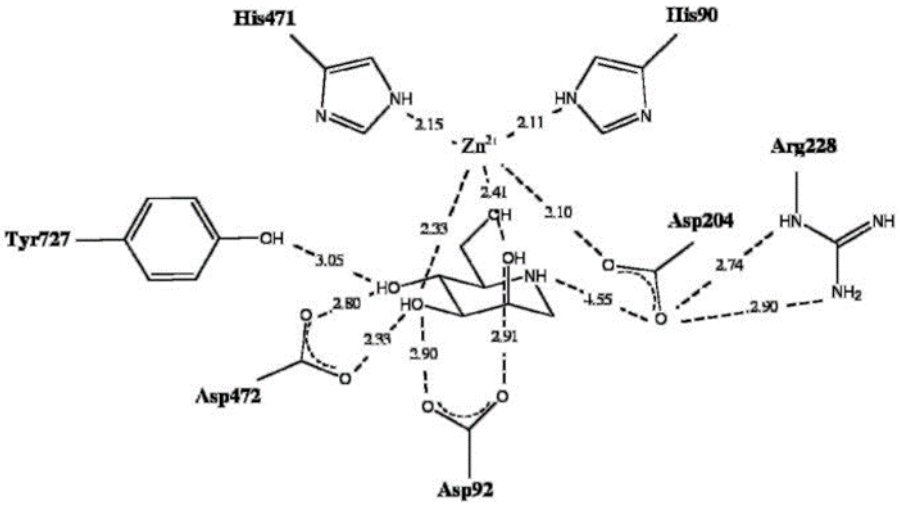

Figure 91. Schéma du complexe DNJ/α-mannosidase[255].

1.3 Fonctionnalisation des surfaces avec les iminosucres

Nous avons montré dans le chapitre précédent les OEG diminuent l'adsorption non spécifiques des analytes sur la surface. La plateforme de détection a donc été conçue et adaptée pour la reconnaissance spécifique de l'α-mannosidase.

1.3.1 Partie Expérimentale

De la même manière que dans la partie précédente. Nous avons assemblé des nanoparticules avec un diamètre de 12,4 nm ± 1,1 nm sur une surface d'or sur laquelle nous avons greffé des thiols avec une fonction terminale alcynes. Les nanoparticules fonctionnalisées avec l'AP12N3 présentant une fonction azoture terminale sont assemblées par chimie clic sur la SAM de thiols alcynes. La surface est recouverte de manière homogène avec une densité de 3000 NP/µm² (Figure. 92).

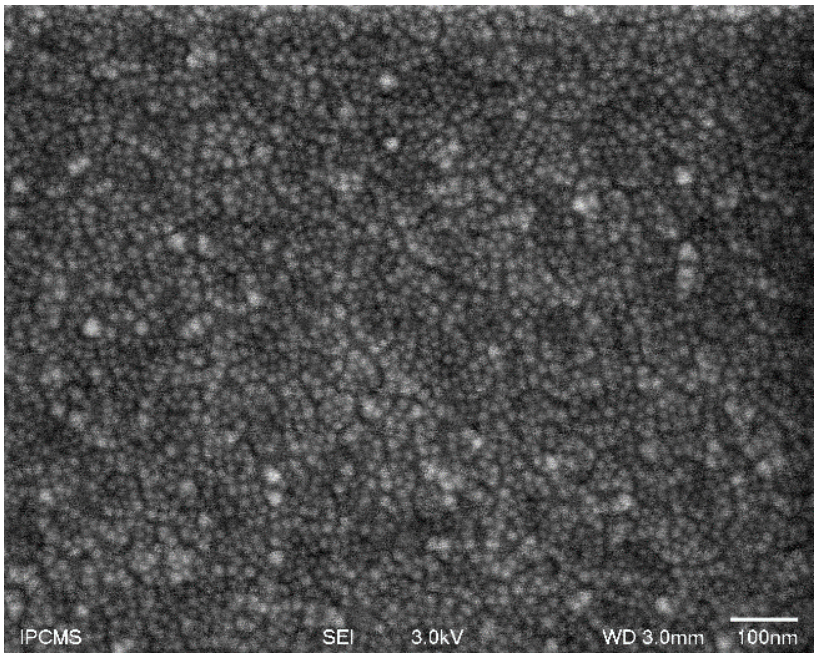

Figure 92. Images MEB d'assemblage de nanoparticules de 12nm. Grossissement x100000.

Les nanoparticules étant assemblées suite à la réaction de chimie clic sur les alcynes de la SAM possèdent des fonctions azotures disponibles sur la surface permettant le greffage d'autres molécules avec une terminaison alcyne par chimie clic (Figure 93).

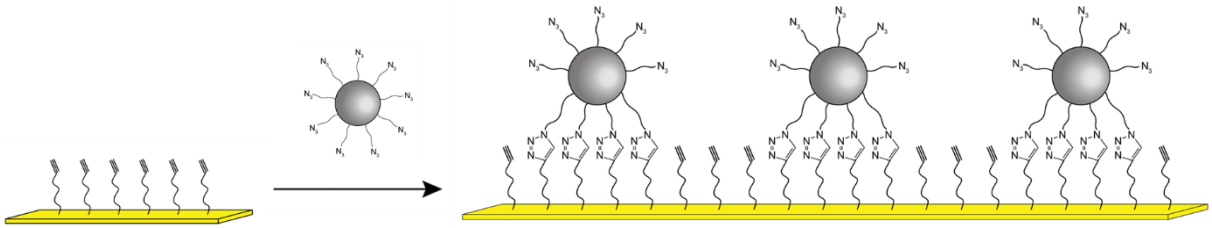

Figure 93. Représentation schématique de la surface d'or recouverte de nanoparticules avec des azotures libres en surface permettant la clic de molécules comportant un groupement alcyne.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que nous pouvons greffer une molécule avec un alcyne sur la face supérieure des nanoparticules. Dans le cas présent nous allons greffer un dérivé alcyne d'un iminosucre : 1-deoxynojirimycine (Figure 94).

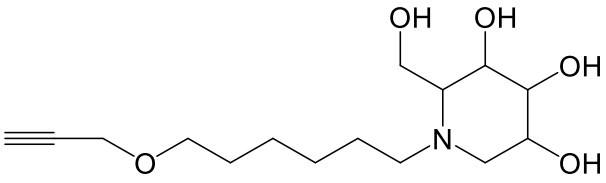

Figure 94. Schéma de la molécule de 1-deoxynojirimycine (DNJ) alcyne

Le protocole de chimie clic de la molécule de DNJ sur les surfaces est le même que celui décrit dans le chapitre précédent. Les substrats fonctionnalisés avec des nanoparticules sont plongés dans une solution de THF contenant le catalyseur au cuivre et la triethylamine ainsi que 2mM de DNJ-alcyne. Après le greffage de la molécule de DNJ nous avons greffé des molécules O-(2-azidoethyl)heptaethylene glycol (OEG_N_3) sur les alcynes libres en surface par CuAAc clic (Figure 95)

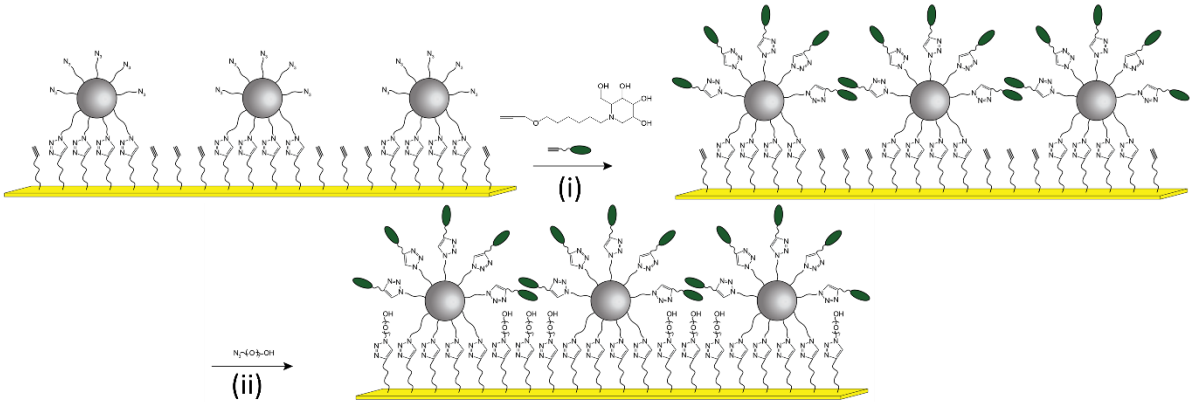

Figure 95. Représentation schématique du greffage de la molécule de DNJ par chimie clic sur une surface de nanoparticules (i) suivi du greffage de la molécule OEG_N3 sur les alcynes libres.

En supposant que la surface occupée par la molécule de DNJ greffée sur les nanoparticules soit d'environ 1 nm^2 [256] et que la surface disponible d'une nanoparticule de 10 nm est d'environ 150 nm^2 il est possible de disposer plus de 100 molécules de DNJ à la surface d'une nanoparticule. Ce qui nous amène à un système avec une valence supérieure à 100.

1.3.2 Caractérisations

1.3.2.1 XPS

Nous avons caractérisé par XPS un assemblage de nanoparticules sur lesquelles ont été greffé les molécules de DNJ ainsi que les molécules OEG_N_3 greffées sur les alcynes libres entre les nanoparticules. Les énergies de liaison étudiées sont celles du fer, de l'azote et du carbone (figure 96).

Le spectre d'analyse de la région Fe2p montre deux contributions principales correspondant aux niveaux d'énergie Fe2p1/ et Fe2p3/2 ayant centrés à 722,7 eV et 709,8 eV. Chaque pic possède deux contributions correspondantes à Fe^{2+} et Fe^{3+} de la magnétite. La composante satellitaire à 717 eV a été attribuée au Fe3+ contenu dans la magnétite contenue dans les nanoparticules qui se sont oxydées. Le spectre C1s possède 2 contributions, la contribution majeure à 285 eV est attribuée aux liaisons (C-C), (C-N) et (C-H)[257]. La deuxième contribution 287,3 eV est attribuée aux liaisons (C-O)[257] des iminosucres et des molécules OEG. L'azote (N1s) possède une faible contribution à 399,8 eV correspondant aux liaisons (C-N) des triazoles formée par chimie clic. Nous n'expliquons pas la faible contribution de l'azote.

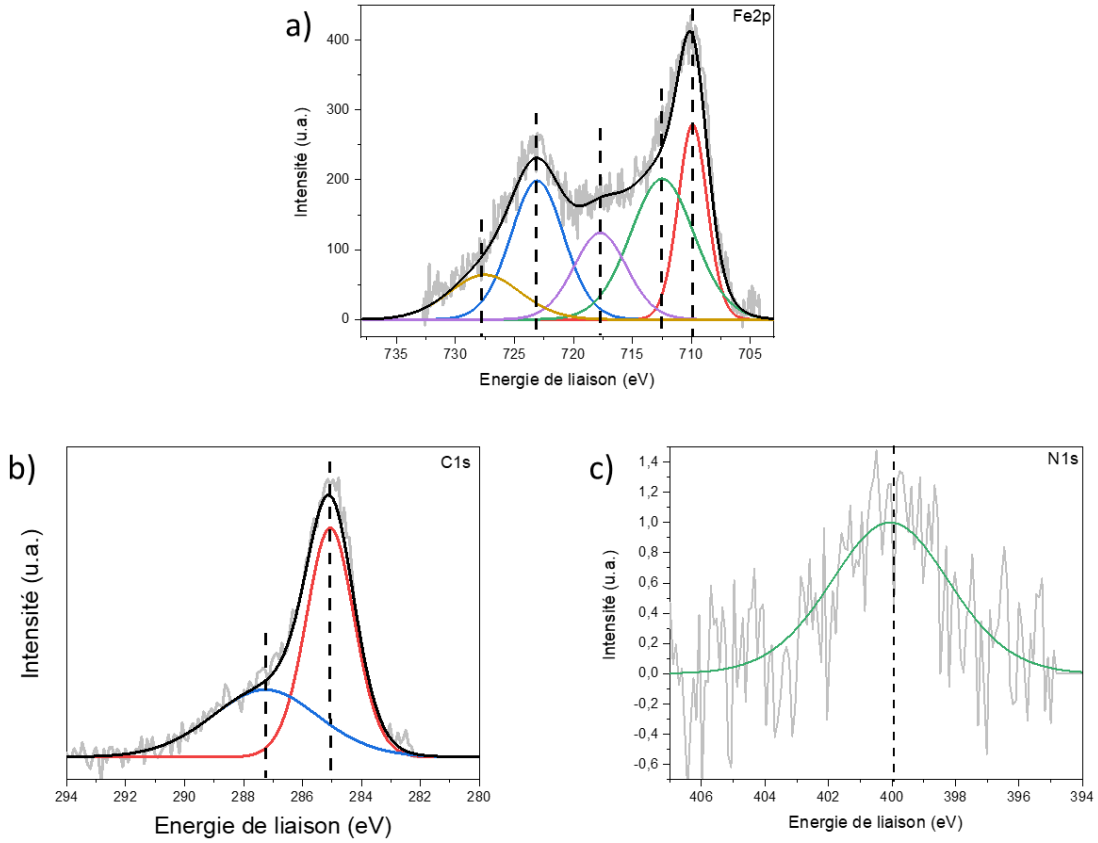

Figure 96. Mesures XPS Fe2p (a), C1s (b) et N1s (c) d'un assemblage de nanoparticules avec la molécule de DNJ greffée sur les nanoparticules et OEG_N3 sur les alcynes.

1.3.2.2 SPR

Toutes les mesures SPR ont été effectuées dans la configuration de Kretschmann. La longueur d'onde de la source lumineuse est fixe (785 nm).

Nous avons suivi par SPR la construction du bio-capteur (figure 97). L'angle de résonance plasmonique de l'or est à 65,56°, le greffage de la SAM de thiol alcyne provoque un décalage angulaire de 0,4°. L'assemblage des nanoparticules décale l'angle de résonance à 68,18°. Le greffage par chimie clic de la molécule de DNJ est à 68,46°. L'ajout par chimie clic des molécules OEG_N_3 provoque un léger décalage angulaire de 0,01°. Nous notons l'élargissement du pic après greffage de la DNJ et des OEG_N_3. Cet élargissement n'apparait pas lors du greffage de la biotine et de la biotine-OEG. Nous n'expliquons pas cet élargissement du pic.

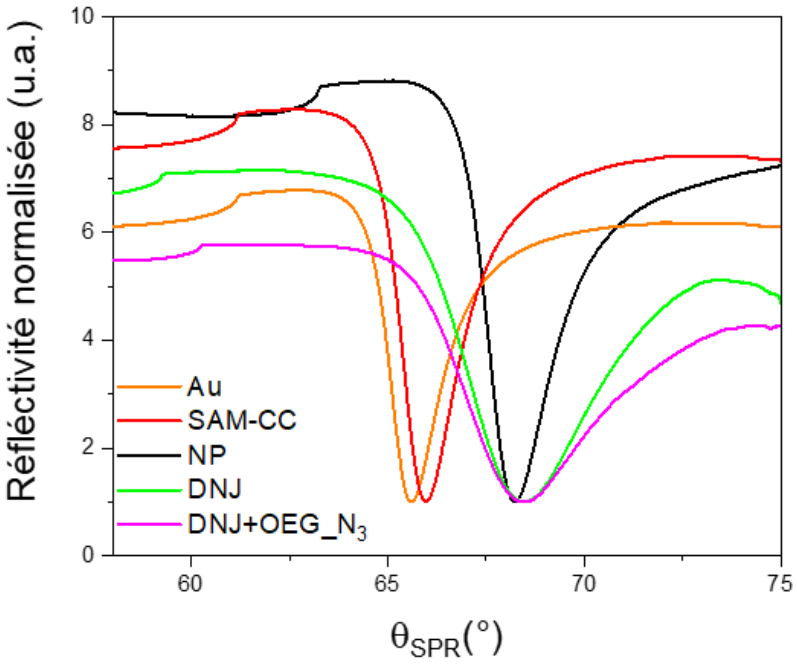

Figure 97. Angle de résonance SPR lors des différentes étapes de construction du bio-capteur.

2 Détection α-mannosidase par SPR

2.1 Extraction et préparation de l'α-mannosidase

L'α-mannosidase commerciale reçue provient d'une plante : Canavalia ensiformis, plus communément nommée Jack Bean. Elle est reçue et stockée dans une suspension de sulfate d'ammonium (3 M, pH = 7,5) qui empêche le développement bactérien et maintient l'enzyme sous une forme stable. L'enzyme est extraite par centrifugation à 10000 g pendant 10 minutes. L'enzyme se retrouvera au fond du tube de centrifugation, ce qui nous permet de retirer la solution de sulfate d'ammonium. Nous plaçons ensuite l'enzyme dans la solution souhaitée, dans le cas présent l'enzyme sera placée dans l'eau. Les premières mesures sont effectuées dans l'eau car nous avons effectué les mesures SPR pour la détection de la streptavidine en milieu aqueux.

2.2 Détection de l'α-mannosidase

Dans un premier temps nous regardons la variation du signal plasmonique d'une surface de nanoparticules recouverte de DNJ comme décrite dans la partie précédente. Pour étudier correctement les phénomènes d'adsorption de l'α-mannosidase sur notre surface nous avons fait les mesures pour des solutions avec une concentration allant de 1 µg/mL et 100 µg/mL (Figure 98). Aucun décalage de l'angle de résonance n'est observé pour des concentrations inférieures à 1 µg/mL Nous avons commencé les mesures avec les solution d'enzymes les plus concentrées. Ce qui nous a permis de définir la concentration minimale expérimentale que notre capteur est capable de détecter. Par la suite nous calculerons la limite de détection théorique.

Nous observons des variations de l'angle de résonance plasmon de surface allant de 0.063° à 0,978° pour 1 µg/mL et 100 µg/mL respectivement après injection de l'α-mannosidase. Cette variation angulaire est observée en moins de 3 minutes après injection de l'α-mannosidase et se stabilise après rinçage de la surface à l'eau (figure 98 trait discontinu).

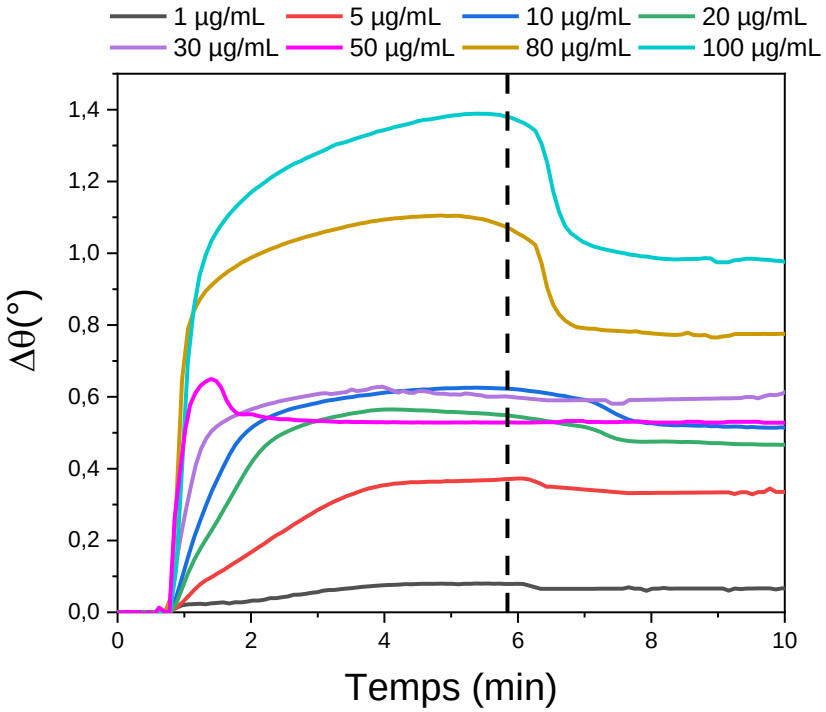

Figure 98. Sensorgrammes après injection d'α-mannosidase à différentes concentrations allant de 1 µg/mL à 100 µg/mL. Le trait discontinué correspond à l'injection d'eau pour le rinçage.

