



Synthèse de réactifs multifonctionnels et d'analogues de mycotoxine. Application à la détection de mycotoxines dans des solutions alimentaires.

Dorra Gargouri

► To cite this version:

Dorra Gargouri. Synthèse de réactifs multifonctionnels et d'analogues de mycotoxine. Application à la détection de mycotoxines dans des solutions alimentaires.. Chimie analytique. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR041 . tel-03123176

HAL Id: tel-03123176

<https://theses.hal.science/tel-03123176>

Submitted on 27 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Chimie Bio-Organique

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Synthèse de réactifs multifonctionnels et d'analogues de mycotoxines. Application à la détection de mycotoxines dans des solutions alimentaires.

**Présentée et soutenue par
Dorra GARGOURI**

Thèse soutenue publiquement le 18 Septembre 2020
devant le jury composé de

Dr. Hafsa KORRI-YOUSSOUFI	Directeur de recherche / Université Paris Sud	Rapportrice
Pr. Jean-Manuel RAIMUNDO	Professeur / Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
Dr. Florence LAGARDE	Chargé de recherche CNRS / Institut des sciences analytiques, Lyon	Examinatrice
Pr. Anthony ROMIEU	Professeur / Université de Bourgogne	Examineur
Pr. Franck LEDERF	Professeur / Université de Rouen	Directeur de thèse
Pr. Pierre-Yves RENARD	Professeur / Université de Rouen	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par Pr. Franck LE DERF et co-directeur Pr. Pierre-Yves RENARD, laboratoire COBRA

Co-encadrants : Dr. Alexandre HAEFELÉ, Dr. Julien VIEILLARD, Dr. Xavier FRANCK



Remerciements

Tout d'abord, j'adresse tous mes remerciements aux membres du jury : Dr. Hafsa KORRI YOUSOUFI, Pr. Jean-Manuel RAIMUNDO, Dr. Florence LAGARDE et Pr. Anthony ROMIEU qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger et d'évaluer mon projet.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Pr. Franck Le Derf et mon co-directeur Pr. Pierre-Yves Renard sans qui cette thèse n'aurait pas pu se faire. Merci pour la confiance qu'ils m'ont accordée et l'expertise qu'ils m'ont transmise, mais aussi à la liberté qu'ils ont su me laisser ont fait de ces années de thèse que je considère comme une expérience extrêmement formatrice et enrichissante. Enfin, j'ai été extrêmement sensible à leurs qualités humaines d'écoute et de compréhension tout au long de ce travail. S'ils m'ont formée à la recherche, ils m'ont également aidée à grandir au sens humain du terme, et je leur suis extrêmement reconnaissante.

J'aimerais également remercier mes encadrants Dr. Julien Vieillard et Dr. Alexandre Haefelé et Dr. Xavier Franck pour leurs encadrements au quotidien, leur grande disponibilité et leur savoir-faire. Merci pour le temps que vous m'avez consacré à discuter plusieurs points de mon projet lorsque j'en avais besoin.

Ces années de thèse ont par ailleurs été l'occasion pour moi d'exercer en tant qu'enseignante au sein de l'IUT Rouen et l'Université de Rouen (Rouen et Evreux) Je souhaiterais adresser ma gratitude aux professeurs Dr. Sébastien Balieu, Dr. Kateryna Fatyeyeva qui m'ont accompagnée, et conseillée durant mes missions d'enseignement. Je remercie l'ensemble du personnel de l'université que j'ai été amené à côtoyer à ce titre, et avec qui mes relations furent aussi cordiales que constructives.

J'en profite également pour remercier toute l'équipe de Chimie Bio-organique sur le site de Rouen et d'Evreux avec qui j'ai tissé des liens solides durant ces années.

Mes remerciements vont aussi à ma famille et mes amis qui, avec cette question récurrente, « Quand est-ce que tu la soutiens cette thèse ? », bien qu'angoissante en période fréquente de doutes, m'ont permis de ne jamais dévier de mon objectif final.

Un merci ne suffit aux quatre Dr. Powerwomen : Batoul (Bella 2) et Kathleen (Bella 3), Josiane (Jojo) et Imene qu'elles étaient une 2^{ème} famille pour moi. Qu'aurais je fais si vous n'étiez pas là ! Merci d'être à mes côtés aux moments les plus folles et aux moments les plus difficiles. Plus d'une fois j'ai pensé que je ne verrais jamais le bout de tunnel mais vous étiez là comme de vraies amies et sœurs (et parfois des mamans) pour me reconforter et m'aider à avancer.

Un énorme Merci pour des personnes tout simplement géniales ! Merci pour votre positivité et pour tous les moments inoubliables (Mahmoud, Farah, Kamel, Ahdi, Brahim, Hussein, Laurent, Seif, Imen (la cousine), Amaury (Mi amore), Jana, Bilal, Nassim, Mona, Marwa, Romain (mon papa ours) , Samuel, Kevin, Sergue). Sans vous je ne n'aurais pas pu savoir relativiser et penser à mon avenir après thèse.

Mon équipe de théâtre, les rêveurs de scène (Hugues, Ghida, Claire, Jason, Géraldine, Eve, Alexandra, Sébastien...) Merci de me faire sortir à chaque fois de ma bulle de scientifique et de faire de moi la factrice du bonheur.

Merci encore mes amis ! Vous êtes des anges !

Malgré la distance qui nous sépare, je tiens à cœur de remercier ma famille. Mes parents de m'avoir supporté et appuyé durant toutes ces années. De m'avoir donné des racines et des ailes et de m'avoir inculquées des valeurs qui m'ont permis d'avancer et de viser le ciel pour atteindre mes ambitions. J'aurai toujours une famille vers qui je me tourne à tous les moments de la vie grâce à mes idoles depuis mon enfance, mes sœurs qui sont pour toujours un vrai soutien. Merci Slim d'être à mes côtés. Merci pour tes conseils toujours pertinents et ta disponibilité. Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour mes premiers fans mes neveux et mes nièces. Je vous souhaite que de belles choses dans vos vies ! Dans les pires moments comme dans les meilleurs, j'ai toujours pu compter sur vous. Je ne vous remercierai jamais assez.

Alors du fond du cœur... Merci à vous tous !

"Il faut toujours viser la lune, car même en cas d'échec, on atterrit dans les étoiles"

Oscar WILDE

"La dure bataille de la vie : Ce ne sont pas toujours les plus forts ni les plus rapides qui la gagnent : L'homme qui tôt ou tard remporte la victoire, est celui qu'il en est capable"

A mes chers parents,

Liste des abréviations, acronymes et anglicisme

% : pourcentage

°C : degré celsius

µg : microgramme

Å : angstrom

ABNP : 4-azido-2-nitrophenylbiocystin-4-nitrophenyl

Abs : absorbance

Ac : Anticorps

ACN : acétonitrile

ADC : antibody-drug conjugate

AF : aflatoxine

AFG1 : aflatoxine G1

AFG2 : Aflatoxine G2

AFM : Atomic Force Microscopy

AFM1 : aflatoxine M1

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation de l'environnement et du travail

Aoaa : acide aminooxyacétique

APDP : N-(4-(p-azidosalicylamido)butyl)-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide

APG : p-azidophenyl glyoxal

APTES : 3-aminopropyltriethoxysilane

ASBA : 4-(p-azidosalicylamido)butylamine

Atf : Azidotetrafluoro

ATR : Attenuated total reflectance

Azoc : azidométhylcarbamate

B : brillance

BBQ : Black Berry Quencher

BHQ : Black Hole Quencher

Boc : tert-Butoxycarbonyl

BSA : Bovin Serum Albumin

CCM : chromatographie sur couche mince

CEA : Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies renouvelables

CI : conversion interne

CIRC : Centre Internationale de Recherche sur le Cancer

CIS : croisement inter-système

CL : chimiluminescence

CLHP : Chromatographie liquide à haute performance

cLOD : calculated limits of detection

CPG : Chromatographie phase gazeuse
CuAAC : copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition
Cy : Cyanine
DABCYL : 4-(DimethylAminoazo) Benzene-4-CarboxYLic acid
DAS : diacétoxyscirpénol
DCC : dicyclohexylcarbodiimide
DL50 : dose létale médiane
DMF : diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxyde
DON : déxynivalénol
DTT : dithiothréitol
EDC : 1-éthyl-3-[3-(diméthylamino)propyl]carbodiimide
EFSA : Autorité européenne de sécurité des aliments
ELISA : Enzyme Linked Immunosorbant Assay
Em : Emission
equiv : équivalent
ER : Estrogen receptors
ESIPT : Excited State Intramolecular Proton Transfer
ETH : Eidgenössische Technische Hochschule
EtOAc : Acétate d'éthyle
EtOH : éthanol
eV : électronvolt
F : Fluorophore
FAM : 5-carboxyfluorescéine
FB : fumonisine
Fc : fragment cristallisable
FIA : Fluorescent Immuno-Assay
FID: Flame ionisation detection, 23
Fmoc : 9-fluorenylmethoxycarbonyl
FRET : Forster Resonance Energy Transfer
FTIR : Fourier Transform Infrared
GA : glutaraldéhyde
GC : Gas Chromatography
GES : Gaz à effet de serre
h : heure
HOMO : Highest Occupied Molecular Orbitals
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HPTLC : High performance thin layer chromatography

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry
HRP : horse-radish peroxidase
Hz : Hertz
iEDDA : inverse-Electron Demand Diels Alder
I_F : intensité de fluorescence
IR-ATR : Infrared- Attenuated total reflectance
ITO : Oxyde d'antimoine
kg : Kilogramme
kJ : kilojoule
KLH : Keyhole Limpet Hemocyanin
LETI : Laboratoire d'électronique et de technologie de l'information
LFIA : Lateral Flow Immunoassay
LOC : lab-on-a chip
LS : Light scattering
Max : maximal
MBS : m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide
MeOH : *méthanol*
mg : milligramme
min : minute
MIP : molecularly imprinted polymers
mL : millilitre
MPBH : 4-(4-N-maleimidophenyl)butyric acid hydrazide
MS : Mass spectroscopy
MSN : Mesoporous Silice Nanoparticles
Mts : Méthanethiosulfonate
Mts-Atf-Biotin : (Méthanethiosulfonate- Azidotetrafluoro- Biotin)
NEB : Néphropathie Endémique des Balkans
ng : nanogramme
NHS : N-Hydroxysuccinimide
NHS-ASA : N-hydroxysuccinimidyl-4-azidocalycyclic acid
NIV : nivalérol
nm : nanomètre
NP : nanoparticule
oa-TOF : orthogonal acceleration time-of-flight
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OTA : ochratoxine A
p.c. : poids corporel
PA : phosphatase alcaline

PAT : patuline
PBS : Phosphate-Buffered saline
PEG : Polyéthylène glycol
PET : Photoinduced Electron Transfer
PM-IRRAS : Polarization Modulation-Infrared Reflection Absorption Spectroscopy
ppb : partie par milliard
Pydec : pyridyldithioéthoxycarbonyl
Q : Quencher
QCM : quartz crystal microbalance
QD's : Quantum Dots
QY : Quantum Yield
R6G : Rhodamine 6G
R_f : rapport frontal
RIA : Radioimmunoassay
RIFS : Reflectometric interference spectroscopy
RMN : Résonance magnétique nucléaire
RP-HPLC : Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
s : seconde
SAM : Self-Assembled Monolayers
SANPAH : N-succinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate
SERS : surface enhanced raman scattering
S_N2 : Substitution nucléophile d'ordre 2
SPAAC : Strain-promoted alkyne-azide cycloaddition
SPDP : N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate
SPIT-FRI : Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay
SPPS : synthèse peptidique sur surface peptidique
SPR : Surface Plasmon Resonance
SSTN : Succinic Acid Succinimidyl Ester 5-Thioxy-2-nitrobenzyl Ester
TCEP : tris(2-carboxyethyl)phosphine
TCO : trans-cyclooctène
TCT : trichothécène
TEG : triéthylène glycol
TES : Triéthylsilane
τ_F : temps de vie
TFA : trifluoroacetic acid
TPMC : N-(3-triethoxysilylpropyl) -4-(N'-maleimidylmethyl) cyclohexanamide
TRICEPS : Trifunctional Chromoproteomic Reagent
Trt : trityle

TSTU : N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(N-succinimidyl)uronium tetrafluoroborate

UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography

UPLC : Ultra Performance liquid chromatography

UV : Ultraviolet

V : volt

XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy

ZEA : zéaralénone

α : alpha

β : Bêta

γ : gamma

ϵ : coefficient d'absorption molaire

λ_{em} : longueur d'onde d'émission

σ : sigma

Φ_F : rendement quantique

Table des matières

Introduction	17
A. Généralités sur les mycotoxines	21
A.I Les différents types des mycotoxines dans la nature	24
A.II Réglementation internationale sur les mycotoxines :	32
B. Méthodes connues pour la détection des mycotoxines	34
B.I Méthodes analytiques pour la détection des mycotoxines	34
B.II Méthodes immunochimiques	36
B.III Les biocapteurs	46
C. Principe du SPIT-FRI	69
C.I Etapes de fonctionnement du SPIT-FRI	70
C.II L'orthogonalité et la chimiosélectivité	70
C.III Fonctionnalisation de la phase solide	79
C.IV Activation	80
C.V Compétition immunologique	80
C.VI Réactivation	81
D. Objectifs du projet de thèse	81
Chapitre 1 : Synthèse des réactifs multifonctionnels	84
A. Etat de l'art	89
A.I Généralités des différents composés hétérofonctionnels décrits dans la littérature.	89
B. Résultats et discussions	113
B.I Stratégie de la synthèse des tripodes T4-P et T5-P	115
B.II Synthèse des réactifs hétérobifonctionnels D4-P et D5-P	124
C. Conclusion	125
Chapitre 2 : Application des réactifs multifonctionnels au SPIT-FRI	129
A. Etat de l'art	105
A.I Choix du fluorophore	105
A.II Analogues de mycotoxines	107
A.III Les anticorps	110

A.IV	Choix du quencher	114
B.	Résultats et discussion	118
C.	Conclusion	133
Chapitre 3 : Stratégie de fonctionnalisation de surface		135
A.	Etat de l'art.....	139
A.I	Monocouches auto-assemblées (SAM).....	139
A.II	Fonctionnalisation d'une surface d'or	143
B.	Résultats et discussion	156
B.I	Stratégie et protocole de fonctionnalisation du tripode T4-R6G.....	156
B.II	Stratégie et protocole de la fonctionnalisation du tripode T5	173
C.	Conclusion	178
Conclusion générale et perspectives		181
Partie expérimentale		187
Matériels et méthodes		203

Introduction

" Le plus difficile, c'est de décider d'agir. Le reste ne tient qu'à la persévérance."

Amelia Earhart

Introduction

La population mondiale est exposée à différents défis politiques, socio-économiques et scientifiques afin de préserver, à long terme, une alimentation saine et de qualité et ce en quantité satisfaisante. Nos aliments transformés ou sous forme de matières premières peuvent provenir de différents pays. Il est donc indispensable de maîtriser la traçabilité des produits ainsi que des contrôles sanitaires drastiques de sorte à protéger les consommateurs. Le risque de contamination chimique ou biologique est donc un enjeu de santé public majeur. Ces contaminations peuvent être de différentes natures et de différentes provenances :¹

- Les contaminants environnementaux et chimiques résultant des pratiques agricoles, industrielles et des activités humaines comme les métaux (Arsenic,² Mercure,³ Plomb, Aluminium ou Cadmium), les micropolluants organiques (les hydrocarbures aromatiques polycycliques), les émissions de gaz à effet de serre (GES) qui engendre une atmosphère polluée, les pesticides appliqués sur les cultures, et certains additifs alimentaires présents dans certains aliments tel que le dioxyde de Titane (E171).⁴
- Les contaminants biologiques naturels sont inévitables et présentent un risque majeur vu leur présence abondante et spontanée dans les plantes. Parmi lesquels, les phycotoxines, les alcaloïdes et les glucosides, nous pouvons aussi mentionner les contaminations bactériennes.

Dans tous les cas, les effets sur l'Homme dépendent des concentrations, de la stabilité en température et dans le temps des contaminants. Dans notre projet, nous nous intéressons principalement aux mycotoxines qui sont pour parties des substances néfastes produites par des champignons et qui peuvent contaminer des végétaux destinés à une consommation humaine ou animale (les légumes, les fruits et les céréales).

A. Généralités sur les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires de moisissures produites par différentes espèces de champignons. Selon l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire, de l'alimentation, de l'environnement et du travail), on recense plus de 300 variétés de mycotoxines dont une trentaine sont toxiques pour l'Homme et l'animal.

¹ Panisset, J.-C., Dewailly, E., Doucet-Leduc, H., Gérin, M., Gosselin, P., Cordier, S., Viau, C., Quénel, P., Devailley, E. *Environnement et santé publique: fondements et pratiques* Edisem, **2005**, (14), 369-395.

² De l'arsenic dans le riz <https://www.lanutrition.fr/les-news/de-larsenic-dans-le-riz>.

³ Aston, S. R.; Fowler, S. W. Mercury in the Open Mediterranean: Evidence of Contamination? *Sci. Total Environ.* **1985**, 43 (1–2), 13–26.

⁴ Dorier, M.; Béal, D.; Tisseyre, C.; Marie-Desvergne, C.; Dubosson, M.; Barreau, F.; Houdeau, E.; Herlin-Boime, N.; Rabilloud, T.; Carriere, M. The Food Additive E171 and Titanium Dioxide Nanoparticles Indirectly Alter the Homeostasis of Human Intestinal Epithelial Cells *in Vitro*. *Environ. Sci. Nano.* **2019**, 6 (5), 1549–1561.

Introduction

Ces mycotoxines ont une durée de vie plus importante que les moisissures elles-mêmes. Elles sont thermostables à des températures conventionnelles de transformation entre 80°C et 100°C. De ce fait, elles résistent à bon nombre de traitements comme les procédés habituels de cuisson et de stérilisation (mais ceci varie aussi selon le type de toxine).⁵ Elles présentent des effets antinutritionnels et sont définies comme des substances délétères pour les animaux d'élevage et les êtres humains.⁶

Le risque associé aux mycotoxines peut être aigu ou chronique. Le risque aigu au contact de fortes concentrations de mycotoxines est modéré chez l'Homme et concerne plutôt la filière animale. Cette contamination peut se faire d'une manière directe par la consommation des végétaux comme les céréales et leurs produits dérivés (la bière),⁷ les grains, les fruits secs (amandes, noix, arachides), les fruits y compris leurs jus et les compotes pour les nourrissons ainsi que leurs produits de fermentation tels que les vins et le cidre.⁸ Sur cette liste, nous pouvons également ajouter le café, le cacao et les épices. La contamination peut également se faire d'une manière indirecte par la consommation d'aliments d'origine animale contaminés suite à l'ingestion de fourrages contaminés.

L'exposition peut également être chronique et dans ce cas les concentrations en toxines sont beaucoup plus faibles. Cependant, du fait de leur persistance, ces mycotoxines peuvent s'accumuler dans l'organisme en se liant aux protéines plasmatiques. Elles peuvent causer des maladies chroniques appelées « mycotoxicoses », voire conduire aux décès des personnes contaminées. Les populations dont l'alimentation est peu variée sont les principales victimes de ces pathologies.

⁵ Kabak, B. The Fate of Mycotoxins during Thermal Food Processing. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, 89 (4), 549–554.

⁶ Hussein, H. Toxicity, Metabolism, and Impact of Mycotoxins on Humans and Animals. *Toxicology* **2001**, 167 (2), 101–134.

⁷ a) Rodríguez-Carrasco, Y.; Fattore, M.; Albrizio, S.; Berrada, H.; Mañes, J. Occurrence of Fusarium Mycotoxins and Their Dietary Intake through Beer Consumption by the European Population. *Food Chem.* **2015**, 178, 149–155. b) Inoue, T.; Nagatomi, Y.; Uyama, A.; Mochizuki, N. Fate of Mycotoxins during Beer Brewing and Fermentation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2013**, 77 (7), 1410–1415.

⁸ Harris, K. L.; Bobe, G.; Bourquin, L. D. Patulin Surveillance in Apple Cider and Juice Marketed in Michigan. *J. Food Prot.* **2009**, 72 (6), 1255–1261.

Introduction

Plusieurs facteurs de contamination sont responsables de la présence des mycotoxines dans nos aliments, et ils peuvent avoir lieu à différentes étapes de la filière agroalimentaire, avant comme après la récolte (Figure 1).⁹



Figure 1 : Schéma représentant les différentes étapes de contamination alimentaire en mycotoxines

La majorité des contaminations a lieu lors de la phase de croissance des végétaux. En effet, dans les champs, des champignons et moisissures produisant des mycotoxines se développent naturellement sur les plantes. La prolifération des mycotoxines dans les champs est dépendante des conditions climatiques¹⁰ comme la sécheresse, l'humidité,¹¹ la pluviométrie¹² et la concentration en dioxyde de carbone (dans l'atmosphère et les végétaux).¹³ De plus, la présence des mycotoxines n'est pas limitée géographiquement puisqu'on les retrouve sur tous les continents.^{11,14}

Les conditions de stockage et de transport des grains des produits céréaliers à grande échelle sont également responsables d'une contamination par les mycotoxines.¹⁵ Les processus non contrôlés de stockage en termes de durée et de température, et des paramètres additionnels incluant l'humidité, la qualité de l'aération, les fortes températures

⁹ a) Doré, T. Pratiques agricoles et sécurité sanitaire des aliments en production végétale. 9Magan, N.; Medina, A.; Aldred, D. Possible Climate-Change Effects on Mycotoxin Contamination of Food Crops Pre- and Postharvest: Mycotoxins and Climate Change. *Plant Pathol.* **2011**, 60 (1), 150–163.

¹⁰ Chakraborty, S.; Tiedemann, A. V.; Teng, P. S. Climate Change: Potential Impact on Plant Diseases. *Environ. Pollut.* **2000**, 108 (3), 317–326.

¹¹ Paterson, R. R. M.; Lima, N. Further Mycotoxin Effects from Climate Change. *Food Res. Int.* **2011**, 44 (9), 2555–2566.

¹² Lahouar, A.; Marin, S.; Crespo-Sempere, A.; Saïd, S.; Sanchis, V. Effects of Temperature, Water Activity and Incubation Time on Fungal Growth and Aflatoxin B1 Production by Toxinogenic *Aspergillus Flavus* Isolates on Sorghum Seeds. *Rev. Argent. Microbiol.* **2016**, 48 (1), 78–85.

¹³ Paterson, R. R. M.; Lima, N. How Will Climate Change Affect Mycotoxins in Food? *Food Res. Int.* **2010**, 43 (7), 1902–1914.

¹⁴ Miraglia, M.; Marvin, H. J. P.; Kleter, G. A.; Battilani, P.; Brera, C.; Coni, E.; Cubadda, F.; Croci, L.; De Santis, B.; Dekkers, S.; Filippi, L.; Hutjes, R. W. A.; Noordam, M. Y.; Pisante, M.; Piva, G.; Prandini, A.; Toti, L.; van den Born, G. J.; Vespermann, A. Climate Change and Food Safety: An Emerging Issue with Special Focus on Europe. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, 47 (5), 1009–1021.

¹⁵ a) Rohweder, D.; Valenta, H.; Sondermann, S.; Schollenberger, M.; Drochner, W.; Pahlow, G.; Döll, S.; Dänicke, S. Erratum to: Effect of Different Storage Conditions on the Mycotoxin Contamination of *Fusarium Culmorum*-Infected and Non-Infected Wheat Straw. *Mycotoxin Res.* **2011**, 27 (2), 155–156. b) Giorni, P. Effect of Aw and CO2 Level on *Aspergillus Flavus* Growth and Aflatoxin Production in High Moisture Maize Post-Harvest. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, 122 (1–2), 109–113.

et le taux de CO₂ peuvent conduire à une prolifération d'une grande quantité des « mycotoxines de stockage » d'où la détérioration possible des récoltes.

A.I Les différents types des mycotoxines dans la nature

Une étude récente a montré que 25% des denrées alimentaires destinées à l'homme et aux animaux sont contaminées tous les ans par des mycotoxines. Ces dernières sont principalement produites par des moisissures appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* et de fait sont classées selon leurs origines biologiques et leurs structures.¹⁶

Les principales mycotoxines produites et présentes dans nos aliments sont les aflatoxines (AF) **B1**, **B2**, **G1**, **G2**, l'ochratoxine A (OTA), les fumonisines (FB) **B1**, **B2**, **B3**, les trichothécènes (TCT), les zéaralénones (ZEA) et la patuline (PAT). Comme indiqué dans le Tableau 1, toutes les mycotoxines ne présentent pas la même toxicité.¹⁷

Mycotoxines	Animal	DL50 (p.c.)
Aflatoxine B1 ¹⁸	souris	9 mg/kg
	caneton	0,3 mg/kg
	chat	0,3-0,6 mg/kg
	chien	0,5-1,5 mg/kg
	Lapin	0,3-0,5 mg/kg
Ochratoxines	rat	20 mg/kg
	poulet	3,4 mg/kg
	cailles	16,5 mg/kg
	dindes	5,9 mg/kg
	porc	1-6 mg/kg
Fumonisine B1 ¹⁹	porc	100 mg/kg
	volailles	8-100 mg/kg
Trichothécènes	souris	1-7 mg/kg
Zéaralénone	souris	4000-20000 mg/kg
Patuline	Souris	35 mg/kg
	volaille	170 mg/kg

Tableau 1 : Les doses létales médianes DL50 de différentes mycotoxines chez les animaux

A.I.1. Les aflatoxines :

La maladie X du dindon, appelée « Turkey X-disease », a causé la mort de 100 000 dindonneaux et 14 000 canetons dans l'est et le sud de l'Angleterre en 1960.²⁰ L'étude

¹⁶ Greeff-Laubscher, M. R.; Beukes, I.; Marais, G. J.; Jacobs, K. Mycotoxin Production by Three Different Toxigenic Fungi Genera on Formulated Abalone Feed and the Effect of an Aquatic Environment on Fumonisins. *Mycology* **2019**, 1–13.

¹⁷ Atanda S. A. Fungi and Mycotoxins in Stored Foods. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2011**, 5 (25), 4373-4382.

¹⁸ Patterson, D. S. P. Metabolism as a Factor in Determining the Toxic Action of the Aflatoxins in Different Animal Species. *Food Cosmet. Toxicol.* **1973**, 11 (2), 287–294.

¹⁹ Cavret, S.; Lecoœur, S. Les Fusariotoxicooses des animaux d'élevage. *Ann. Méd. Vét.* **2006**, 150, 43-55.

Introduction

étiologique de cette épidémie a révélé que la moisissure du genre *Aspergillus* était responsable de la contamination des aliments de ces volailles. Les substances qui ont pu être isolées des aliments contaminés sont de type aflatoxine. Ces substances ne possédaient pas la même fluorescence sous irradiation UV et il en a donc été conclu que les aflatoxines étaient produites par deux types d'*Aspergillus* différents : les *Aspergillus flavus* qui produisent les aflatoxines B et les *Aspergillus parasiticus* qui produisent les aflatoxines B et G.²¹

Les aflatoxines présentent de faibles poids moléculaires variant de 312 à 330 g/mol,²¹ elles sont très peu solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants non polaires. Elles présentent une meilleure solubilité dans les solvants organiques moyennement polaires (tels que le chloroforme et le méthanol). Elles possèdent également des propriétés de fluorescence sous la lumière ultra-violette (UV) d'où leurs noms « B » pour « Blue » et « G » pour « Green ».²²

Une étude structurale complète a pu montrer que les aflatoxines constituent un groupe de 18 composés structurellement proches. Elles comportent un assemblage de coumarine et de furane. Les aflatoxines B1 (**AFB1**) et B2 (**AFB2**) sont les formes les plus souvent retrouvées dans la contamination des aliments. Comme indiqué dans la Figure 2, ces aflatoxines sont métabolisées au niveau du foie en deux métabolites oxydatifs et hydroxylés les **AFM1** et **AFM2**. Il existe une corrélation directe entre la concentration d'**AFB1** consommée par des vaches et la concentration d'**AFM1** qui se retrouve dans leur lait.²³

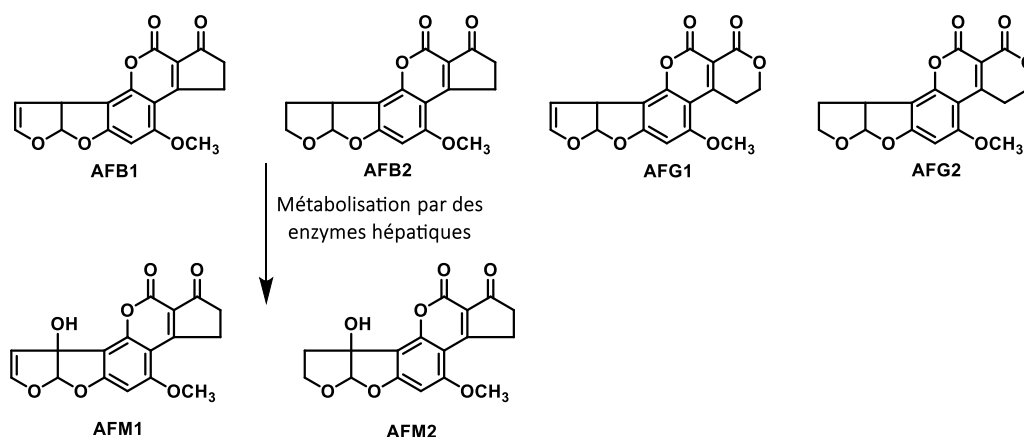


Figure 2 : Les structures chimiques des aflatoxines

²⁰ Goldblatt, L. *Aflatoxin: Scientific Background, Control, and Implications*; Elsevier, **2012**.

²¹ Asao, T.; Büchi, G.; Abdel-Kader, M. M.; Chang, S. B.; Wick, E. L.; Wogan, G. N. The Structures of Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *87* (4), 882–886.

²² Asao, Toyonobu.; Büchi, G.; Abdel-Kader, M. M.; Chang, S. B.; Wick, E. L.; Wogan, G. N. Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85* (11), 1706–1707.

²³ Camarillo, E. H.; Moreno, M. C.; Olvera, V. J. R. Quantifying the Levels of the Mutagenic, Carcinogenic Hydroxylated Aflatoxins (AFM1 and AFM2) in Artisanal Oaxaca-Type Cheeses from the City of Veracruz, Mexico. *J. Microb. Biochem. Technol.* **2016**, *8* (6), 491-497.

Elles prolifèrent principalement après la récolte lors du stockage en cas de forte humidité (>14%) et de « haute » température (>20°C).²⁴ Elles sont présentes principalement dans les produits laitiers,²⁵ le maïs, les arachides,²⁶ le riz,²⁷ les épices, le cacao, la graine de coton et le sorgho.

Ces mycotoxines sont connues pour leur caractère carcinogène, tératogène et immunotoxique. Ainsi, l'**AFB1** est classée par le CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) comme un cancérigène avéré.²⁸ C'est la plus toxique avec une dose létale médiane (DL₅₀) de 0,48 mg/kg chez le rat. La toxicité des autres aflatoxines est caractérisée comme suit : **AFM1** > **AFG1** > **AFB2** > **AFG2**. L'**AFB1** a été identifiée comme étant responsable de cancers des voies respiratoires et du foie chez l'homme.²⁹ La toxicité et l'effet mutagène de cette toxine varient selon les espèces et dépendent des enzymes qui sont responsables de sa métabolisation (glutathion-S-transférase et cytochromes C et P450 par exemple).³⁰ Dans le foie par exemple, il a été montré que l'apparition d'hépatocarcinome résulte d'une mutation de la protéine P53 provoquée par les métabolites de l'**AFB1**.³¹

A.I.2. L'ochratoxine A :

L'ochratoxine A est l'un des métabolites secondaires produits par le genre *Aspergillus* dans les régions chaudes et tropicales³² et par le genre *Penicillium* sous les climats froids comme l'Europe du Nord et le Canada. On la retrouve spécifiquement dans les grains et les

²⁴ Richard, J. L. Some Major Mycotoxins and Their Mycotoxicoses—An Overview. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 3–10.

²⁵ Wood, G. E. Mycotoxins in Foods and Feeds in the United States. *J. Anim. Sci.* **1992**, *70* (12), 3941–3949.

²⁶ C. Menza, N.; Margaret, M. W.; M. Lucy, K. Incidence, Types and Levels of Aflatoxin in Different Peanuts Varieties Produced in Busia and Kisii Central Districts, Kenya. *Open J. Med. Microbiol.* **2015**, *05* (04), 209–221.

²⁷ Bertuzzi, T.; Romani, M.; Rastelli, S.; Giorni, P. Mycotoxins and Related Fungi in Italian Paddy Rice During the Growing Season and Storage. *Toxins* **2019**, *11* (3), 151.

²⁸ Classification du CIRC: <https://www.cancer-environnement.fr/478-Classification-des-substances-cancerogenes.ce.aspx>.

²⁹ a) Iavicoli, I.; Brera, C.; Carelli, G.; Caputi, R.; Marinaccio, A.; Miraglia, M. External and Internal Dose in Subjects Occupationally Exposed to Ochratoxin A. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2002**, *75* (6), 381–386. b) Desai, M. R.; Ghosh, S. K. Occupational exposure to airborne Fungi among rice mill workers with special reference to aflatoxin producing *A. Flavus* strains. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2003**, *10*, 159–162. c) Viegas, S.; Veiga, L.; Malta-Vacas, J.; Sabino, R.; Figueredo, P.; Almeida, A.; Viegas, C.; Carolino, E. Occupational Exposure to Aflatoxin (AFB₁) in Poultry Production. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2012**, *75* (22–23), 1330–1340. d) Viegas, S.; Veiga, L.; Figueredo, P.; Almeida, A.; Carolino, E.; Sabino, R.; Veríssimo, C.; Viegas, C. Occupational Exposure to Aflatoxin B₁ in Swine Production and Possible Contamination Sources. *J. Toxicol. Environ. Health A* **2013**, *76* (15), 944–951.

³⁰ Decad, G. M.; Hsieh, D. P. H.; Byard, J. L. Maintenance of Cytochrome P-450 and Metabolism of Aflatoxin B₁ in Primary Hepatocyte Cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1977**, *78* (1), 279–287.

³¹ Carvajal-Moreno, M. Metabolic Changes of Aflatoxin B₁ to Become an Active Carcinogen and the Control of This Toxin. *Immunome Res.* **2015**, *11* (2).

³² Santos, L.; Marín, S.; Sanchis, V.; Ramos, A. J. Co-Occurrence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Capsicum Powder Samples Available on the Spanish Market. *Food Chem.* **2010**, *122* (3), 826–830.

céréales,³³ et par voie de conséquence dans des aliments provenant de l'Australie, l'Asie, l'Europe et d'Amérique du Nord. Elle est présente également dans les haricots, le café,³⁴ les épices, le vin et les aliments d'origine animale (les reins et le foie du porc, les abats).

Comme l'indique la Figure 3, elle est composée d'un noyau isocoumarine et d'une phénylalanine reliés entre elles par une liaison amide. Sa particularité est de posséder un atome de chlore, ce qui est rare pour un produit naturel.³⁵ L'**OTA** se développe principalement lors des étapes du stockage.

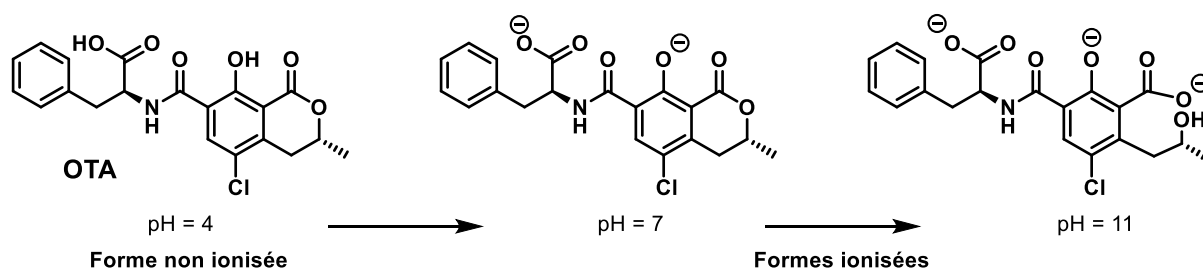


Figure 3 : structures de l'ochratoxine A (Formes ionisées et non ionisées)

L'**OTA** pure est un solide blanc cristallisé possédant une masse moléculaire de 403,8 g/mol. C'est un acide organique avec un faible pKa de 7,1 (pKa du phénol). Elle est soluble en milieu acide ou neutre dans les solvants organiques polaires et très peu soluble dans l'eau. Dans un milieu alcalin, elle devient soluble et stable dans une solution aqueuse de carbonate monosodique (0,1 M, pH 7,4). Son spectre d'absorption UV varie en fonction du pH et de la polarité du solvant.³⁶ Elle présente un maximum d'absorption à 333 nm à pH= 4 et un maximum d'absorption à 380 nm et 385 nm respectivement à pH= 7 et pH= 11 (un pH basique conduit à l'ouverture de la lactone). Sous excitation à 340 nm, l'**OTA** est fluorescente, avec un maximum d'émission à 428 nm dans l'éthanol absolu sous sa forme non ionisée et à 467 nm sous sa forme mono ou di-ionisée (Figure 3).

Étant donné que l'**OTA** est connue par sa stabilité élevée, elle a été identifiée comme pouvant être l'un des facteurs potentiels responsables de Néphropathie Endémique des Balkans (NEB) chez l'Homme.³⁷ Elle est également immunotoxique, tératogène et

³³ Bayman, P.; Baker, J. L.; Doster, M. A.; Michailides, T. J.; Mahoney, N. E. Ochratoxin Production by the *Aspergillus Ochraceus* Group and *Aspergillus Alliaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, 68 (5), 2326–2329.

³⁴ Bucheli, P.; Taniwaki, M. H. Research on the Origin, and on the Impact of Post-Harvest Handling and Manufacturing on the Presence of Ochratoxin A in Coffee. *Food Addit. Contam.* **2002**, 19 (7), 655–665.

³⁵ Bayman, P.; Baker, J. L. Ochratoxins: A Global Perspective. *Mycopathologia* **2006**, 162 (3), 215–223.

³⁶ Bazin, I.; Faucet-Marquis, V.; Monje, M.-C.; El Khoury, M.; Marty, J.-L.; Pfohl-Leschkowicz, A. Impact of PH on the Stability and the Cross-Reactivity of Ochratoxin A and Citrinin. *Toxins* **2013**, 5 (12), 2324–2340.

³⁷ a) Petkova-Bocharova, T.; Chernozemsky, I. N.; Castegnaro, M. Ochratoxin A in Human Blood in Relation to Balkan Endemic Nephropathy and Urinary System Tumours in Bulgaria. *Food Addit. Contam.* **1988**, 5 (3), 299–301 b) Gifford, F. J.; Gifford, R. M.; Eddleston, M.; Dhaun, N. Endemic Nephropathy Around the World. *Kidney Int. Rep.* **2017**, 2 (2), 282–292.

neurotoxique.³⁸ Au vu de sa stabilité chimique à l'hydrolyse et au chauffage, elle possède aussi un pouvoir cancérogène (classé groupe 2B) chez l'animal. Cet effet chez l'homme n'est pas encore démontré.³⁵

A.1.3. Les fumonisines :

Les fumonisines sont des mycotoxines produites par *Fusarium moniliforme*³⁹ et fréquemment retrouvées dans le maïs, notamment en Chine et en Afrique du Sud.⁴⁰ Elles ont été identifiées, pour la première fois en 1988, chez les équidés lors d'une étude sur la leucoencéphalomalacie.⁴¹ Il existe différentes fumonisines (**B1-B4**, **A1** et **A2**) mais les plus fréquentes et les plus toxiques sont les formes **FB1** et **FB2**.

Les fumonisines, comme la **FB1** (Figure 4), présentent quatre fonctions acides carboxyliques qui leur confèrent une forte hydrophilie. Ce sont des composés polaires, solubles dans l'eau et insolubles dans les solvants apolaires.⁴²

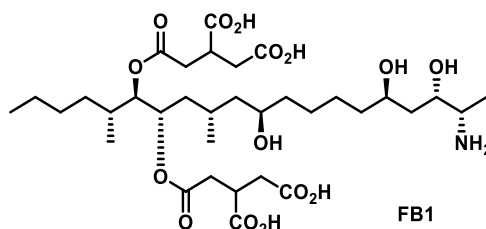


Figure 4 : Structure de la fumonisine **B1**

Elles peuvent être ingérées à de très faibles concentrations chez l'animal et induire une inhibition des voies métaboliques des sphingolipides. Les effets sur l'homme sont supposés mais non démontrés même si des études épidémiologiques menées en Chine indiquent une corrélation entre une forte incidence de cancer de l'œsophage et les régions riches en maïs contaminé par la fumonisine **FB1**.⁴³ Le diagnostic des mycotoxicoses provoquées par les

³⁸ Iavicoli, I.; Brera, C.; Carelli, G.; Caputi, R.; Marinaccio, A.; Miraglia, M. External and Internal Dose in Subjects Occupationally Exposed to Ochratoxin A. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **2002**, 75 (6), 381–386.

³⁹ Gelderblom, W. C. A.; Vleggaar, R.; Kriek, N. P. J. Fumonisin-Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium Moniliforme*. *APPL Env. MICROBIOL* **1988**, 54 (6), 1806-1811.

⁴⁰ Marasas, W. F. O.; Kriek, N. P. J.; Fincham, J. E.; Van Rensburg, S. J. Primary Liver Cancer and Oesophageal Basal Cell Hyperplasia in Rats Caused by *Fusarium Moniliforme*. *Int. J. Cancer* **1984**, 34 (3), 383–387.

⁴¹ Marasas, W. F.; Kellerman, T. S.; Gelderblom, W. C. A.; Coetzer, J. A. W.; Thievi, P. G. Leukoencephalomalacia in Horses Induced by Fumonisin B1 Isolated from *Fusarium Moniliforme*. *Onderstepoort J. vet. Res.* **1988**, 55, 197-203.

⁴² Pour plus d'informations sur les fumonisines : Ducret, C. Une nouvelle classe de mycotoxines: les fumonisines.

⁴³ Chu, F. S.; Lit, G. Y. Simultaneous Occurrence of Fumonisin B1 and Other Mycotoxins in Moldy Corn Collected from the People's Republic of China in Regions with High Incidences of Esophageal Cancer. *Appl. Env. Microbiol.* **1994**, 60 (3), 847-852.

fumonisines reste toutefois difficile puisqu'il n'y a pas assez d'information sur toutes les conséquences toxicologiques.

A.I.4. Les trichothécènes :

Les trichothécènes **TCT** sont produites principalement par des moisissures de genre *Fusarium*.²¹ Ces dernières sont responsables de contamination des champs de céréales principalement dans des régions à climats tempérés telles que l'Amérique du nord,⁴⁴ le Canada, l'Asie et l'Europe.

Les **TCT** dérivent d'un système tricyclique appelé trichothécane (Figure 5). A la structure du trichothécane, s'ajoute une double liaison en position C9 et C10 ainsi qu'un groupement époxy en position C12 et C13 qui est essentiellement responsable de la toxicité et de la stabilité.⁴⁵ On obtient ainsi les 12-13 époxytrichothécènes.

Parmi les 148 trichothécènes isolées, quatre sont des contaminants alimentaires.⁴⁶ Ces mycotoxines sont classées en 4 groupes (de A à D) selon leur composition chimique.⁴⁷ Les groupes A et B diffèrent au niveau de la cétone en C8 tandis que le groupe C intègre un groupement époxyde entre les carbones en position 7 et 8. Les composés du groupe D quant à eux diffèrent car ils intègrent un macrocycle supplémentaire entre les C4 et C15. Les **TCT** du groupe A, les plus courantes, sont les toxines **T-2**, **HT-2** et le diacétoxyscirpénol (**DAS**). Pour le groupe B, les plus importantes sont le déxynivalénol (**DON**) et le nivalénol (**NIV**).⁴⁸

⁴⁴ McMullen, M.; Jones, R.; Gallenberg, D. Scab of Wheat and Barley: A Re-Emerging Disease of Devastating Impact. *Plant Dis.* **1997**, 81 (12), 1340–1348.

⁴⁵ McCormick, S. P.; Stanley, A. M.; Stover, N. A.; Alexander, N. J. Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins* **2011**, 3 (7), 802–814.

⁴⁶ Placinta, C. M.; D'Mello, J. P. F.; Macdonald, A. M. C. A Review of Worldwide Contamination of Cereal Grains and Animal Feed with *Fusarium* Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1999**, 78 (1–2), 21–37.

⁴⁷ Balzer, A. Les trichothécènes : nature et origine. other, **2003**.

⁴⁸ *Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot*; International Programme on Chemical Safety, UNEP, Weltgesundheitsorganisation, Internationale Arbeitsorganisation, Eds.; Environmental health criteria; World Health Organization: Geneva, **1990**.

Introduction

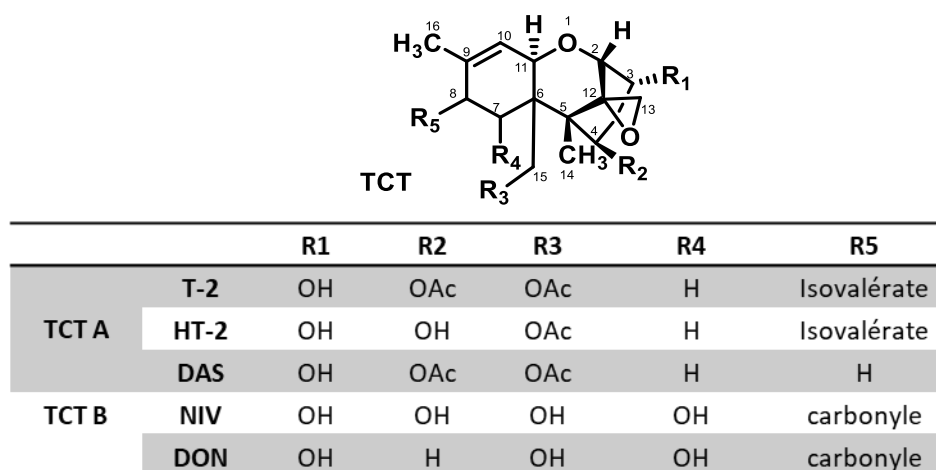


Figure 5 : Structure des trichothécènes **TCT** de type A et type B

Ces mycotoxines sont des poudres incolores, cristallisables de masses molaires variant entre 300 et 600 g/mol. Elles possèdent une bonne solubilité dans les solvants modérément polaires tels que les alcools, les solvants chlorés, l'acétate d'éthyle ou l'éther éthylique et sont parfois légèrement solubles dans l'eau.

Les **TCT** n'absorbent pas les rayonnements visibles et sont donc particulièrement stables dans le temps. Ils possèdent également une thermostabilité élevée (résistants aux températures de cuisson et de stérilisation).

Ils agissent sur les organismes en inhibant les différentes phases de synthèse des protéines (initiation, élongation et terminaison). Le type d'action est corrélé à la structure chimique de la toxine. L'action des **TCT** dans le cytoplasme des cellules résulte dans une accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène qui endommagent les cellules conduisant à des problèmes immunologiques et des maladies gastro-intestinales.⁴⁹

A.I.5. La Zéaralénone :

Produite par des espèces fongiques de type *Fusarium graminearum*, la zéaralénone **ZEN** est présente communément dans le maïs au moment de la floraison mais peut également se retrouver sur le riz, le blé, le sorgho ou l'orge. Sa production est favorisée dans des conditions d'humidité au-dessus de 74%.

La **ZEN** est un solide cristallin blanc et possède une masse moléculaire de 318 g/mol. Il s'agit d'une forme lactone de l'acide résorcylique phénolique (Figure 6). La molécule est faiblement soluble dans l'eau (20 mg/L à 25°C) à cause de la lactone et faiblement soluble dans l'hexane à cause des groupements hydrophiles. Sa solubilité est donc bonne dans les

⁴⁹ Smith, T. K. Recent Advances in the Understanding of Fusarium Trichothecene Mycotoxins. *J. Anim. Sci.* **1992**, 70 (12), 3989–3993.

alcools et les solvants de polarité intermédiaire.⁵⁰ L'acétate d'éthyle est d'ailleurs le solvant le plus utilisé pour son extraction dans les produits alimentaires.

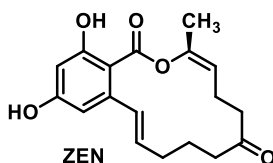


Figure 6 : Structure chimique de la zéaralénone **ZEN**

La **ZEN** possède une faible toxicité aigüe après administrations orales et intrapéritonéales chez la souris, le rat et le cobaye. Elle est cependant classée comme une mycotoxine œstrogénique car elle induit de graves conséquences au niveau des organes reproducteurs. En effet, elle peut être considérée comme un « leurre hormonal », elle se lie sur les récepteurs qui sont le site de fixation des hormones sexuelles. Plusieurs études *in vitro* ont montré que la **ZEN** ainsi que certains de ses métabolites se lient de façon compétitive aux récepteurs d'œstrogènes (ER).⁵¹ Cette liaison à des récepteurs spécifiques, a été également démontrée *in vivo* dans l'utérus.⁵²

A.I.6. La patuline :

La patuline est une mycotoxine produite par différents champignons appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium*.⁵³ Elle est détectée majoritairement dans plusieurs fruits, mais plus particulièrement dans les pommes et leurs produits dérivés.⁵⁴ Elle est à l'origine de contaminations répandues dans les jus de fruits, le cidre et les compotes pour bébés. Nous la retrouvons aussi dans les résidus des céréales (paille et blé). Initialement, la patuline était utilisée en médecine pour traiter les infections aux bactéries (gram positif et négatif).⁵⁵

⁵⁰ Hidy, P. H.; Baldwin, R. S.; Greasham, R. L.; Keith, C. L.; McMullen, J. R. Zearalenone and Some Derivatives: Production and Biological Activities. In *Advances in Applied Microbiology*; Elsevier, **1977**, 22, 59–82.

⁵¹ Kiang, D. T.; Kennedy, B. J.; Pathre, S. V.; Mirocha, C. J. Analogs to Estrogen Receptors. **1978**, 38, 6.

⁵² Kuiper-Goodman, T.; Scott, P. M.; Watanabe, H. Risk Assessment of the Mycotoxin Zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **1987**, 7 (3), 253–306.

⁵³ Samson, R. A.; Houbaken, J.; Varga, J.; Frisvad, J. C. Polyphasic Taxonomy of the Heat Resistant Ascomycete Genus *Byssoschlamys* and Its *Paecilomyces* Anamorphs. *Persoonia - Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **2009**, 22 (1), 14–27.

⁵⁴ a) Guo, Y.; Zhou, Z.; Yuan, Y.; Yue, T. Survey of Patulin in Apple Juice Concentrates in Shaanxi (China) and Its Dietary Intake. *Food Control* **2013**, 34 (2), 570–573. b) Spadaro, D.; Ciavarella, A.; Frati, S.; Garibaldi, A.; Gullino, M. L. Incidence and Level of Patulin Contamination in Pure and Mixed Apple Juices Marketed in Italy. *Food Control* **2007**, 18 (9), 1098–1102. c) Iha, M. H.; Sabino, M. Incidence of Patulin in Brazilian Apple-Based Drinks. *Food Control* **2008**, 19 (4), 417–422. d) Zaid, C.; Abid, S.; Hlel, W.; Bacha, H. Occurrence of Patulin in Apple-Based-Foods Largely Consumed in Tunisia. *Food Control* **2013**, 31 (2), 263–267.

⁵⁵ Lowell, L. W.; Allister, J. L.; Thomas, G. P. Antimicrobial activity of patulin derivatives: A preliminary report. *J. of antibiotics* **1980**, 33 (7), 767–769.

Introduction

Aujourd'hui, son utilisation dans ces traitements est interdite à cause de la neurotoxicité de cette mycotoxine.⁵⁶

C'est une lactone hétérocyclique insaturée dont la structure chimique est représentée en Figure 7. Elle est très polaire et possède une faible masse molaire de 154 g/mol. La patuline est soluble dans l'eau et la plupart des solvants organiques, à l'exception du benzène et de l'éther de pétrole. La **PAT** est stable en milieu acide et perd son activité en milieu basique. Elle possède aussi une excellente stabilité thermique ce qui la rend difficile à éliminer.