Plus la concentration d'enzyme en solution est importante plus le changement d'angle de résonance plasmonique s'effectue rapidement, la cinétique d'adsorption semble être plus rapide pour des concentrations importantes. Nous étudierons la cinétique dans la partie 2.2.2.

Nous pouvons remarquer que pour des concentrations supérieures à 50 µg/mL, l'angle de résonance arrive à un maximum avant de s'abaisser et d'arriver sur une valeur constante après rinçage. Nous pouvons supposer que la totalité des récepteurs sont occupés et que l'excès d'α-mannosidase en solution est retiré par le flux d'eau circulant.

2.2.1 Calcul de la longueur de décroissance l_d et de la masse adsorbée en surface

2.2.1.1 Longueur de décroissance

Dans le chapitre précédent nous avons vu que l'indice de réfraction du milieu a un impact direct sur la longueur de décroissance du système.

Nous avons recalculé l'indice de réfraction à la surface de notre film d'or pour des nanoparticules de 12,4 nm ± 1,1 nm assemblées avec une densité de 3000 NP/µm². L'assemblage étant plus dense d'environ 10% par rapport à celui étudié dans le chapitre 2, l'indice de réfraction du milieu est donc plus important du fait de l'augmentation de la fraction volumique occupée par les nanoparticules. L'indice de réfraction moyen calculé est de 1,71. La longueur de décroissance déduite est de 213 nm.

2.2.1.2 Masse adsorbée en surface

Le calcul de l'épaisseur adsorbée en surface dépend de l'indice de réfraction de l'analyte. Nous n'avons pas recensé d'études dans la littérature indiquant avec exactitude de valeur, l'indice de réfraction de l'α-mannosidase. Nous avons donc utilisé l'indice et la variation d'indice moyen des enzymes pour les calculs qui suivront. Il est donc possible qu'il y ait de légères différences entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales à savoir n = 1.42 [258]

De l'épaisseur, nous en déduisons la masse adsorbée par la formule de Feijter. Pour ce faire, nous avons besoin de la variation de l'indice de réfraction par rapport à la concentration. De même que pour l'indice de réfraction aucune valeur exacte n'a été trouvée. Nous utiliserons la variation d'indice moyen des protéines soit $\frac{\partial n}{\partial c} = 0{,}185\ cm^3.g^{-1}$.

Nous avons calculé les épaisseurs des couches adsorbées et les masses correspondantes aux décalages de l'angle de résonance plasmonique d'après la formule de Campbell et Feijteer, les valeurs sont répertoriées dans le tableau 12.

Tableau 12. Valeurs du décalage de l'angle SPR (Δϑ), de l'épaisseur (d) et de la masse (m) en fonction de la concentration d'α-mannosidase dans l'eau.

A-mannosidase (µg/mL)	Δθ(°)	Epaisseur d (nm)	Masse m (ng/cm²)
1	0,063	0,67	32,55
5	0,335	3,61	175,51
10	0,453	4,91	238,77
20	0,466	5,05	245,76
30	0,504	5,48	266,36
50	0,515	5,60	272,32
80	0,775	8,54	415,44
100	0,978	10,89	529,98

Brissonnet et al. reportent une épaisseur de l'α-mannosidase de 5,1 ± 0,3 nm mesurée par AFM[259]. Nous remarquons que l'épaisseur calculée par l'équation de Feijter est autour de la valeur

expérimentale mesurée par Brissonnet pour les solutions ayant une concentration convergeant autour du plateau à 0,5°.

Comme nous avons certainement une erreur sur les constantes utilisées pour calculer ces valeurs nous ne pouvons pas tirer de conclusion exacte et définir à partir de quelle valeur nous avons la formation de multicouches. Mais il est évident que pour 80 et 100 µg/mL nous avons des épaisseurs nettement supérieures à 5,1 nm.

2.2.2 Modèle de Langmuir, constantes cinétiques à l'équilibre

Nous pouvons remarquer que les courbes correspondantes à 10, 20, 30 et 50 µg/mL (figure 9) semblent converger vers un décalage de l'angle de résonance, autour de 0,5°. Les angles de résonance pour 80 et 100µg/mL sont très supérieurs à 0,5°, ils sont de 0,775° et 0,978° respectivement.

On remarquera que pour une concentration de 50 µg/mL avant de se stabiliser à 0,515° un maximum à 0,642° est atteint avant de se stabiliser. Cette diminution de l'angle de résonance est liée à une détection par le capteur d'un plus grand nombre d'enzymes dans le milieu que ce qu'il est possible de lier à la surface du capteur. L'excès d'enzyme en solution provoque un changement de l'indice de réfraction du milieu qui provoque le changement d'angle de résonance plasmonique. L'α-mannosidase en excès n'ayant pas accès aux iminosucres, est évacuée par le flux d'eau balayant la surface du capteur ce qui ramène l'angle à une valeur stable.

Le modèle des isothermes Langmuir [260,261] est le plus utilisé pour décrire l'adsorption des protéines sur les surfaces. Il découle d'un modèle établit par Irving Langmuir en 1918 qui reçut le prix Nobel en 1938 pour ses travaux sur la chimie de surface. Langmuir décrit l'adsorption d'un gaz sur une surface d'une manière simple, en disant que les molécules d'un gaz vont s'adsorber sur une surface si les sites récepteurs de cette molécule ont la même énergie de liaison, sont coupables par une seule molécule et n'interagissent pas entre eux. Ce modèle nous ramène donc à une hyperbole.

Bien que parfois controversé et remis en question[262], il est très largement utilisé pour décrire les mécanismes d'adsorption de protéines sur une surface.

Pour pouvoir appliquer ce modèle, quatre conditions ont été mises en évidence [262] :

1. tous les sites d'adsorption sont équivalents, distinguables et indépendants
2. chaque site d'adsorption ne peut recevoir qu'une seule protéine
3. la protéine n'interagit pas avec d'autres protéines d'une quelconque manière
4. le processus d'adsorption doit être dynamiquement réversible

On peut donc appliquer ce modèle pour des concentrations en protéines faibles qui ne risqueraient pas d'interagir entre elles.

Mais l'adsorption de gaz sur une surface est plus compliquée que ce que prédit le modèle de Langmuir. Il a été observé que des multicouches se forment sur la surface. Si une simple molécule gazeuse peut former des multicouches, il semble normal qu'une protéine puisse en faire de même.

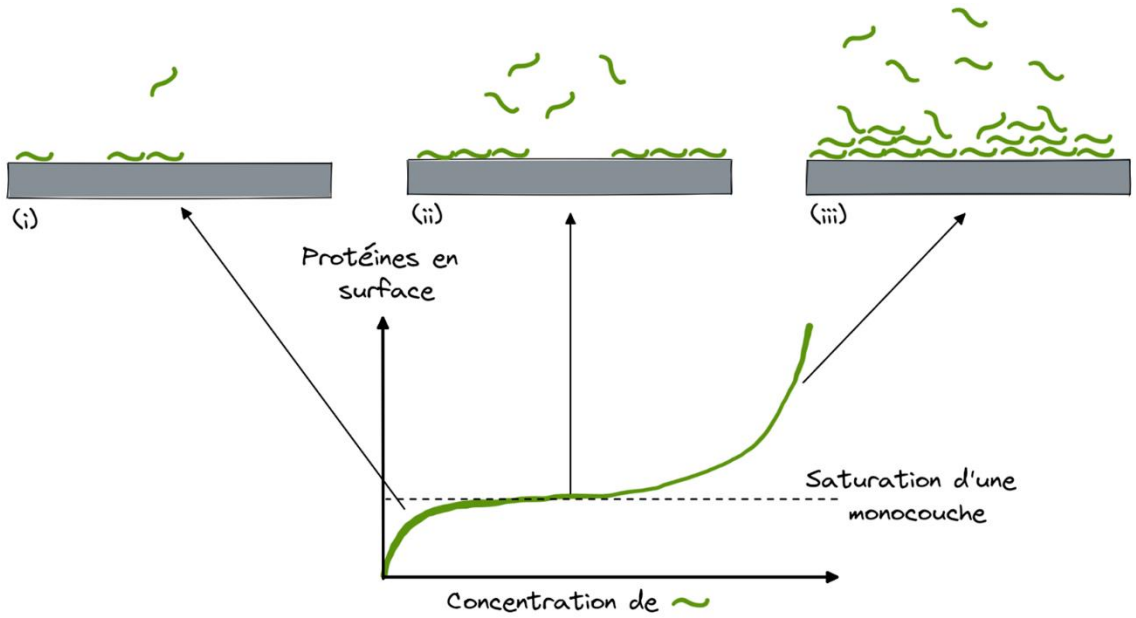

Figure 99. Schéma illustrant la théorie de Brunauer, Emmett et Teller

On remarquera que pour de faibles concentrations (figure 99 (i) et (ii)), la courbe suit le régime proposé par Langmuir. Lorsque la concentration de la solution augmente nous avons formation de multicouches (figure 99 (iii)).

Nous avons tracé la variation d'angle de résonance plasmonique en fonction de la concentration d'α-mannosidase en solution. Nous avons affiné les concentrations allant de 1 à 50 µg/mL avec l'isotherme de Langmuir (figure 100) décrivant un modèle d'adsorbion d'une monocouche.

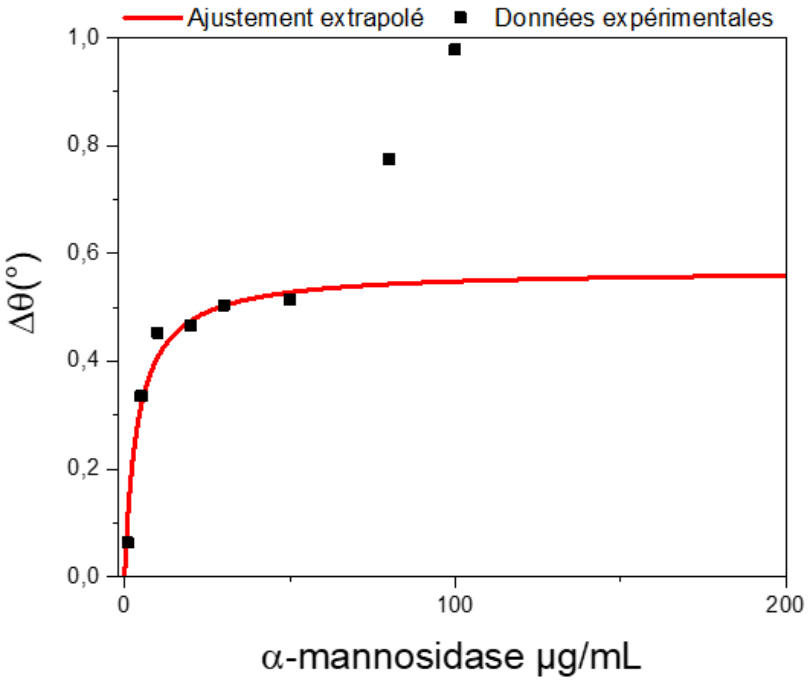

Figure 100. Décalage de l'angle SPR en fonction de la concentration d'α-mannosidase en solution. Les points expérimentaux entre 1 et 50 µg/mL ont étés affinés avec l'équation de l'isotherme de Langmuir qui a été extrapolée à des concentrations plus élevées.

La figure 100 nous montre un changement de régime pour les concentrations supérieures à 50 µg/mL qui ne coïncide pas avec l'isotherme de Langmuir. Nous supposons donc que pour des concentrations trop élevées, les enzymes vont se disposer en multicouches car tous les récepteurs sont occupés. Dans ce cas présent nous sommes dans une autre configuration qui peut être assimilée au modèle de Brunauer-Emmett-Teller (BET). Cette hypothèse est confirmée par le calcul des épaisseurs liées à l'augmentation de l'angle de résonance plasmonique calculé avec l'équation de Feijter. Nous ne nous attarderons pas sur la formation de multicouches. En effet, dans le but de l'étude est de détecter de faibles quantités et non pas d'étudier l'adsorption des protéines en multicouches.

Nous concentrerons notre étude sur les concentrations en dessous de 50 µg/mL, qui suivent le modèle de l'isotherme de Langmuir :

$$\theta = \frac{[C]}{[C] + K_D}\theta_{\max} \qquad (1)$$

$\Delta\theta$ étant la réponse du système en degrés, [C] la concentration de la streptavidine, $\Delta\theta_{\max}$ la réponse maximale du système et K_D la constante de dissociation. L'affinement des données expérimentales avec l'équation 1 nous donne accès aux valeurs de $\Delta\theta_{max}$ et K_D. La constante d'association K_A en est déduite par la suite, c'est l'inverse de K_D ($K_D=1/K_A$).

Tableau 13. Valeur des constantes d'affinité extraites par l'équation de l'isotherme de Langmuir appliquées pour des concentrations en α–mannosidase allant de 1 à 50 µg/mL.

K_D (M)	K_A (M^{-1})	$\Delta\theta_{\max}$ (°)
(1,76 ± 0,47) $x10^{-8}$	(5,68 ± 2,13) $x10^{7}$	0,57 ± 0,03

En général lorsque nous utilisons des enzymes, le terme K_D n'est pas utilisé, nous utilisons le terme K_i. Le terme K_i se réfère à la constante d'inhibition, tandis que K_D à la constante de dissociation. Les deux termes sont utilisés pour décrire l'affinité de liaison qu'une molécule a pour une enzyme ou un récepteur. Le terme K_D est un terme plus général, plus universel. Par la suite $K_i = K_D$.

Les travaux de recherche de P. Compain[248] ont montré que pour des systèmes multivalents d'iminosucres, nous augmentons la constante d'affinité des systèmes. Comme décrit plus tôt, certains systèmes basés sur des fullerènes peuvent s'apparenter à des nanoparticules. Comme pour tous systèmes où les molécules sont greffées de manière compacte, nous pouvons nous attendre à de la gêne stérique entre les ligands qui va limiter l'effet de la multivalence. Comme vu dans le chapitre précédent, la gêne stérique peut être réduite grâce à la géométrie sphérique des nanoparticules. Il a été montré que le système présentant la meilleure constante d'inhibition est celui avec 36 unités de DNJ. La constante K_i de ce système est de 1,1 10^{-9} M. Si l'on compare la constante d'affinité à la constante calculée par l'isotherme de Langmuir, nous remarquons que nous avons un ordre de grandeur de différence. Cette différence peut être attribuée au fait que nous effectuons la détection en surface et non en solution ce qui diminue la dynamique d'interaction entre le DNJ et l'enzyme. Nous allons ensuite déterminer par la constante d'inhibition, le moment de l'entrée en contact de l'α-mannosidase avec le DNJ par la méthode des pentes.

2.2.3 Détermination des constantes cinétiques par la méthode d'analyse des pentes

Nous avons déterminé les constantes d'adsorption (K_A) et de désorption (K_D=K_i) dans la partie précédente à l'aide des décalages angulaires à l'équilibre et à l'isotherme de Langmuir. Nous traçons ici les pentes lors de l'adsorption de l'enzyme en fonction des concentrations entre 1 et 50 µg/mL (figure 101).

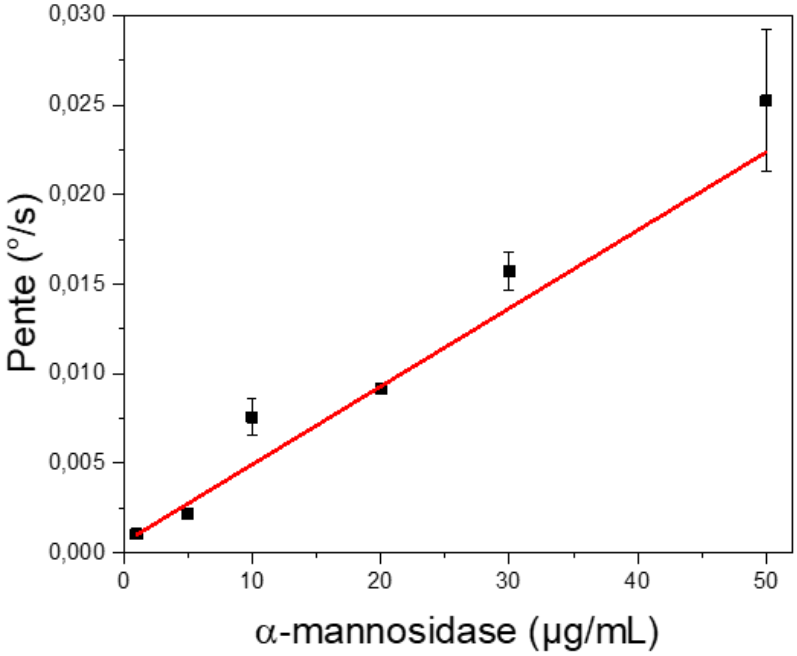

Figure 101. Pentes mesurées lors de l'adsorption de l'α-mannosidase en fonction de sa concentration.

En utilisant les données expérimentales, nous sommes en mesure de tracer les pentes en fonction des concentrations pour obtenir les constantes k_{on} et k_{off} lors de l'association de l'iminosucres et de l'α-mannosidase en sachant que :

$$k_{obs} = k_{on}\,[A] + k_{off} \qquad (2)$$

Tableau 14. Constantes cinétiques d'adsorption et de désorption issues de l'affinement linéaire.

k_{on} (°.s-1)	k_{off} (°.s-1.M-1)	K_D (M)	K_A (M^{-1})
(9,32 ± 1,33) x10^4	(6,17 ± 1,3) x10^{-4}	(6,6 ± 0,28) x10^{-9}	(1.52 ± 0,3) x10^8

Comme dans le cas du complexe biotine/streptavidine, nous observons un ordre de grandeur de différence entre les constantes issues de l'affinement avec l'isotherme de Langmuir et celles calculées par la méthode des pentes. Il est possible d'expliquer cette différence par le phénomène de diffusion accentué par le flux dans l'appareil BioNavis.

On reporte plusieurs études portant sur l'inhibition de l'α-mannosidase par la molécule de DNJ et de l'importance de la multivalence[248,259]. Suivant le nombre de valences la constante d'inhibition varie entre 1,88.10^{-4} et 1,1$10^{-9}$ M (valence 1 et 36).

Lors de cette étude des pentes, la valeur de la constante K_i s'apparente à celle du système avec une valence de 36 DNJ de P. Compain. Nos résultats sont en accord avec ceux reportés dans la littérature : la constante d'inhibition n'est pas augmentée au-delà d'une valence de 36[248].

2.2.4 Limite de détection

Nous avons calculé la limite de détection théorique en nM (équation 3) de notre biocapteur pour la comparer avec la limite de détection que nous observons expérimentalement.

$$\mathrm{LoD} = \frac{3\sigma}{\mathrm{k}} \qquad (3)$$

Avec σ l'erreur de notre appareil (σ = 10^{-3} °) et k la sensibilité de notre système en °.M^{-1}.