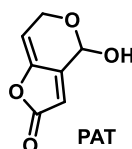


Figure 7 : Structure de la patuline

Cette mycotoxine est connue comme étant immunotoxique, hépatotoxique, neurotoxique et tératogène.⁵⁷

A.II Réglementation internationale sur les mycotoxines :

Aujourd'hui, l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) et l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) recommandent le contrôle de la concentration en mycotoxines

⁵⁶ Stott, W. T.; Bullerman, L. B. Patulin: A Mycotoxin of Potential Concern in Foods. *J. Milk Food Technol.* **1975**, 38 (11), 695–705.

⁵⁷ a) Moake, M. M.; Padilla-Zakour, O. I.; Worobo, R. W. Comprehensive Review of Patulin Control Methods in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2005**, 4 (1), 8–21. b) Vidal, A.; Ouhibi, S.; Ghali, R.; Hedhili, A.; De Saeger, S.; De Boevre, M. The Mycotoxin Patulin: An Updated Short Review on Occurrence, Toxicity and Analytical Challenges. *Food Chem. Toxicol.* **2019**, 129, 249–256.

Introduction

dans différents types d'aliments,^{17,35,58} en particulier dans les pays ayant des conditions difficiles d'alimentation (Nigéria, Ghana, Soudan,...). Ceci a amené à fixer des doses tolérables pour chaque mycotoxine selon le type d'aliment, c'est-à-dire une dose à laquelle un individu pourrait être exposé tout au long de sa vie sans effet néfaste sur sa santé (Tableau 2).

Mycotoxines	Produits	DT p.c. (Dose tolérable)
Aflatoxines (AFs)	Céréales	5 µg/kg
	Lait et fromages	0,5-0,25 µg/kg (AFM1)
	Arachides	15 µg/kg (AFB1, AFG1, AFB2, AFG2)
	Bétail	100 µg/kg
	Volailles	300 µg/kg
Ochratoxines (OTA)	Céréales	5 µg/kg
	Café vert	8 µg/kg
	Vins	10 µg/kg
	Jus de raisin	2 µg/kg
	Aliments à base de céréales	3 µg/kg
Fumonisine (FB)	Mais et céréales	80 ng/kg
	Aliments pour bébés	3 µg/kg
Trichothécènes (TCT)	Aliments pour adultes	0,061 µg/kg (HT-2)
		1 µg/kg (T-2)
Zéaralénone (ZEN)	Céréales	1250 µg/kg
Patuline (PAT)	Jus de pomme	50 µg/kg
	Pomme	25 µg/kg
	Aliments pour bébé	10 µg/kg

Tableau 2 : Doses tolérables de quelques mycotoxines dans différents aliments

Du fait de la résistance de toutes ces mycotoxines, il est très difficile de les détruire. Il est donc recommandé de travailler sur l'amélioration des conditions de culture et de stockage pour limiter la prolifération des moisissures. L'utilisation de substances répulsives des insectes, des formules insecticides ou fongicides, ou des gaz stérilisants peuvent permettre de limiter l'apparition des moisissures. Plusieurs essais ont été effectués afin de réduire la toxicité des mycotoxines en les inactivant thermiquement ou par irradiation lumineuse dans le domaine du visible.¹³ Cependant, les résultats expérimentaux ne sont pas encore transposables à l'échelle industrielle. Ainsi, les exigences sanitaires imposent la mise en œuvre de méthodes sensibles et sélectives pour détecter la présence de ces mycotoxines.

⁵⁸ a) Bhat, R.; Rai, R. V.; Karim, A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x> b) *Aspergillus: Biology and Industrial Applications*; Bennett, J. W., Klich, M. A., Eds.; Biotechnology series; Butterworth-Heinemann: Boston, 1992.

B. Méthodes connues pour la détection des mycotoxines

Diverses techniques analytiques communes ont été développées depuis des décennies pour l'extraction, la détection et la quantification des mycotoxines. Elles sont utilisées de nos jours⁵⁹ mais elles possèdent quelques limites qui rendent leur mise en œuvre difficile au niveau industriel.

B.1 Méthodes analytiques pour la détection des mycotoxines

Les techniques chromatographiques sont principalement utilisées pour doser les mycotoxines. Ces techniques combinent une étape de séparation (extraction) des analytes présents dans un mélange complexe et une étape de détection. Les techniques chromatographiques utilisées sont la CCM (Chromatographie sur Couche Mince), la CPG (Chromatographie en Phase Gazeuse), la CLHP ou HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) et l'UHPLC (Chromatographie liquide à ultra haute performance).⁶⁰

B.1.1. Chromatographie liquide sur couche mince (CCM)

Au début des années 70, la chromatographie sur couche mince (CCM) est reportée par l'équipe de Gimeno comme la première technique reconnue et recommandée pour la détection des mycotoxines.⁶¹ Cette technique permet, en jouant avec les solvants d'élutions, de séparer des mycotoxines en fonction de leurs rapports frontaux (R_f) différents.⁶² Cette méthode a été utilisée pour des analyses unidimensionnelles et bidimensionnelles.⁶³ Les techniques de détection varient en fonction des mycotoxines à détecter : les substances colorées sont visualisées sous la lumière visible. Les mycotoxines fluorescentes sont examinées sous la lumière UV. Tandis que pour les toxines non fluorescentes des réactifs de pulvérisation spécifiques chromogéniques ou fluorogéniques sont utilisés pour relever des couleurs ou de la fluorescence.

L'évolution des technologies a permis à la chromatographie sur couche mince à haute performance (HPTLC «High Performance Thin Layer Chromatography») d'accéder à une

⁵⁹ Turner, N. W.; Bramhmbhatt, H.; Szabo-Vezse, M.; Poma, A.; Coker, R.; Piletsky, S. A. Analytical Methods for Determination of Mycotoxins: An Update (2009–2014). *Anal. Chim. Acta* **2015**, 901, 12–33.

⁶⁰ Sabino, M. Detection and Determination of Patulin in Fruits and Fruit Products. In *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*; Elsevier, **2008**, 261–270.

⁶¹ Gimeno, A. Thin Layer Chromatographic Determination of Aflatoxins, Ochratoxins, Sterigmatocystin, Zearalenone, Citrinin, T-2 Toxin, Diacetoxyscirpenol, Penicillic Acid, Patulin, and Penitrem A. *J. - Assoc. Off. Anal. Chem.* **1979**, 62 (3), 579–585.

⁶² a) Wollish, E. G.; Schmall, Morton.; Hawrylyshyn, Mary. Thin-Layer Chromatography. Recent Developments in Equipment and Applications. *Anal. Chem.* **1961**, 33 (9), 1138–1142. b) Scott, P. M.; Lawrence, J. W.; Walbeek, W. V. Detection of Mycotoxins by Thin-Layer Chromatography: Application to Screening of Fungal Extracts. *Appl. Microbiol.* **1970**, 20 (5), 839–842.

⁶³ a) Sokolović, M.; Šimpraga, B. Survey of Trichothecene Mycotoxins in Grains and Animal Feed in Croatia by Thin Layer Chromatography. *Food Control* **2006**, 17 (9), 733–740. b) Betina, V. Thin-Layer Chromatography of Mycotoxins. *J. Chromatogr. A* **1985**, 334, 211–276.

analyse rapide, sensible, quantitative et moins consommatrice de solvants que la CCM.^{63b} Cependant, cette technique manque de précision et de spécificité surtout lorsque l'on analyse des matrices complexes. De plus, l'appareil de mesure doit être équipé d'un densimètre (instrument pour la mesure de la densité du fluide) qui est très coûteux.⁶⁴

B.I.2. La chromatographie gazeuse (CPG ou GC)

La chromatographie en phase gazeuse est une technique qui peut être couplée à une méthode de détection comme la spectrométrie de masse (MS), la détection par ionisation de flamme (FID) ou la spectroscopie infrarouge (FTIR) pour identifier des substances volatiles issues des mycotoxines.⁶⁵ Elle a été appliquée à l'analyse des mycotoxines dans les années 90 suite aux travaux de Tarter et Scott.⁶⁶ En 2004, l'équipe japonaise de Tabata a développé une méthode GC/MS pour l'analyse et la détection de la Patuline dans le jus de pomme.⁶⁷ Les travaux de Markaki ont permis d'atteindre, avec cette technique, des limites de détection de 5,8 µg/kg de patuline dans les jus de fruits.⁶⁸

Malgré les efforts pour simplifier les préparations des échantillons,⁶⁹ cette technique requiert une étape de dérivation obligatoire avant analyse pour les mycotoxines non volatiles.⁷⁰ Cette dérivation peut s'effectuer soit par silylation ou par polyfluoroacylation.⁷¹

B.I.3. La chromatographie liquide à haute performance (HPLC)

L'HPLC peut être utilisée en phase normale ou en phase inverse pour analyser des mycotoxines. Elle a été couplée à différentes méthodes de détection telles que les détections par spectrophotométrie d'absorption mono- ou multilongueur d'onde, la spectrophotométrie en émission de fluorescence (FLD) et la spectrométrie de masse.⁷² Ceci

⁶⁴ Betina, V. *Chromatography of Mycotoxins: Techniques and Applications*; Elsevier, **1993**.

⁶⁵ Young, J. C.; Games, D. E. Analysis of Fusarium Mycotoxins by Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *J. Chromatogr. A* **1994**, 663 (2), 211–218.

⁶⁶ a) Lehotay, S. J.; Hajšlová, J. Application of Gas Chromatography in Food Analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2002**, 21 (9–10), 686–697 b) Tarter, E. J.; Scott, P. M. Determination of Patulin by Capillary Gas Chromatography of the Heptafluorobutyrate Derivative. *J. Chromatogr. A* **1991**, 538 (2), 441–446.

⁶⁷ Tabata, S.; Iida, K.; Suzuki, J.; Kimura, K.; Ibe, A.; Saito, K. A Quantification and Confirmation Method of Patulin in Apple Juice by GC/MS. *J. Food Hyg. Soc. Jpn. Shokuhin Eiseigaku Zasshi* **2004**, 45 (5), 245–249.

⁶⁸ Moukas, A.; Panagiotopoulou, V.; Markaki, P. Determination of Patulin in Fruit Juices Using HPLC-DAD and GC-MSD Techniques. *Food Chem.* **2008**, 109 (4), 860–867.

⁶⁹ Sheu, F.; Shyu, Y. T. Analysis of Patulin in Apple Juice by Diphasic Dialysis Extraction with in Situ Acylation and Mass Spectrometric Determination. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (7), 2711–2714.

⁷⁰ Onji, Y.; Aoki, Y.; Tani, N.; Umehayashi, K.; Kitada, Y.; Dohi, Y. Direct Analysis of Several Fusarium Mycotoxins in Cereals by Capillary Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1998**, 815 (1), 59–65.

⁷¹ Scott, P. M. Mycotoxin Methodology. *Food Addit. Contam.* **1995**, 12 (3), 395–403.

⁷² a) Herzallah, S. M. Determination of Aflatoxins in Eggs, Milk, Meat and Meat Products Using HPLC Fluorescent and UV Detectors. *Food Chem.* **2009**, 114 (3), 1141–1146. b) Frisvad, J. C.; Thrane, U. Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on

donne la possibilité de séparer et purifier une large gamme d'espèces fongiques avec une bonne sensibilité et une bonne sélectivité. L'HPLC-FLD étant particulièrement bien adaptée pour analyser des mycotoxines naturellement fluorescentes, comme les Aflatoxines **AFs** ou l'Ochratoxine **OTA**.

Parmi les travaux décrits dans la littérature, on peut citer ceux de Jinap⁷³ qui utilisent une double détection par absorption et par fluorescence pour doser simultanément des **AFs**, le **ZEN**, l'**OTA** et le **DON** par RP-HPLC-UV-FLD. Par cette méthode, ils sont parvenus à détecter et quantifier quelques nanogrammes d'analytes.

Le couplage de l'HPLC avec la spectrométrie de masse (HPLC-MS) a ouvert de nouvelles possibilités pour l'identification et la quantification de multiples mycotoxines ionisables (**AFs** et **OTA**) sans la nécessité de les dériver.⁷⁴ Ainsi, en 2000, l'équipe de Sewram a montré qu'il était possible de détecter des quantités de l'ordre de 4 µg/L de patuline dans le jus de pomme par HPLC-APCI-MS-MS.⁷⁵ Cependant, la sensibilité de cette technique dépend de la méthode d'ionisation. L'utilisation de la spectrométrie de masse en tandem a permis d'améliorer les limites de sensibilité de cette technique et d'atteindre des limites de détection très basses, de l'ordre du ng/kg.

Les techniques chromatographiques ont de bonnes performances en termes de sélectivité, de sensibilité et d'analyse multi-résidus. Néanmoins, nous ne pouvons pas ignorer le coût élevé des équipements requis. De plus, il n'est pas possible d'accéder à une automatisation totale allant de la préparation des échantillons à la détection des analytes. Enfin, ces équipements requièrent des personnels qualifiés, leur portabilité est limitée et les analyses doivent avoir lieu en laboratoire.

B.II Méthodes immunochimiques

Les techniques immunologiques sont basées sur la formation des complexes antigènes-anticorps (Ag-Ac). Ces méthodes se basent sur une compétition de liaison à l'anticorps entre l'analyte libre (Ag) non marqué dans l'échantillon à analyser et des molécules marquées par un traceur (Ag* ou Ac*), que ce soit radioactif, enzymatique,

alkylphenone retention indices and UV-vis spectra (Diode array detection). *J. Chromatogr.* **1987**, 404, 195-214.
c) Pereira, V. L.; Fernandes, J. O.; Cunha, S. C. Mycotoxins in Cereals and Related Foodstuffs: A Review on Occurrence and Recent Methods of Analysis. *Trends Food Sci. Technol.* **2014**, 36 (2), 96–136.

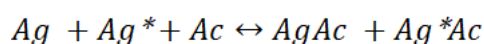
⁷³ Soleimany, F.; Jinap, S.; Rahmani, A.; Khatib, A. Simultaneous Detection of 12 Mycotoxins in Cereals Using RP-HPLC-PDA-FLD with PHRED and a Post-Column Derivatization System. *Food Addit. Contam. Part A* **2011**, 28 (4), 494–501.

⁷⁴ Wen, J.; Kong, W.; Hu, Y.; Wang, J.; Yang, M. Multi-Mycotoxins Analysis in Ginger and Related Products by UHPLC-FLR Detection and LC-MS/MS Confirmation. *Food Control* **2014**, 43, 82–87.

⁷⁵ Sewram, V.; Nair, J. J.; Nieuwoudt, T. W.; Leggott, N. L.; Shephard, G. S. Determination of Patulin in Apple Juice by High-Performance Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2000**, 897 (1–2), 365–374.

luminescent, dans le système de dosage. Cette compétition a pour but de faire interagir ces molécules (Ag et Ag*) avec les sites de liaison des anticorps spécifiques (Ac) à l'analyte étudié.

Dans ces techniques de dosage, les mycotoxines peuvent jouer le rôle de l'antigène. La mise en œuvre d'un immunodosage compétitif nécessite trois intervenants (Équation 1) : un antigène (Ag) (mycotoxines présentes dans l'échantillon), un anticorps spécifique (Ac) et un marqueur (*). Le principe consiste à doser les quantités de mycotoxines marquées (Ag*) et complexées (Ag*-Ac) et d'en déduire les quantités d'Ag libre.



Équation 1 : Equation de base des dosages immunochimiques par compétition

Dans le cas des dosages des contaminants alimentaires cibles, on distingue trois systèmes de détection en fonction du type de traceur utilisé, la méthode radio-immunologique (RIA) qui nécessite le marquage d'un antigène (ou de l'anticorps secondaire) par un isotope radioactif, la méthode ELISA pour « Enzymed-Linked Immunosorbent Assay » qui implique d'utiliser une enzyme, comme traceur, et aussi la méthode FIA pour « Fluorescent Immuno-Assay » où l'antigène ou l'anticorps secondaire est marqué par un fluorophore.

B.II.1. Méthode radio-immunologique (RIA)

La RIA est globalement une méthode immunologique compétitive et sensible. Dans le cas de la détection des mycotoxines, elle implique une incubation des anticorps spécifiques avec un échantillon de mycotoxines à analyser (Ag) et une quantité constante des mycotoxines radiomarquées (Ag*) par l'isotope radioactif, ^{125}I par exemple. La mesure de la radioactivité des deux fractions (Ag-Ac et Ag*-Ac) permet alors de déterminer la concentration des mycotoxines cibles de l'analyte.

Cette technique a été appliquée avec succès à la détection des **AFs** et **OTA**.⁷⁶ Il est intéressant de noter que la purification des échantillons avant analyse n'était pas indispensable. Mais, la purification des échantillons peut augmenter la sensibilité des analyses. Par exemple, lors de la détection des mycotoxines de type **T-2**, une amélioration de la limite de détection a été observée de 2,5-5 ppb à 1-2,5 ppb.^{76,77}

Malgré une mise en œuvre simple et une bonne sensibilité, la RIA est de moins en moins utilisée⁷⁷ puisqu'elle nécessite la manipulation de radioéléments qui ne peut être

⁷⁶ a) Arora. *Handbook of Applied Mycology: Volume 5: Mycotoxins in Ecological Systems*; CRC Press, **1991**. b) Cole, R. J. *Modern Methods in the Analysis and Structural Elucidation of Mycotoxins*; Elsevier, **2012**.

⁷⁷ Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clin. Chem.* **2005**, 51 (12), 2415–2418.

effectuée que dans des laboratoires équipés et accrédités. Les méthodes les plus sensibles sont en général les méthodes ELISA, car l'information de liaison de l'anticorps à l'antigène est démultipliée par le taux de roulement « turnover » de l'enzyme pour son substrat chromogénique, fluorogénique ou luminescent.

B.II.2. ELISA

La technique ELISA⁷⁸ est une technique immunologique développée dans les années 70. Elle possède une bonne sensibilité et une bonne spécificité lors de la détection des mycotoxines sans marquage radioactif.⁷⁹

Il s'agit d'une technique compétitive hétérogène qui repose sur l'interaction entre des anticorps spécifiques à des mycotoxines (anti-mycotoxines) et des mycotoxines libres (Ag) dans l'échantillon à analyser. Cette méthode repose sur un marquage de l'anticorps ou de l'antigène avec un traceur enzymatique de façon covalente ou non.⁸⁰ Parmi les enzymes les plus communément utilisées dans le marquage, nous pouvons citer la peroxydase de raifort (HRP pour « Horse-Radish Peroxidase ») et aussi la phosphatase alcaline (PA).⁸¹ Pour chaque enzyme, une méthode colorimétrique ou luminescente permet de quantifier l'enzyme présente. Une réaction enzymatique avec un substrat approprié donne naissance à une coloration de la solution dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'enzymes présente et donc inversement proportionnelle à la quantité de mycotoxines libres.

Les différents modes de compétition peuvent être utilisés : le dosage direct, indirect ou en sandwich.

La 1^{ère} **méthode compétitive directe** ou test ELISA pour « Enzyme Linked Immunosorbant Assay ». Comme l'indique la Figure 8, elle est basée sur des anticorps (Acs) immobilisés sur une surface solide **(1)** qui vont interagir avec les bioéléments en solution : les composés de concentration inconnue (Ag) de l'échantillon à analyser et les composés marqués avec un traceur (Ag*), de concentration connue (le marqueur pouvant être fluorescent dans le cas des dosages FIA, ou une enzyme dans le cas des dosages ELISA). De ce fait, une compétition se déroule entre les antigènes libres (Ag) et marqués (Ag*) pour se lier aux sites accessibles des anticorps spécifiques fixés sur la surface **(2)**. Ce qui amène à des interactions Ag-Ac ou/et Ag*-Ac. Suite à une étape de rinçage éliminant les composés non liés à l'anticorps de capture, l'incubation des solutions avec un substrat chromogénique **(3)**,

⁷⁸ Ljungström, E. Engval. I. Detection of human antibodies to *Trichinella Spiralis* by enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. *Acta path. microbiol. scand. Sect.* **1975**, 83, 231-237.

⁷⁹ Kuang, B.; King, L.; Wang, H. F. Therapeutic Monoclonal Antibody Concentration Monitoring: Free or Total? *Bioanalysis* **2010**, 2 (6), 1125–1140.

⁸⁰ Porstmann, T.; Kiessig, S. T. Enzyme Immunoassay Techniques an Overview. *J. Immunol. Methods* **1992**, 150 (1–2), 5–21.

⁸¹ Chu, F. S. Immunoassays for Analysis of Mycotoxins. *J. Food Prot.* **1984**, 47 (7), 562-569.

Introduction

fluorogénique ou luminescent approprié à l'enzyme, permet de déterminer la quantité d'enzyme (ou de fluorophore) restant liée à la surface solide. Ceci permet la formation d'un composé soluble et coloré, dont la concentration, mesurée par spectrophotométrie, peut être reliée à la quantité d'enzymes liées sur la phase solide. Le traceur nous permet d'évaluer les quantités de complexes Ag^*-Ac restant sur la phase solide en présence de l' Ag , et de la comparer à celle sans Ag . Connaissant le signal attendu à diverses concentrations d' Ag^* présent dans le milieu, il est alors possible de déterminer la concentration de l' Ag libre (Équation 1).



Figure 8 : ELISA direct

La 2^{ème} **méthode indirecte** (Figure 9) peut avoir lieu en immobilisant électrostatiquement les antigènes (Ag), issus de l'échantillon, à la surface du matériau support **(1)**. Ici, une solution des anticorps spécifiques à l'analyte est rajoutée afin de se lier avec les antigènes préalablement ancrés **(2)**. Une fois que les anticorps primaires ont interagit avec les mycotoxines fixées, la solution est rincée, puis des anticorps secondaires conjugués à une enzyme sont rajoutés permettent de quantifier la quantité d'anticorps spécifiques fixés sur la phase solide **(3)**. Ce second anticorps, ou anticorps traceur, est modifié sur sa partie constante par une enzyme et reconnaît la partie constante de l'anticorps spécifique variable, pour ne pas influencer avec la reconnaissance de l'antigène. De nouveau, les anticorps secondaires non liés sont rincés puis le dosage se fait par l'ajout d'un substrat spécifique à l'enzyme **(4)** ce qui permet la conversion de la réponse du substrat à un signal fluorescent ou chromogénique. Ceci facilite la détermination de la quantité des anticorps liés par spectrophotométrie via une amplification du signal lié au taux de roulement de l'enzyme utilisée.

Introduction

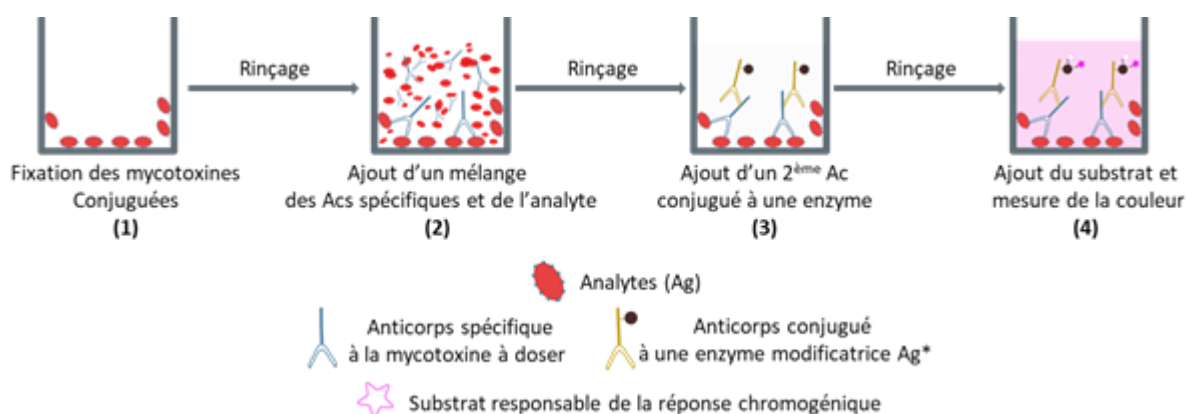


Figure 9 : ELISA indirect

Finalement, une alternative d'immunodosage appelée « **Sandwich** », repose sur deux étapes de bio-reconnaissance.⁸² Ce format (Figure 10) consiste dans la formation d'une double liaison de l'analyte à deux anticorps appariés et complémentaires. En premier lieu, des anticorps primaires spécifiques de la cible (dits anticorps de capture) sont préalablement fixés sur la surface solide. La solution contenant l'antigène (analyte) de concentration inconnue est ensuite ajoutée **(1)**. Une 1^{ère} bioreconnaissance a lieu. Après rinçage, un second pool d'anticorps, marqués par une enzyme ou un fluorophore, appelés anticorps de révélation ou anticorps secondaire, est ajouté **(2)**. Ce second anticorps spécifique va interagir avec les antigènes préalablement capturés et immobilisés sur la surface, mais via un autre épitope (une autre zone de reconnaissance sur l'antigène) que l'anticorps de capture. De ce fait, dans ce processus de dosage « sandwich », les mycotoxines cibles sont reconnues par les deux populations d'anticorps. La seconde bioreconnaissance ayant pour but d'améliorer la spécificité de réponse, et évite d'avoir à passer par une étape de marquage ou d'immobilisation sur phase solide de l'antigène. De plus, dans ce format (en ajoutant le substrat), le signal est d'autant plus élevé que la concentration d'antigène est importante **(3)**, alors que dans les deux autres formats, le signal obtenu *in fine* est d'autant plus faible que la concentration d'antigène est élevée dans la solution à doser.

⁸² Li, Y.; Liu, X.; Lin, Z. Recent Developments and Applications of Surface Plasmon Resonance Biosensors for the Detection of Mycotoxins in Foodstuffs. *Food Chem.* **2012**, 132 (3), 1549–1554.