En effectuant un affinement linéaire aux faibles concentrations nous obtenons une valeur k = 3,6.10^6 °.M^{-1}. Ce qui nous ramène à une valeur de 0,27 nM pour la limite de détection théorique correspondant à 60 ng/mL. Cette concentration est semblable à celle de la streptavidine (0,57 ng/mL). Nous n'observons pas de variation de l'angle de résonance pour des concentrations inférieures à 1 µg/mL.

2.3 Détection de l'enzyme dans le tampon HEPES

Nous avons travaillé dans l'eau pour les premiers essais de détection de l'enzyme par la molécule de DNJ comme dans le cas du couple étudié précédemment : biotine/streptavidine. Nous avons pu déterminer les constantes d'affinités qui semblent correspondre à ce que l'on retrouve dans la littérature. Nous travaillons toujours dans la configuration de Kretschmann à 785 nm avec un flux constant de 50 µL/min.

Nous allons maintenant regarder ce qu'il advient de notre système quand la détection s'effectue dans un tampon. La molécule utilisée pour faire office de tampon en solution aqueuse est l'HEPES (figure 102). Une solution 20 mM HEPES à pH 7,0 a été préparée. Cette solution comprend également 100 mM de NaCl pour mimer la force ionique d'un liquide physiologique et 0,6% de DMSO pour faciliter la solubilisation des iminosucres dans le tampon. Nous utilisons ce tampon car c'est celui utilisé par P. Compain et son équipe lors des mesures des constantes d'inhibition des composés multivalents[248].

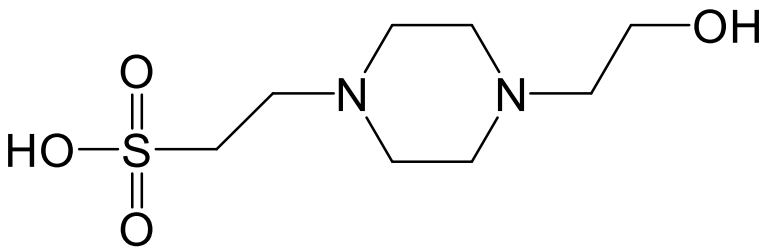

Figure 102. Représentation schématique de la molécule d'HEPES.

Nous avons mesuré la variation de l'angle de résonance plasmonique variant de 0,016° à 0,356° pour des concentrations allant respectivement de 0.1 µg/mL à 100 µg/mL (figure 103). Plus la concentration de la solution injectée est élevée plus le décalage angulaire est rapide.

Pour des concentration inférieures ou égales à 10 µg/mL, nous observons un décalage angulaire de l'angle de résonance qui reste stable après rinçage. Pour les solutions avec 25, 50 et 100 µg/mL d'α-

mannosidase nous pouvons noter une augmentation de l'angle de résonance suivi d'une baisse après le rinçage de la surface par le tampon.

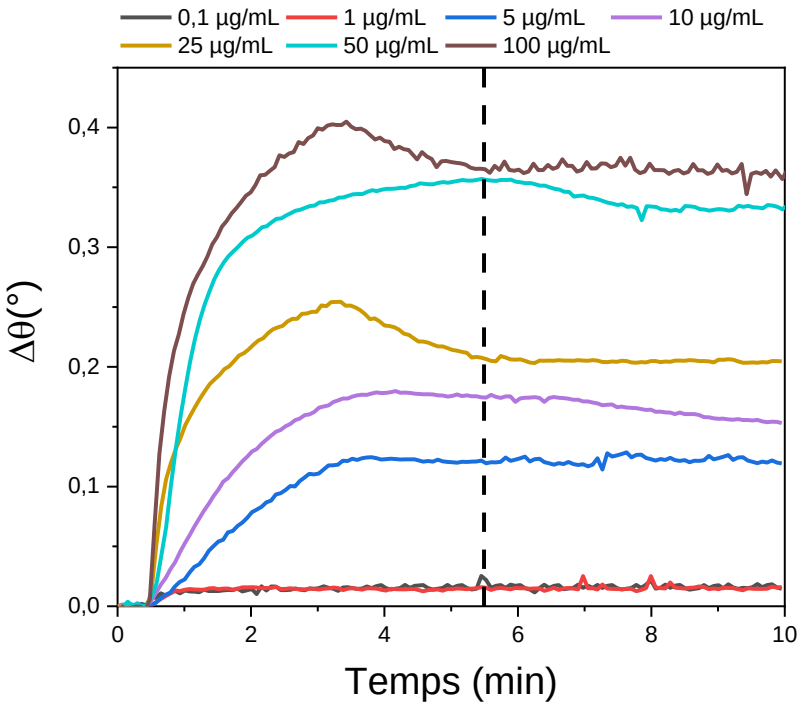

Figure 103. Sensorgramme après injection d'α-mannosidase à différentes concentrations, allant de 0,1µg/mL à 100µg/mL. Le trait discontinu correspond à l'injection du tampon pour rincer la surface.

2.3.1 Masse adsorbée en surface.

Des décalages de l'angle de résonance pour différente concentrations, nous pouvons en déduire les masses et épaisseurs correspondantes à ces décalages angulaires (tableau 15).

Tableau 15. Valeur du décalage de l'angle SPR (Δϑ), de l'épaisseur (d) et de la masse (m) en fonction de la concentration d'α-mannosidase dans le tampon HEPES.

A-mannosidase (µg/mL)	Δθ(°)	Epaisseur d (nm)	Masse m (ng/cm²)
0,1	0,016	0,169	8,25
1	0,016	0,169	8,25
5	0,119	1,27	61,67
10	0,153	1,63	79,42
25	0,204	2,18	106,17
50	0,331	3,56	173,38
100	0,356	3,84	186,71

Les décalages angulaires observés sont plus faibles que dans le cas où nous étions dans l'eau. En conséquence les l'épaisseur d'enzyme et leur masse sont également inférieurs. Nous n'observons pas d'épaisseurs supérieures à 5 nm, il n'y a donc pas de multicouches qui se sont formées.

Nous avons néanmoins pu détecter un changement de l'angle de résonance plasmonique stable dans le temps pour une concentration de 0,1 µg/mL

Il est surprenant de constater que l'usage d'un tampon fait chuter les décalages angulaires de plus de 60% pour une solution à concentration égale dans l'eau. Il a néanmoins été reporté par Ferreira et al.[263] peuvent complexer les métaux et interagir avec des systèmes biologiques. La Jack Bean possède un ion Zn^{2+} dans son site actif, nous pouvons supposer que le SDS va se complexer avec l'ion et donc empêcher le DNJ de pouvoir interagir avec le site actif de l'enzyme et ainsi limiter la détection de la Jack Bean.

2.3.2 Modèle de Langmuir, constantes cinétiques à l'équilibre.

Le décalage de l'angle de résonance plasmonique a été tracé en fonction de la concentration de l'α-mannosidase dans le tampon HEPES (figure 104). L'isotherme de Langmuir semble coïncider avec les points expérimentaux ce qui nous permet d'en déduire les constantes d'affinité à l'équilibre (tableau 16).

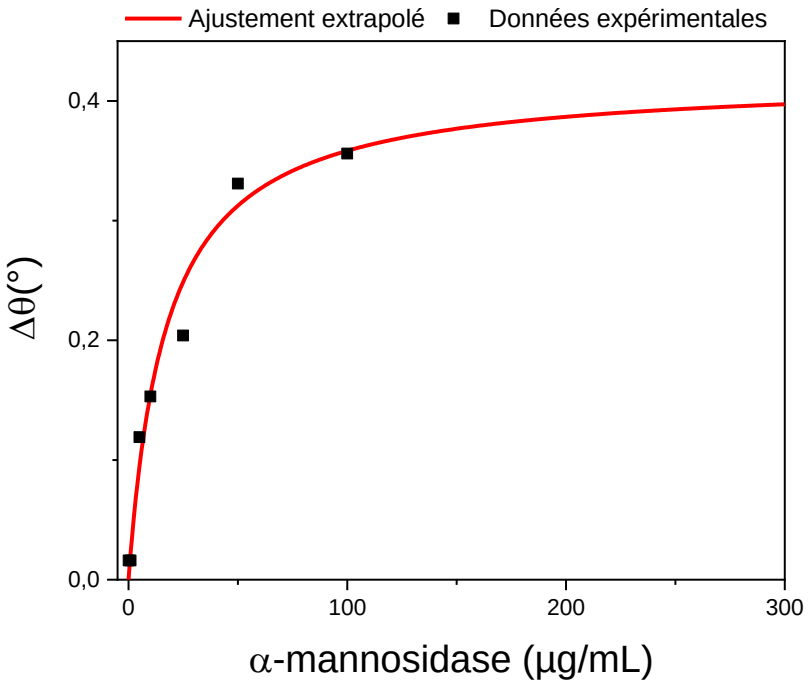

Figure 104. Décalage de l'angle SPR en fonction de la concentration d'α-mannosidase en solution. Les points expérimentaux entre 0,1 et 100 µg/mL ont étés affinés avec l'équation de l'isotherme de Langmuir qui a été extrapolée à des concentrations plus élevées.

Tableau 16. Valeur des constantes d'affinité extraites par l'équation de l'isotherme de Langmuir appliquées pour des concentrations en α–mannosidase allant de 0,1 à 100 µg/mL.

K_D (M)	K_A (M^{-1})	$\Delta\theta_{max}$ (°)
(8,1 ± 2,2) x10^{-8}	(1,23 ± 0,45) x10^{6}	0,42 ± 0,04

Les valeurs des constantes K_A et K_D sont du même ordre de grandeur que lorsque la détection de l'enzyme s'effectue dans l'eau. Ce qui signifie que, quel que soit le milieu, l'affinité entre l'iminosucres et le récepteur reste inchangée. Nous avons le décalage angulaire maximal théorique qui diminue d'environ 25%. En utilisant les équations de Campbell et Feijter pour déterminer la masse et l'épaisseur correspondante à ce décalage de l'angle de résonance plasmonique nous obtenons une épaisseur de 4,54 nm correspondante à 221 ng/cm².

Cette épaisseur est légèrement inférieure à l'épaisseur de l'enzyme mesurée dans la littérature[259] (5,1 nm) mais reste néanmoins plausible vu l'approximation que nous avons fait sur les indices de réfraction de l'α-mannosidase.

2.3.3 Détermination des constantes cinétiques par la méthode d'analyse des pentes

Nous avons déterminé les valeur des pentes lors de l'adsorption de l'α-mannosidase par la molécule de DNJ que nous avons tracé en fonction de la concentration d'enzyme en solution correspondante (figure 105).

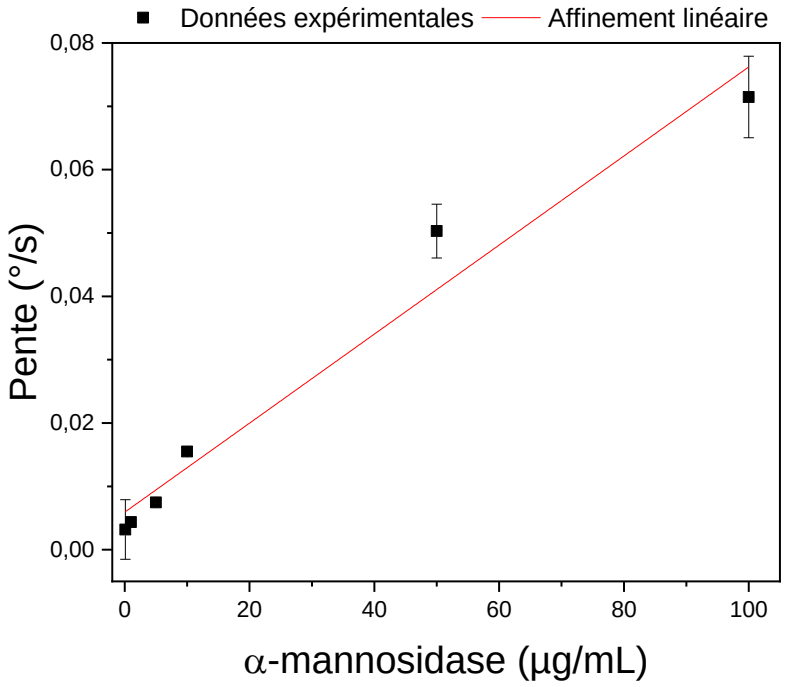

Figure 105. Pentes mesurées lors de l'adsorption de l'α-mannosidase en fonction de sa concentration.

Nous en avons déduit les constantes cinétiques grâce à l'équation (2) (tableau 17)

Tableau 17. Constantes cinétiques d'adsorption et de désorption issues de l'affinement linéaire.

k_{on} (°.s-1)	k_{off} (°.s-1.M-1)	K_D (M)	K_A (M^{-1})
(1,55 ± 0,14) $x10^5$	(5,92 ± 0,29)x 10^{-4}	(3,82 ± 0,28) $x10^{-9}$	(2,62 ± 0,3) $x10^8$

Les constantes cinétiques sont du même ordre de grandeur que dans l'eau. La valeur de K_D se rapproche de celle obtenue par l'équipe de P. Compain (1,1 nM), ce qui semble normal du fait de l'utilisation du même tampon.

3 Régénération du capteur par la dénaturation de l'α-mannosidase

La dénaturation de l'α-mannosidase est peu décrite, mais la littérature concorde sur le fait que l'enzyme est dénaturée par le dodécylsulfate de sodium (SDS)[264,265]. La molécule de SDS (figure 106) va dissoudre les liaisons hydrophobes de l'enzyme grâce à sa chaine aliphatique, tandis que le sulfate va attaquer les liaisons ioniques. Cela va décomposer la structure tertiaire et secondaire de l'enzyme jusqu'à un dépliement total de l'enzyme. Une fois que le SDS aura complètement entouré l'enzyme, celle-ci sera complétement inactive. Les autres surfactants comme le Triton X-100 ou le tween 20 n'ont pas assez d'effet sur l'enzyme[265].

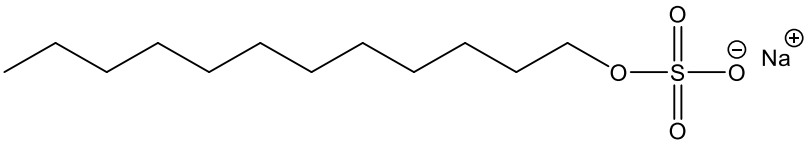

Figure 106. Représentation schématique de la molécule de SDS.

Des test d'activité en présence de certaines solutions telles que des solution de SDS ou d'urée ont été effectuées par Marinkovic et al.[266] pour tester l'activité de l'α-mannosidase. Il s'avère que d'après la littérature la molécule diminuant le plus l'activité de l'enzyme est l'urée. Lorsque nous plongeons l'enzyme dans une solution à 8M d'urée, l'enzyme perd presque toute son activité[267]. L'urée va surtout rendre l'enzyme inactive en se liant au groupement peptidiques empêchant toute interaction des récepteurs avec les sites actifs de l'enzyme.

Par la suite nous nous focaliserons sur l'utilisation du SDS comme dénaturant. Des essais de dénaturation seront également effectués avec l'urée.

3.1 Essais de dénaturation par le SDS

Les valeurs de concentration d'une solution de SDS pour la dénaturation de l'α-mannosidase ne sont pas bien décrites dans la littérature. Marinkovic[266] démontre que plonger l'enzyme dans une solution à 30 mM de SDS fait perdre à l'enzyme 50% de son activité. Nous allons donc commencer par exposer la surface du biocapteur recouverte d'enzyme avec des solutions à faible concentration en SDS. Nous commencerons par regarder la réponse SPR du biocapteur recouvert d'enzyme soumis à un flux de SDS d'une concentration de 10^{-5} M, nous augmenterons la concentration si nécessaire.

La densité en nanoparticules des surfaces pour les expériences suivantes est de 2900 NP/µm². Les mesures sont effectuées dans l'eau à un flux constant de 50 µL/min.

Après une injection d'une solution de Jack Bean de 100 µg/mL, le décalage angulaire est de 0,63° ce qui correspond à 308 ng/cm² d'enzyme (Figure 107, cercle magenta). Une première solution à 10^{-5} M de SDS est mise en contact avec la surface (Figure 107, premier cercle bleu). L'impact de cette dernière sur le biocapteur est négligeable. La réponse angulaire diminue de 0,03°, ce qui correspond à une perte de 15 ng/cm² d'enzyme. Une concentration 100 fois plus importante (Figure 107 second cercle bleu)

est injectée dans le système de micro-fluidique. Encore une fois la baisse du décalage angulaire est de 0,03°. Une troisième et dernière solution de SDS de concentration 10^{-2} M est injecté à la surface du capteur. Après contact avec le SDS, nous observons une rapide augmentation de l'angle de résonance puis une chute rapide jusqu'à l'arrivé sur un plateau à 0,33° qui nous indique que la solution de SDS a retiré près de la moitié des enzymes en surface.

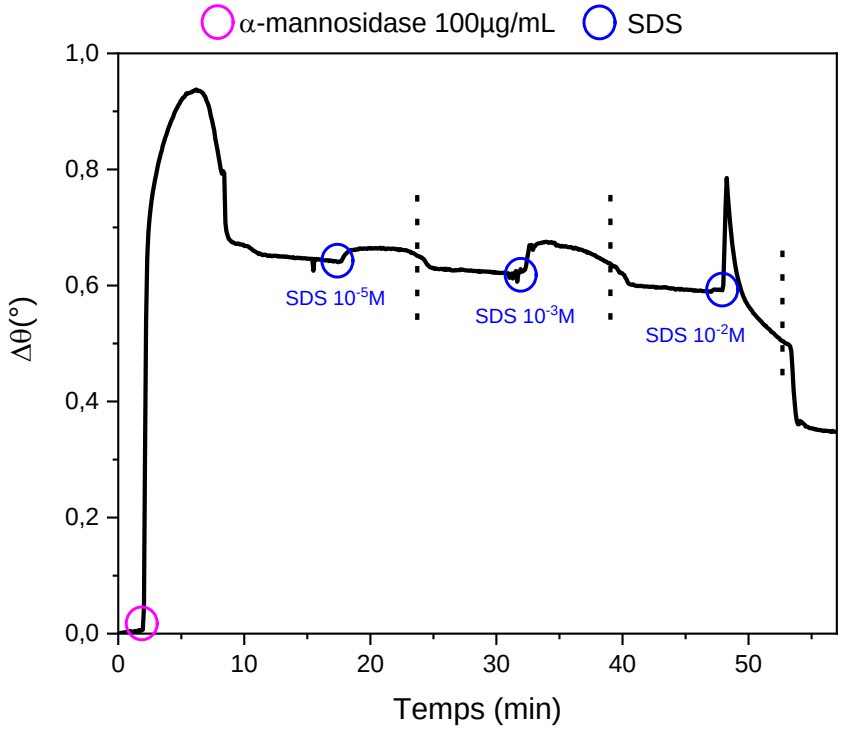

Figure 107. Sensorgramme suite à l'adsorption d'une solution concentrée à 100 µg/mL d'α-mannosidase (cercle magenta) suivie de plusieurs injections répétées de SDS à différentes concentration (cercles bleus). Les traits discontinus verticaux correspondent au rinçage

Nous avons ensuite expérimenté l'action d'une solution de SDS à 10^{-2} M. Une solution de 10 µg/mL d'α-mannosidase est injectée à la surface du biocapteur (Figure 107 cercle magenta). Cette quantité provoque un décalage angulaire de 0,36° correspondant à une masse de 174 ng/cm² d'enzyme.

Après la stabilisation du signal, nous injectons une première fois une solution de SDS à 10^{-2} M (Figure 22 premier cercle bleu). L'injection du SDS provoque d'abord une forte augmentation de la réponse du capteur due au SDS entrant dans la zone de détection du capteur. L'injection provoque ensuite une chute brutale du signal correspondant au rinçage de la surface par l'eau. Puis le signal chute lentement en dessous de 0,2°. Cette chute lente et continue signifie que nous retirons probablement l'enzyme formant un complexe avec le DNJ. Trois autres injections de SDS s'en suivent, le schéma du sensorgramme est le même pour toutes les injections de SDS : une montée rapide liée au SDS détectée par la surface puis une chute brutale.

Après quatre injections à 10^{-2} M de SDS, le signal est descendu en dessous de la ligne de base (Figure 108 traits discontinus horizontaux). Cela suggère que nous avons retiré une légère quantité de matière de la surface. L'hypothèse dominante suppose que le SDS s'est attaqué aux liaisons entre le soufre des thiols et l'or. En effet, cette liaison n'est pas covalente et peut être rompue par le SDS[268]. Si l'on

applique l'équation de Feijter à ce décalage angulaire négatif de 0.025°, nous savons que nous avons retiré 11,3 ng de matière par cm². Nous avons étudié la surface après dénaturation au MEB pour voir si nous avions une densité en nanoparticules plus faible. La densité en nanoparticules reste de 2900 NP/µm².

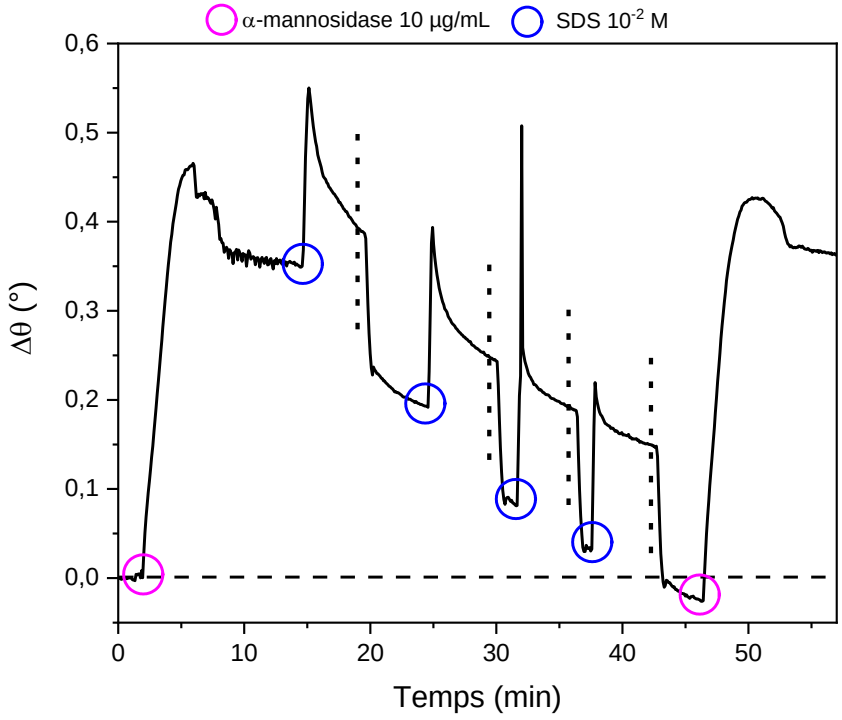

Figure 108. Sensorgramme suite à l'adsorption d'une solution concentrée à 10 µg/mL d'α-mannosidase (cercle magenta) suivie de plusieurs injections répétées de SDS à 10-2 M (cercles bleus). Les traits discontinus verticaux correspondent au rinçage de la surface par l'eau.

Pour contrôler que le SDS n'a fait que dénaturer l'enzyme et peut être quelques thiols en surface sans enlever le DNJ, nous avons injecté à nouveau une solution d'enzyme à 10 µg/mL (Figure 108 deuxième cercle magenta). Nous constatons un décalage angulaire de 0,39° par rapport au point au moment de l'injection (-0,025°). Ce décalage angulaire correspond à une adsorption de 189 ng/cm² d'α-mannosidase. Nous pouvons donc supposer que les récepteurs sont toujours disponibles à la surface des nanoparticules, la différence entre la première et la deuxième injection (15 ng/cm²) est négligeable.

La solution ne semble pas assez concentrée pour laver la surface du biocapteur de l'enzyme en une seule fois, une solution concentrée à 10^{-1}M en SDS est utilisée sur une nouvelle surface de densité en nanoparticules équivalente. La concentration d'α-mannosidase en solution injectée est la même (Figure 109 premier cercle magenta), à savoir 10 µg/mL, le décalage angulaire après la première injection d'enzyme est de 0,25°. Après stabilisation du signal, nous avons injecté une solution de SDS de concentration 0,1M. Le signal augmente brutalement pour ensuite redescendre au niveau de la ligne de base (Figure 109 traits discontinus horizontal). Subséquemment une autre solution d'α-mannosidase est inoculée dans le système, le signal retourne à 0,24°. L'opération est répétée une troisième fois pour un résultat identique (Figure 109). La quatrième fois où nous répétons l'expérience le décalage angulaire n'est pas de 0,25° (121 ng/cm²) mais de 0,19° (91 ng/cm²), ce qui correspond à

30 ng/cm² d'enzyme en moins à la surface du biocapteur. La quatrième injection de SDS engendre une descente en dessus de la ligne de base.

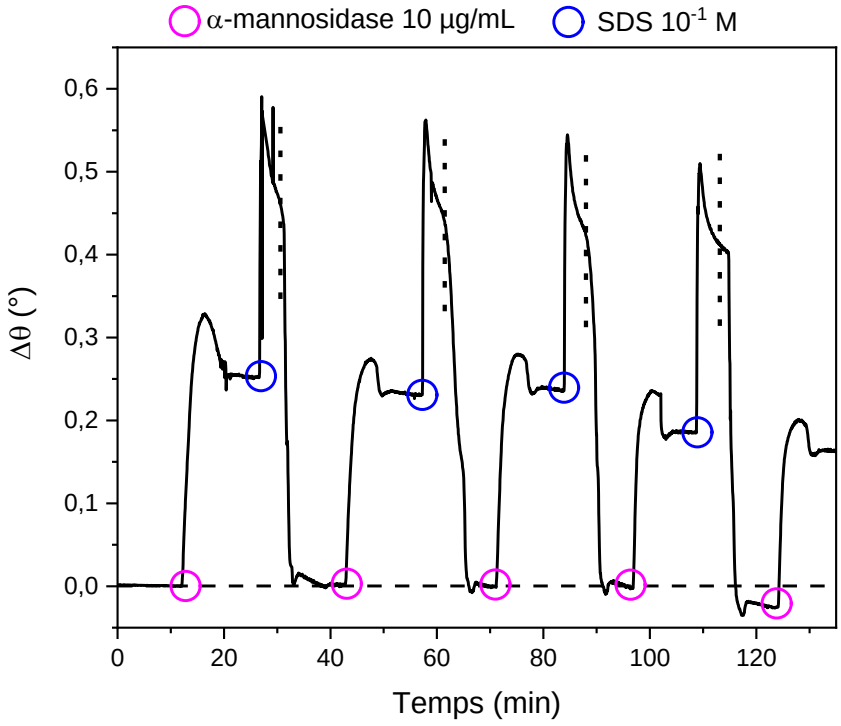

Figure 109. Sensorgramme suite à l'adsorption d'une solution concentrée à 10 µg/mL d'α-mannosidase (cercles magenta) suivie de plusieurs injections répétées de SDS à 10-1 M (cercles bleus). Les traits discontinus verticaux correspondent au rinçage de la surface par l'eau

Nous n'expliquons pas la baisse de décalage angulaire entre les trois premières injections de jack bean et la quatrième. Il n'est pas impossible qu'une exposition trop importante au SDS ait légèrement dégradé la surface. Pour confirmer cette hypothèse il faudrait reprendre toutes les caractérisations de surface tel que l'XPS ou le PM-IRRAS. Dans les deux cas (figure 108 et 109) il en résulte un décalage angulaire négatif d'environ 0,025°.

Pour essayer de comprendre un peu mieux l'action du SDS sur l'enzyme ancrée sur le capteur, nous avons fait varier la quantité d'enzyme en surface du capteur tout en gardant la même concentration de SDS pour nettoyer la surface. Pour ce faire, nous avons choisi de travailler en injectant une solution à 1 µg/mL et 5 µg/mL à la surface du capteur (Figure 110). Les surfaces de nanoparticules ont une densité similaire aux précédentes (2900 NP/µm²). Le sensorgramme noir représente les mesures sur la surface exposée à une solution de Jack Bean à 1 µg/mL, tandis que la courbe rouge, celle de la surface est exposée à une solution concentrée à 5 µg/mL en Jack Bean. Les décales de l'angle de résonance plasmon de surface sont de 0,097° et 0,213° respectivement (46 ng/cm² et 101 ng/cm²). Dans les deux cas nous constatons qu'après exposition au SDS, le sensorgramme descend sous la ligne de base, ce qui signifie une perte de matière en surface. Bien que la différence entre les deux soit minime (-0,05° et -0,03° pour la courbe noire et rouge respectivement), la surface préalablement moins recouverte d'enzyme est plus sensible au SDS que celle avec plus d'enzyme en surface.

Lors de la seconde injection de Jack Bean, nous remarquons des réponses sans réel sens, la courbe rouge a une réponse bien plus importante (0,33°) après application de SDS en surface et la courbe noire ne repasse pas au-dessus de la ligne de base. Dans les deux cas après un rinçage au SDS 0,1 M,

les décalages angulaires sont encore plus bas, nous supposons que de la matière est retirée de la surface du biocapteur.

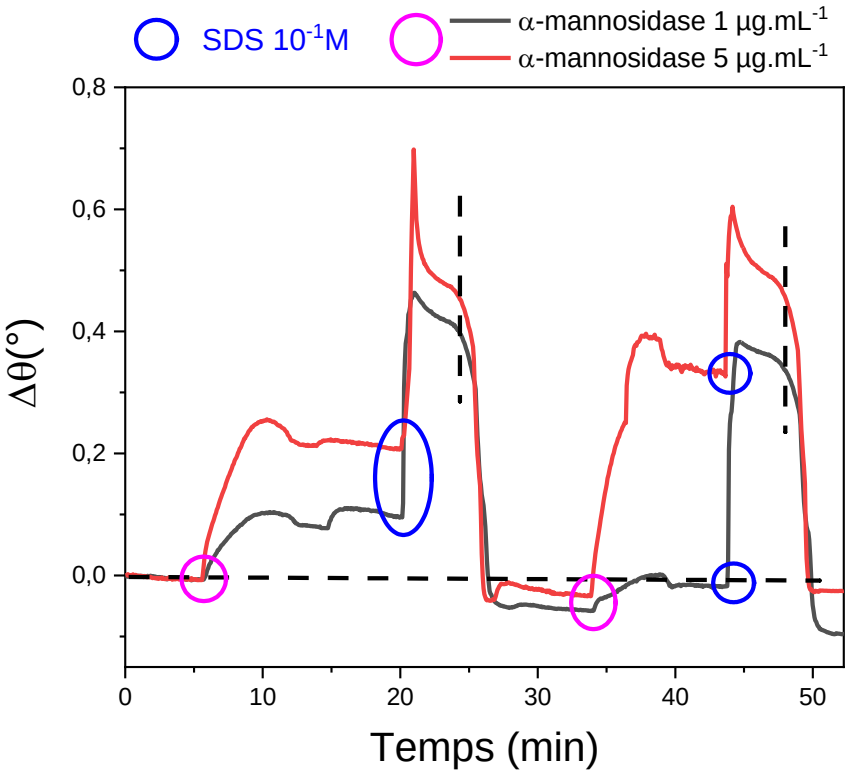

Figure 110. Sensorgramme suite à l'adsorption d'une solution concentrée à 1 µg/mL et 5 µg/mL d'α-mannosidase (cercles magenta) suivie de plusieurs injections répétées de SDS à 10^{-1} M (cercles bleus). Les traits discontinus verticaux correspondent au rinçage de la surface.

Le SDS semble dénaturer l'α-mannosidase, nous observons une diminution de l'angle de résonance plasmonique après application du SDS. Lorsque la quantité d'enzyme adsorbée en surface est faible (<10µg/mL), une concentration en SDS de 0,1 M semble endommager la surface et retirer de la matière : nous observons des décalages angulaires de l'angle de résonance en dessous de la ligne de base.

Il faut donc adapter la quantité de SDS à la quantité d'α-mannosidase adsorbée en surface. Nous avons vu que pour retirer 120 ng/cm² d'enzyme il faut une concentration en SDS de 0,1 M et que nous pouvions régénérer la surface jusqu'à 4 fois.

3.2 Essais de dénaturation par l'urée

L'urée (figure 111), comme les surfactants, est connue pour dénaturer les protéines[269,270]. Elle est connue comme agent chaotropique, c'est-à-dire qu'elle détruit la structure tridimensionnelle des macromolécules tel que les protéines en s'attaquant aux liaisons hydrogènes. La structure tertiaire de la protéine est la première visée. Lorsque la désorganisation des hélices alpha et feuillets béta advient cela laisse place à l'eau qui peut pénétrer dans les régions plus hydrophobes de la structure pour accélérer le processus de dénaturation.

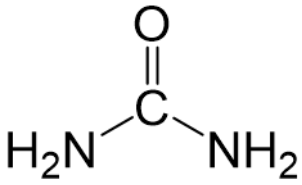

Figure 111. Représentation schématique de la molécule d'urée.

Nous avons donc voulu dénaturer lα-mannosidase adsorbée à la surface du biocapteur avec des solutions d'urée à différentes concentration (Figure 112). Après une injection d'α-mannosidase nous avons un décalage angulaire de 0,22° correspondant à 106 ng/cm² d'enzymes, ce qui est proche des décalages angulaires de l'angle de résonance SPR observé dans la partie précédente. Une première solution d'urée à 3M est injectée à la surface du biocapteur avec l'enzyme adsorbée à sa surface. Nous observons une chute de la réponse angulaire à 0,14° qui correspond à une perte de 40% de la masse de protéine en surface. Pour retirer plus d'enzyme de la surface nous essayons d'exposer la surface avec des solutions à 5 et 8M d'urée. Un fort décalage angulaire dû à l'importante concentration d'urée est observé, ce décalage est résorbé lorsque l'eau vient nettoyer la surface. Nous pouvons constater que l'angle de résonance plasmonique ne varie pas après ces deux injections. Seule la première exposition à l'urée a eu un effet sur les enzymes adsorbées en surface.

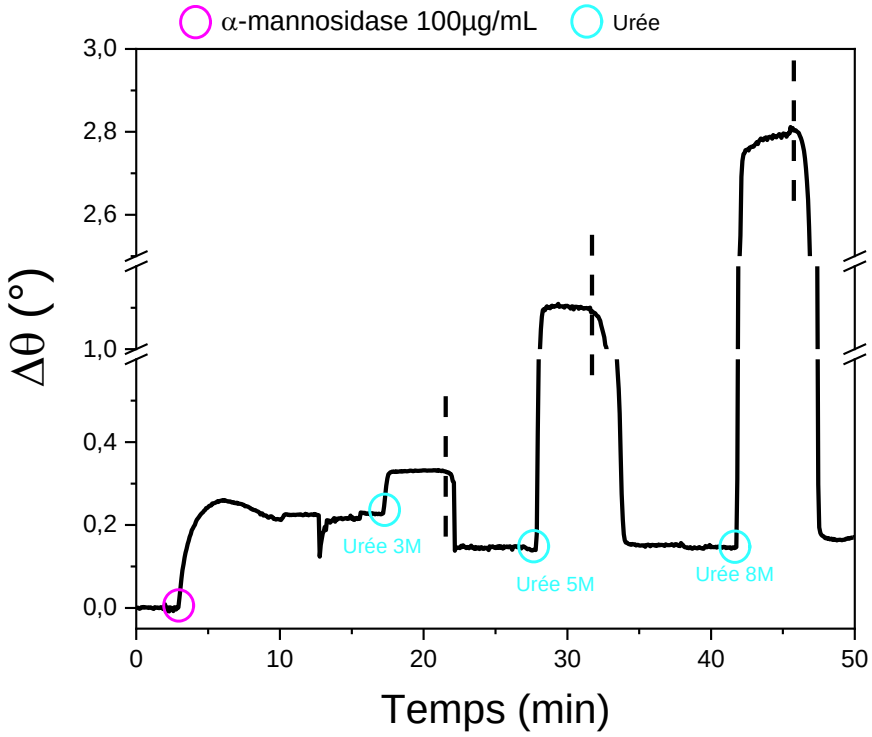

Figure 112. Sensorgramme suite à l'adsorption d'une solution concentrée à 1 µg/mL d'α-mannosidase (cercle magenta) suivie de plusieurs injections répétées d'urée à 3,5 et 8 M (cercles bleus). Les traits discontinus verticaux correspondent au rinçage de la surface p

L'urée est définie comme un agent pouvant diminuer l'activité d'une enzyme mais peut également être utilisé comme agent dénaturant. D'après les expériences effectuées sur nos biocapteurs, il semblerait que l'urée ne retire qu'environ 40% des enzymes adsorbées en surface. Des injections répétées d'urée ne semblent pas influer sur la désorption.

4 Conclusion

Nous avons vu qu'il était possible de modifier notre surface de nanoparticules en greffant d'autres molécules afin de pouvoir détecter d'autres analytes avec une visée applicative concrète.

La détection et l'inhibition de l'α-mannosidase par des iminosucres semble avoir des résultats concluants dans l'eau. Les valeurs des constantes d'inhibition (6,6 nM) sont proches de celles de la littérature (1,1 nM). La valence importante (>100) qu'offrent les nanoparticules n'impacte pas la constante d'inhibition et nous indique que la valence qui offre une inhibition maximale est bien 36 et qu'après cela nous arrivons sur un plateau.

Nous avons reproduit les conditions opératoires utilisées par P. Compain lors de la mesure de la constante d'inhibition de l'α-mannosidase. Le tampon HEPES semble limiter l'adsorption de la Jack Bean du fait de sa possible interaction avec les ions zinc présents dans les sites actifs de l'enzyme. La quantité d'enzyme en surface est moins importante, mais la constante d'inhibition n'est pas affectée.

L'urée et le SDS ont étés utilisés pour essayer de dénaturer l'enzyme adsorbée sur le biocapteur afin de pouvoir le réutiliser sans devoir recommencer le processus de fonctionnalisation depuis le départ. Le SDS semble être adapté à la dénaturation de la Jack Bean. Il faut néanmoins adapter les concentrations du surfactant avec les quantités d'enzymes adsorbées en surface.

Nous avons prouvé que notre plateforme peut être modifiée pour la détection de tout type de protéine et d'enzyme. Nous avons également été les premiers à utiliser des iminosucres greffés à des nanoparticules d'oxyde de fer pour la détection par SPR de la Jack Bean à 4,5 nM dans l'eau et 0,45 nM dans le tampon HEPES et montré qu'il était possible de régénérer un tel type de biocapteur.