Introduction

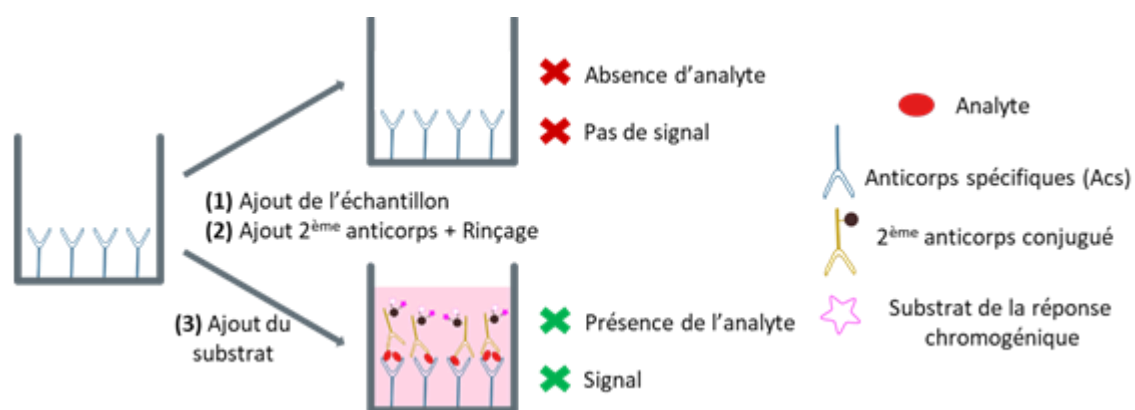


Figure 10 : Principe d'immunodosage « Sandwich »

Actuellement, la méthode ELISA est l'une des méthodes de référence utilisées pour la détection des mycotoxines dans différents résidus alimentaires⁵⁹ comme les céréales et les produits laitiers.⁸³ L'application de cette méthode permet d'utiliser soit le dosage direct ou indirect.⁷⁶

B.II.2.1 ELISA directe : Immunodosages à flux continu

ELISA directe est l'approche la plus appliquée.^{76,84} Elle a conduit à une vraie évolution dans la détection des mycotoxines. De nos jours, plusieurs entreprises telles que Neogen, Novaktis et Romer, commercialisent cette méthode en proposant différents kits à usage unique dédiés pour la détection spécifique de quelques types de mycotoxines comme les aflatoxines (AFs), fumonisines, trichothécènes (TCT).⁸⁵ Ces tests sont basés sur un dispositif d'immunodosage à flux continu pour « flow-through immunoassay », et non à des dispositifs à base de plaques micropuits.

Ce test est qualitatif et/ou semi-quantitatif. Il repose sur des anticorps anti-mycotoxines greffées à une membrane de papier filtre au lieu des micropuits utilisés dans la méthode ELISA classique. Une compétition pour se lier aux anticorps greffés s'effectue entre les mycotoxines libres de l'échantillon (Ag) (déposé sur le papier filtre) et les mycotoxines conjuguées à une enzyme (Ag*). Si le test est négatif (en absence des mycotoxines dans l'échantillon), les mycotoxines Ag* interagissent avec tous les anticorps ce qui résulte une coloration intense en présence du substrat. Si le test est positif, les

⁸³ a) Montagna, M. T. Occurrence of Aflatoxin M1 in Dairy Products in Southern Italy. *Int J Mol Sci* **2008**, 8. b) Oveisi, M.-R.; Jannat, B.; Hajimahmoodi, M.; Nikzad, A. Presence of Aflatoxin M1 in Milk and Infant Milk Products in Tehran, Iran. *Food Control* **2017**, 18, 1216-1218.

⁸⁴ Evtugyn, G.; Subjakova, V.; Melikishvili, S.; Hianik, T. Affinity Biosensors for Detection of Mycotoxins in Food. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Elsevier, **2018**, 85, 263–310.

⁸⁵ a) Aflatoxines - Novakits <http://www.novakits.com/23-aflatoxinesrapidmicrobiology> b) Romer Labs Launches AgraQuant® Aflatoxin M1 High Sensitivity ELISA <https://www.rapidmicrobiology.com/news/romer-labs-launches-agraquant-aflatoxin-m1-high-sensitivity-elisa-kit> c) Reveal® Q+ MAX | Sécurité Alimentaire | Neogen <https://foodsafety.neogen.com/fr/reveal-q-plus-max>.

mycotoxines libres de l'échantillon (Ag) vont également interagir avec les anticorps de surface, et diminuer la quantité d'Ag* se fixant sur les anticorps. Il y aura donc moins de mycotoxines marquées et donc moins d'enzymes présentes, d'où un signal moins intense en présence d'une même quantité de substrat. Ainsi, l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la quantité des mycotoxines présente dans l'échantillon.⁸⁶ Ce type de dispositif est rapide et est commercialisé par la société R-Biopharm. Le kit OCHRCARD par exemple est caractérisé par un temps d'incubation de 5 min ce qui permet une utilisation sur site sans la nécessité de transport d'échantillons en laboratoire. De plus, cette approche a été utilisée pour l'analyse multiplexe de plusieurs analytes.⁸⁷

En 2014, l'équipe de Burmistrova a mis au point un test d'immunodosage à flux continu à usage unique pour la détection simultanée de trois mycotoxines (**OTA**, **ZEN** et **FB1**) avec une durée d'analyse de 15 min après un prétraitement simple de l'échantillon.⁸⁸ Ce dispositif a été testé sur des échantillons de blé et de maïs pour une détection de ces trois mycotoxines à des seuils conformes aux réglementations européennes (soit 2,5, 50 et 1000 µg/kg pour **OTA**, **ZEN** et **FB1** respectivement dans le blé et 2,5, 100 et 1000 µg/kg pour **OTA**, **ZEN** et **FB1** dans le maïs). Les faux positifs et les faux négatifs inférieurs à 5% sont qualifiés comme acceptables dans ce test.

Plus tard, en 2017, le test multiplex développé par l'équipe de Beloglazova⁸⁹ a permis la détection simultanée des mycotoxines **ZEN**, **DON**, **AFB1** et **OTA** dans des aliments céréaliers. Les seuils obtenus pour ces mycotoxines sont respectivement de 50, 200, 1 et 10 µg/kg dans différentes céréales comme le blé, l'orge, le soja, la farine de maïs et le riz. Ces travaux ont permis de mettre en évidence l'importance du traitement des échantillons sur les résultats obtenus et les risques d'interprétation erronée des résultats en cas de la saturation des membranes.

Cependant, le coût élevé de ces kits est peu compatible avec une utilisation routinière, et une diminution de signal peut être liée à d'autres interférences que la présence de la mycotoxine (faux positifs).

⁸⁶ Nolan, P.; Auer, S.; Spehar, A.; Elliott, C. T.; Campbell, K. Current Trends in Rapid Tests for Mycotoxins. *Food Addit. Contam. Part A* **2019**, 36 (5), 800–814.

⁸⁷ Saha, D.; Acharya, D.; Roy, D.; Shrestha, D.; Dhar, T. K. Simultaneous Enzyme Immunoassay for the Screening of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in Chili Samples. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 584 (2), 343–349.

⁸⁸ Burmistrova, N. A.; Rusanova, T. Y.; Yurasov, N. A.; Goryacheva, I. Y.; De Saeger, S. Multi-Detection of Mycotoxins by Membrane Based Flow-through Immunoassay. *Food Control* **2014**, 46, 462–469.

⁸⁹ Beloglazova, N. V.; Graniczowska, K.; Njumbe Ediage, E.; Averkieva, O.; De Saeger, S. Sensitive Flow-through Immunoassay for Rapid Multiplex Determination of Cereal-Borne Mycotoxins in Feed and Feed Ingredients. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65 (33), 7131–7137.

B.II.2.2 ELISA indirecte

Plusieurs exemples dans la littérature ont prouvé l'efficacité de la méthode ELISA dans la détection des mycotoxines comme les **AFs**,⁹⁰ **OTA**⁹¹ et le **ZEN**.⁹² Les travaux de Dzantiev montrent une nouvelle approche rapide basée sur des tests ELISA compétitifs indirects pour le contrôle simultané de trois mycotoxines en 25 min : **AFB1**, **OTA** et **ZEN** avec des limites de détection de 0,24 ng/kg, 1,2 ng/kg et 3 ng/kg respectivement.⁹³

Cette méthode présente généralement quelques limites comme des réactions croisées et des interférences de matrice qui peuvent avoir lieu. En fait, la présence d'un deuxième anticorps principalement dans le test ELISA de type indirect, peut conduire à des réactions croisées avec des mycotoxines et des composés structurellement connexes présentes dans l'échantillon menant à des interférences dans les liaisons Ag-Ac. Ceci peut évidemment affaiblir les liaisons Ag-Ac et donc fausser les quantifications conduisant ainsi à une surestimation des résultats, soit des faux positifs.^{76,94}

Une autre méthode sous forme de capteurs simples et facilement transportables a été développée. Il s'agit d'un dispositif à bande fluorescente qui se base sur le système immunologique « sandwich ».

B.II.2.3 Méthode immunochromatographique à flux latéral

Le test de bandelette immunochromatographique à flux latéral (LFIA pour « Lateral Flow Immunoassay ») constitue une méthode qualitative et/ou semi-quantitative. Il est basé sur une technique de séparation par bio-reconnaissance. Il permet la détection des mycotoxines cibles d'un échantillon liquide suivant un processus « OFF-ON » qui permet de visualiser en temps réel la présence ou l'absence de l'entité cible. La lecture des résultats s'effectue à l'œil nu par une apparition d'une couleur à intensité variable sur la zone de réponse.

⁹⁰ a) Morgan, M. R. A.; Kang, A. S.; Chan, H. W.-S. Aflatoxin Determination in Peanut Butter by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Sci. Food Agric.* **1986**, 37 (9), 908–914. b) Sarımehtemoglu, B.; Kuplulu, O.; Celik, T. H. Detection of Aflatoxin M1 in Cheese Samples by ELISA. *Food Control* **2004**, 15, 45-49.

⁹¹ Ghali, R.; Hmaissia-khlifa, K.; Ghorbel, H.; Maaroufi, K.; Hedili, A. Incidence of Aflatoxins, Ochratoxin A and Zearalenone in Tunisian Foods. *Food Control* **2008**, 19 (9), 921–924.

⁹² Liu, M.-T.; Ram, B. P.; Hart, L. P.; Pestka, J. J. Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Mycotoxin Zearalenone. *Appl. Env. Microbiol.* **1985**, 50 (2), 332-336.

⁹³ Urusov, A.; Zherdev, A.; Petrakova, A.; Sadykhov, E.; Koroleva, O.; Dzantiev, B. Rapid Multiple Immunoassay of Mycotoxins. *Toxins* **2015**, 7 (2), 238–254.

⁹⁴ Turner, N. W.; Subrahmanyam, S.; Piletsky, S. A. Analytical Methods for Determination of Mycotoxins: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 632, 168-180.

Une application large et connue de cette méthode est retrouvée dans la vie quotidienne avec les tests de grossesse.⁹⁵ C'est un immunodosage compétitif de type « sandwich ».⁹⁶

La bandelette de détection à écoulement latéral est composée elle-même de quatre parties posées sur un support pour une meilleure stabilité et une manipulation aisée (Figure 11) :⁹⁷

- Une « zone de dépôt » d'échantillon sous forme liquide, à partir de laquelle l'échantillon va migrer vers les autres zones par capillarité.
- Une « membrane de conjugués » qui intègre des anticorps spécifiques contre l'antigène à rechercher et sont marqués par des nanoparticules colorées ou fluorescentes (type quantum dots). Il est important de noter que les NPs d'or sont les plus utilisées pour le marquage du premier anticorps puisqu'elles présentent plusieurs avantages (propriétés optiques, thermiques et électroniques, ainsi qu'une bonne compatibilité biomoléculaire et une bonne résistance chimique). Elles peuvent être synthétisées selon différentes formes, tailles et sont facilement fonctionnalisables et stables. L'agrégation de ces NPs peut entraîner un changement de couleurs observables à l'œil nu.
- Une zone de détection constituée d'une membrane poreuse de nitrocellulose. Elle contient deux lignes : « la ligne de test » et « la ligne de contrôle ».
La « ligne de test » est revêtue d'anticorps de capture spécifique à l'analyte, et permet un piégeage en sandwich de l'antigène (une réponse positive colorée, une réponse négative pas de coloration).
La « ligne de contrôle » comprend des anticorps reconnaissant l'anticorps marqué par les nanoparticules d'or, ou l'antigène (analyte) immobilisé, par exemple sur une protéine comme la BSA, séralbumine bovine, ce qui permet de vérifier le bon écoulement du liquide dans la zone de détection et valider le test.⁹⁸ Chaque anticorps est spécifique d'un épitope différent pour obtenir le dosage en sandwich, cela implique donc d'avoir des mycotoxines de taille suffisante pour que deux anticorps différents puissent se lier sur les deux épitopes sans interagir.
- Une zone de collecte des déchets composée d'un papier absorbant.

⁹⁵ Butler, S. A.; Khanlian, S. A.; Cole, L. A. Detection of Early Pregnancy Forms of Human Chorionic Gonadotropin by Home Pregnancy Test Devices. *Clin. Chem.* **2001**, 12, 2131-2136.

⁹⁶ Chard, T. Review: Pregnancy Tests: A Review. *Hum. Reprod.* **1992**, 7 (5), 701-710.

⁹⁷ a) Koczula, K. M.; Gallotta, A. Lateral Flow Assays. *Essays Biochem.* **2016**, 60 (1), 111-120. b) Goryacheva, I. Y.; Saeger, S. D.; Eremin, S. A.; Peteghem, C. V. Immunochemical Methods for Rapid Mycotoxin Detection: Evolution from Single to Multiple Analyte Screening: A Review. *Food Addit. Contam.* **2007**, 24 (10), 1169-1183.

⁹⁸ Posthuma-Trumpie, G. A.; Korf, J.; van Amerongen, A. Lateral Flow (Immuno) Assay: Its Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats. A Literature Survey. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 393 (2), 569-582.

Introduction

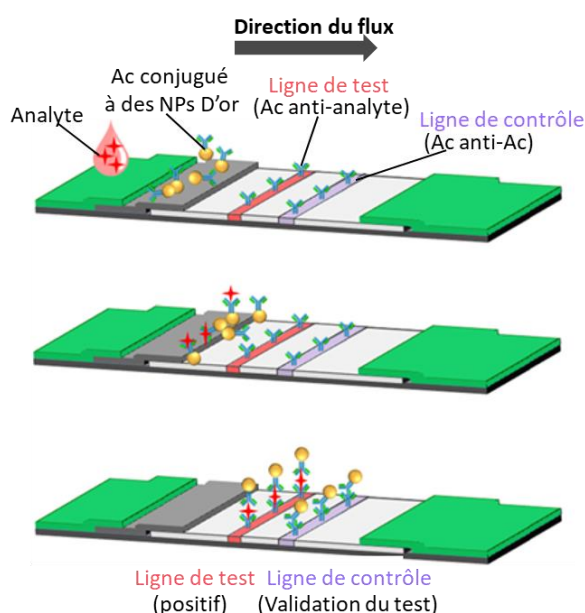


Figure 11 : Principe d'immunodosage à flux latéral^{97a}

En effet, ce format d'immunodosage consiste dans la formation d'une liaison double de l'analyte à deux anticorps appariés et complémentaires. En cas de test positif, une 1^{ère} biorecognition entre l'antigène et les anticorps de capture a lieu. Par la suite, ce complexe va s'écouler sur tout le long de la bandelette pour arriver à la « ligne de test » pour une 2^{ème} biorecognition entre ce complexe et un deuxième anticorps spécifique à l'analyte, fixé sur la membrane. En cas de test négatif, l'anticorps marqué libre interagit directement avec l'anticorps anti-anticorps de capture (Ac anti-Ac), ou l'antigène conjugué à la protéine BSA, fixé sur la « ligne de contrôle ».

Cette méthode est fréquemment utilisée dans la détection des mycotoxines sous forme de kits portables pour une réponse rapide et moins coûteuse. Des kits sont développés par la société Vicam pour la détection des différents types des mycotoxines (**AFs**, Fumonisines, **OTA** et **ZEN**) avec une durée d'analyse de 4 min.

Elle permet aussi de détecter plusieurs analytes simultanément dans les mêmes conditions. Des lignes de tests supplémentaires des anticorps spécifiques à différents types de mycotoxines peuvent être immobilisées sur la même bandelette.⁹⁹

EN 2014, l'équipe de Song a dosé en 15 min différents types de mycotoxines (**AFB1**, **ZEN** et **DON**) dans des échantillons de céréales en utilisant un même test

⁹⁹ Foubert, A.; Beloglazova, N. V.; Gordienko, A.; Tessier, M. D.; Drijvers, E.; Hens, Z.; De Saeger, S. Development of a Rainbow Lateral Flow Immunoassay for the Simultaneous Detection of Four Mycotoxins. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, 65 (33), 7121–7130.

immuno chromatographique à flux latéral.¹⁰⁰ Dans cet exemple, la zone de test comprend les trois mycotoxines conjuguées à la BSA. Les limites de détection visuelle (vLOD) de ce test sont de 0,03, 1,6 et 10 µg/kg pour **AFB1**, **ZEN** et **DON** respectivement et les limites de détection calculées (cLOD) sont de 0,05, 1 et 3 µg/kg respectivement. Ces résultats ont été confirmés par la méthode LC-MS/MS.

Cette approche est limitée aux échantillons qui ne nécessitent pas une purification ou un prétraitement, et aux toxines pouvant présenter deux sites de reconnaissance par deux anticorps différents, ce qui exclue les petites toxines comme la patuline.⁹⁸ Actuellement, l'accent est mis sur les biocapteurs qui sont des techniques efficaces et de plus en plus indispensables dans divers domaines comme la médecine,¹⁰¹ l'environnement,¹⁰² la biotechnologie et aussi l'agroalimentaire.¹⁰³

B.III Les biocapteurs

Les biocapteurs sont des outils analytiques compacts, simples, miniaturisés, autorisant des analyses fiables avec un bon niveau de sélectivité et de sensibilité. Ils possèdent donc des avantages intéressants par rapport aux méthodes conventionnelles.¹⁰⁴

Un biocapteur est un dispositif analytique sur lequel une biomolécule, sensible à une molécule cible, est immobilisée (une enzyme, un acide nucléique, un aptamère, des récepteurs synthétiques, ou encore des polymères à empreintes moléculaires (MIP)) (Figure 10).

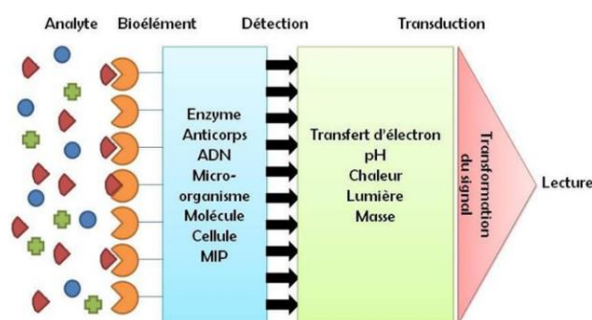


Figure 12 : Présentation schématique d'un biocapteur¹⁰⁵

¹⁰⁰ Song, S.; Liu, N.; Zhao, Z.; Njumbe Ediage, E.; Wu, S.; Sun, C.; De Saeger, S.; Wu, A. Multiplex Lateral Flow Immunoassay for Mycotoxin Determination. *Anal. Chem.* **2014**, 86 (10), 4995–5001.

¹⁰¹ Cooper, M. A. Optical Biosensors in Drug Discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (7), 515–528.

¹⁰² Yadav, R.; Dwivedi, S.; Kumar, S.; Chaudhury, A. Trends and Perspectives of Biosensors for Food and Environmental Virology. *Food Environ. Virol.* **2010**, 2 (2), 53–63.

¹⁰³ a) Alocilja, E. C.; Radke, S. M. Market Analysis of Biosensors for Food Safety. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, 18 (5–6), 841–846 b) Nayak, M.; Kotian, A.; Marathe, S.; Chakravorty, D. Detection of Microorganisms Using Biosensors—A Smarter Way towards Detection Techniques. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 25 (4), 661–667.

¹⁰⁴ Xue, Z.; Zhang, Y.; Yu, W.; Zhang, J.; Wang, J.; Wan, F.; Kim, Y.; Liu, Y.; Kou, X. Recent Advances in Aflatoxin B1 Detection Based on Nanotechnology and Nanomaterials-A Review. *Anal. Chim. Acta* **2019**, 1069, 1–27.

Introduction

Un biocapteur est un dispositif fréquemment utilisé dans la détection des mycotoxines.¹⁰⁶ Il intègre également un transducteur optique, électrochimique ou piézoélectrique qui permettra de convertir la reconnaissance biologique en un signal quantifiable (Tableau 3).¹⁰⁷

Biocapteur	Type de transducteur
Electrochimique ¹⁰⁸	Ampérométrique (mesure de l'intensité du courant), potentiométrique (mesure du potentiel), conductimétrique (mesure de la conductivité), mesure d'impédance.
Optique	Résonance plasmonique de surface (SPR), luminescence.
Piézoélectrique ¹⁰⁹	Mécanique (sensible à la variation de la masse) (QCM).
Calorimétrique	Sensible à la variation de la chaleur (dégagement/absorption).

Tableau 3 : Classement des biocapteurs selon leurs modes de détection

B.III.1. Méthodes d'immobilisation des biorécepteurs sur surface

La nécessité de l'immobilisation des bioéléments de reconnaissance sur une surface dans les tests ELISA ou dans le développement des biocapteurs vient de l'objectif d'obtenir une localisation de la reconnaissance au niveau de l'interface solide-liquide.

La technique d'immobilisation doit permettre d'assurer une spécificité de reconnaissance du biorécepteur et sa cible tout en limitant sa dénaturation sur une surface solide. De plus, elle doit garantir l'accessibilité maximale de l'analyte au biorécepteur qui est introduit à une concentration connue. Ceci facilite la séparation et la purification des complexes de reconnaissance des réactifs en excès. D'un point de vue industriel et pratique, la méthode choisie pour immobiliser des biomolécules doit être facilement reproductible à grande échelle et à faible coût. Elle doit assurer une bonne longévité du capteur et si possible la régénération de la surface en vue d'une réutilisation.^{107b} Une étape de préconcentration des analytes d'intérêt peut être ajoutée au biocapteur pour améliorer la sensibilité et réduire le risque de faux positif.

¹⁰⁵ Soullignac, C. Modification de l'Isatine pour la fabrication de biocapteurs. **2018**.

¹⁰⁶ Santana Oliveira, I.; da Silva Junior, A. G.; de Andrade, C. A. S.; Lima Oliveira, M. D. Biosensors for Early Detection of Fungi Spoilage and Toxigenic and Mycotoxins in Food. *Curr. Opin. Food Sci.* **2019**, 29, 64–79.

¹⁰⁷ a) Borisov, S. M.; Wolfbeis, O. S. Optical Biosensors. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (2), 423–461. b) Damborsky, P.; Vitel, J.; Katrlík, J. Optical Biosensors. *Essays Biochem.* **2016**, 60 (1), 91–100.

¹⁰⁸ a) Hajian, R.; Ensafi, A. A. Determination of Aflatoxins B1 and B2 by Adsorptive Cathodic Stripping Voltammetry in Groundnut. *Food Chem.* **2009**, 115 (3), 1034–1037 b) Jalalvand, A. R. Fabrication of a Novel and High-Performance Amperometric Sensor for Highly Sensitive Determination of Ochratoxin A in Juice Samples. *Talanta* **2018**, 188, 225–231.

¹⁰⁹ a) Chauhan, R.; Solanki, P. R.; Singh, J.; Mukherjee, I.; Basu, T.; Malhotra, B. D. A Novel Electrochemical Piezoelectric Label Free Immunosensor for Aflatoxin B1 Detection in Groundnut. *Food Control* **2015**, 52, 60–70 b) Chauhan, R.; Singh, J.; Sachdev, T.; Basu, T.; Malhotra, B. D. Recent Advances in Mycotoxins Detection. *Biosens. Bioelectron.* **2016**, 81, 532–545.

Différentes méthodes d'immobilisation physico-chimiques, faciles à mettre en œuvre, simples et transposables sont utilisées dans le cadre du développement des biocapteurs qui permettent d'avoir un maximum de cibles biologiques fixées.¹⁰¹ Nous distinguons deux catégories (Figure 13) :

- Des **méthodes d'immobilisation physiques** (l'adsorption et l'inclusion) qui sont basées sur des liaisons faibles, rapides et réversibles.
- Des **méthodes d'immobilisation chimiques** (la réticulation et le couplage covalent) qui sont basées sur des liaisons covalentes. Ce sont, tous deux, des procédés lents et irréversibles.

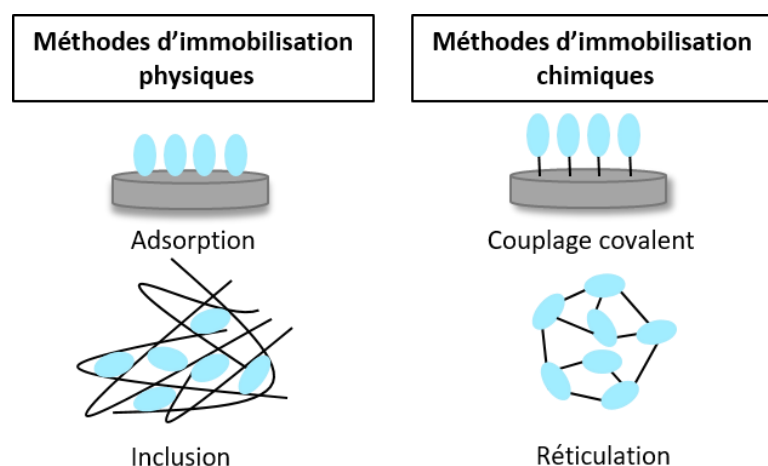


Figure 13 : Différentes méthodes d'immobilisation des composés chimiques dans un biocapteur

B.III.1.1 Adsorption

L'adsorption est un phénomène physique d'interaction entre une molécule en solution et une surface solide. Cette technique n'induit pas de modification de l'élément biologique, mais elle met en jeu des interactions faibles (20-40 kJ/mol) de type Van der Waals, des liaisons hydrogènes, des interactions homophiles (hydrophobes/hydrophiles) ou des interactions électrostatiques par transfert de charge. L'adsorption physique est facile à mettre en œuvre et économique. Elle peut être utilisée pour fonctionnaliser différentes surfaces : or, oxyde d'indium étain (ITO pour « Indium Tin Oxide »), verre, nanomatériaux (nanoparticules (NPs), graphènes, ...). Nous pouvons également citer dans ce groupe, les liaisons or-Soufre (Au-S) qui sont des liaisons rigides. Ces dernières se forment en une monocouche auto-assemblée (SAM : Self-Assembled Monolayers) difficile à détruire sauf par irradiation UV ou en présence d'oxydants. Cette notion sera abordée un peu plus en détail dans le chapitre 3.