Conclusion générale

Le but de ce travail était de construire une plateforme SPR versatile pour la détection d'analytes variées grâce à l'assemblage de nanoparticules d'oxyde de fer sur une surface d'or spécifiquement fonctionnalisée avec des biomolécules. La construction du biocapteur s'effectue en trois étapes de réactions de chimie clic CuAAc ce qui permet d'obtenir une structure finale robuste.

La décomposition thermique a permis, en contrôlant les conditions opératoires, de synthétiser des nanoparticules d'oxyde de fer de 10 nm. Les nanoparticules ont été fonctionnalisées avec un ligand permettant d'effectuer la réaction de CuAAc clic. Les nanoparticules ont été assemblées sur une surface d'or fonctionnalisé avec des thiols possédant des groupements complémentaires à ceux des nanoparticules pour effectuer réaction de CuAAc clic. La cinétique de réaction en fonction des paramètres expérimentaux a été étudiée.

L'assemblage de nanoparticules d'oxyde de fer a été effectué pour modifier les propriétés plasmoniques de surface de l'or. Les groupements fonctionnels disponibles sur les nanoparticules après leur assemblage nous ont permis de greffer des biomolécules à leur surface. Les espaces entre les nanoparticules possédant des groupements alcynes propices à l'adsorption non spécifique ont été comblés par le greffage de dérivés d'oligo éthylène glycol (OEG) par la réaction de CuAAc. La courbure des nanoparticules, ainsi que leur fonctionnalisation par des molécules adaptées ont permis d'accroitre la quantité d'analyte adsorbée à la surface.

Dans un premier temps, nous avons travaillé avec un couple modèle de la littérature pour pouvoir comparer l'efficacité de notre plateforme avec les biocapteurs existants. Le couple biotine streptavidine est en effet souvent utilisé pour sa grande constante d'affinité ($K_D \approx 10^{-14}$ M). Des essais avec une molécule de biotine ont été effectués et ont montré de premiers résultats satisfaisants. La molécule de biotine a été modifiée, nous y avons ajouté une chaine (OEG) pour augmenter la distance entre la nanoparticule et le groupement biotine et ainsi favoriser la mobilité de la chaine mais également sa solubilité en milieu aqueux. Les chaines OEG greffées entre les nanoparticules ont permis d'empêcher l'adsorption non spécifique et de rendre notre capteur spécifique à la streptavidine. La limite de détection du biocapteur ainsi que les constantes d'affinités du système ont pu être déterminées.

Les résultats se sont montrés concluants pour ce couple modèle de la littérature. Nous avons donc choisi de travailler dans un second temps avec un couple analyte/récepteur ayant une visée plus applicative. Pour ce faire nous avons choisi de travailler avec un iminosucre (le DNJ) comme récepteur et l'α-mannosidase comme analyte. L'α-mannosidase est une enzyme qui se trouve en déficit chez les patients atteints d'alpha-mannosidose provoquant une surcharge lysosomale pouvant entrainer une immunodéficience, ou des anomalies physiques. De la même manière que pour la biotine l'iminosucre a été greffé par une réaction de chimie clic sur les nanoparticules. La détection de l'enzyme montre des résultats prometteurs. De plus, aucun système similaire au notre n'a été recensé dans la littérature.

La dernière partie de cette thèse porte sur les aspects de régénération de notre surface de bio-détection. En effet, les multiples réactions de chimie CuAAc clic ainsi que la synthèse des composés de la plateforme (nanoparticules, molécules, …) sont onéreux. Ce qui nous a amenés à nous intéresser à la dénaturation des analytes adsorbées à la surface du biocapteur pour pouvoir utiliser la plateforme

pour plusieurs détections successives. Encore une fois, les résultats semblent prometteurs, nous avons réussi à régénérer une surface presque entièrement recouverte d'α-mannosidase jusqu'à quatre fois.

Références

1. Corma, A. Catalysis by Gold. Vol. 6. By Geoffrey C. Bond, Catherine Louis, and David T. Thompson. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 7734–7735 (2007).
2. Ford, M. J., Masens, C. & Cortie, M. B. THE APPLICATION OF GOLD SURFACES AND PARTICLES IN NANOTECHNOLOGY. *Surf. Rev. Lett.* **13**, 297–307 (2006).
3. Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G. & Whitesides, G. M. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem. Rev.* **105**, 1103–1170 (2005).
4. Attaran, A. *et al.* Circuit Model of Fano Resonance on Tetramers, Pentamers, and Broken Symmetry Pentamers. *Plasmonics* **9**, 1303–1313 (2014).
5. Osorio, M. F., Figueroa, P., Prieto, F., Boulanger, P. & Londoño, E. A novel approach to documenting artifacts at the Gold Museum in Bogota. *Computers & Graphics* **35**, 894–903 (2011).
6. Payan, R. & Rasigni, G. Étude des propriétés optiques de certains métaux en couches minces, en liaison avec leur structure électronique. *J. Phys. France* **25**, 92–98 (1964).
7. Siegel, J., Lyutakov, O., Rybka, V., Kolská, Z. & Švorčík, V. Properties of gold nanostructures sputtered on glass. *Nanoscale Res Lett* **6**, 96 (2011).
8. Malinský, P., Slepička, P., Hnatowicz, V. & Švorčík, V. Early stages of growth of gold layers sputter deposited on glass and silicon substrates. *Nanoscale Res Lett* **7**, 241 (2012).
9. Alkhatib, A., Souier, T. & Chiesa, M. Non-ohmic transport behavior in ultra-thin gold films. *Materials Science and Engineering: B* **176**, 840–845 (2011).
10. Carmichael, E. S. & Gruebele, M. Controlling the Smoothness of Optically Transparent Gold Films by Temperature Tuning. *J. Phys. Chem. C* **113**, 4495–4501 (2009).
11. Doron-Mor, I., Barkay, Z., Filip-Granit, N., Vaskevich, A. & Rubinstein, I. Ultrathin Gold Island Films on Silanized Glass. Morphology and Optical Properties. *Chem. Mater.* **16**, 3476–3483 (2004).
12. Yakubovsky, D. I., Arsenin, A. V., Stebunov, Y. V., Fedyanin, D. Y. & Volkov, V. S. Optical constants and structural properties of thin gold films. *Opt. Express* **25**, 25574 (2017).
13. Baaziz, W. *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Reproducible Tuning of the Size and Nanosized-Dependent Composition, Defects, and Spin Canting. *The Journal of Physical Chemistry C* **118**, 3795–3810 (2014).
14. Demortière, A. *et al.* Size-dependent properties of magnetic iron oxidenanocrystals. *Nanoscale* **3**, 225–232 (2011).
15. Han, D. H., Wang, J. P. & Luo, H. L. Crystallite size effect on saturation magnetization of fine ferrimagnetic particles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **136**, 176–182 (1994).
16. Mody, V. V., Singh, A. & Wesley, B. Basics of magnetic nanoparticles for their application in the field of magnetic fluid hyperthermia. *European Journal of Nanomedicine* **5**, (2013).
17. Fodil, K. De la détection à l'imagerie de nanoparticules magnétiques. (2014).
18. Negi, D. S. *et al.* Surface spin canting in F e 3 O 4 and CoF e 2 O 4 nanoparticles probed by high-resolution electron energy loss spectroscopy. *Phys. Rev. B* **95**, 174444 (2017).
19. Buchenau, U. & Müller, I. Optical properties of magnetite. *Solid State Communications* **11**, 1291–1293 (1972).
20. Querry, M. R. *Optical Constants*. (1985).
21. Colombo, M. *et al.* Biological applications of magnetic nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 4306 (2012).
22. Murray, C. B., Norris, D. J. & Bawendi, M. G. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 8706–8715 (1993).
23. Peng, X., Wickham, J. & Alivisatos, A. P. Kinetics of II-VI and III-V Colloidal Semiconductor Nanocrystal Growth: "Focusing" of Size Distributions. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 5343–5344 (1998).
24. LaMer, V. K. & Dinegar, R. H. Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 4847–4854 (1950).

25. Lu, A.-H., Salabas, E. L. & Schüth, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 1222–1244 (2007).
26. Demortière, A. *et al.* Size-dependent properties of magnetic iron oxidenanocrystals. *Nanoscale* **3**, 225–232 (2011).
27. Cotin, G. New strategies towards the synthesis of innovative multifunctional magnetic nanoparticles combining MRI imaging and/or magnetic hyperthermia therapy. (Strasbourg, 2017).
28. Perton, F. Architecture de nanoparticules hybrides pour une imagerie et/ou thérapie multimodales. (Strasbourg, 2019).
29. Israelachvili, J. N. Contrasts between Intermolecular, Interparticle, and Intersurface Forces. in *Intermolecular and Surface Forces* 205–222 (Elsevier, 2011). doi:10.1016/B978-0-12-375182-9.10011-9.
30. Bellido, E., Domingo, N., Ojea-Jiménez, I. & Ruiz-Molina, D. Structuration and Integration of Magnetic Nanoparticles on Surfaces and Devices. *Small* **8**, 1465–1491 (2012).
31. Pichon, B. P. *et al.* Magnetotunable Hybrid Films of Stratified Iron Oxide Nanoparticles Assembled by the Layer-by-Layer Technique. *Chem. Mater.* **23**, 3668–3675 (2011).
32. Pauly, M. *et al.* Large 2D monolayer assemblies of iron oxide nanocrystals by the Langmuir–Blodgett technique. *Superlattices and Microstructures* **46**, 195–204 (2009).
33. Vakarelski, I. U., McNamee, C. E. & Higashitani, K. Deposition of silica nanoparticles on a gold surface via a self-assembled monolayer of (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **295**, 16–20 (2007).
34. Yang, J., Zhou, M., Liu, J., Wang, H. & Weng, C. Fabrication and tribological properties of self-assembled monolayers of alkanethiols on nickel substrates. *Applied Surface Science* **559**, 149963 (2021).
35. Gooding, J. J., Mearns, F., Yang, W. & Liu, J. Self-Assembled Monolayers into the 21st Century: Recent Advances and Applications. *Electroanalysis* **15**, 81–96 (2003).
36. Abdul-Moqueet, M. M., Tovias, L., Lopez, P. & Mayer, K. M. Synthesis and bioconjugation of alkanethiol-stabilized gold bipyramid nanoparticles. *Nanotechnology* **32**, 225601 (2021).
37. Chen, S., Li, L., Boozer, C. L. & Jiang, S. Controlled Chemical and Structural Properties of Mixed Self-Assembled Monolayers of Alkanethiols on Au(111). *Langmuir* **16**, 9287–9293 (2000).
38. Zhang, H.-M., Xie, Z.-X., Mao, B.-W. & Xu, X. Self-Assembly of Normal Alkanes on the Au (111) Surfaces. *Chem. Eur. J.* **10**, 1415–1422 (2004).
39. Onclin, S., Ravoo, B. J. & Reinhoudt, D. N. Engineering Silicon Oxide Surfaces Using Self-Assembled Monolayers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**, 6282–6304 (2005).
40. Wang, G., Wang, C., Yang, R., Liu, W. & Sun, S. A Sensitive and Stable Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Monolayer Protected Silver Film. *Sensors* **17**, 2777 (2017).
41. Sagiv, J. Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 92–98 (1980).
42. Ratner, B. D., Hoffman, A. S. & McArthur, S. L. Physicochemical Surface Modification of Materials Used in Medicine. in *Biomaterials Science* 487–505 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-816137-1.00033-7.
43. Bürgi, T. Properties of the gold–sulphur interface: from self-assembled monolayers to clusters. *Nanoscale* **7**, 15553–15567 (2015).
44. Chen, G. The nature of the Sulfur-Metallic bonds (Metal = Ni, Pd and Pt) in doped gold nanoclusters: A density functional approach. *Computational and Theoretical Chemistry* **1195**, 113094 (2021).
45. Zhao, Y., Zhou, F., Zhou, H. & Su, H. The structural and bonding evolution in cysteine–gold cluster complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 1690–1698 (2013).
46. Schilter, D. Thiol oxidation: A slippery slope. *Nat Rev Chem* **1**, 0013 (2017).
47. Porter, M. D., Bright, T. B., Allara, D. L. & Chidsey, C. E. D. Spontaneously organized molecular assemblies. 4. Structural characterization of n-alkyl thiol monolayers on gold by optical

ellipsometry, infrared spectroscopy, and electrochemistry. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 3559–3568 (1987).
48. Yildirim, O. *et al.* Monolayer-directed Assembly and Magnetic Properties of FePt Nanoparticles on Patterned Aluminum Oxide. *IJMS* **11**, 1162–1179 (2010).
49. Kutsenko, V. Y. *et al.* Alkylthiol self-assembled monolayers on Au(111) with tailored tail groups for attaching gold nanoparticles. *Nanotechnology* **28**, 235603 (2017).
50. Lee, S., Yoon, J. H. & Yoon, S. Adsorption Patterns of Gold Nanoparticles on Methyl-Terminated Self-Assembled Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry C* **115**, 12501–12507 (2011).
51. Shein, J. B., Lai, L. M. H., Eggers, P. K., Paddon-Row, M. N. & Gooding, J. J. Formation of Efficient Electron Transfer Pathways by Adsorbing Gold Nanoparticles to Self-Assembled Monolayer Modified Electrodes. *Langmuir* **25**, 11121–11128 (2009).
52. Gehan, H. *et al.* A General Approach Combining Diazonium Salts and Click Chemistries for Gold Surface Functionalization by Nanoparticle Assemblies. *Langmuir* **26**, 3975–3980 (2010).
53. Chaikin, Y., Leader, H., Popovitz-Biro, R., Vaskevich, A. & Rubinstein, I. Versatile Scheme for the Step-by-Step Assembly of Nanoparticle Multilayers. *Langmuir* **27**, 1298–1307 (2011).
54. He, H. X. *et al.* Fabrication of Designed Architectures of Au Nanoparticles on Solid Substrate with Printed Self-Assembled Monolayers as Templates. *Langmuir* **16**, 3846–3851 (2000).
55. Zhao, J., Spasova, M., Li, Z.-A. & Zharnikov, M. Ferromagnetic Cobalt Nanoparticles and Their Immobilization on Monomolecular Films and Chemical Templates. *Adv. Funct. Mater.* **21**, 4724–4735 (2011).
56. Pichon, B. P. *et al.* 2D Assembling of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Promoted by SAMs Used as Well-Addressed Surfaces. *J. Phys. Chem. C* **114**, 9041–9048 (2010).
57. Kolb, H. C., Finn, M. G. & Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 18 (2001).
58. Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2**, 565–598 (1963).
59. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(i)-Catalyzed Regioselective ™Ligationʃ of Azides and Terminal Alkynes*. 4.
60. Michael, A. & Schulthess, O. Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren. *J. Prakt. Chem.* **45**, 55–63 (1892).
61. Tornøe, C. W., Christensen, C. & Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **67**, 3057–3064 (2002).
62. Berg, R. & Straub, B. F. Advancements in the mechanistic understanding of the copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. *Beilstein J. Org. Chem.* **9**, 2715–2750 (2013).
63. Hein, J. E. & Fokin, V. V. Copper-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(i) acetylides. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 1302 (2010).
64. Chouhan, G. & James, K. CuAAC Macrocyclization: High Intramolecular Selectivity through the Use of Copper–Tris(triazole) Ligand Complexes. *Org. Lett.* **13**, 2754–2757 (2011).
65. Díez-González, S. Well-defined copper(i) complexes for Click azide–alkyne cycloaddition reactions: one Click beyond. *Catal. Sci. Technol.* **1**, 166 (2011).
66. Moitra, N., Moreau, J. J. E., Cattoën, X. & Wong Chi Man, M. Convenient route to water-sensitive sol–gel precursors using click chemistry. *Chem. Commun.* **46**, 8416 (2010).
67. Rodionov, V. O., Fokin, V. V. & Finn, M. G. Mechanism of the Ligand-Free CuI-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction. *Angew. Chem.* **117**, 2250–2255 (2005).
68. Nolte, C., Mayer, P. & Straub, B. F. Isolation of a Copper(I) Triazolide: A “Click” Intermediate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 2101–2103 (2007).
69. Thirumurugan, P., Matosiuk, D. & Jozwiak, K. Click Chemistry for Drug Development and Diverse Chemical–Biology Applications. *Chem. Rev.* **113**, 4905–4979 (2013).
70. Tron, G. C. *et al.* Click chemistry reactions in medicinal chemistry: Applications of the 1,3-dipolar cycloaddition between azides and alkynes. *Med. Res. Rev.* **28**, 278–308 (2008).

71. Hein, C. D., Liu, X.-M. & Wang, D. Click Chemistry, A Powerful Tool for Pharmaceutical Sciences. *Pharm Res* **25**, 2216–2230 (2008).
72. Jiang, X. *et al.* Recent applications of click chemistry in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* **14**, 779–789 (2019).
73. Kolb, H. C. & Sharpless, K. B. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today* **8**, 1128–1137 (2003).
74. Hou, J., Liu, X., Shen, J., Zhao, G. & Wang, P. G. The impact of click chemistry in medicinal chemistry. *Expert Opinion on Drug Discovery* **7**, 489–501 (2012).
75. Manzenrieder, F., Luxenhofer, R., Retzlaff, M., Jordan, R. & Finn, M. G. Stabilization of Virus-like Particles with Poly(2-oxazoline)s. *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 2601–2605 (2011).
76. Lutz, J.-F. & Börner, H. G. Modern trends in polymer bioconjugates design. *Progress in Polymer Science* **33**, 1–39 (2008).
77. Evans, R. A. The Rise of Azide–Alkyne 1,3-Dipolar 'Click' Cycloaddition and its Application to Polymer Science and Surface Modification. *Aust. J. Chem.* **60**, 384 (2007).
78. Kinge, S., Gang, T., Naber, W. J. M., van der Wiel, W. G. & Reinhoudt, D. N. Magnetic Nanoparticle Assembly on Surfaces Using Click Chemistry. *Langmuir* **27**, 570–574 (2011).
79. Kinge, S., Gang, T., Naber, W. J. M., van der Wiel, W. G. & Reinhoudt, D. N. Magnetic Nanoparticle Assembly on Surfaces Using Click Chemistry. *Langmuir* **27**, 570–574 (2011).
80. Fratila, R. M. *et al.* Covalent immobilisation of magnetic nanoparticles on surfaces via strain-promoted azide–alkyne click chemistry. *New Journal of Chemistry* **41**, 10835–10840 (2017).
81. Agard, N. J., Baskin, J. M., Prescher, J. A., Lo, A. & Bertozzi, C. R. A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides. *ACS Chem. Biol.* **1**, 644–648 (2006).
82. Toulemon, D. Stratégies d'assemblage par chimie 'click' de nanoparticules magnétiques sur des surfaces fonctionnalisées. (Strasbourg, 2013).
83. Toulemon, D., Pichon, B. P., Cattoën, X., Man, M. W. C. & Begin-Colin, S. 2D assembly of non-interacting magnetic iron oxide nanoparticles via"click" chemistry. *Chem. Commun.* **47**, 11954 (2011).
84. Toulemon, D. *et al.* Fast Assembling of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles by Microwave-Assisted Copper(I) Catalyzed Alkyne–Azide Cycloaddition (CuAAC). *Chem. Mater.* **25**, 2849–2854 (2013).
85. Toulemon, D. *et al.* Enhanced Collective Magnetic Properties Induced by the Controlled Assembly of Iron Oxide Nanoparticles in Chains. *Adv. Funct. Mater.* **26**, 2454–2462 (2016).
86. Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. & Adley, C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances* **28**, 232–254 (2010).
87. Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I. & Palleschi, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 1405–1423 (2006).
88. Alocilja, E. C. & Radke, S. M. Market analysis of biosensors for food safety. *Biosensors and Bioelectronics* **18**, 841–846 (2003).
89. Terry, L. A., White, S. F. & Tigwell, L. J. The Application of Biosensors to Fresh Produce and the Wider Food Industry. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 1309–1316 (2005).
90. Stocker, J. *et al.* Development of a Set of Simple Bacterial Biosensors for Quantitative and Rapid Measurements of Arsenite and Arsenate in Potable Water. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 4743–4750 (2003).
91. Li, M., Gou, H., Al-Ogaidi, I. & Wu, N. Nanostructured Sensors for Detection of Heavy Metals: A Review. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **1**, 713–723 (2013).
92. West, J. L. & Halas, N. J. Engineered Nanomaterials for Biophotonics Applications: Improving Sensing, Imaging, and Therapeutics. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **5**, 285–292 (2003).
93. Endo, T., Kerman, K., Nagatani, N., Takamura, Y. & Tamiya, E. Label-Free Detection of Peptide Nucleic Acid−DNA Hybridization Using Localized Surface Plasmon Resonance Based Optical Biosensor. *Anal. Chem.* **77**, 6976–6984 (2005).
94. Max, C. *Über die Ursache der elektromotorischen Eigenschaften der Gewebe, zugleich ein Beitrag zur Lehre von polyphasischen Elektrolytke*. (1906).

95. Sörensen, S. Enzymstudien II: über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen. (1909).
96. Hughes, W. S. THE POTENTIAL DIFFERENCE BETWEEN GLASS AND ELECTROLYTES IN CONTACT WITH THE GLASS. *J. Am. Chem. Soc.* **44**, 2860–2867 (1922).
97. Nelson, J. M. & Griffin, E. G. ADSORPTION OF INVERTASE. *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 1109–1115 (1916).
98. Griffin, E. G. & Nelson, J. M. THE INFLUENCE OF CERTAIN SUBSTANCES ON THE ACTIVITY OF INVERTASE. *J. Am. Chem. Soc.* **38**, 722–730 (1916).
99. Heineman, W. R. & Jensen, W. B. Leland C. Clark Jr. (1918–2005). *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 1403–1404 (2006).
100. Clark, L. C. & Lyons, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**, 29–45 (2006).
101. Guilbault, G. G. & Montalvo, J. G. Urea-specific enzyme electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **91**, 2164–2165 (1969).
102. Yoo, E.-H. & Lee, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* **10**, 4558–4576 (2010).
103. Trevisani, M. *et al.* Biosensing the Histamine Producing Potential of Bacteria in Tuna. *Front. Microbiol.* **10**, 1844 (2019).
104. Keow, C. M. *et al.* An amperometric biosensor for the rapid assessment of histamine level in tiger prawn (Penaeus monodon) spoilage. *Food Chemistry* **105**, 1636–1641 (2007).
105. Rodriguezmozaz, S., Alda, M., Marco, M. & Barcelo, D. Biosensors for environmental monitoring: A global perspective. *Talanta* **65**, 291–297 (2005).
106. Chouteau, C., Dzyadevych, S., Durrieu, C. & Chovelon, J. A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosensors and Bioelectronics* **21**, 273–281 (2005).
107. Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A. & Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification1International Union of Pure and Applied Chemistry: Physical Chemistry Division, Commission I.7 (Biophysical Chemistry); Analytical Chemistry Division, Commission V.5 (Electroanalytical Chemistry).1. *Biosensors and Bioelectronics* **16**, 121–131 (2001).
108. Prieto-Simon, B., Campas, M. & Marty, J.-L. Biomolecule Immobilization in Biosensor Development: Tailored Strategies Based on Affinity Interactions. *PPL* **15**, 757–763 (2008).
109. Killard, A. Antibodies: production, functions and applications in biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **14**, 257–266 (1995).
110. Persson, E., Ezban, M. & Shymko, R. M. Kinetics of the interaction between the human factor VIIIa subunits: effects of pH, ionic strength, Ca2+ concentration, heparin, and activated protein C-catalyzed proteolysis. *Biochemistry* **34**, 12775–12781 (1995).
111. Reimhult, E. & Kumar, K. Membrane biosensor platforms using nano- and microporous supports. *Trends in Biotechnology* **26**, 82–89 (2008).
112. Martínez-Muñoz, L., Barroso, R., Paredes, A. G., Mellado, M. & Rodríguez-Frade, J. M. Methods to Immobilize GPCR on the Surface of SPR Sensors. in *G Protein-Coupled Receptor Screening Assays* (eds. Prazeres, D. M. F. & Martins, S. A. M.) vol. 1272 173–188 (Springer New York, 2015).
113. Liu, J., Cao, Z. & Lu, Y. Functional Nucleic Acid Sensors. *Chem. Rev.* **109**, 1948–1998 (2009).
114. Hesselberth, J., Robertson, M. P., Jhaveri, S. & Ellington, A. D. In vitro selection of nucleic acids for diagnostic applications. *Reviews in Molecular Biotechnology* **74**, 15–25 (2000).
115. Johnson, K. A. & Goody, R. S. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry* **50**, 8264–8269 (2011).
116. Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D. & Kim, M. Immobilized Enzymes in Biosensor Applications. *Materials* **12**, 121 (2019).
117. Songa, E. A. & Okonkwo, J. O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review. *Talanta* **155**, 289–304 (2016).

118. Goers, L. *et al.* Whole-cell Escherichia colilactate biosensor for monitoring mammalian cell cultures during biopharmaceutical production: Whole-cell Escherichia collactate biosensor. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 1290–1300 (2017).
119. Weiss, S. Fluorescence Spectroscopy of Single Biomolecules. *Science* **283**, 1676–1683 (1999).
120. Damborský, P., Švitel, J. & Katrlík, J. Optical biosensors. *Essays in Biochemistry* **60**, 91–100 (2016).
121. Shons, A., Dorman, F. & Najarian, J. An immunospecific microbalance. *J. Biomed. Mater. Res.* **6**, 565–570 (1972).
122. Montagut, Y. *et al.* QCM Technology in Biosensors. in *Biosensors - Emerging Materials and Applications* (ed. Serra, P. A.) (InTech, 2011). doi:10.5772/17991.
123. Folch, A. *Introduction to bioMEMS*. (2012).
124. Mosbach, K. & Danielsson, B. An enzyme thermistor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **364**, 140–145 (1974).
125. Li, K. *et al.* Fast and Sensitive Ellipsometry-Based Biosensing. *Sensors* **18**, 15 (2017).
126. Arwin, H. Is ellipsometry suitable for sensor applications? *Sensors and Actuators A: Physical* **92**, 43–51 (2001).
127. Kozma, P., Kehl, F., Ehrentreich-Förster, E., Stamm, C. & Bier, F. F. Integrated planar optical waveguide interferometer biosensors: A comparative review. *Biosensors and Bioelectronics* **58**, 287–307 (2014).
128. Dostálek, J. *et al.* Surface plasmon resonance biosensor based on integrated optical waveguide. *Sensors and Actuators B: Chemical* **76**, 8–12 (2001).
129. Strianese, M. *et al.* Fluorescence-Based Biosensors. in *Spectroscopic Methods of Analysis* (ed. Bujalowski, W. M.) vol. 875 193–216 (Humana Press, 2012).
130. Homola, J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**, 528–539 (2003).
131. Wood, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **4**, 396–402 (1902).
132. Fano, U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves). *J. Opt. Soc. Am.* **31**, 213 (1941).
133. Bohm, D. & Pines, D. A Collective Description of Electron Interactions. I. Magnetic Interactions. *Phys. Rev.* **82**, 625–634 (1951).
134. Pines, D. & Bohm, D. A Collective Description of Electron Interactions: II. Collective vs Individual Particle Aspects of the Interactions. *Phys. Rev.* **85**, 338–353 (1952).
135. Bohm, D. & Pines, D. A Collective Description of Electron Interactions: III. Coulomb Interactions in a Degenerate Electron Gas. *Phys. Rev.* **92**, 609–625 (1953).
136. Ritchie, R., Arakawa, E., Cowan, J. & Hamm, R. Surface-Plasmon Resonance Effect in Grating Diffraction. *Phys. Rev. Lett.* **21**, 1530–1533 (1968).
137. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Physik* **216**, 398–410 (1968).
138. Kretschmann, E. & Raether, H. Notizen: Radiative Decay of Non Radiative Surface Plasmons Excited by Light. *Zeitschrift für Naturforschung A* **23**, 2135–2136 (1968).
139. Drude, P. Zur Elektronentheorie der Metalle. *Ann. Phys.* **306**, 566–613 (1900).
140. Patskovsky, S., Kabashin, A. V., Meunier, M. & Luong, J. H. T. Properties and sensing characteristics of surface-plasmon resonance in infrared light. *J. Opt. Soc. Am. A* **20**, 1644 (2003).
141. Freestone, I., Meeks, N., Sax, M. & Higgitt, C. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bull* **40**, 270–277 (2007).
142. Mie, G. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen. *Ann. Phys.* **330**, 377–445 (1908).
143. Bukasov, R. & Shumaker-Parry, J. S. Highly Tunable Infrared Extinction Properties of Gold Nanocrescents. *Nano Lett.* **7**, 1113–1118 (2007).
144. Sandu, T. Shape effects on localized surface plasmon resonances in metallic nanoparticles. *J Nanopart Res* **14**, 905 (2012).

145. Li, Y., Zhao, K., Sobhani, H., Bao, K. & Nordlander, P. Geometric Dependence of the Line Width of Localized Surface Plasmon Resonances. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 1352–1357 (2013).
146. Homola, J., Yee, S. S. & Gauglitz, G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B: Chemical* **54**, 3–15 (1999).
147. Jung, L. S., Campbell, C. T., Chinowsky, T. M., Mar, M. N. & Yee, S. S. Quantitative Interpretation of the Response of Surface Plasmon Resonance Sensors to Adsorbed Films. *Langmuir* **14**, 5636–5648 (1998).
148. Xu, Y., Ang, Y., Wu, L. & Ang, L. High Sensitivity Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Two-Dimensional MXene and Transition Metal Dichalcogenide: A Theoretical Study. *Nanomaterials* **9**, 165 (2019).
149. Wijaya, E. *et al.* Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **15**, 208–224 (2011).
150. Hossain, M. B., Mehedi, I. M., Moznuzzaman, M., Abdulrazak, L. F. & Hossain, M. A. High performance refractive index SPR sensor modeling employing graphene tri sheets. *Results in Physics* **15**, 102719 (2019).
151. Ahmed, A. M. & Shaban, M. Highly sensitive Au–Fe2O3–Au and Fe2O3–Au–Fe2O3 biosensors utilizing strong surface plasmon resonance. *Appl. Phys. B* **126**, 57 (2020).
152. Gaur, R., Padhy, H. M. & Elayaperumal, M. Surface plasmon assisted toxic chemical NO₂ gas sensor by Au ⁄ ZnO functional thin films. *J. Sens. Sens. Syst.* **10**, 163–169 (2021).
153. Wang, G., Wang, C., Yang, R., Liu, W. & Sun, S. A Sensitive and Stable Surface Plasmon Resonance Sensor Based on Monolayer Protected Silver Film. *Sensors* **17**, 2777 (2017).
154. El-Gohary, S., Choi, M., Kim, Y. & Byun, K. Dispersion Curve Engineering of TiO2/Silver Hybrid Substrates for Enhanced Surface Plasmon Resonance Detection. *Sensors* **16**, 1442 (2016).
155. Pal, S., Verma, A., Prajapati, Y. K. & Saini, J. P. Figure of Merit Enhancement of Surface Plasmon Resonance Biosensor Using Ga-Doped Zinc Oxide in Near Infrared Range. *Photonic Sens* **10**, 340–352 (2020).
156. Wang, S., Liu, N., Cheng, Q., Pang, B. & Lv, J. Surface Plasmon Resonance on the Antimonene–Fe2O3–Copper Layer for Optical Attenuated Total Reflection Spectroscopic Application. *Plasmonics* **16**, 559–566 (2021).
157. Zhao, X. *et al.* Sensitivity Enhancement in Surface Plasmon Resonance Biochemical Sensor Based on Transition Metal Dichalcogenides/Graphene Heterostructure. *Sensors* **18**, 2056 (2018).
158. Wang, Y., Dostalek, J. & Knoll, W. Magnetic Nanoparticle-Enhanced Biosensor Based on Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance. *Anal. Chem.* **83**, 6202–6207 (2011).
159. Erenildo Ferreira de Macedo, Daniela Ducatti Formaggio, Nivia Salles Santos & Dayane Batista Tada. Gold Nanoparticles Used as Protein Scavengers Enhance Surface Plasmon Resonance Signal. *Sensors* **17**, 2765 (2017).
160. Dolci, M. Design of magnetic iron oxide nanoparticle assemblies supported onto gold thin films for SPR biosensor applications. (Strasbourg, 2018).
161. Focsan, M. *et al.* A simple and efficient design to improve the detection of biotin-streptavidin interaction with plasmonic nanobiosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **86**, 728–735 (2016).
162. Nusz, G. J. *et al.* Label-Free Plasmonic Detection of Biomolecular Binding by a Single Gold Nanorod. *Anal. Chem.* **80**, 984–989 (2008).
163. Sheppard, G. *et al.* Thiolene-based microfluidic flow cells for surface plasmon resonance imaging. *Biomicrofluidics* **5**, 026501 (2011).
164. Kim, H. M., Jin, S. M., Lee, S. K., Kim, M.-G. & Shin, Y.-B. Detection of Biomolecular Binding Through Enhancement of Localized Surface Plasmon Resonance (LSPR) by Gold Nanoparticles. *Sensors* **9**, 2334–2344 (2009).
165. Chen, C.-D., Cheng, S.-F., Chau, L.-K. & Wang, C. R. C. Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 926–932 (2007).

166. Li, R. *et al.* Sensitive detection of carcinoembryonic antigen using surface plasmon resonance biosensor with gold nanoparticles signal amplification. *Talanta* **140**, 143–149 (2015).
167. Nath, N. & Chilkoti, A. Label-Free Biosensing by Surface Plasmon Resonance of Nanoparticles on Glass: Optimization of Nanoparticle Size. *Analytical Chemistry* **76**, 5370–5378 (2004).
168. Martinez-Perdiguero, J., Retolaza, A., Bujanda, L. & Merino, S. Surface plasmon resonance immunoassay for the detection of the TNFα biomarker in human serum. *Talanta* **119**, 492–497 (2014).
169. Mitchell, J. S., Wu, Y., Cook, C. J. & Main, L. Sensitivity enhancement of surface plasmon resonance biosensing of small molecules. *Analytical Biochemistry* **343**, 125–135 (2005).
170. Bai, Y. *et al.* Aptamer/thrombin/aptamer-AuNPs sandwich enhanced surface plasmon resonance sensor for the detection of subnanomolar thrombin. *Biosensors and Bioelectronics* **47**, 265–270 (2013).
171. Kurdekar, A. D. *et al.* Streptavidin-conjugated gold nanoclusters as ultrasensitive fluorescent sensors for early diagnosis of HIV infection. *Science Advances* **4**, (2018).
172. Edwards, P. R. *et al.* Kinetics of Protein-Protein Interactions at the Surface of an Optical Biosensor. *Analytical Biochemistry* **231**, 210–217 (1995).
173. Spinke, J., Liley, M., Guder, H. J., Angermaier, L. & Knoll, W. Molecular recognition at self-assembled monolayers: the construction of multicomponent multilayers. *Langmuir* **9**, 1821–1825 (1993).
174. Schuck, P. USE OF SURFACE PLASMON RESONANCE TO PROBE THE EQUILIBRIUM AND DYNAMIC ASPECTS OF INTERACTIONS BETWEEN BIOLOGICAL MACROMOLECULES. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26**, 541–566 (1997).
175. Pérez-Luna, V. H. *et al.* Molecular Recognition between Genetically Engineered Streptavidin and Surface-Bound Biotin. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 6469–6478 (1999).
176. Wang, Y., Partridge, A. & Wu, Y. Improving nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance detection of small molecules by reducing steric hindrance via molecular linkers. *Talanta* **198**, 350–357 (2019).
177. Kaushik, A. *et al.* Iron oxide nanoparticles–chitosan composite based glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **24**, 676–683 (2008).
178. Haun, J. B., Yoon, T.-J., Lee, H. & Weissleder, R. Magnetic nanoparticle biosensors: Magnetic nanoparticle biosensors. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol* **2**, 291–304 (2010).
179. Soelberg, S. D., Stevens, R. C., Limaye, A. P. & Furlong, C. E. Surface Plasmon Resonance Detection Using Antibody-Linked Magnetic Nanoparticles for Analyte Capture, Purification, Concentration, and Signal Amplification. *Anal. Chem.* **81**, 2357–2363 (2009).
180. Kumar, S. *et al.* Electrochemical paper based cancer biosensor using iron oxide nanoparticles decorated PEDOT:PSS. *Analytica Chimica Acta* **1056**, 135–145 (2019).
181. Pichon, B. P., Barbillon, G., Marie, P., Pauly, M. & Begin-Colin, S. Iron oxide magnetic nanoparticles used as probing agents to study the nanostructure of mixed self-assembled monolayers. *Nanoscale* **3**, 4696 (2011).
182. Halthur, T. J. *Multilayer Structures for Biomaterial Applications Biomacromolecule-based Coatings*.
183. Abraham, A.-L. Caractérisation et analyse évolutive des répétitions intragéniques : une étude au niveau des gènes, des séquences protéiques et des structures tridimensionnelles. (2008).
184. Miller, J., McLachlan, A. D. & Klug, A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA fromXenopus oocytes. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* **14**, 157–169 (2001).
185. Chen, D. *et al.* Regulation of protein-ligand binding affinity by hydrogen bond pairing. *Sci. Adv.* **2**, e1501240 (2016).
186. Bitencourt-Ferreira, G., Veit-Acosta, M. & de Azevedo, W. F. Hydrogen Bonds in Protein-Ligand Complexes. in *Docking Screens for Drug Discovery* (ed. de Azevedo, W. F.) vol. 2053 93–107 (Springer New York, 2019).