En revanche, cette méthode présente comme inconvénient principal une certaine fragilité vis-à-vis des conditions de manipulation telles que le pH, les forces ioniques ou la

température. Ceci joue un rôle important dans le manque de reproductibilité lorsque l'on utilise une immobilisation via cette méthode.

B.III.1.2 Inclusion

La méthode d'inclusion est un piégeage qui permet d'incorporer mécaniquement le biorécepteur à l'intérieur d'une matrice polymérique de type gel insoluble à partir des polymères conducteurs¹¹⁰ (polyphénylène, polythiophène, polyaniline, polyacétylène, polypyrrole) ou dans une matrice inorganique de type gel de silice. Ceci permet d'immobiliser un maximum de bioéléments tout en les protégeant de l'environnement extérieur. Cependant, l'inconvénient de cette stratégie est que l'accès aux biomolécules fixées est limité à cause de leur confinement ce qui diminue la sensibilité de la méthode.

B.III.1.3 Réticulation

La réticulation (ou le « cross-linking ») est appliquée principalement pour l'immobilisation des biomolécules (enzymes, anticorps (Ac), ...), en présence d'un réticulant comme le glutaraldéhyde (**GA**) ou d'autres agents bifonctionnels permettant de créer des liens covalents (Figure 14) entre les biorécepteurs (**Ac-NH₂**) par des liaisons chimiques covalentes intermoléculaires.¹¹¹

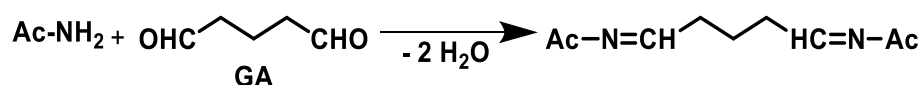


Figure 14 : Formation d'une liaison covalente par réticulation

Par la suite, ils sont retenus sur la surface par adsorption ou par des liaisons covalentes. Ceci aboutit à la rigidification de la structure par la formation des composés de haute masse moléculaire sous forme d'agrégats insolubles dans l'eau tout en conservant leurs propriétés biologiques. L'inconvénient de cette méthode est l'épaisseur du film formé (soit très fine, soit épaisse) ce qui peut affecter l'activité biologique, limiter l'accessibilité de la biomolécule, et entraîner la diminution de la sensibilité. Contrairement à la méthode physique d'inclusion, la réticulation ne permet pas d'immobiliser une grande quantité de biomolécules.

¹¹⁰ Gerard, M. Application of Conducting Polymers to Biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, 17 (5), 345-359.

¹¹¹ Tischer, W.; Wedekind, F. Immobilized Enzymes: Methods and Applications. In *Biocatalysis - From Discovery to Application*; Fessner, W.-D., Archelas, A., Demirjian, D. C., Furstoss, R., Griengl, H., Jaeger, K.-E., Morís-Varas, E., Öhrlein, R., Reetz, M. T., Reymond, J.-L., Schmidt, M., Servi, S., Shah, P. C., Tischer, W., Wedekind, F., Eds.; de Meijere, A., Houk, K. N., Kessler, H., Lehn, J.-M., Ley, S. V., Schreiber, S. L., Thiem, J., Trost, B. M., Vögtle, F., Yamamoto, H., Series Eds.; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **1999**, 200, 95-126.

B.III.1.4 Couplage covalent

Le couplage covalent est la méthode la plus utilisée pour l'immobilisation des biorécepteurs. Il permet de fixer le biorécepteur d'une façon permanente et irréversible. Cette approche consiste à créer des liaisons covalentes entre le support solide et la molécule à immobiliser par une forte adhésion. Les réactions chimiques mises en œuvre dépendent fortement du type de la surface choisie.⁸⁴ Différentes fonctions chimiques peuvent être impliquées dans ce type d'immobilisation sur surface.¹⁰¹

Par exemple, la présence d'une fonction acide carboxylique sur une surface (Figure 15) permet la formation d'une liaison amide (via un couplage utilisant un carbodiimide pour former des esters de N-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS)) avec des fonctions amines primaires des protéines. Cette liaison amide est particulièrement insensible aux risques d'hydrolyse ou d'oxydation.

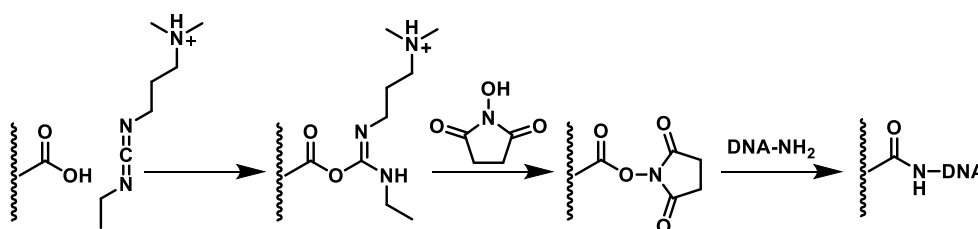


Figure 15 : Formation d'une liaison amide sur surface

D'autres types de liaisons peuvent être mis en jeu sur des surfaces de verre ou de silice en faisant réagir le 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) afin de générer le groupe 3-aminopropyle (Figure 16).¹¹²

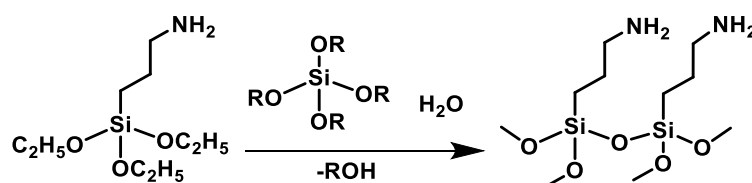


Figure 16 : Formation du groupe 3-aminopropyle sur surface de silice

De même, nous pouvons aussi utiliser la formation de ponts disulfure par la formation de liaisons S-S.

Plusieurs propriétés rendent cette méthode d'immobilisation plus favorable par rapport aux autres méthodes puisqu'elle répond à différentes exigences recherchées pour le développement des biocapteurs : elle met en jeu des liaisons résistantes vis-à-vis des

¹¹² Vashist, S. K.; Dixit, C. K.; MacCraith, B. D.; O'Kennedy, R. Effect of Antibody Immobilization Strategies on the Analytical Performance of a Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay. *The Analyst* **2011**, *136* (21), 4431-4436.

changements de conditions opératoires ce qui évite les phénomènes de relargage. De plus, elle donne la possibilité de stabiliser et de moduler les propriétés des bioéléments sans le risque de leur dénaturation. Il faut cependant s'assurer d'une certaine homogénéité de l'accrochage sur la surface, et s'assurer que la liaison covalente ne dégrade pas les propriétés biologiques de la biomolécule immobilisée, si, par exemple, elle utilise un groupement fonctionnel (amine, thiol...) nécessaire à son activité biologique, ou si l'immobilisation rend stériquement inaccessible le site de liaison d'un anticorps par exemple.

B.III.2. Les méthodes de détection

Parmi les méthodes de détection citées précédemment (électrochimique, optique, piézoélectrique et calorimétrique), par soucis de concision et de cohérence avec les travaux réalisés, seuls les capteurs optiques seront détaillés dans ce manuscrit.

Les biocapteurs optiques contiennent un élément de détection de la bioreconnaissance intégré à un transducteur optique. La bioreconnaissance entre hôte-récepteur est détectée puis transformée en mesure de phénomènes optiques :

- La variation de l'indice de réfraction mesurée par un effet de résonance plasmonique de surface (SPR). Le signal détecté est généré directement par l'interaction du matériau analysé avec le transducteur.
- La variation de l'intensité de fluorescence consécutive à une excitation par une énergie lumineuse.
- La chimiluminescence (CL) consécutive à une excitation par une réaction chimique.¹¹³
- La diffusion de la lumière basée sur des effets causés par des particules de taille définie présentes dans l'échantillon (SERS « surface enhanced raman scattering » et LS « Light scattering »).¹¹⁴
- La réflectance (RIFS pour « Reflectometric interference spectroscopy »).

B.III.2.1 Résonance Plasmon de Surface (SPR)

Parmi les biocapteurs optiques sans marquage,¹¹⁴ les plus répandus sont les dispositifs SPR qui ont pu être utilisés avec succès pour détecter des espèces chimiques et biologiques y compris les mycotoxines.¹¹⁵ Il existe deux technologies SPR utilisant soit une surface solide plane métallique déposée sur un prisme (HORIBA), soit un canal microfluidique au contact d'un prisme (BIACORE).

¹¹³ Coulet, P. R.; Blum, L. J. Bioluminescence/Chemiluminescence Based Sensors. *TrAC Trends Anal. Chem.* **1992**, 11 (2), 57–61.

¹¹⁴ Khansili, N.; Rattu, G.; Krishna, P. M. Label-Free Optical Biosensors for Food and Biological Sensor Applications. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, 265, 35–49.

¹¹⁵ Homola, J. Surface Plasmon Resonance Sensors for Detection of Chemical and Biological Species. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (2), 462–493.

Introduction

Dans tous les cas, l'interaction est mesurée en temps réel entre un anticorps immobilisé sur une surface (ou sur les parois du canal microfluidique) et un mélange d'espèces en solution à quantifier. Le biorécepteur immobilisé sur le film métallique du transducteur va se lier à l'analyte en solution injecté en flux contenu.

La SPR (Figure 17) utilise le principe de résonance plasmonique basé sur une oscillation collective des électrons libres du métal qui se produit à l'interface solide-liquide. La présence des biomolécules à capturer lors de l'interaction de l'analyte en solution avec un partenaire immobilisé sur la surface conduit à une modification de l'indice de réfraction optique à cette interface. Cette interface métallique (principalement l'or⁸²) est posée sur un prisme en verre du biocapteur irradié par une onde électromagnétique selon un angle prédéterminé.¹⁰¹ Une partie du signal lumineux est réfractée vers le détecteur et une autre partie, l'onde évanescente, est transmise à la surface du métal au niveau de l'interface solide-liquide. S'il y a une interaction entre l'analyte et le récepteur immobilisé en surface, l'indice de réfraction de l'interface est modifié, ce qui perturbe l'onde évanescente et résulte en une modification du signal mesurable. La perturbation du signal étant corrélée à la taille et à la quantité d'analyte en interaction.

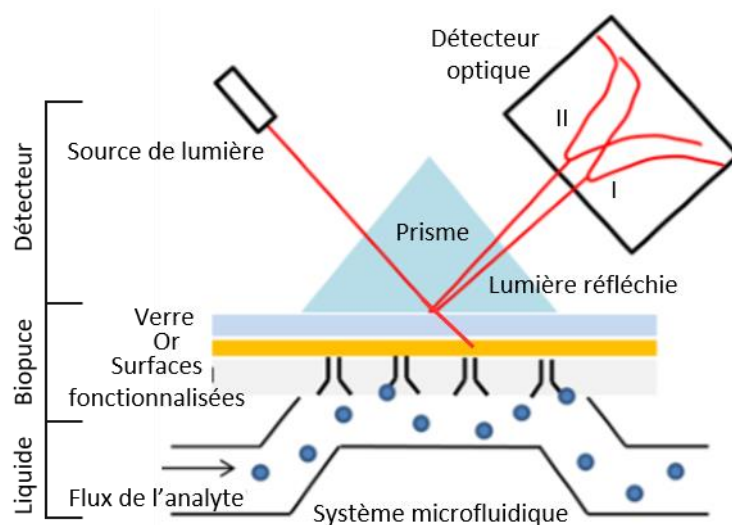


Figure 17 : Principe de l'analyse SPR^{116,107b}

Cette technique est basée sur les méthodes immunologiques compétitives déjà observées en ELISA (direct/ indirect/ sandwich).¹¹⁷ Elle est principalement utilisée pour des petites molécules y compris les mycotoxines.¹¹⁸

¹¹⁶ Hodnik, V.; Anderluh, G. Toxin Detection by Surface Plasmon Resonance. *Sensors* **2009**, 9 (3), 1339–1354.

¹¹⁷ Santos, A. O.; Vaz, A.; Rodrigues, P.; Veloso, A. C. A.; Venâncio, A.; Peres, A. M. Thin Films Sensor Devices for Mycotoxins Detection in Foods: Applications and Challenges. *Chemosensors* **2019**, 7 (1), 3.

Ce système a été utilisé par l'équipe de Van Der Gaag pour analyser **AFB1**, **ZEN**, **FB1**, **OTA** et **DON** par SPR avec des limites de détection respectives de 0,2 µg/L, 0,01 µg/L, 50 µg/L, 0,1 µg/L, 0,5 µg/L.¹¹⁹ Comme le montre l'étude effectuée par Cuccioloni et al., la technique SPR peut également être utilisée pour doser sélectivement différentes aflatoxines (**AFB1**, **AFG1**, **AFM1**).¹²⁰ En 2000, l'équipe de O'Kennedy a utilisé la technologie BIACORE pour quantifier des aflatoxines **AFB1**.¹²¹

Un seul exemple dans la littérature décrit la détection de la patuline **PAT** avec un biocapteur immunochimique SPR. Les travaux de Bijarski et D'Auria,¹²² montrent un dérivé de la patuline P-Sat-GlnBP immobilisé sur la surface du capteur. Une solution d'anticorps spécifique anti-PAT est injectée à une concentration fixe en présence d'une forte concentration de patuline. La limite de détection de cette méthode est de 0,1 nM. Cette approche est avérée non fiable puisque des effets parasites d'autres réactions dans l'échantillon influencent la précision des mesures.

Les principaux atouts des biocapteurs SPR sont leurs capacités de sonder les surfaces d'une manière non destructive, régénérative, rapide et efficace. De ce fait, non seulement ils ont un potentiel d'utilisation routinière dans les labos mais aussi ils ont un potentiel de miniaturisation en puces métalliques réutilisables et économiques vu que l'analyse se fait sur de très petits volumes à l'échelle du µL et en temps réel.¹²³ Cependant, elle reste une méthode qui nécessite des agents expérimentés pour son utilisation et pour l'analyse des résultats dans des laboratoires spécialisés et notamment elle ne peut pas être une méthode portable pour un usage simple sur site.

Pour cela, la détection des mycotoxines peut être aussi assistée par un marquage luminescent qui implique la génération d'un signal optique par une méthode fluorescente. En relation avec notre travail présenté, nous nous focaliserons sur ce type de biocapteurs

¹¹⁸ Mitchell, J. Small Molecule Immunosensing Using Surface Plasmon Resonance. *Sensors* **2010**, *10* (8), 7323–7346.

¹¹⁹ van der Gaag, B.; Spath, S.; Dietrich, H.; Stigter, E.; Boonzaaijer, G.; van Osenbruggen, T.; Koopal, K. Biosensors and Multiple Mycotoxin Analysis. *Food Control* **2003**, *14* (4), 251–254.

¹²⁰ Cuccioloni, M.; Mozzicafreddo, M.; Barocci, S.; Ciuti, F.; Pecorelli, I.; Eleuteri, A. M.; Spina, M.; Fioretti, E.; Angeletti, M. Biosensor-Based Screening Method for the Detection of Aflatoxins B₁–G₁. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (23), 9250–9256.

¹²¹ a) Daly, S. J.; Keating, G. J.; Dillon, P. P.; Manning, B. M.; O'Kennedy, R.; Lee, H. A.; Morgan, M. R. A. Development of Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for Aflatoxin B₁. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48* (11), 5097–5104. b) Dunne, L.; Daly, S.; Baxter, A.; Haughey, S.; O'Kennedy, R. Surface Plasmon Resonance-Based Immunoassay for the Detection of Aflatoxin B₁ Using Single-Chain Antibody Fragments. *Spectrosc. Lett.* **2005**, *38* (3), 229–245.

¹²² Pennacchio, A.; Ruggiero, G.; Staiano, M.; Piccialli, G.; Oliviero, G.; Lewkowicz, A.; Synak, A.; Bojarski, P.; D'Auria, S. A Surface Plasmon Resonance Based Biochip for the Detection of Patulin Toxin. *Opt. Mater.* **2014**, *36* (10), 1670–1675.

¹²³ Quinn, J. G.; O'Kennedy, R. Transduction Platforms and Biointerfacial Design of Biosensors for "Real-Time" Biomolecular Interaction Analysis. *Anal. Lett.* **1999**, *32* (8), 1475–1517.

optiques exploités et présentés dans la littérature. Nous commençons tout d'abord par définir la luminescence et la fluorescence.

B.III.2.2 La luminescence

La luminescence est un phénomène physique qui réside dans l'émission de lumière par un rayonnement électromagnétique qui n'est pas d'origine thermique. Contrairement à l'incandescence, obtenue par des corps chauffés à haute température (lumière chaude), la luminescence est obtenue sans avoir besoin de chauffer le matériau. On parle aussi de lumière froide. Précisément, il s'agit de l'émission d'un photon résultant de l'excitation d'une molécule depuis son état fondamental.

Il existe une large gamme de composés luminescents de différentes natures pour des applications *in vivo* et *in vitro* :¹²⁴

- Des composés organiques : les composés hydrocarbures aromatiques (naphtalène, anthracènes, pérylène, phénanthrène, ...), la fluorescéine, les rhodamines, les coumarines, les oxazines, les cyanines, les polyènes, certains acides aminés sont également légèrement fluorescents (tryptophane, phénylalanine, tyrosine), ...
- Des composés inorganiques : les nanocristaux (Quantum Dots (QDs)) à base de ZnS, CdS, ZnSe, les nanoparticules de métaux nobles (Au), l'ion uranyle (UO_2^+), les ions lanthanides (Eu^{3+} , Tb^{3+} , ...), les surfaces dopées par quelques métaux pour le domaine de l'optique (Nd, Mn, Ce, Sn, Cu, ...), ...
- Des composés organométalliques : les complexes de métaux de transition (comme $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$), les complexes de lanthanides (Eu^{3+} , Tb^{3+} , ...), ...

Plusieurs types de luminescence sont distingués en fonction de leurs modes d'excitation envisageables (Tableau 4) :

Type de luminescence	Mode d'excitation
Photoluminescence	Photons (lumière UV, visible)
Bioluminescence	Réaction enzymatique
Chimiluminescence	Réaction chimique
Triboluminescence	Friction, rupture, déformation
Sonoluminescence	Ultrasons
Radioluminescence	Rayons X, rayonnements α , β et γ
Thermoluminescence	Elévation de température
Cathodoluminescence	Électrons accélérés
Electroluminescence	Champ électrique

Tableau 4 : Différents types de luminescence

¹²⁴ Valeur, B. *Invitation à la fluorescence moléculaire*; De Boeck Supérieur, 2004.

Dans la suite, nous nous intéresserons uniquement au phénomène de photoluminescence appliqué à la détection de mycotoxines.

B.III.2.2.1 La photoluminescence

La photoluminescence est une approche analytique dominante dans plusieurs domaines. Cette approche permet d'ajouter des propriétés photophysiques à des biomolécules grâce à leur association à des fluorophores afin d'améliorer la sensibilité tout en assurant leurs affinités spécifiques à des biorécepteurs.

D'une manière générale, suite à une excitation photonique par absorption de lumière ultraviolette ou visible (d'un photon), la molécule va passer d'un état fondamental S_0 à un état excité d'énergie supérieure. Le retour à l'état fondamental peut se faire selon différentes voies possibles (Figure 18). Ces voies englobent les deux processus de fluorescence et de phosphorescence ainsi que les transferts d'énergie.

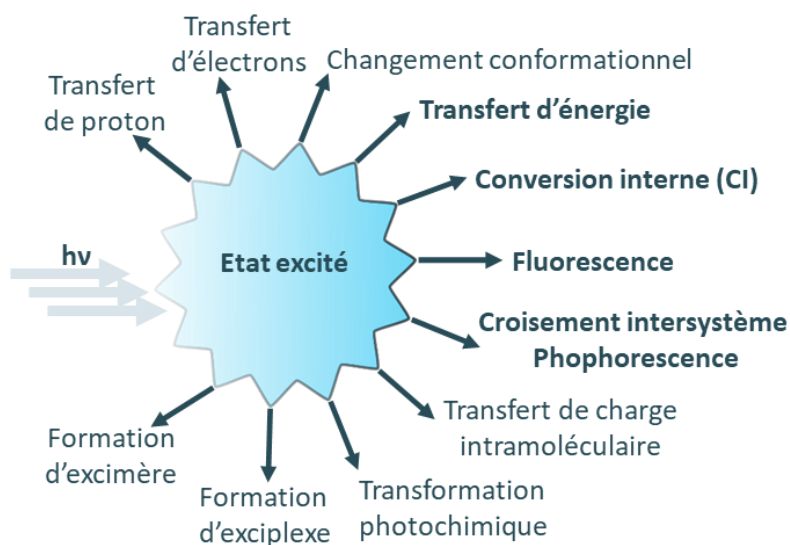


Figure 18 : Voies de désexcitation possibles d'une molécule après irradiation¹²⁴

La différence entre les deux phénomènes de fluorescence et phosphorescence dépend de la nature de l'état excité de la molécule luminescente. Pour mieux comprendre et illustrer ces deux processus, nous nous référons au diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 19).

Introduction

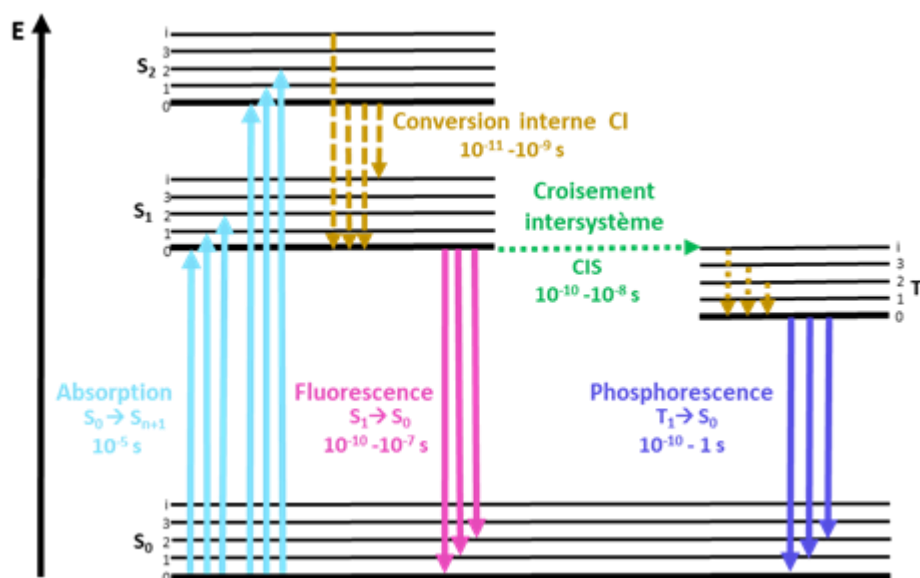


Figure 19 : Diagramme de Perrin Jablonski d'un système photoluminescent

D'après le diagramme de Perrin-Jablonski, pour le phénomène de fluorescence, les électrons à l'état excité sont de même état de spin qu'à l'état fondamental. Par contre, la phosphorescence résulte d'un changement d'état de spin entre l'état excité et l'état fondamental.

La fluorescence est un phénomène qui repose sur la capacité d'une molécule à réémettre, sous forme de lumière, l'énergie qu'elle absorbe suite à une excitation. Le mécanisme de fluorescence peut être expliqué via le diagramme de Perrin-Jablonski comme suit : tout d'abord, une source d'excitation fait passer la molécule fluorescente (fluorophore) de l'état électronique fondamental S_0 à un état électronique singulet excité S_1 de plus haute énergie. La durée de vie de l'état excité S_1 varie de 10^{-10} à 10^{-7} s. Par la suite, une partie de l'énergie absorbée sera dissipée par une transition non radiative, appelée conversion interne (CI), entre deux états électroniques de même multiplicité de spin pour mener l'état excité vers son niveau vibrationnel 0, le moins énergétique. Le retour du fluorophore à son état fondamental S_0 , par une relaxation de l'état S_1 à S_0 , s'accompagne de l'émission d'un photon. Le phénomène de fluorescence peut aussi entrer en compétition avec des interactions entraînant une désexcitation non radiative de la molécule, limitant ainsi sa fluorescence.

Une autre voie de désexcitation se fait d'une manière différente que la fluorescence. Il s'agit d'une transition non radiative isoénergétique entre l'état vibrationnel le moins énergétique 0 de S_1 et un niveau vibrationnel d'un état excité triplet T_1 , avec modification de l'état de spin. Ce processus est appelé croisement inter-système (CIS). Cette transition est suivie par une relaxation vibrationnelle vers le niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité T_1 . La durée de vie de l'état excité T_1 varie de 10^{-6} à 1 s. Ce croisement intersystème (CIS) est

suivi par une émission de phosphorescence avec une relaxation de l'état T_1 à S_0 . Le processus de la phosphorescence ne sera pas décrit en détail. Nous nous intéressons principalement à la fluorescence qui présente un phénomène plus rapide que le phénomène de phosphorescence.

Plusieurs paramètres et grandeurs photophysiques caractérisent un fluorophore donné : tout d'abord son spectre d'excitation et son spectre d'émission d'où découle son déplacement de Stokes (Figure 20).

Le spectre d'émission de fluorescence rend compte des propriétés spectrales de la lumière émise. Il représente le profil d'intensité (= nombre de photons émis) aux différentes longueurs d'onde. Il ne varie pas en fonction de la longueur d'onde d'excitation. Ce spectre peut être considéré comme l'image miroir du spectre d'absorption. Ceci est démontré par les mêmes transitions lors de l'absorption de S_0 à S_1 et d'émission de S_1 à S_0 .¹²⁵

Le spectre d'excitation est obtenu par la mesure des variations de l'intensité de fluorescence en fonction de la longueur d'onde d'excitation. L'intensité de fluorescence dépend du nombre de molécules excitées. En absence d'interférence avec la fluorescence, le spectre d'excitation et le spectre d'absorption sont superposables.