187. Compain, P. & Bodlenner, A. The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: A New, Rapidly Emerging Topic in Glycoscience. *ChemBioChem* **15**, 1239–1251 (2014).
188. *eLS*. (Wiley, 2001). doi:10.1002/047001590X.
189. Bhuyan, A. K. On the mechanism of SDS-induced protein denaturation. *Biopolymers* **93**, 186–199 (2010).
190. Park, J. *et al.* Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Mater* **3**, 891–895 (2004).
191. Cotin, G. Décomposition thermique Hyperthermie magnétique IRM Nanoparticules d'oxyde de fer Nanoparticules d'oxyde de fer Nanoparticules magnétiques Précurseur Theranostic Théranostique. (Strasbourg, 2017).
192. Perton, F. Architecture de nanoparticules hybrides pour une imagerie et/ou thérapie multimodales. (Strasbourg, 2019).
193. Sartori, K. *et al.* Room Temperature Blocked Magnetic Nanoparticles Based on Ferrite Promoted by a Three-Step Thermal Decomposition Process. *Journal of the American Chemical Society* **141**, 9783–9787 (2019).
194. Baaziz, W. Synthèse et caractérisation des nanoparticules spinelles et coeur-coquille à base d'oxyde de fer et de cobalt. (Université de strasbourg, 2011).
195. Basly, B. *et al.* Dendronized iron oxide nanoparticles as contrast agents for MRI. *Chem. Commun.* **46**, 985–987 (2010).
196. Cotin, G. *et al.* Unravelling the Thermal Decomposition Parameters for The Synthesis of Anisotropic Iron Oxide Nanoparticles. *Nanomaterials* **8**, 881 (2018).
197. Wang, X.-Y. *et al.* Optimizing the silanization of thermally-decomposed iron oxide nanoparticles for efficient aqueous phase transfer and MRI applications. *RSC Adv.* **6**, 93784–93793 (2016).
198. Toulemon, D. Stratégies d'assemblage par chimie 'click' de nanoparticules magnétiques sur des surfaces fonctionnalisées. (Strasbourg, 2013).
199. Dolci, M. *et al.* Robust clicked assembly based on iron oxide nanoparticles for a new type of SPR biosensor. *Journal of Materials Chemistry C* **6**, 9102–9110 (2018).
200. Toulemon, D., Pichon, B. P., Cattoën, X., Man, M. W. C. & Begin-Colin, S. 2D assembly of non-interacting magnetic iron oxide nanoparticles via"click" chemistry. *Chemical Communications* **47**, 11954 (2011).
201. Mallakpour, S. & Madani, M. A review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles. *Progress in Organic Coatings* **86**, 194–207 (2015).
202. Daou, T. J. *et al.* Coupling Agent Effect on Magnetic Properties of Functionalized Magnetite-Based Nanoparticles. *Chem. Mater.* **20**, 5869–5875 (2008).
203. Xue, Y., Li, X., Li, H. & Zhang, W. Quantifying thiol–gold interactions towards the efficient strength control. *Nat Commun* **5**, 4348 (2014).
204. Prato, M. *et al.* Optical Characterization of Thiolate Self-Assembled Monolayers on Au(111). *J. Phys. Chem. C* **112**, 3899–3906 (2008).
205. Wang, J.-S. A FAST ALGORITHM FOR RANDOM SEQUENTIAL ADSORPTION OF DISCS. *International Journal of Modern Physics C* **05**, 707–715 (1994).
206. Cieśla, M. & Nowak, A. Managing numerical errors in random sequential adsorption. *Surface Science* **651**, 182–186 (2016).
207. Cieśla, M. & Ziff, R. M. Boundary conditions in random sequential adsorption. *Journal of Statistical Mechanics: Theory and Experiment* **2018**, 043302 (2018).
208. Zhang, G. & Torquato, S. Precise algorithm to generate random sequential addition of hard hyperspheres at saturation. *Physical Review E* **88**, (2013).
209. Green, N. M. Avidin. in *Advances in Protein Chemistry* vol. 29 85–133 (Elsevier, 1975).
210. Yamamoto, M. *et al.* Comparison of Argon and Oxygen Plasma Treatments for Ambient Room-Temperature Wafer-Scale Au–Au Bonding Using Ultrathin Au Films. *Micromachines* **10**, 119 (2019).

211. Lapin, N. A. & Chabal, Y. J. Infrared Characterization of Biotinylated Silicon Oxide Surfaces, Surface Stability, and Specific Attachment of Streptavidin. *J. Phys. Chem. B* **113**, 8776–8783 (2009).
212. Yamashita, T. & Hayes, P. Analysis of XPS spectra of Fe2+ and Fe3+ ions in oxide materials. *Applied Surface Science* **254**, 2441–2449 (2008).
213. Kong, H., Song, J. & Jang, J. One-step fabrication of magnetic γ-Fe2O3/polyrhodanine nanoparticles using in situ chemical oxidation polymerization and their antibacterial properties. *Chem. Commun.* **46**, 6735 (2010).
214. Liu, G. *et al.* Understanding the hydrophobic mechanism of 3-hexyl-4-amino-1, 2,4-triazole-5-thione to malachite by ToF-SIMS, XPS, FTIR, contact angle, zeta potential and micro-flotation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **503**, 34–42 (2016).
215. Taraballi, F. *et al.* A model study for tethering of (bio)active molecules to biomaterial surfaces through arginine. *Organic & Biomolecular Chemistry* **12**, 4089 (2014).
216. Pradier, C.-M., Salmain, M., Zheng, L. & Jaouen, G. Specific binding of avidin to biotin immobilised on modified gold surfaces. *Surface Science* **502**–**503**, 193–202 (2002).
217. Joseph, Y., Guse, B. & Nelles, G. Aging of 1,ω-Alkyldithiol Interlinked Au Nanoparticle Networks. *Chemistry of Materials* **21**, 1670–1676 (2009).
218. Twardowski, M. S. *et al.* A model for estimating bulk refractive index from the optical backscattering ratio and the implications for understanding particle composition in case I and case II waters. *J. Geophys. Res.* **106**, 14129–14142 (2001).
219. Rauf, S., Zhou, D., Abell, C., Klenerman, D. & Kang, D.-J. Building three-dimensional nanostructures with active enzymes by surface templated layer-by-layer assembly. *Chem. Commun.* 1721 (2006) doi:10.1039/b517557g.
220. Dolci, M. *et al.* Investigation of the structure of iron oxide nanoparticle assemblies in order to optimize the sensitivity of surface plasmon resonance-based sensors. *Applied Surface Science* **527**, 146773 (2020).
221. Rho, D. & Kim, S. Demonstration of a Label-Free and Low-Cost Optical Cavity-Based Biosensor Using Streptavidin and C-Reactive Protein. *Biosensors* **11**, 4 (2020).
222. D'Agata, R., Palladino, P. & Spoto, G. Streptavidin-coated gold nanoparticles: critical role of oligonucleotides on stability and fractal aggregation. *Beilstein Journal of Nanotechnology* **8**, 1–11 (2017).
223. Reiter, R., Motschmann, H. & Knoll, W. Ellipsometric characterization of streptavidin binding to biotin-functionalized lipid monolayers at the water/air interface. *Langmuir* **9**, 2430–2435 (1993).
224. Pietkiewicz, J. *et al.* PREPARATION OF BOVINE SERUM ALBUMIN MONOMER FOR CONJUGATION EXPERIMENTS BY USING DIFFERENT TYPES OF CHROMATOGRAPHY MEDIA. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **36**, 658–670 (2013).
225. Zhang, Z., Liang, Y., Yan, L., Yan, F. & Fang, S. Protein adsorption materials of the soluble conducting polymer poly(acryloyl chloride)-g-polypyrrole. *New Journal of Chemistry* **34**, 2822 (2010).
226. De Feijter, J. A., Benjamins, J. & Veer, F. A. Ellipsometry as a tool to study the adsorption behavior of synthetic and biopolymers at the air-water interface. *Biopolymers* **17**, 1759–1772 (1978).
227. Tumolo, T., Angnes, L. & Baptista, M. S. Determination of the refractive index increment (dn/dc) of molecule and macromolecule solutions by surface plasmon resonance. *Analytical Biochemistry* **333**, 273–279 (2004).
228. Amartely, H., Avraham, O., Friedler, A., Livnah, O. & Lebendiker, M. Coupling Multi Angle Light Scattering to Ion Exchange chromatography (IEX-MALS) for protein characterization. *Scientific Reports* **8**, (2018).
229. Barer, R. Refractometry and Interferometry of Living Cells*†. *J. Opt. Soc. Am.* **47**, 545 (1957).
230. Barreto, M. S. C., Elzinga, E. J. & Alleoni, L. R. F. The molecular insights into protein adsorption on hematite surface disclosed by in-situ ATR-FTIR/2D-COS study. *Scientific Reports* **10**, (2020).

231. Charles, P. *et al.* Reduction of Non-Specific Protein Adsorption Using Poly(ethylene) Glycol (PEG) Modified Polyacrylate Hydrogels In Immunoassays for Staphylococcal Enterotoxin B Detection. *Sensors* **9**, 645–655 (2009).
232. Li, L., Chen, S., Zheng, J., Ratner, B. D. & Jiang, S. Protein Adsorption on Oligo(ethylene glycol)-Terminated Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers: The Molecular Basis for Nonfouling Behavior. *J. Phys. Chem. B* **109**, 2934–2941 (2005).
233. Kahraman *et al.* Synthesis and Characterization of Phosphorus- and Carborane-Containing Polyoxanorbornene Block Copolymers. *Polymers* **11**, 613 (2019).
234. Ensing, B. *et al.* On the origin of the extremely different solubilities of polyethers in water. *Nat Commun* **10**, 2893 (2019).
235. Cooper, M. A., Hansson, A., Löfås, S. & Williams, D. H. A Vesicle Capture Sensor Chip for Kinetic Analysis of Interactions with Membrane-Bound Receptors. *Analytical Biochemistry* **277**, 196–205 (2000).
236. Tang, Y., Mernaugh, R. & Zeng, X. Nonregeneration Protocol for Surface Plasmon Resonance: Study of High-Affinity Interaction with High-Density Biosensors. *Analytical Chemistry* **78**, 1841–1848 (2006).
237. Li, Y.-J. *et al.* Reversible immobilization of proteins with streptavidin affinity tags on a surface plasmon resonance biosensor chip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 1321–1326 (2006).
238. Shi, L. *et al.* Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale* **13**, 10748–10764 (2021).
239. Fantauzzi, M., Elsener, B., Atzei, D., Rigoldi, A. & Rossi, A. Exploiting XPS for the identification of sulfides and polysulfides. *RSC Adv.* **5**, 75953–75963 (2015).
240. Osipov, V. Y. *et al.* Photoluminescence from NV− Centres in 5 nm Detonation Nanodiamonds: Identification and High Sensitivity to Magnetic Field. *Nanoscale Res Lett* **14**, 279 (2019).
241. Jung, L. S., Nelson, K. E., Stayton, P. S. & Campbell, C. T. Binding and Dissociation Kinetics of Wild-Type and Mutant Streptavidins on Mixed Biotin-Containing Alkylthiolate Monolayers. *Langmuir* **16**, 9421–9432 (2000).
242. Rios, F. & Smirnov, S. Biochemically Responsive Smart Surface. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 768–774 (2009).
243. Blasi, D. *et al.* Enhancing the Sensitivity of Biotinylated Surfaces by Tailoring the Design of the Mixed Self-Assembled Monolayer Synthesis. *ACS Omega* **5**, 16762–16771 (2020).
244. Yoo, E.-H. & Lee, S.-Y. Glucose Biosensors: An Overview of Use in Clinical Practice. *Sensors* **10**, 4558–4576 (2010).
245. Kiappes, J. L. *et al.* ToP-DNJ, a Selective Inhibitor of Endoplasmic Reticulum α-Glucosidase II Exhibiting Antiflaviviral Activity. *ACS Chem. Biol.* **13**, 60–65 (2018).
246. Mehta, A., Zitzmann, N., Rudd, P. M., Block, T. M. & Dwek, R. A. α-Glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents. *FEBS Letters* **430**, 17–22 (1998).
247. Ya'kobovitz, M. K., Butters, T. D. & Cohen, E. Inhibition of α-glucosidase activity by N-deoxynojirimycin analogs in several insect phloem sap feeders: Inhibition of phloem feeders a-glucosidase. *Insect Science* **23**, 59–67 (2016).
248. Lepage, M. L. *et al.* Iminosugar-Cyclopeptoid Conjugates Raise Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition at Unprecedented High Levels. *Chem. Eur. J.* **22**, 5151–5155 (2016).
249. van den Elsen, J. M. H. Structure of Golgi alpha-mannosidase II: a target for inhibition of growth and metastasis of cancer cells. *The EMBO Journal* **20**, 3008–3017 (2001).
250. Schneider, J. P. *et al.* Synthesis and Glycosidase Inhibition Properties of Calix[8]arene-Based Iminosugar Click Clusters. *Pharmaceuticals* **13**, 366 (2020).
251. Foucart, Q. *et al.* Synthesis and glycosidase inhibition of conformationally locked DNJ and DMJ derivatives exploiting a 2-oxo- *C* -allyl iminosugar. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 7204–7214 (2019).
252. Radin, N. S. Treatment of Gaucher disease with an enzyme inhibitor. *Glycoconjugate Journal* **13**, 153–157 (1996).

253. Mena-Barragán, T. *et al.* Probing the Inhibitor versus Chaperone Properties of sp2-Iminosugars towards Human β-Glucocerebrosidase: A Picomolar Chaperone for Gaucher Disease. *Molecules* **23**, 927 (2018).
254. Abian, O. *et al.* Therapeutic Strategies for Gaucher Disease: Miglustat (NB-DNJ) as a Pharmacological Chaperone for Glucocerebrosidase and the Different Thermostability of Velaglucerase Alfa and Imiglucerase. *Mol. Pharmaceutics* **8**, 2390–2397 (2011).
255. Numao, S., Kuntz, D. A., Withers, S. G. & Rose, D. R. Insights into the Mechanism of Drosophila melanogaster Golgi α-Mannosidase II through the Structural Analysis of Covalent Reaction Intermediates. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 48074–48083 (2003).
256. Ertl, P., Rohde, B. & Selzer, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* **43**, 3714–3717 (2000).
257. Chen, X., Wang, X. & Fang, D. A review on C1s XPS-spectra for some kinds of carbon materials. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures* **28**, 1048–1058 (2020).
258. Barer, R. & Tkaczyk, S. Refractive Index of Concentrated Protein Solutions. *Nature* **173**, 821–822 (1954).
259. Brissonnet, Y. *et al.* Topological Effects and Binding Modes Operating with Multivalent Iminosugar-Based Glycoclusters and Mannosidases. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 18427–18435 (2013).
260. Langmuir, I. THE ADSORPTION OF GASES ON PLANE SURFACES OF GLASS, MICA AND PLATINUM. *Journal of the American Chemical Society* **40**, 1361–1403 (1918).
261. Langmuir, I. VAPOR PRESSURES, EVAPORATION, CONDENSATION AND ADSORPTION. *Journal of the American Chemical Society* **54**, 2798–2832 (1932).
262. Latour, R. A. The langmuir isotherm: A commonly applied but misleading approach for the analysis of protein adsorption behavior: Protein Adsorption and the Langmuir Isotherm. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **103**, 949–958 (2015).
263. Ferreira, C. M. H., Pinto, I. S. S., Soares, E. V. & Soares, H. M. V. M. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. *RSC Adv.* **5**, 30989–31003 (2015).
264. Kimura, Y., Hess, D. & Sturm, A. The N-glycans of jack bean alpha-mannosidase. Structure, topology and function. *European Journal of Biochemistry* **264**, 168–175 (1999).
265. Freeze, H. H. & Kranz, C. Endoglycosidase and Glycoamidase Release of N-Linked Glycans. *Current Protocols in Molecular Biology* **89**, (2010).
266. Marinkovic, D. V. & Marinkovic, J. N. Isolation and properties of α-D-mannosidase from human kidney. *Biochemical Journal* **155**, 217–223 (1976).
267. Aikawa, J., Matsuo, I. & Ito, Y. In vitro mannose trimming property of human ER α-1,2 mannosidase I. *Glycoconjugate Journal* **29**, 35–45 (2012).
268. Clottes, E., Couthon, F., Denoroy, L. & Vial, C. Creatine kinase compactness and thiol accessibility during sodium dodecyl sulfate denaturation estimated by resonance energy transfer and 2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid cleavage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1209**, 171–176 (1994).
269. Das, A. & Mukhopadhyay, C. Urea-Mediated Protein Denaturation: A Consensus View. *J. Phys. Chem. B* **113**, 12816–12824 (2009).
270. Bennion, B. J. & Daggett, V. The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 5142–5147 (2003).

Annexes

Appareillage

Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'acquisition des spectres infrarouge à transformée de Fourier ont étés effectuées en utilisant un spectromètre Spectrum II (Perkin Elmer). Les échantillons ont étés broyés avec du bromure de potassium (KBr) et pressés sous forme de pastille. Les mesures ont été effectués à température ambiante entre 400 cm^{-1} et 4000 cm^{-1}.

Spectroscopie infrarouge de réflexion-absorption à modulation de phase

La spectroscopie infrarouge de réflexion-adsorption à modulation de phase a été effectuées avec le modèle IFS66/S (Brucker) à température ambiante dans la gamme spectrale 850 cm^{-1} et 3500 cm^{-1}.

Spectrométrie photoélectronique X (XPS)

Les mesures XPS ont été effectuées avec un spectromètre possédant une source de rayons-X Al Kα (1486,6 eV). Les décalages des énergies ont étés corrigés par le pic corresondant à Au $4f_{7/2}$ du substrat d'or à 84 eV.

Microscopie électronique à balayage (MEB)

Les images MEB ont été obtenus en utilisant le microscope Zeiss Gemini SEM 500 équipé avec un canon à émission de champ fonctionnant à un voltage de 1 kV.

Microscopie électronique à transmission (TEM)

Les mesures TEM ont été effectuées par le microscope JEOL ARF200F à 200 kV.

Mesures résonance plasmon de surface

Pour les mesures SPR nous avons utilisé un parreil commercial (Bionavis). Les mesures ont été effectuées dans la configuration de Kretschmann à longueur d'onde fixée (785 nm). Nous avons étudié les changements de l'angle de résonance plasmonique. Les solutions aqueuses de protéines circulent dans le système de micro-fluidique à 50 µg/min. Les substrats commerciaux sont composés de verre BK7 sur lesquels est déposé une couche d'or de 48 nm ainsi qu'une couche d'adhésion de chrome de 2 nm.

Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Les mesures de granulométrie sur les suspensions de nanoparticules ont été effectuées avec un l'appareil de chez MALVERN (nano ZS).

Synthèses

Synthèse du 12-azido-dodecyl-phsphonic acid (AP12N3)

Etape 1 :

Synthèse du diethyl(12-bromododecyl)phosphonate : Dans un ballon de 50 mL un mélange de 1,12 bromododecane (0,2 mol) et trithylphosphite (33 mmol) sont chauffés à 160°C pendant au moins 4 heures sous reflux. Le produit est purifié par colonne de chromatographie sur silice (dichlorométhane/acetate d'ethyl 3 :2)

Etape 2 :

Synthèse du diethyl(12-azido-dodecyl)phosphonate : dans un ballon de 25mL le produit de l'étape 1 est introduit en plus de 5 équivalents molaires d'azoture de sodium dans de l'éthanol. Le mélange est mis sous reflux à 80°C pendant 48h. Après évaporation du solvant nous ajoutons de l'eau, le produit est extrait au dichlorométhane 3 fois. Le solvant est ensuite évaporé à nouveau.

Etape 3 :

Synthèse de l'AP12N3 : Dans un ballon de 25 mL le produit de l'étape 2 est mélangé avec 3 équivalents molaires de trimethylsilyl bromide dans 8 mL de dichlorométhane anhydre. La solution est mise sous agitation sous argon pendant la nuit à température ambiante. Le solvant est retiré par évaporation. Nous ajoutons 10 mL d'eau au produit, la solution est mise sous agitation pendant 2 heures. La solution est ensuite filtrée est séchée. L'AP12N3 est un solide blanc à l'aspect satiné possédant une texture proche de la cire.

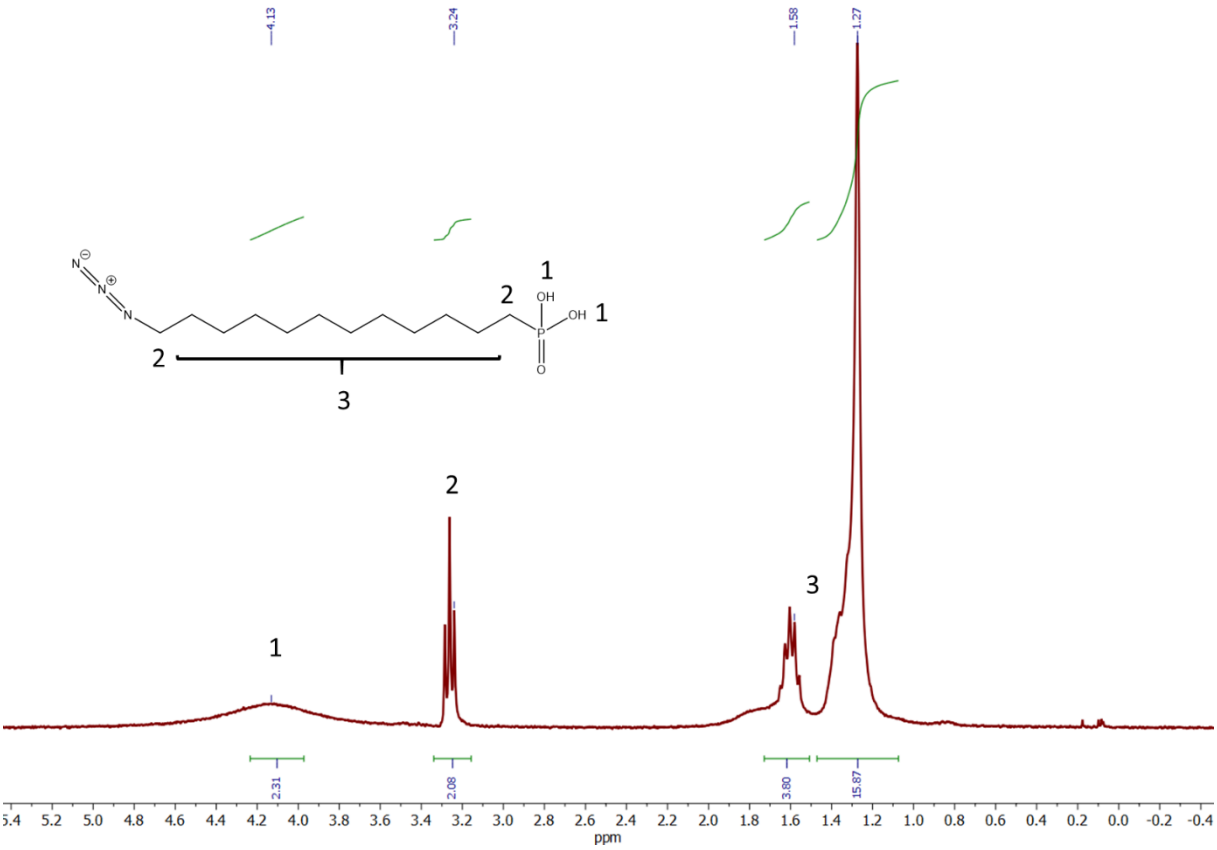

Figure 113. Spectre RMN 1H de l'AP12N3.

^{1}HNMR : 4,13 (s, 2H) ; 3,24 (t, 2H) ; 1,21-1,57 (m , 20 H).

Synthèse de l'undec-10-yne-1-thiol

Etape 1 :

Dans un ballon de 50 mL nous mélangeons 0,8g d'undecyn-1-ol avec 1 mL de chlorure de méthanesulfonyle dans 35 mL de THF sec. Dans un second ballon de 10 mL 1,27g de triethylamine est dissoute dans 5 mL de THF anhydre. Le mélange du second ballon est lentement ajouté au ballon de 50 mL. Le mélange est mis sous agitation magnétique sous argon pendant 2 heures àtempérature ambiante. Nous ajoutons ensuite de l'eau froide à la solution et extrayons deux fois à l'éther. LA phase organique est lavée avec un mélange H_2O/HCl 1M puis rincée à nouveau avec de l'eau. La phase organique est ensuite rincée avec un mélange H_2O/Na_2CO_3 (2.94g pour 35 mL d'eau). La phase organique est séchée à l'aide de $MgSO_4$. Le solvant est finalement évaporé.

Etape 2 :

Dans un ballon de 50 mL un mélange de thioacetate de potassium (2 équivalent molaire) avec le produit de la première étape est effectué dans le méthanol. Le ballon est placé sous reflux sous

argon à 70°C pendant 3 heures. La solution est lavée avec de l'eau froide comme dans l'étape précédente et la phase aqueuse avec de l'éther. Le solvant est ensuite évaporé.

Etape 3 :

Dans un ballon de 50 mL le produit de la seconde étape est méla,ngé avec un large excès de HCl (30 équivalent molaires) dans 20 mL d'éthanol. Le ballon est placé sous reflux sous argon pendant 5 heures à 70°C. Le produit est lavé comme dans les deux étapes précédentes. Le solvant est évaporé pour laisser place à un liquide visqueux de couleur jaune.

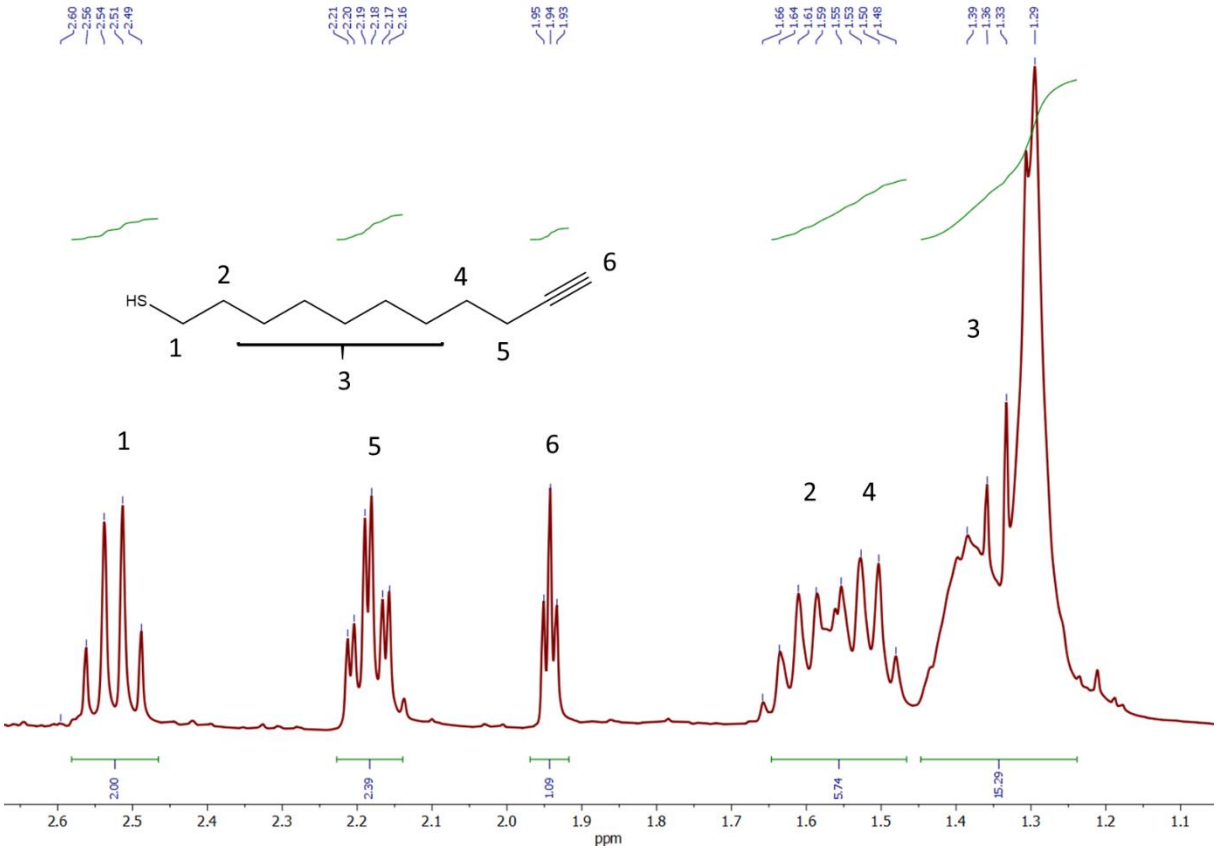

Figure 114. Spectre RMN 1H de l'undec-10-yne-1-thiol.

^{1}HNMR : 2,60-2,49 (m, 2H) ; 2,21-2,16 (m, 2H); 1,95-1,93 (t, 1H); 1,66-1,29 (m, 14H).

Synthèse N-propargyl-Biotinamide (Biotine alcyne)

Dasns un balon de 25 mL nous mélangeons 1,6 mmol de biotine, 2,12 mmol d'EDC.HCl et 1,96 mmol de propargylamine dans 16 mL d'un mélange de CH_3CN/MeOH (3 :1).

Nous laissons agiter 24h à température ambiante. La solution est filtrée pour enlever les dérivées d'EDC.HCl formées (résidus blancs pâteux). Nous ajoutons du MeOH au filtrat. La solution est filtrée sur célite. Le solvant est évaporé sous vide et purifié par colonne de silice en utilisant comme éluant le chloroforme et le méthanol. Nous commençons avec un éluant concentré à 4% en MeOH. La quantité de MeOH est augmentée au cours du temps.

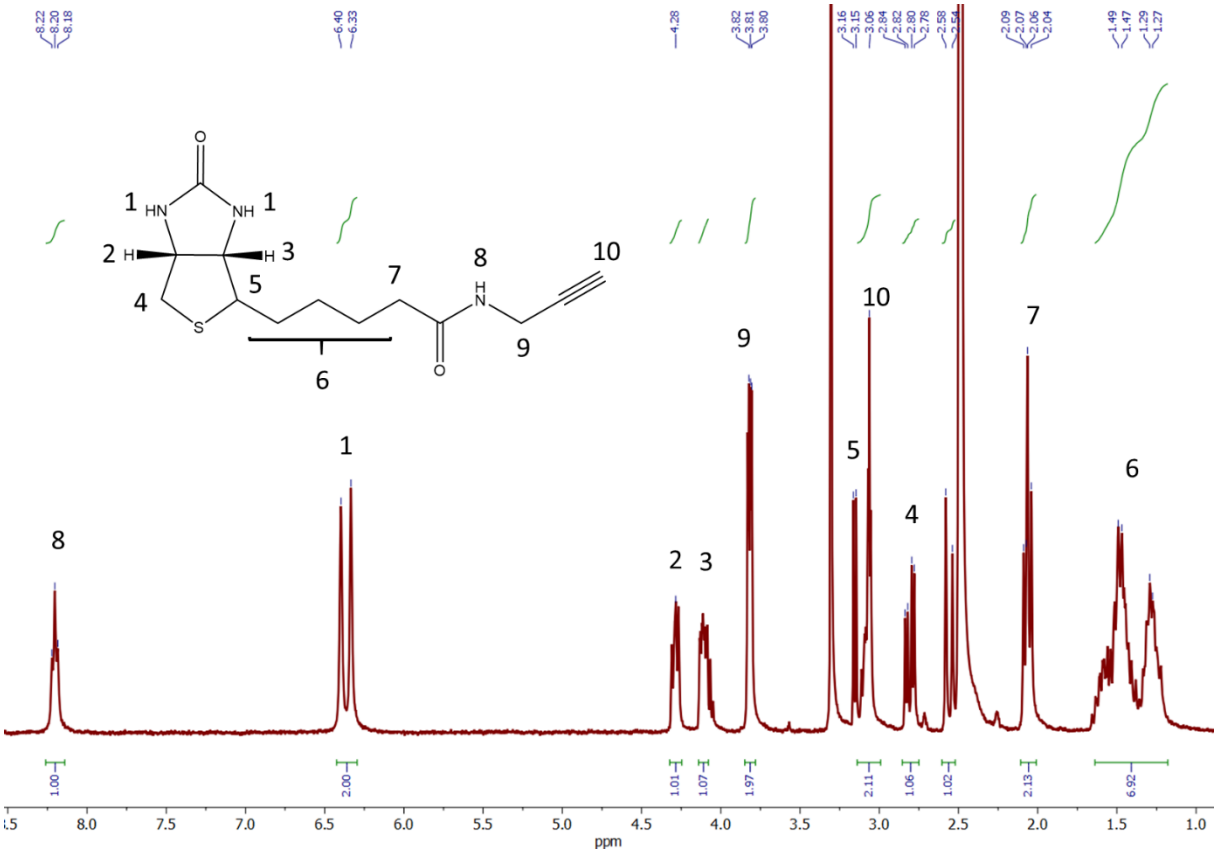

Figure 115. Spectre RMN 1H de la biotine alcyne.

^{1}HNMR : 8,22-8,18 (t, 1H) ; 6,4 (s, 1H) ; 6,33 (s, 1H) ; 4,28 (m, 1H); 4,11 (m, 1H); 3,82-3,80 (t, 2H); 3,16 (sd, 1H); 3,06 (m, 1H); 2,84-2,78 (m, 2H); 2,09-2,04 (t, 2H); 1,55-1,23 (m, 7H).

Réactions de chimie CuAAc clic

Assemblage des nanoparticules

Le substrat d'or d'une épaisseur de 48 nm déposé sur du verre BK7 a été plongé dans une solution d'éthanol concentré à 2 mN de undec-10-yne-1-thiol pendant 48 heures pour former une monocouche dense de thiols. Les nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées avec la molécule d'AP12N3 ont été assemblée à la surface de la monocouche de thiols déposée sur l'or par la réaction de CuAAc clic. Le substrat a été immergé dans une solution de nanoparticules concentrée à 1 mg/mL avec 0,5 mL de triethylamine et 6,5 mg de $CuBr(PPh_3)_3$. La réaction s'effectue sous reflux pendant 8 heures.

Greffe des molécules à la surface des nanoparticules

Le protocole de greffage par chimie clic est le même pour toutes les molécules greffées. Le substrat avec les nanoparticules en surface est plongé dans une solution à 2 mM de la molécule que nous souhaitons greffer (Biotine, Biotine PEG, PEGs) avec 0,5 mL de triethylamine et 6,5 mg de $CuBr(PPh_3)_3$. La réaction s'effectue sous reflux pendant 24 heures.

Pier Andrea BERLING

Conception d'un biocapteur SPR à base de nanoparticules à haut indice de réfraction déposées sur un film d'or

Résumé

La conception d'un biocapteur SPR performant peut s'avérer compliquée. C'est pourquoi beaucoup de biocapteurs utilisent des labels pour augmenter leur sensibilité pour pouvoir détecter de faibles quantités d'analyte. La méthode de conception du biocapteur présentée ici permet de s'affranchir de l'utilisation de labels tout en augmentant la sensibilité du biocapteur grâce aux nanoparticules d'oxyde de fer et leur indice de réfraction. L'assemblage par chimie « clic » permet de contrôler l'assemblage des nanoparticules et de faire en sorte qu'elles soient assemblées covalament sur la surface d'or. Les nanoparticules déposées sur une surface d'or sont le pilier du biocapteur. L'or utilisé pour ses propriétés plasmonqiue couplé avec les nanoparticules augmentant la surface spécifique et l'indice de réfraction de la surface permettent de détecter de faibles quantités d'analytes. Une fois l'assemblage de nanoparticules effectuées il est possible de greffer par chimie « clic » toute sorte de bio-récepteur à la surface des nanoparticules, conférant ainsi au biocapteur une grande versatilité et un champ d'applications étendu. Le biocapteur ainsi conçu peut être régénéré, pour pouvoir être utilisé plusieurs fois, en utilisant les surfactants adéquats.

Mots-clés : Nanoparticules, biocapteur, résonance plasmon de surface, chimie CuAAC clic, protéines, régénération.

Résumé en anglais

Designing a high-performance SPR biosensor can be complicated. For this reason, many biosensors use labels to increases their sensitivity in order to detect small amounts of analytes. The sensor design method presented in this work allows us to avoid the use of labels while increasing the sensitivity of the biosensor thanks to iron oxide nanoparticles and their high refractive index. The assembly by « click » chemistry allows us to control the assembly of the nanoparticles and to make sure they are covalently assembled on the gold surface. The use of gold substrate used for its plasmonic properties coupled with the nanoparticles increasing the specific surface and the refractive index allow the detection of small quantities of analytes. Once the assembly of nanoparticles is done, its possible to graft by « click » chemistry any kind of biorecteptor on the surface of the nanoparticles, conferring to the biosensor a great versatility and a wide field of applications. The biosensors thus designed can be regenrated, so that it can be used several times, by using the appropieted surfactants.

Keywords: Nanoparticles, biosensor, surface plasmon resonance, CuAAC click chemistry, proteins, regeneration.

Pier Andrea BERLING

Conception d'un biocapteur SPR à base de nanoparticules à haut indice de réfraction déposées sur un film d'or

Résumé

La conception d'un biocapteur SPR performant peut s'avérer compliquée. C'est pourquoi beaucoup de biocapteurs utilisent des labels pour augmenter leur sensibilité pour pouvoir détecter de faibles quantités d'analyte. La méthode de conception du biocapteur présentée ici permet de s'affranchir de l'utilisation de labels tout en augmentant la sensibilité du biocapteur grâce aux nanoparticules d'oxyde de fer et leur indice de réfraction. L'assemblage par chimie « clic » permet de contrôler l'assemblage des nanoparticules et de faire en sorte qu'elles soient assemblées covalament sur la surface d'or. Les nanoparticules déposées sur une surface d'or sont le pilier du biocapteur. L'or utilisé pour ses propriétés plasmonqiue couplé avec les nanoparticules augmentant la surface spécifique et l'indice de réfraction de la surface permettent de détecter de faibles quantités d'analytes. Une fois l'assemblage de nanoparticules effectuées il est possible de greffer par chimie « clic » toute sorte de bio-récepteur à la surface des nanoparticules, conférant ainsi au biocapteur une grande versatilité et un champ d'applications étendu. Le biocapteur ainsi conçu peut être régénéré, pour pouvoir être utilisé plusieurs fois, en utilisant les surfactants adéquats.

Mots-clés : Nanoparticules, biocapteur, résonance plasmon de surface, chimie CuAAC clic, protéines, régénération.

Résumé en anglais

Designing a high-performance SPR biosensor can be complicated. For this reason, many biosensors use labels to increases their sensitivity in order to detect small amounts of analytes. The sensor design method presented in this work allows us to avoid the use of labels while increasing the sensitivity of the biosensor thanks to iron oxide nanoparticles and their high refractive index. The assembly by « click » chemistry allows us to control the assembly of the nanoparticles and to make sure they are covalently assembled on the gold surface. The use of gold substrate used for its plasmonic properties coupled with the nanoparticles increasing the specific surface and the refractive index allow the detection of small quantities of analytes. Once the assembly of nanoparticles is done, its possible to graft by « click » chemistry any kind of biorecteptor on the surface of the nanoparticles, conferring to the biosensor a great versatility and a wide field of applications. The biosensors thus designed can be regenrated, so that it can be used several times, by using the appropieted surfactants.

Keywords: Nanoparticles, biosensor, surface plasmon resonance, CuAAC click chemistry, proteins, regeneration.