Les longueurs d'onde des maxima d'émission $\lambda_{\max}$ (Em) et d'absorption $\lambda_{\max}$ (Abs) dépendent de plusieurs facteurs comme le solvant,¹²⁶ le pH, la concentration et la température.

Le spectre d'émission de fluorescence est situé à des longueurs d'onde plus élevées (soit de plus basse énergie) que le spectre d'absorption, ce qui indique que le photon émis est moins énergétique que celui qui a été absorbé. Cette perte d'énergie correspond à la relaxation vibrationnelle (ou CI) observée. La différence d'énergie Δ_S entre $\lambda_{\max}$ (Em) et $\lambda_{\max}$ (Abs) est appelée **déplacement de Stokes**.¹²⁷ Plus la perte d'énergie dans le système est importante plus le déplacement de Stokes est élevé. D'ailleurs, ce paramètre indique les relaxations vibrationnelles qui s'opèrent au sein du fluorophore durant le phénomène de fluorescence. Il présente les longueurs d'onde de la conversion interne (CI).

¹²⁵ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; **1983**.

¹²⁶ Klymchenko, A. S.; Mely, Yves. Fluorescent Environment-Sensitive Dyes as Reporters of Biomolecular Interactions. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; Elsevier, **2013**, 113, 35–58.

¹²⁷ Stokes, G. G. On the Change of Refrangibility of Light. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **1852**, 142, 463–562.

Introduction

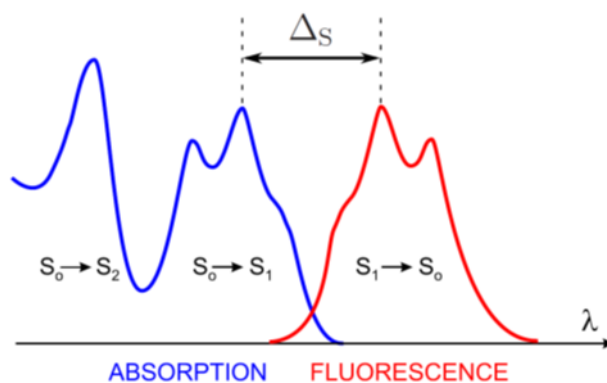


Figure 20 : Exemple de spectre d'absorption et d'émission d'un fluorophore

Le rendement quantique de fluorescence est noté Φ_F ou **QY** pour « Quantum Yield », exprimé en %, lié au spectre d'émission. Il correspond à l'efficacité de fluorescence d'un fluorophore étudié. C'est le rapport du nombre des photons émis sur le nombre des photons absorbés par un fluorophore. La valeur du rendement quantique est en général obtenue en comparant avec un fluorophore de référence qui possède un rendement quantique connu. Ce paramètre peut être déterminé selon la formule suivante : $\Phi_F = \text{QY} = N_{\text{émis}} / N_{\text{absorbés}}$

Le temps de vie de fluorescence, notée τ_F , d'un composé présente la durée de vie de son état excité S_1 . Il est dépendant de la durée de vie de l'émission de fluorescence (transition radiative) et les durées des vies des désexcitations non radiatives en relation. Plus les processus de désactivation non radiative sont rapides, plus la durée de vie de fluorescence et, très généralement, le rendement quantique diminue. L'environnement de la molécule (type des molécules voisines, concentration ionique du solvant, pH, ...) joue un rôle important dans la valeur de cette durée de vie de fluorescence.

Le coefficient d'extinction molaire (ou coefficient d'absorption molaire ou absorptivité molaire) du fluorophore ϵ est exprimé en $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ($\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Il caractérise la capacité d'un composé à absorber la lumière. Il varie en fonction de la longueur d'onde, la température et le solvant. Il est déterminé grâce à la loi de Beer-Lambert $A = \epsilon \times \ell \times C$ (ℓ est le trajet optique et C la concentration de la solution). Plus le coefficient d'extinction molaire est important, plus la lumière incidente est absorbée.

La brillance B correspond au produit du rendement quantique par le coefficient d'extinction molaire. C'est la valeur la plus représentative de l'efficacité avec laquelle un fluorophore absorbe puis réémet de la lumière suite à cette photoexcitation. Cette caractéristique est particulièrement utilisée dans le domaine de l'imagerie moléculaire pour comparer l'efficacité des sondes fluorescentes. Elle tient compte du rendement quantique du composé et son coefficient d'absorption molaire, c'est-à-dire sa capacité à absorber la lumière. Elle est étroitement liée au rendement quantique selon la formule : $B = \epsilon \times \Phi_F$

Introduction

Une large gamme de fluorophores organiques polycycliques aromatiques possédant des propriétés physico-chimiques caractéristiques ont été utilisés dans divers domaines de recherches et dans diverses applications (Figure 21).

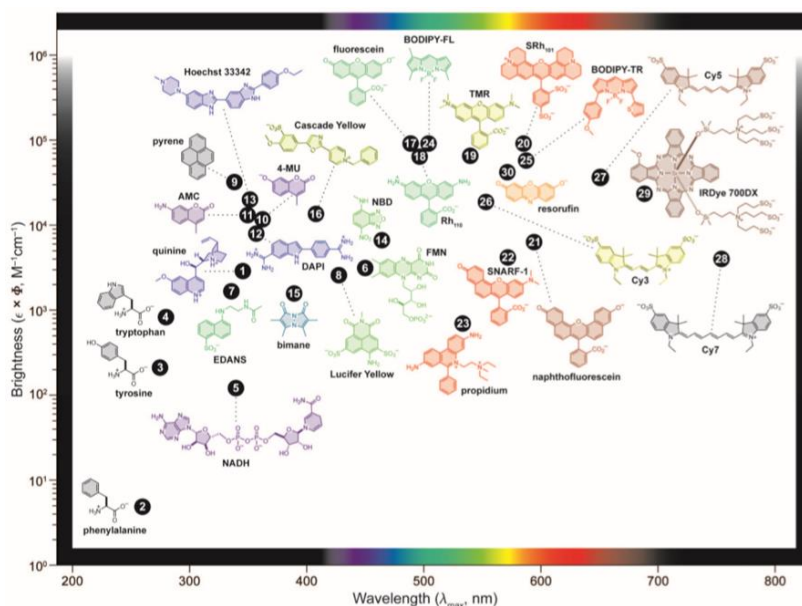


Figure 21 : Structures des grandes familles de fluorophores organiques présentées en fonction de la brillance ($\epsilon \times \Phi$) de chaque famille et en fonction des longueurs d'onde d'absorption maximales (λ_{max}). La couleur de chaque structure indique le maximum d'émission (λ_{em})¹²⁸

B.III.2.2.2 Détection fluorogénique

La détection fluorogénique (ou pro-fluorescente) fait intervenir la génération ou la modification d'un signal de fluorescence suite à la reconnaissance d'un analyte d'intérêt. Plusieurs approches sont possibles et une des plus utilisées est l'approche de type « OFF-ON ».

Les modulations des sondes activables de type « OFF-ON » reposent sur la modification des propriétés photophysiques et principalement le spectre d'émission et d'excitation en présence du bioélément cible. Le principe est le suivant : en absence de l'analyte, un phénomène d'extinction du signal de fluorescence a lieu et la sonde n'émet pas de lumière et est dite « éteinte » (état « OFF »). En présence de la (des) molécule(s) cible(s) dans l'échantillon étudié, ce phénomène d'extinction est supprimé et la réponse caractéristique se traduit par une augmentation du signal de fluorescence (émission de lumière). La sonde est dite « allumée » (état « ON »).

De ce fait, les biocapteurs à base de fluorescence (transfert d'énergie ou transfert électronique) sont les plus fréquemment appliqués dans plusieurs secteurs¹²⁹ et notamment

¹²⁸ Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, 3 (3), 142–155.

dans le cadre de la détection des mycotoxines par extinction (ou « quenching ») de fluorescence.

Dans certains cas, il peut y avoir une désexcitation vers l'état fondamental de nature non radiative, ce qui cause une extinction de luminescence appelée « quenching ». Ce phénomène est fortement lié aux propriétés photophysiques et à la structure chimique de chaque fluorophore. Ce qui a emmené le développement des sondes et des biopuces pour la détection fluorogénique des bioanalytes basées sur une émission lumineuse liée à une reconnaissance biologique.

Ce phénomène d'extinction de fluorescence peut avoir lieu par différents mécanismes. On distingue tout d'abord le cas de la pro-fluorescence. C'est la capacité d'une molécule unique d'émettre de la lumière suite à une modification de sa structure moléculaire. Différents mécanismes sont possibles, les plus utilisés sont :

- Génération du signal par formation ou modification du cœur fluorescent.¹³⁰
- Extinction de la fluorescence par transfert d'électron photo-induit (PET pour « Photoinduced Electron Transfer »).¹³¹
- Rupture du mécanisme de transfert de protons à l'état excité (ESIPT pour « Excited State Intramolecular Proton Transfer »).¹³²

Mais la technique utilisée dans ce projet fait intervenir un processus de transfert d'énergie entre deux molécules, ce transfert est de type FRET¹³³ pour « Förster Resonance Energy Transfer » comme mécanisme d'extinction. Contrairement à la pro-fluorescence qui utilise un seul chromophore, les sondes fluorescentes à base de FRET nécessitent la présence de deux chromophores. Depuis quelques années, cette application de FRET est en plein développement et a permis la détection de nombreux évènements biologiques.

¹²⁹ a) Giuliano, K. A.; Taylor, D. L. Fluorescent-Protein Biosensors: New Tools for Drug Discovery. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16* (3), 135–140 b) Strianese, M.; Staiano, M.; Ruggiero, G.; Labella, T.; Pellecchia, C.; D'Auria, S. Fluorescence-Based Biosensors. In *Spectroscopic Methods of Analysis*; Bujalowski, W. M., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **2012**, 875, 193–216.

¹³⁰ a) Chen, X.; Pradhan, T.; Wang, F.; Kim, J. S.; Yoon, J. Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (3), 1910–1956 b) Zheng, H.; Zhan, X.-Q.; Bian, Q.-N.; Zhang, X.-J. Advances in Modifying Fluorescein and Rhodamine Fluorophores as Fluorescent Chemosensors. *Chem Commun* **2013**, *49* (5), 429–447.

¹³¹ Zhang, W.; Zhao M.; Dua, L.; Li, M.; Design Strategy for Photoinduced Electron Transfer-Based Small Molecule Fluorescent Probes of Biomacromolecules. *Analyst*, **2014**, *139*, 2641–2649.

¹³² a) Chen, K.-Y.; Tsai, H.-Y.; Lin, W.-C.; Chu, H.-H.; Weng, Y.-C.; Chan, C.-C. ESIPT Fluorescent Dyes with Adjustable Optical Properties: Substituent and Conjugation Effects. *J. Lumin.* **2014**, *154*, 168–177 b) Padalkar, V. S.; Seki, S. Excited-State Intramolecular Proton-Transfer (ESIPT)-Inspired Solid State Emitters. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (1), 169–202.

¹³³ Förster, Th. 10th Spiers Memorial Lecture. Transfer Mechanisms of Electronic Excitation. *Discuss Faraday Soc* **1959**, *27*, 7–17.

B.III.2.3 Applications aux capteurs à base de fluorescence

B.III.2.3.1 Phénomène de FRET

Le FRET est un transfert d'énergie non radiatif par interaction dipôle-dipôle entre un donneur d'énergie et un accepteur d'énergie. Dans le cadre de la détection utilisant ce phénomène de FRET, le transfert d'énergie a lieu entre le fluorophore et un autre chromophore, appelé «quencher», qui va dissiper l'énergie qui lui est transmise de façon non émissive.¹³⁴ Dans ce cas, c'est le fluorophore (F) qui joue le rôle de donneur d'énergie et le quencher (Q) celui d'accepteur d'énergie.

Deux paramètres sont primordiaux pour que le phénomène de FRET soit efficace (Figure 22) : le premier consiste dans la distance physique « d » séparant les deux partenaires qui doivent être spatialement proches, la distance pouvant être comprise entre 10 Å et 100 Å. En effet, selon la théorie de Förster, l'efficacité du phénomène de transfert d'énergie FRET décroît proportionnellement à $1/d^6$. Il diminue donc rapidement avec la distance entre les deux chromophores. Le deuxième paramètre réside dans le recouvrement spectral entre le spectre d'émission du fluorophore et le spectre d'absorption du quencher.

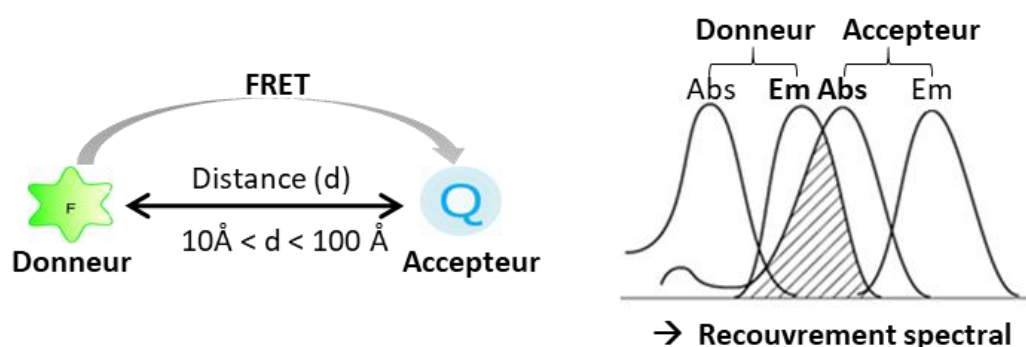


Figure 22 : Paramètres nécessaires pour l'établissement du phénomène de FRET

Comme présenté dans la Figure 23, l'excitation du fluorophore (F) **(1)** par une lumière $h\nu$ absorbée est suivie par le retour à son état fondamental **(2)**. Ceci permet de faire passer, de façon concomitante, l'accepteur Q de son état fondamental à son état excité **(3)** (de l'état A à l'état B). Ceci représente le processus du transfert d'énergie proprement dit. Le quencher retourne ensuite à son état fondamental de façon non radiative **(4)**, qui indique l'état de repos du système FRET (état C). Dans certains cas, le quencher Q peut être remplacé par un Accepteur lui-même fluorescent, qui émettra à sa longueur d'onde

¹³⁴ a) Sapsford, K. E.; Berti, L.; Medintz, I. L. Materials for Fluorescence Resonance Energy Transfer Analysis: Beyond Traditional Donor–Acceptor Combinations. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45 (28), 4562–4589
b) Clegg, R. M. Chapter 1 Förster Resonance Energy Transfer—FRET What Is It, Why Do It, and How It's Done. In *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*; Elsevier, **2009**, 33, 1–57.

d'émission spécifique, supérieure à celle du donneur. L'utilisation de quenchers dont l'énergie à l'état excité est totalement dissipée de façon non radiative est préférée dans le cadre des détections fluorogéniques, car il est possible d'obtenir un véritable système OFF-ON sans avoir à utiliser des filtres spécifiques pour distinguer l'émission du Donneur et celle de l'Accepteur.

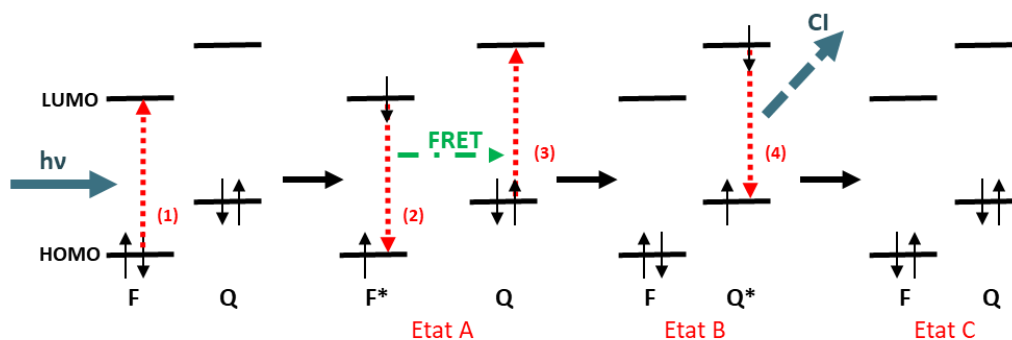


Figure 23 : Principe de la détection par FRET

Le choix des deux partenaires est très important. Le choix du couple F/Q sera développé dans le chapitre 2.

B.III.2.3.2 Immunocapteurs à base de fluorescence

Une nouvelle révolution s'est annoncée dans le domaine agroalimentaire et spécifiquement dans la détection des mycotoxines dans les résidus alimentaires. La combinaison entre la nanotechnologie¹⁰⁴ et les méthodes de fluorescence ainsi que l'utilisation des immunodosages a joué un rôle dans cette évolution.¹³⁵ Ces immunocapteurs décrits sont non seulement en passe de révolutionner les méthodes de détection des mycotoxines mais ils participent également au développement des micropuces. D'ailleurs, nous ne pouvons pas parler de l'évolution des biocapteurs sans porter l'accent sur le rôle crucial des nanomatériaux¹³⁶ dans le développement de ces biocapteurs.

Plusieurs types de nanomatériaux sont appliqués comme les nanoparticules métalliques (Au/Ag NPs),¹³⁷ les quantum dots (QDs),¹³⁸ le graphène et ses formes oxydés.¹³⁹

¹³⁵ Shi, J.; Tian, F.; Lyu, J.; Yang, M. Nanoparticle Based Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) for Biosensing Applications. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3 (35), 6989–7005.

¹³⁶ Alhamoud, Y.; Yang, D.; Fiati Kenston, S. S.; Liu, G.; Liu, L.; Zhou, H.; Ahmed, F.; Zhao, J. Advances in Biosensors for the Detection of Ochratoxin A: Bio-Receptors, Nanomaterials, and Their Applications. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, 141, 111418.

¹³⁷ Doria, G.; Conde, J.; Veigas, B.; Giestas, L.; Almeida, C.; Assunção, M.; Rosa, J.; Baptista, P. V. Noble Metal Nanoparticles for Biosensing Applications. *Sensors* **2012**, 12 (2), 1657–1687.

¹³⁸ a) Kattke, M. D.; Gao, E. J.; Sapsford, K. E.; Stephenson, L. D.; Kumar, A. FRET-Based Quantum Dot Immunoassay for Rapid and Sensitive Detection of *Aspergillus Amstelodami*. *Sensors* **2011**, 11 (6), 6396–6410. b) Zekavati, R.; Safi, S.; Hashemi, S. J.; Rahmani-Cherati, T.; Tabatabaei, M.; Mohsenifar, A.; Bayat, M. Highly Sensitive FRET-Based Fluorescence Immunoassay for Aflatoxin B1 Using Cadmium Telluride Quantum Dots.

L'équipe de Sapsford,¹⁴⁰ en 2006, a montré l'efficacité d'une méthode de détection et de quantification des mycotoxines **AFB1** dans des échantillons de maïs et de noix. Leur approche est basée sur un immunodosage compétitif indirect mis au point sur un biocapteur spécifique. Après l'extraction des **AFB1** des échantillons par le méthanol, une solution à concentration connue d'anticorps monoclonaux spécifiques marqués par un fluorophore émettant dans le proche infrarouge (la cyanine Cy-5), nommés Cy5-anti-AFB1, est ajoutée. L'incubation de l'analyte **AFB1** et ces anticorps permet de créer un mélange des complexes **AFB1**-Cy5-anti-AFB1, ainsi que des anticorps Cy5-anti-AFB1 libres non liés. Cette solution est incubée sur une surface sur laquelle des mycotoxines **AFB1** à une concentration connue ont été préalablement accrochées. La quantification est effectuée selon l'intensité du signal de la fluorescence qui correspond aux anticorps Cy5-anti-AFB1 libres n'ayant pas réagi avec les **AFB1** de l'échantillon et qui se sont liés aux antigènes **AFB1** sur surface. Comme on connaît la concentration initiale des Cy5-anti-AFB1 libres et la concentration des **AFB1** sur surface, la concentration des **AFB1** de l'analyte peut être déduite. Plus le signal de fluorescence diminue, plus la concentration d'**AFB1** dans l'échantillon est importante. La durée de la mesure est de 30 min auxquelles il faut ajouter 2h pour l'extraction de l'échantillon. Cette méthode est moins pratique par rapport à d'autres méthodes décrites, car il s'agit de mesurer une diminution de signal ce qui est moins sensible qu'une apparition de signal.

La fluorescence est couramment utilisée dans la transduction. Elle permet une grande sensibilité et est précise en cas d'utilisation de plusieurs longueurs d'ondes. Elle est fréquemment utilisée dans le cas des biocapteurs basés sur des enzymes, des anticorps et des aptamères.

Plusieurs scientifiques se sont intéressés aux biocapteurs à base d'aptamères (les aptacapteurs).¹⁴¹ Ce vif intérêt vient de la facilité de synthèses et de fonctionnalisation avec différents groupements possibles à un faible coût, sans ignorer aussi leur spécificité et stabilité.¹⁴²

Microchim. Acta **2013**, 180 (13–14), 1217–1223. c) Lu, Z.; Chen, X.; Hu, W. A Fluorescence Aptasensor Based on Semiconductor Quantum Dots and MoS₂ Nanosheets for Ochratoxin A Detection. *Sens. Actuators B Chem.* **2017**, 246, 61–67.

¹³⁹ a) Malhotra, B. D.; Srivastava, S.; Ali, Md. A.; Singh, C. Nanomaterial-Based Biosensors for Food Toxin Detection. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2014**, 174 (3), 880–896. b) Pandey, P.; Datta, M.; Malhotra, B. D. Prospects of Nanomaterials in Biosensors. *Anal. Lett.* **2008**, 41 (2), 159–209.

¹⁴⁰ Sapsford, K. E.; Taitt, C. R.; Fertig, S.; Moore, M. H.; Lassman, M. E.; Maragos, C. M.; Shriver-Lake, L. C. Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Aflatoxin B1 in Corn and Nut Products Using the Array Biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21 (12), 2298–2305.

¹⁴¹ Zhang, Y.; Lai, B.; Juhas, M. Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules* **2019**, 24 (5), 941.

¹⁴² Bunka, D. H. J.; Stockley, P. G. Aptamers Come of Age – at Last. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, 4 (8), 588–596.

B.III.2.3.3 Aptacapteurs

Les aptamères, comme les anticorps, suscitent un grand intérêt en raison de leur forte sélectivité et affinité envers les biomolécules cibles.¹⁴³ Un aptamère est un composé synthétique qui peut être un oligonucléotide ou un peptide (ADN ou ARN) qui possède une structure tridimensionnelle 3D capable de se lier avec des (bio)molécules spécifiques (protéines, petites molécules, ions, cellules).¹⁴⁴

Les travaux de Ma ont montré le développement d'un aptacapteur pour la détection des mycotoxines de type **AFB1**.¹⁴⁵ Ce système est basé sur des nanoparticules mésoporeuses de silice (MSN) dont les pores sont remplis de rhodamine 6G (**R6G**) et bouchées par des aptamères immobilisés sur la surface de MSN par liaisons électrostatiques (Figure 24). En présence de mycotoxines, les aptamères vont interagir avec celles-ci et vont se décrocher des MSN. Dans ce cas, les molécules de **R6G** seront libérées et donneront un signal de fluorescence. L'intensité de fluorescence mesurée dépend de la concentration des **AFB1** dans l'échantillon. La détection des **AFB1** a été testée dans différents échantillons d'aliments commerciaux (arachides et huile d'arachide, maïs et huile de maïs, flocons d'avoines et riz). Cette approche montre une très bonne sensibilité et sélectivité avec les **AFB1** avec une limite de détection de 0,13 µg/L.

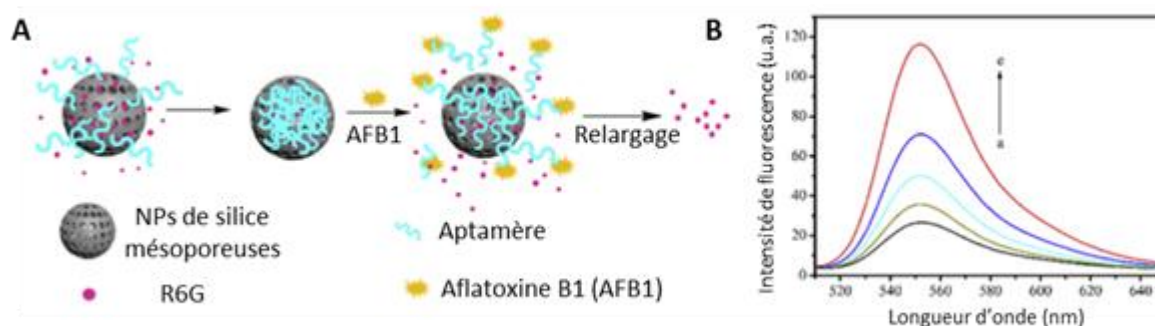


Figure 24 : (A) Principe de la détection des mycotoxines **AFB1** par un aptacapteur basé sur des MSN. (B) Spectre d'émission de l'aptacapteur en présence d'**AFB1** à différentes concentrations.¹⁴⁵

L'équipe d'Escarpa a développé une nouvelle stratégie « on the fly » basée sur un aptacapteur pour la détection des **FB** et **OTA** à différentes concentrations grâce à l'utilisation

¹⁴³ Xu, L.; Zhang, Z.; Zhang, Q.; Li, P. Mycotoxin Determination in Foods Using Advanced Sensors Based on Antibodies or Aptamers. *Toxins* **2016**, 8 (8), 239.

¹⁴⁴ McKeague, M.; DeRosa, M. C. Challenges and Opportunities for Small Molecule Aptamer Development. *J. Nucleic Acids* **2012**, 2012, 1–20.

¹⁴⁵ Tan, H.; Ma, L.; Guo, T.; Zhou, H.; Chen, L.; Zhang, Y.; Dai, H.; Yu, Y. A Novel Fluorescence Aptasensor Based on Mesoporous Silica Nanoparticles for Selective and Sensitive Detection of Aflatoxin B1. *Anal. Chim. Acta* **2019**, 1068, 87–95.

Introduction

d'aptamères fluorescents.¹⁴⁶ Il s'agit d'un micromoteur tubulaire¹⁴⁷ constitué de graphène oxydé et de nanoparticules de Pt (rGO/PtNPs). Suite à l'ajout de H_2O_2 , il génère des microbulles permettant le mouvement du système dans la solution. Comme l'indique la Figure 25, en absence de mycotoxines cibles (situation A), l'aptamère s'adsorbe par interaction électrostatique sur la couche externe des micromoteurs en graphène qui joue le rôle de quencher. Le fluorophore accroché à l'aptamère est alors éteint et aucun signal de fluorescence n'est observé. En présence de mycotoxines en solution (situations B et C), une interaction entre les aptamères et l'analyte a lieu par biorecognition en formant un complexe aptamère/**FB1**. L'aptamère n'est plus capable de s'adsorber sur le nanotube et un signal de fluorescence s'établit exprimant la réponse de bio-reconnaissance entre les aptamères et les mycotoxines. L'intensité de fluorescence mesurée est liée à la concentration des mycotoxines présents en solution (situation C).

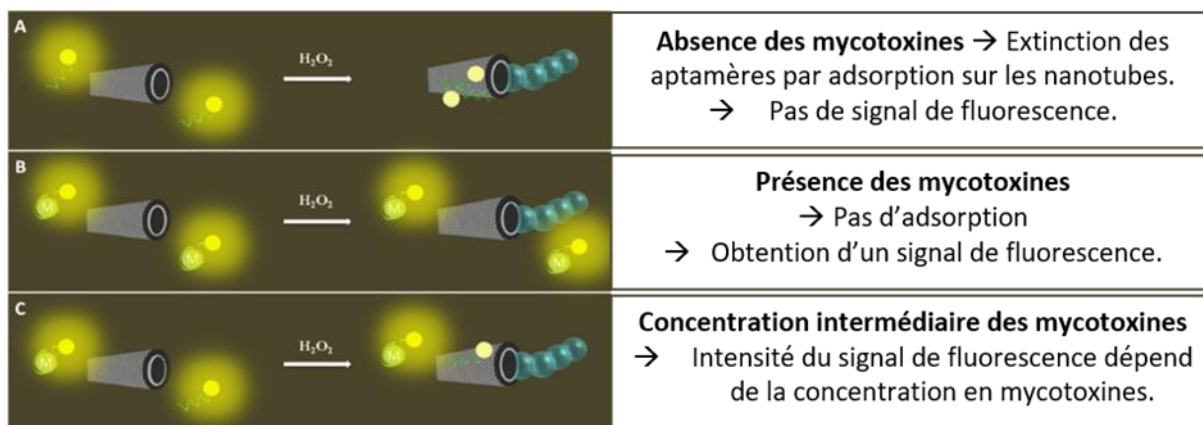


Figure 25 : Stratégie des biocapteurs basés sur des micromoteurs¹⁴⁶

Le développement d'un tel dispositif révolutionnaire vise à obtenir un système rapide et sélectif pour la détection des deux mycotoxines pour lesquelles l'union européenne a fixé des doses tolérables de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ pour **FB** et 0,002-0,01 $\mu\text{g/mL}$ pour **OTA**. Ce système a fait preuve d'une bonne sensibilité lors de la détection simultanée d'**OTA** et de fumonisine **FB1** dans un échantillon de 1 μL en 2 min. Les limites de détection respectives obtenues sont 7 ng/mL et 0,4 ng/mL.

¹⁴⁶ Molinero-Fernández, Á.; Moreno-Guzmán, M.; López, M. Á.; Escarpa, A. Biosensing Strategy for Simultaneous and Accurate Quantitative Analysis of Mycotoxins in Food Samples Using Unmodified Graphene Micromotors. *Anal. Chem.* **2017**, 89 (20), 10850–10857.

¹⁴⁷ a) Zha, F.; Wang, T.; Luo, M.; Guan, J. Tubular Micro/Nanomotors: Propulsion Mechanisms, Fabrication Techniques and Applications. *Micromachines* **2018**, 9 (2), 78. b) Karshalev, E.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; Wang, J. Micromotors for "Chemistry-on-the-Fly." *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, 140 (11), 3810–3820.

En 2017, les travaux de Li et Zhang ont montré la possibilité de détecter sélectivement l'aflatoxine **AFM1**.¹⁴⁸ Ils ont mis au point un immunocapteur basé sur un signal fluorescent de type « OFF-ON » utilisant le phénomène de FRET. Dans cet exemple, le FRET va s'établir entre des nanoparticules de Palladium (PdNPs), qui jouent le rôle de l'accepteur d'énergie « quencher », et la 5-carboxyfluorescéine (FAM), utilisé comme fluorophore, greffée sur des aptamères reconnaissant l'**AFM1** fonctionnalisés par des atomes d'azotes. Comme l'indique la Figure 26, en absence des **AFM1** en solution, ces deux entités sont rapprochées (via les interactions électrostatiques entre les acides nucléiques et les nanoparticules) et la fluorescence de FAM est éteinte. En présence des molécules cibles **AFM1** en solution, les aptamères-AFM1 ont tendance à se lier préférentiellement aux **AFM1**, d'où un éloignement entre FAM et PdNPs et un signal de fluorescence s'établit.

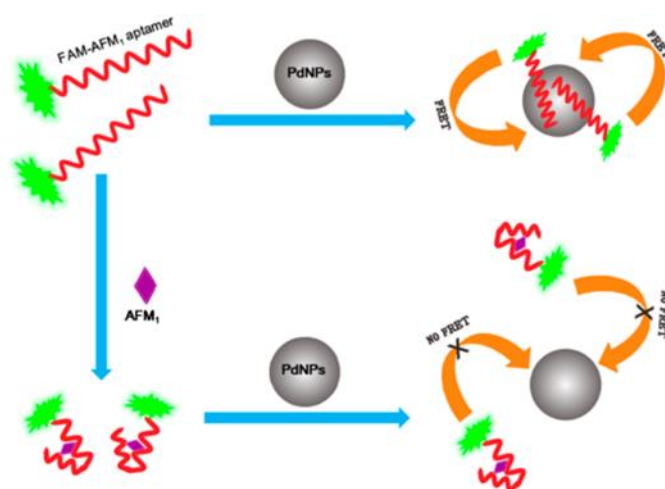


Figure 26 : Illustration du biocapteur **AFM1**¹⁴⁸

Récemment, l'équipe de Zhao a développé une sonde fluorescente basée sur le FRET pour la détection rapide des **AFB1** dans le vin et la farine de maïs. Il s'agit d'un aptamère simple sur lequel sont accrochés un fluorophore FAM à une extrémité et un quencher **BHQ-1** à l'autre extrémité.¹⁴⁹ En absence d'**AFB1**, l'aptamère est suffisamment long pour que le FRET ne soit pas efficace. En présence de mycotoxines **AFB1** en solution, l'aptamère va se lier aux mycotoxines en formant une structure repliée qui rapproche le fluorophore FAM de son quencher **BHQ-1**, ce qui se traduit par une extinction de fluorescence (Figure 27). La détection de l'analyte est mesurée en fonction du changement de l'intensité de la fluorescence. Cette méthode est très efficace avec une limite de détection évaluée à 3,9 nM.

¹⁴⁸ Li, H.; Yang, D.; Li, P.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Ding, X.; Mao, J.; Wu, J. Palladium Nanoparticles-Based Fluorescence Resonance Energy Transfer Aptasensor for Highly Sensitive Detection of Aflatoxin M1 in Milk. *Toxins* **2017**, 9 (10), 318.

¹⁴⁹ Wang, C.; Sun, L.; Zhao, Q. A Simple Aptamer Molecular Beacon Assay for Rapid Detection of Aflatoxin B1. *Chin. Chem. Lett.* **2019**, 30 (5), 1017–1020.

Introduction

De plus, cette stratégie présente une très bonne sélectivité pour **AFB1** par rapport à d'autres mycotoxines grâce à l'utilisation d'aptamères affins.

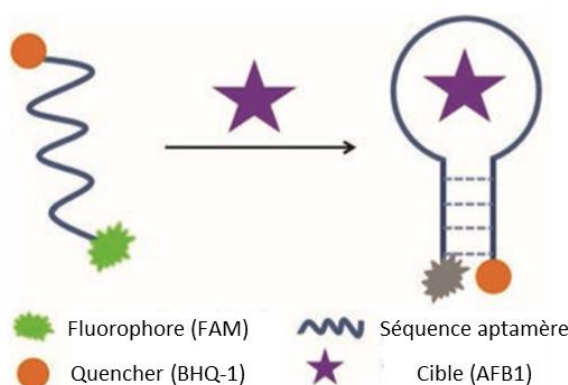


Figure 27 : Système de détection des **AFB1** Aptamère-FAM-BHQ1¹⁴⁹

Les travaux de Zeng ont démontré qu'une autre stratégie de type « OFF-ON » pour la détection des **OTA** était possible.¹⁵⁰ Elle repose sur l'hybridation d'un aptamère fluorescent spécifique à **OTA** et un brin ADN marqué par un quencher. En absence de toxines, le brin d'ADN et l'aptamère sont hybridés, induisant le rapprochement du fluorophore et provoquant l'extinction de ce dernier. Et en présence des mycotoxines de type **OTA** (Figure 28), l'aptamère interagit préférentiellement avec celles-ci et l'hybridation est rompue. Le fluorophore et le quencher s'éloignent induisant un signal de fluorescence considérable. Cette approche est très rapide (1 min) avec une bonne sélectivité et avec une limite de détection de 0,8 ng/mL. De plus, cette stratégie peut être intégrée dans des systèmes portables pour la détection sur site, et présente l'avantage d'induire une apparition de signal en présence de l'analyte.

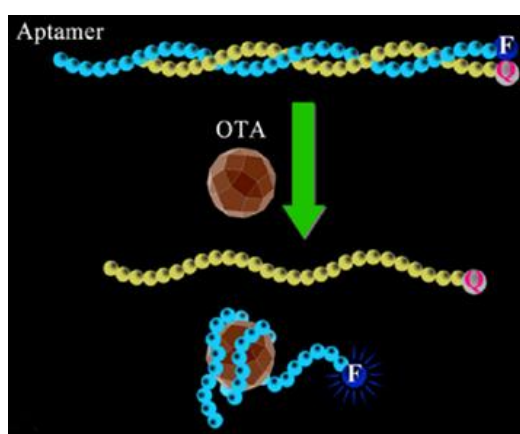


Figure 28 : Illustration de l'aptamère fluoré et le brin d'ADN-Quencher dans le cas de la présence des Ochratoxines¹⁵⁰

¹⁵⁰ Chen, J.; Fang, Z.; Liu, J.; Zeng, L. A Simple and Rapid Biosensor for Ochratoxin A Based on a Structure-Switching Signaling Aptamer. *Food Control* **2012**, 25 (2), 555–560.

Toutes les techniques décrites, comme les méthodes analytiques, les méthodes immunologiques, les systèmes d'analyse en flux allant jusqu'aux biocapteurs, connaissent un développement intense. Chacune de ces méthodes a ses potentiels et ses faiblesses au niveau de la reconnaissance simultanée des analytes, la sensibilité, les limites de détection, le temps et le coût d'analyse.

Les obstacles scientifiques et financiers s'estompent peu à peu au fil des années pour arriver à satisfaire les besoins du marché agroalimentaire. La mise en œuvre de ces approches à l'échelle industrielle ont conduit à des réussites commerciales.^{151,152} En outre, l'évolution de ces techniques s'oriente vers des systèmes microfluidiques qui convertissent ces techniques nécessitant des instrumentations de laboratoire lourdes à mettre en œuvre en des techniques compactes et à de véritables dispositifs à micro-échelle appelés des « laboratoire sur puce » (LOC pour « lab-on-a chip »).¹⁵³ L'application de LOC est non seulement en passe de révolutionner plusieurs domaines¹⁵⁴ mais elle participe aussi à la forte demande du marché pour le développement des systèmes pour la détection des mycotoxines. L'attractivité de ces systèmes repose sur leur simplicité et portabilité intégrant plusieurs techniques à micro-échelle et ne nécessitant pas de personnel qualifié.

Dans ce contexte, un projet collaboratif associant différents laboratoires français vise à mettre en place un système de détection en flux par immunoanalyse. La technologie utilisée dans ce projet est le SPIT-FRI pour « Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay ». Il s'agit d'une détection immunoanalytique brevetée et développée par le CEA (Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies renouvelables).

Cette thèse s'inscrit dans le développement d'une application envisagée d'un immunocapteur en flux basé sur la méthode SPIT-FRI pour la détection des mycotoxines en circulation continue de fluide. Ce projet a été initié dans le cadre d'une collaboration avec deux équipes du CEA-Saclay (Service de pharmacologie et d'immunologie à Saclay, chargée de la production des anticorps) et CEA-LETI (Laboratoire d'électronique et de technologie de l'information à Grenoble, chargée de la mise en place du dispositif de détection).

¹⁵¹ Mycotoxin Testing Market 2019 Global Industry Share, Size, Revenue, Latest Trends, Business Boosting Strategies, CAGR Status, Growth Opportunities and Forecast 2023 - 360 Research Reports <https://www.marketwatch.com/press-release/mycotoxin-testing-market-2019-global-industry-share-size-revenue-latest-trends-business-boosting-strategies-cagr-status-growth-opportunities-and-forecast-2023-360-research-reports-2019-06-24>.

¹⁵² Rapidust® <https://www.eurofins.com/food-and-feed-testing/food-testing-services/rapidust/>.

¹⁵³ Guo, L.; Feng, J.; Fang, Z.; Xu, J.; Lu, X. Application of Microfluidic "Lab-on-a-Chip" for the Detection of Mycotoxins in Foods. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**, *46* (2), 252–263.

¹⁵⁴ Chin, C. D.; Linder, V.; Sia, S. K. Lab-on-a-Chip Devices for Global Health: Past Studies and Future Opportunities. *Lab Chip* **2007**, *7* (1), 41–57.

C. Principe du SPIT-FRI

Le fonctionnement du SPIT-FRI est schématisé dans la Figure 29.¹⁵⁵ Cette technologie repose sur l'utilisation d'une structure hétérotrifonctionnelle appelée « tripode », sur laquelle sont liées (i) un composé fluorescent, (ii) un analogue synthétique de l'analyte cible et (iii) un groupe fonctionnel permettant un lien avec la phase solide (étape 1). La détection fluorogénique du SPIT-FRI est de type « OFF-ON » utilisant le phénomène de FRET pour obtenir l'état « éteint ». Cette extinction est obtenue par l'utilisation d'un anticorps anti-analyte marqué par un quencher spécifique du fluorophore utilisé. C'est l'affinité de l'anticorps pour l'analogue de la toxine qui lui permet de se lier au tripode (étape 2). En présence de l'analyte en solution, une biorecognition de l'analyte par l'anticorps marqué a lieu, ce qui a pour conséquence le déplacement de celui-ci. L'éloignement de l'anticorps et de son quencher permet le rétablissement du signal de fluorescence (étape 3). Tant que l'analyte n'a pas été détecté par le dispositif, il n'est pas nécessaire de le remplacer, ce qui permet son utilisation en flux continu. Enfin, après reconnaissance de l'analyte d'intérêt, il est possible de régénérer cet immunocapteur en faisant passer une nouvelle solution d'anticorps marqués sur la surface (étape 4). La clef de la réussite de ce dispositif est la reconnaissance croisée des anticorps pour l'analogue de la toxine et la toxine elle-même. L'affinité des anticorps pour l'analogue de la toxine doit être suffisante pour que l'anticorps reste immobilisé sur le tripode sous un flux de liquide, et la différence d'affinité suffisante pour que la toxine déplace l'anticorps du tripode vers elle lorsqu'elle est présente en solution.

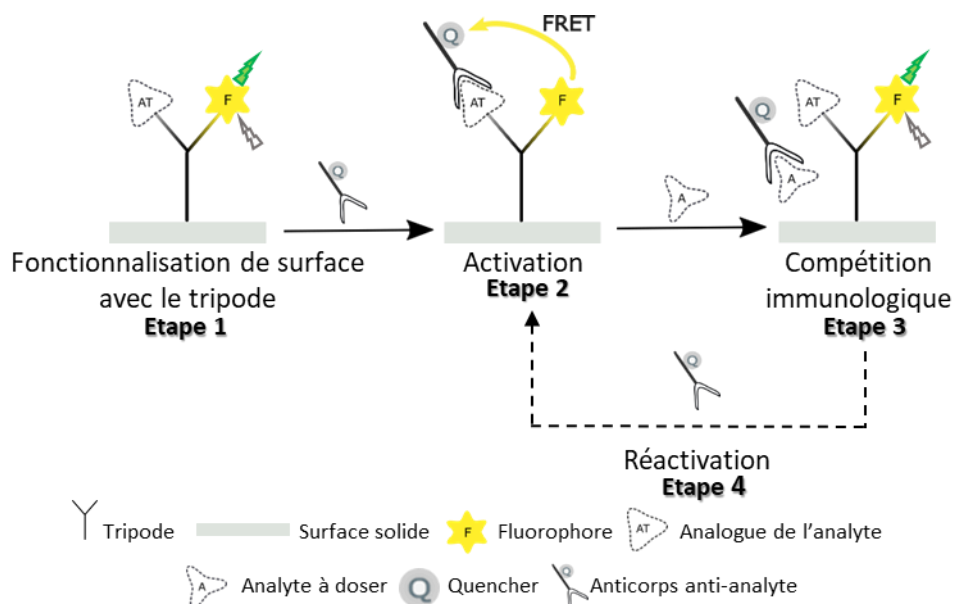


Figure 29 : Représentation schématique du principe de fonctionnement du SPIT-FRI

¹⁵⁵ Volland, H.; Neuburger, L.-M.; Schultz, E.; Grassi, J.; Perraut, F.; Créminon, C. Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay. A Concept for Continuous Monitoring of an Immunoassay Including a Regeneration of the Solid Phase. *Anal. Chem.* **2005**, 77 (6), 1896–1904.

Plusieurs travaux ont été élaborés au sein de l'équipe du Pr. Pierre-Yves Renard, en collaboration avec les équipes du CEA-Saclay chargées de la production des anticorps et l'équipe CEA-LETI chargée de la mise en place du dispositif de détection. Ces travaux ont pour but d'optimiser et améliorer le développement de cet immunocapteur à base de fluorescence qui sera utilisé pour la détection de n'importe quel analyte en flux continu. Nous avons justement choisi, dans notre projet, le concept SPIT-FRI pour la détection fluorogénique éventuelle des mycotoxines dans des extraits alimentaires.

C.I Etapes de fonctionnement du SPIT-FRI

L'élaboration d'un tel dispositif nécessite plusieurs parties indépendantes à étudier. Dans cette partie, nous nous focaliserons sur les étapes distinctes nécessaires pour son développement ainsi que la compréhension du fonctionnement de la méthode SPIT-FRI (Figure 29).

- Synthèse du réactif hétérotrifonctionnel appelé « tripode », ainsi que le greffage des analogues de toxines et du fluorophore.
- Etude de fonctionnalisation par l'immobilisation du « cross-linker » synthétisé sur un support solide.
- Activation en présence des anticorps marqués par un quencher.
- Compétition immunologique par des tests d'affinité anticorps/analogue de toxine et anticorps/mycotoxine en solution.
- Tests microbiologiques avec des solutions contenant l'analyte à détecter.

C.II L'orthogonalité et la chimiosélectivité

La 1^{ère} partie du développement d'un tel dispositif SPIT-FRI réside dans le choix du linker principal, le tripode. Comme l'indique la Figure 30, il comprend trois fonctions chimiques (F1, F2 et F3) orthogonales entre elles. Elles permettent de lier les trois partenaires nécessaires : le fluorophore, l'analogue de l'analyte et la surface solide.

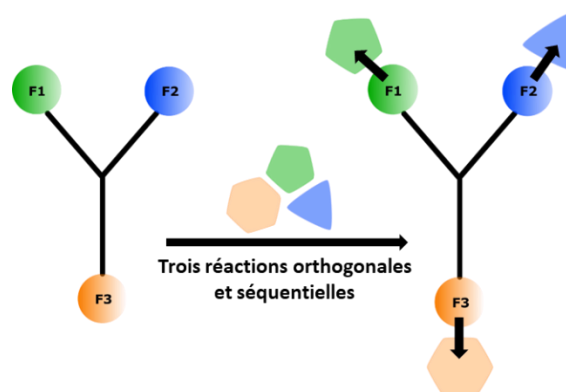


Figure 30 : Préparation d'architectures moléculaires complexes par des réactions chimiosélectives et orthogonales

Un choix méticuleux de cette molécule hétérotrifonctionnelle doit être fait au niveau de la stratégie de synthèse ainsi qu'au niveau des fonctions chimiques introduites. Nous avons choisi d'introduire des fonctions chimiques orthogonales dans le but d'éviter des étapes supplémentaires de protection et de déprotection et aussi afin d'éviter la formation de sous-produits indésirables.¹⁵⁶ Une fonction permettant l'immobilisation irréversible de ce tripode sur le support solide choisi est nécessaire. De même, deux autres fonctions réactives et orthogonales entre elles permettront le greffage séquentiel du fluorophore d'un côté et l'analogue de toxine de l'autre.

Ceci nous a emmené à étudier les diverses catégories des réactions orthogonales et chimiosélectives potentiellement utilisables dans l'objectif d'obtenir un tripode universel, approprié à être utilisé avec différentes molécules d'intérêt.

La dérivation du tripode va se faire par le couplage de trois partenaires via des ligations orthogonales et chimiosélectives. Ces deux notions vont définir l'ordre séquentiel du couplage d'un groupe réactif avec un autre que ce soit dans la stratégie de synthèse du tripode basée sur des blocs de construction « building blocks » ou lors du greffage du fluorophore, de l'analogue de l'analyte et l'immobilisation de surface.

La chimiosélectivité a été tout d'abord abordée par Trost¹⁵⁷ en 1983 afin de montrer la capacité d'un réactif chimique à discriminer un site réactif parmi d'autres. Cette propriété implique que parmi une multitude de groupes fonctionnels potentiellement réactifs, seuls deux partenaires réagissent sélectivement l'un avec l'autre, sans interagir avec les autres fonctions présentes dans le milieu. Autrement dit, les réactions chimiosélectives peuvent tolérer la présence de différentes fonctions chimiques diverses dans le milieu ne nécessitant pas une protection avec des groupes protecteurs spécifiques.¹⁵⁸

Le concept d'**orthogonalité** en chimie organique est étroitement lié à la chimiosélectivité.¹⁵⁹ Il repose sur la réactivité chimique et la sélectivité de la formation de liaison en même temps. Ce principe est basé sur le potentiel que possèdent deux groupements chimiques à former des liaisons covalentes de façon spécifique, et donc à se lier mutuellement d'une manière rapide, sélective et efficace. Autrement dit, ces deux groupements réactifs n'interfèrent pas avec les fonctions chimiques présentes dans le milieu. Si la chimiosélectivité peut avoir un caractère général, l'orthogonalité est donc

¹⁵⁶ Pantin, M.; Caillé, J.; Boeda, F.; Fontaine, L.; Pearson-Long, M. S. M.; Bertus, P. Heteromultifunctional Oxazolones as Versatile Linkers for Click Chemistry Reactions: Heteromultifunctional Oxazolones as Versatile Linkers for Click Chemistry Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2019**.

¹⁵⁷ Trost, B. M. Selectivity: A Key to Synthetic Efficiency. *Science* **1983**, 219 (4582), 245–250.

¹⁵⁸ Lemieux, G. A.; Bertozzi, C. R. Chemoselective Ligation Reactions with Proteins, Oligosaccharides and Cells. **1998**, 16, 506-513.

¹⁵⁹ Wong, C.-H.; Zimmerman, S. C. Orthogonality in Organic, Polymer, and Supramolecular Chemistry: From Merrifield to Click Chemistry. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (17), 1679.

dépendante des autres fonctions chimiques que l'on peut trouver dans le milieu de sorte de ne pas avoir des réactivités croisées avec d'autres molécules portant différents groupes fonctionnels.

L'application de cette technique est en plein essor. Une des applications où l'orthogonalité et la chimiosélectivité ont beaucoup d'importance est le marquage de biomolécules *in vivo*.¹⁶⁰ En effet, cette propriété est indispensable pour permettre leur modification sélective sans interférer avec d'autres éléments biologiques présents dans le même environnement. Les groupements fonctionnels impliqués doivent non seulement réagir de façon spécifique avec leur partenaire mais également présenter une bonne stabilité en milieu physiologique (résister à l'hydrolyse ou à l'oxydation, par exemple).

Nous allons illustrer dans la suite de ce manuscrit quelques exemples de réactions bio-orthogonales ayant pu être utilisées dans des contextes cellulaires.

C.II.1. La réaction de Staudinger

Cette réaction portant le nom de celui qui l'a découverte. La ligation de Staudinger,¹⁶¹ est parmi les premières réactions bio-orthogonales développées. Elle se base sur une réaction entre un groupement phosphine et un groupement azoture.¹⁶² Cette réaction entre une phosphine trisubstituée (alkyl ou aryl) qui joue le rôle de nucléophile et un azoture qui joue le rôle d'électrophile produit un iminophosphorane (aza-ylure) accompagné d'un dégagement de diazote. C'est la réaction de ligation elle-même, qui permet de lier deux molécules. Cependant, en milieu aqueux et à température ambiante, cet intermédiaire réactionnel s'hydrolyse spontanément pour donner l'oxyde de phosphine et une amine primaire (Figure 31).

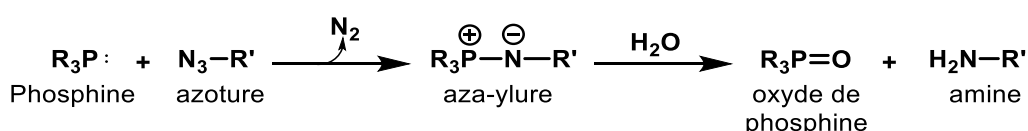


Figure 31 : Réaction de Staudinger

L'utilisation de cette réaction, dans sa forme classique pour lier deux molécules présente néanmoins quelques inconvénients, le principal étant l'instabilité de l'intermédiaire réactionnel aza-ylure dans l'eau. Pour empêcher l'hydrolyse spontanée de l'aza-ylure et concrétiser la ligation, il est possible d'utiliser un dérivé de triarylphosphine réagissant intermédiairement pour piéger intramoléculairement l'aza-ylure. Pour ce faire, on utilise un

¹⁶⁰ Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. Chemistry in Living Systems. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1 (1), 13–21.

¹⁶¹ Staudinger, H.; Meyer, J. Über neue organische Phosphorverbindungen III. Phosphinmethylenderivate und Phosphinimine. *Helv. Chim. Acta* **1919**, 2 (1), 635–646.

¹⁶² van Berkel, S. S.; van Eldijk, M. B.; van Hest, J. C. M. Staudinger Ligation as a Method for Bioconjugation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50 (38), 8806–8827.

triarylphosphine portant un groupement électrophile sur l'un des groupements aryle. Un exemple est donné en Figure 32 avec la présence d'un ester méthylique placé en ortho sur un des aromatiques des phosphines qui joue le rôle de piège électrophile par une cyclisation intramoléculaire afin de capturer le nucléophile (Figure 33).¹⁶³ La ligation entre la phosphine et l'azoture conduit alors à la formation d'une liaison amide, stable. A noter que depuis cet exemple, des versions « traceless » où la phosphine est éliminée du milieu et seule la liaison amide est obtenue entre les deux entités ont été mises au point. Le principal défaut de cette ligation est sa cinétique lente en milieu aqueux.

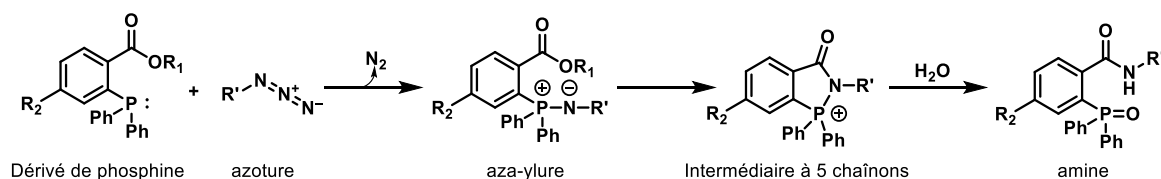


Figure 32 : Mécanisme de la réaction de Staudinger entre un triarylphosphine et un dérivé azoture

C.II.2. Les réactions de cycloadditions

Une majorité des réactions orthogonales appartiennent à la famille des réactions de cycloaddition. Ces réactions sont caractérisées par un mécanisme concerté entre deux molécules insaturées où la rupture et la formation de liaison σ et π se font simultanément pour former un adduit cyclique (Figure 33).

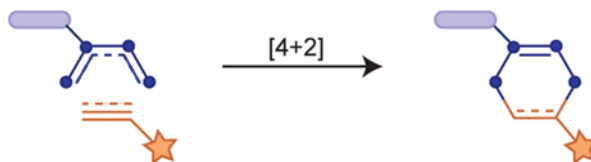


Figure 33 : Exemple de réaction de cycloaddition [4+2]¹⁶⁴

C.II.2.1 La réaction de Diels Alder à demande électronique inverse

La réaction de Diels Alder est une cycloaddition de type [4+2] à demande électronique normale ou inverse (iEDDA pour « inverse-Electron Demand Diels Alder ») permettant de former deux liaisons carbone-carbone.¹⁶⁵

Il s'agit d'une réaction entre un alcène électrophile et un diène riche en électrons produisant un cycle à six chaînons, un cyclohexène (Figure 34). Pour que la réaction se produise avec des cinétiques acceptables en milieu biologique, deux cas de figure ont été

¹⁶³ Saxon, E. Cell Surface Engineering by a Modified Staudinger Reaction. *Science* **2000**, 287 (5460), 2007–2010.

¹⁶⁴ Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9 (3), 592–605.

¹⁶⁵ Smith, M. B. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*; John Wiley & Sons, **2019**.

considérés : les réactions de Diels-Alder à demande électronique normale (diénophile appauvri en électrons et diène enrichi en électrons), et les réactions de Diels-Alder à demande inverse qui ont rencontré le plus de succès dans les réactions de ligation orthogonales. Pour augmenter la vitesse de la réaction, l'alcène, appelé diénophile, doit être substitué par des groupements donneurs d'électrons, quant au diène il est appauvri en électrons. Les alcènes de type trans-cyclooctène (TCO), norbornène et cyclopropène sont les plus utilisés dans des iEDDA pour réagir avec les diènes électrophiles et les tetrazines.¹⁶⁶

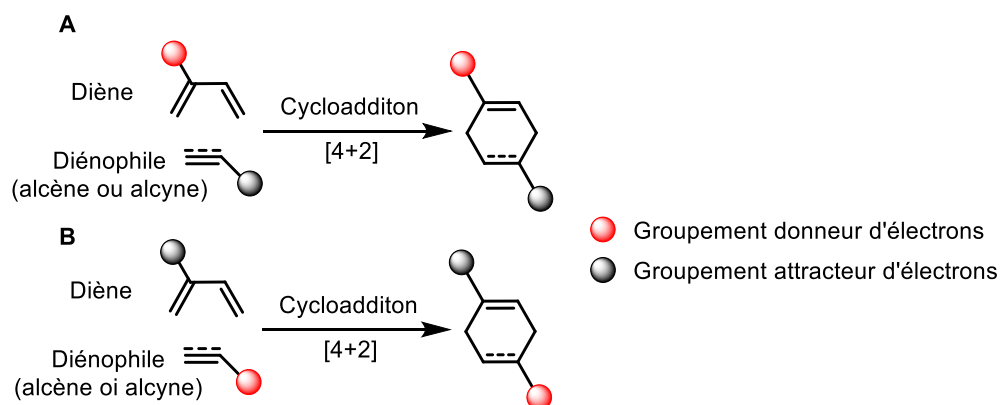


Figure 34 : Cycloaddition de Diels Alder [4+2] **(A)** Diels Alder normale **(B)** Diels Alder inverse

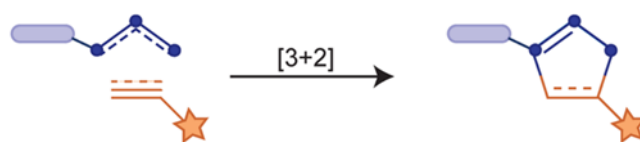
A noter qu'une cycloaddition de Diels-Alder à demande normale impliquant un diénophile appauvri en électrons comme un maléimide implique une réactivité croisée avec les biothiols, car le diénophile est également un accepteur de Michael qui peut réagir avec les thiols, ce qui explique le recours plus fréquent aux iEDDA, qui de plus présentent des constantes cinétiques très favorables.

C.II.2.2 Cycloaddition [3+2] : Réactions dites de chimie Click

La cycloaddition 1,3 dipolaire est fréquemment appliquée en chimie organique.¹⁶⁵ La réaction s'effectue par un mécanisme de cycloaddition concerté (Figure 35), entre des composés 1,3 dipolaires qui présentent un système portant 3 électrons π délocalisés sur trois atomes à résonance chargée par apparition de charges positives et négatives à chaque extrémité (tels que les azotures, les azométhines-ylides, les diazoalcane et les aziridines) et un diapolarophile substitué, ce qui aboutit à un cycle à cinq chaînons qui pourraient être, par exemple, des dérivés de triazolines, triazoles ou pyrrolidine.¹⁶⁷

¹⁶⁶ Blackman, M. L.; Royzen, M.; Fox, J. M. Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation Based on Inverse-Electron-Demand Diels-Alder Reactivity. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (41), 13518–13519.

¹⁶⁷ Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565–598.

Figure 35 : Cycloaddition [3+2]¹⁶⁴

Depuis la redécouverte de la réaction de Huisgen catalysée au cuivre par Sharpless et Meda, ^{168,169} cette réaction a été dénommée « réactions click ». Ces réactions de chimie click sont des réactions orthogonales pouvant se faire en présence d'autres groupes fonctionnels. Deux réactions en chimie click sont souvent utilisées : la réaction CuAAC pour « Copper catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition » et la réaction SPAAC pour « Strain-Promoted Alkyne Azide Cycloaddition ».

C.II.2.2.1 CuAAC

Nous nous intéressons principalement à la réaction de Huisgen. Cette réaction a été développée au 19^{ème} siècle et fréquemment utilisée en tant que réaction chimiosélective. Elle s'effectue entre un groupement azoture et un groupement alcène ou alcyne pour conduire à la formation respective de 1,2,3-triazolines et 1,2,3-triazoles. Son mécanisme a été décrit plus tard par Huisgen.¹⁷⁰ Cette réaction est très lente et nécessite une haute pression et une activation thermique. De plus, elle aboutit à la formation de deux régioisomères difficiles à séparer (Figure 36).¹⁷¹

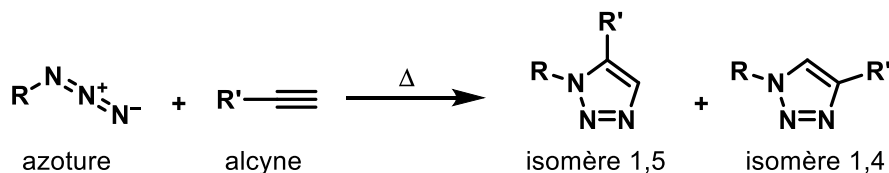


Figure 36 : Réaction de Huisgen – Cycloaddition 1,3- dipolaire

En 2002, les groupes de Sharpless¹⁶⁸ et de Meldal¹⁶⁹ ont développé conjointement une réaction de Huisgen dont la cinétique est accélérée en présence de Cuivre (I). Cette forme rapide est connue sous le nom CuAAC pour « Copper Catalyzed Alkyne Azide Cycloaddition » (Figure 37). L'utilisation d'un catalyseur Cuivre (I) rend de plus cette réaction catalytique a

¹⁶⁸ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41 (14), 2596–2599.

¹⁶⁹ a) 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.* **2002**, 67 (9), 3057–3064 b) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide–Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, 108 (8), 2952–3015.

¹⁷⁰ Huisgen, R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, 2 (11), 633–645.

¹⁷¹ Haldón, E.; Nicasio, M. C.; Pérez, P. J. Copper-Catalysed Azide–Alkyne Cycloadditions (CuAAC): An Update. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13 (37), 9528–9550.

permis d'améliorer la régiosélectivité par la production exclusive du triazole anti (1,4-disubstitué 1, 2, 3-triazole).

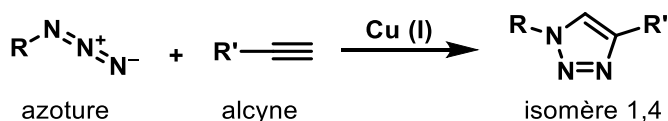


Figure 37 : Réaction CuAAC

Le mécanisme de cette réaction explique l'accélération de la cinétique et l'origine de la régiochimie du produit obtenu de cette réaction. Après un premier mécanisme proposé par Meldal en 2002, l'équipe de Fokin a démontré l'intervention d'un intermédiaire de cuivre binucléaire (Figure 38).¹⁷² De plus, il est important de noter que les alcynes disubstitués sont incompatibles avec la réaction CuAAC.

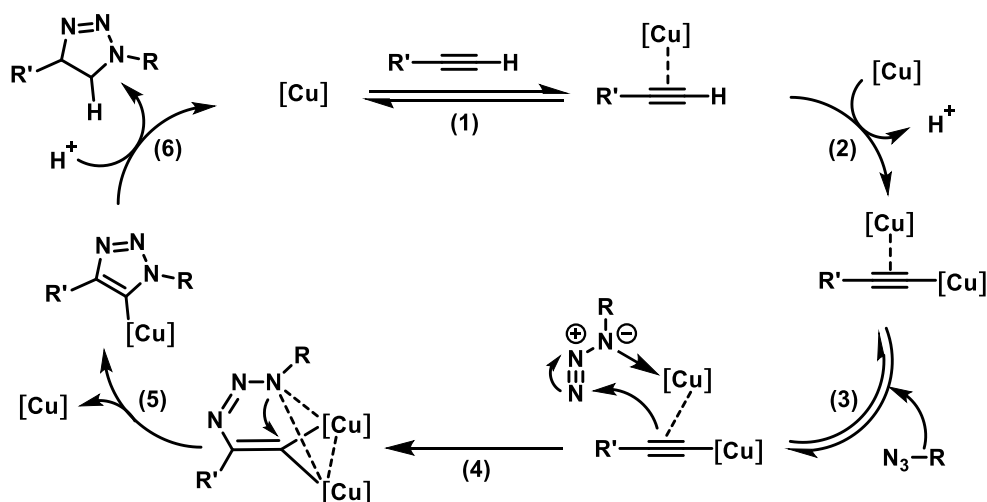


Figure 38 : Cycle catalytique pour la réaction CuAAC démontré par Fokin et Coll.¹⁷²

Tout d'abord, le cycle catalytique repose sur l'interaction entre l'alcyne et un premier atome de Cuivre par le biais d'une liaison σ faible et réversible afin de former un complexe d'acétylure du Cuivre **(1)**. Cette étape est suivie par une étape d'activation **(2)** en formant le complexe catalytique actif. Il s'agit de l'introduction d'un 2^{ème} atome de Cuivre qui coordine l'alcyne par interaction π . Ensuite, une liaison réversible est formée entre l'Azote le plus nucléophile de l'azoture et le Cuivre **(3)** qui est suivie par une attaque entre le carbone β de l'acétylure de Cuivre et l'azoture au niveau son azote le plus électrophile **(4)**. Cette étape conduit à la formation de la 1^{ère} liaison covalente C-N. Puis, la formation de la 2^{ème} liaison covalente C-N **(5)** s'effectue par attaque nucléophile de l'azote coordonné sur le carbone terminal de l'alcyne qui implique le départ d'un atome du Cuivre. Enfin, la liaison C-Cu est

¹⁷² Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, 340 (6131), 457–460.

rompue afin de régénérer le catalyseur et aboutir à la formation régiosélective de 1,2,3-triazoles 1,4 disubstitué (6).

Cette réaction régio- et chimiosélective est la clé de la « chimie Click ». Elle a révolutionné la synthèse en chimie en tant que réaction orthogonale et de bio-conjugaison.

C.II.2.2.2 SPAAC

Pour exploiter le potentiel de la chimie click, une autre réaction a été développée permettant de s'affranchir de l'utilisation du Cuivre. Il s'agit de la réaction entre un groupement cyclooctyne tendu, et un groupement azoture. L'absence de catalyseur métallique permet d'utiliser cette réaction dans des environnements biologiques. Cette réaction, appelée réaction SPAAC pour « Strain Promoted Alkyne-Azide Cycloaddition » a été développée par Wittig et Krebs et utilisée par Carolyn Bertozzi comme nouvelle réaction bio-orthogonale dans la chimie de bio-conjugaison.¹⁷³ Cette réaction s'effectue dans un environnement aqueux et à température ambiante. Les groupements alcynes les plus utilisés dans cette réaction sont les cyclooctynes. La présence du cycle fait augmenter la réactivité de l'alcyne par la tension de cycle ce qui permet de s'affranchir de l'utilisation du catalyseur au Cuivre (I). Cependant, cette réaction est non régiosélective.

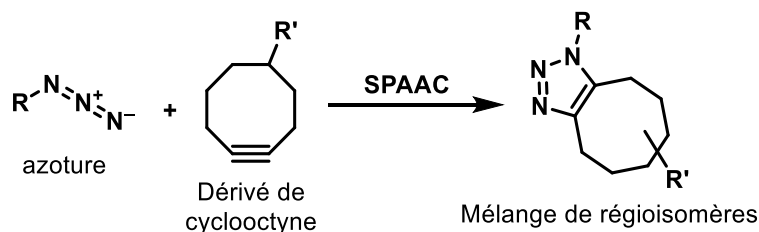


Figure 39 : Réaction de SPAAC

C.II.3. Les condensations du carbonyle (aldéhyde/cétone)

Les cétones et les aldéhydes étant qu'électrophiles peuvent réagir rapidement avec les amines qui possèdent un caractère nucléophile fort comme les nucléophiles à effet α tels que les hydrazines, les hydrazides et les oxyamines. Ce caractère est expliqué par la présence d'un hétéroatome en position α portant un doublet non liant qui augmente la nucléophilie du composé et diminue le caractère basique. Ces réactions conduisent à la formation de bases de Schiff relativement stables (oximes, hydrazones).¹⁶⁴ La Figure 40 montre que l'interaction entre les doublets non liants génèrent une HOMO plus haute en énergie ce qui fait augmenter la nucléophilie des nucléophiles à effet α . Ceci emmène à la diminution conjointe de la basicité grâce à l'effet électroattracteur de l'hétéroatome en α . Cette diminution de la basicité permet aux oxyamines et hydrazines d'être réactives à des pH

¹⁷³ Agard, N. J.; Prescher, J. A.; Bertozzi, C. R. A Strain-Promoted [3 + 2] Azide-Alkyne Cycloaddition for Covalent Modification of Biomolecules in Living Systems. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126 (46), 15046–15047.

où les amines sont protonnées, d'où une sélectivité, car les amines, protonnées, ne peuvent alors former de base de Schiff.

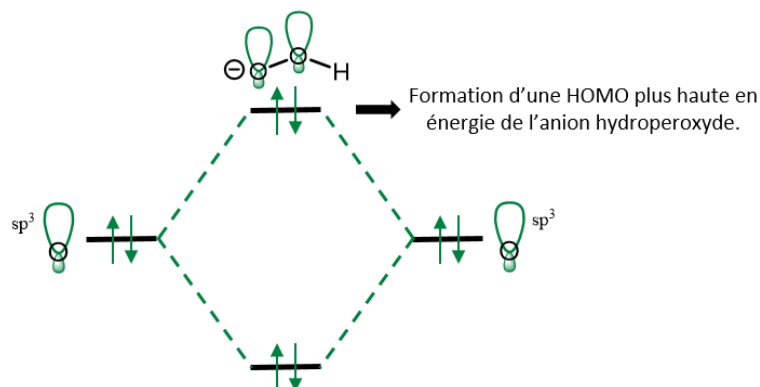


Figure 40 : Effet du nucléophile α sur l'ion hydroperoxyde ¹⁷⁴

Deux réactions de condensation d'alpha nucléophiles, basées sur la condensation des carbonyles sont représentées dans la Figure 41. La première est la réaction entre un dérivé carbonylé et une hydrazine qui conduit à la formation d'une hydrazone. La 2^{ème} réaction fait intervenir un dérivé oxyamine pour conduire à la formation d'une oxime. Contrairement à la formation des bases de Schiff simples, ces réactions perdent leur caractère réversible aux conditions usuelles de pH, et peuvent être utilisées comme des réactions de liaison chimique.

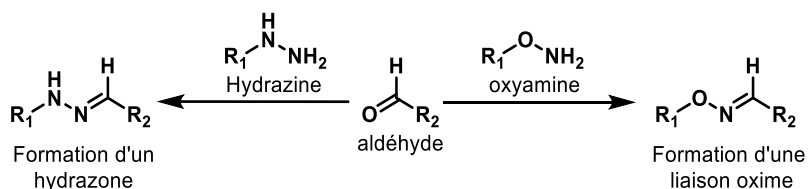


Figure 41 : Réactions chimiosélectives par condensation des carbonyles

Une liaison oxime est une liaison stable dans des conditions physiologiques normales mais elle peut être aussi clivée en cas de chauffage dans des conditions acides ou en présence de dithionate de sodium.¹⁷⁵ La formation de cette liaison est accélérée dans un milieu aqueux. Cependant, dans les deux cas, les réactions restent réversibles lors des variations importantes de pH. Cette hydrolyse limite leurs utilisations dans des conditions spécifiques, et elles restent peu utilisables dans des systèmes vivants.

¹⁷⁴ Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. G. *Organic Chemistry*, 2nd ed.; Oxford University Press: Oxford; New York, **2012**.

¹⁷⁵ Pojer, P. The Use of Sodium Dithionite for the Reduction of Imines and the Cleavage of Oximes. *Aust. J. Chem.* **1979**, 32 (1), 201.

C.III Fonctionnalisation de la phase solide

Après avoir choisi la stratégie de synthèse adéquate du tripode qui se base principalement sur des blocs de construction portant des fonctions chimiques orthogonales, nous passons à l'immobilisation de ce composé hétérotrifonctionnel sur une surface solide par une des trois fonctions. Les deux autres fonctions servant à greffer le fluorophore d'un côté et l'analogue de l'analyte de l'autre. Le choix et les possibilités de surfaces solides ainsi que l'optimisation du mode d'accrochage seront décrits dans le chapitre 3.

La mise en œuvre du système SPIT-FRI nécessite l'immobilisation du tripode synthétisé sur un support solide où se déroule les mesures de l'intensité de fluorescence (Figure 42). Une lecture locale de l'information permet d'envisager facilement une solution multiplexée, où différentes zones seraient fonctionnalisées par différentes toxines, ce qui permettrait d'effectuer des dosages simultanés de ces toxines sur le même dispositif.

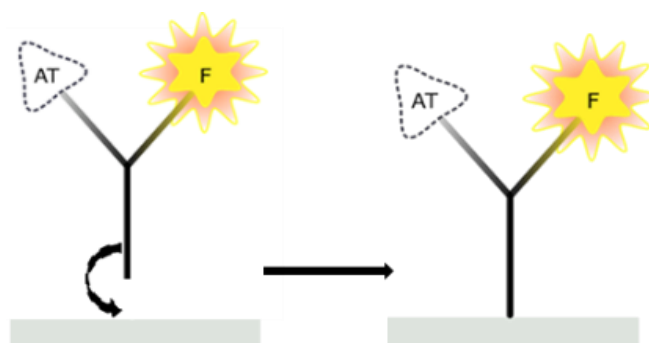


Figure 42 : Etape de fonctionnalisation du SPIT-FRI

A cette étape, le tripode, sur lequel le fluorophore est accroché, est fixé sur la phase solide. L'intensité de fluorescence (I_F) devrait être maximale (signal ON). La densité de fonctionnalisation est un paramètre important défini par le nombre des tripodes accrochés par unité de surface qui va moduler l'intensité de fluorescence. Dans le cas où la distance est très importante entre les fluorophores, elle peut engendrer un signal de fluorescence très faible. Dans une 2^{ème} possibilité où la distance est trop proche entre les fluorophores identiques accrochés, ceci peut générer une interférence entre eux. Il s'agit de « l'auto-quenching » qui peut fausser par la suite l'extinction de luminescence en présence du quencher. De plus, compte tenu de la taille importante des anticorps, si deux tripodes sont trop proches dans l'espace, l'approche des anticorps sur l'analogue de toxine pourrait être gênée, ce qui conduirait à une extinction incomplète du signal de fluorescence, et donc à un rapport signal/bruit défavorable. Afin d'éviter ces phénomènes d'interactions entre les tripodes fluorescents, il est important d'optimiser la distance entre les fluorophores. Pour ce fait, la saturation de la surface par des molécules neutres est une phase intermédiaire nécessaire. Elle permet de réduire le phénomène d'auto-quenching, l'accrochage non

spécifique des anticorps et des éléments présents dans le flux. Par manque de temps, cette phase d'optimisation n'a pas été effectuée lors de cette thèse.

C.IV Activation

L'étape qui suit la fonctionnalisation est l'étape d'activation. Elle réside dans l'introduction dans le système d'une solution d'anticorps spécifiques liés à un quencher adapté au fluorophore fixé au support solide. De ce fait, l'anticorps va s'accrocher à l'analogue de l'analyte sur surface par biorecognition (Figure 43). En absence d'analyte en flux, l'anticorps spécifique anti-analyte reste en interaction affine avec l'analogue, et se fixe sur la phase solide. Dans les conditions idéales de bio-recognition entre les anticorps et les analogues de l'analyte, la distance entre le fluorophore et le quencher devient très proche. De ce fait, le phénomène de FRET entre ces deux partenaires s'opère : le fluorophore du tripode est le donneur d'énergie et le quencher ou un autre fluorophore greffé sur l'anticorps joue le rôle d'accepteur d'énergie. Par conséquent, il en résulte la diminution de l'intensité de fluorescence (I_F) jusqu'à extinction (signal OFF). Idéalement, plus l'extinction de fluorescence est importante dans cette étape, plus grande sera l'amplitude du signal obtenu à l'étape suivante, et meilleur le rapport signal/bruit.

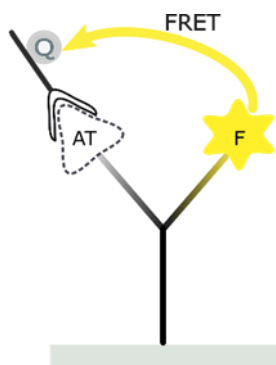


Figure 43 : Etape d'activation du SPIT-FRI

C.V Compétition immunologique

Cette étape est l'étape clé de la détection et de la quantification de l'analyte en solution. Elle se produit en présence de l'analyte à détecter dans un échantillon introduit en flux dans le système. Elle va dépendre étroitement de l'affinité des anticorps spécifiques envers l'analyte et son analogue. En présence de l'analyte en solution, une biorecognition de l'analyte par l'anticorps marqué a lieu, ce qui a pour conséquence le déplacement de celui-ci. L'éloignement de l'anticorps et de son quencher permet le rétablissement du signal de fluorescence. Autrement dit, grâce au flux engendré lors de l'analyse, les anticorps spécifiques doivent se détacher de la surface solide grâce à une meilleure reconnaissance de l'analyte que de son analogue accroché sur le tripode. Ceci se traduit par un éloignement dans l'espace du quencher par rapport au fluorophore. De ce

fait, il en résulte une diminution du FRET et un rétablissement de la fluorescence (signal de fluorescence ON) (Figure 44). Il est important de noter que le déplacement des anticorps devrait être proportionnel à la concentration en analyte dans l'échantillon (et à l'affinité respective de l'anticorps pour l'analyte et son analogue). La concentration de l'analyte peut alors être déterminée en fonction de l'intensité de fluorescence obtenue.

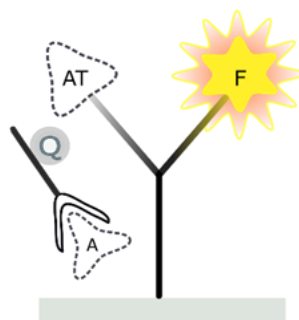


Figure 44 : Etape de compétition immunologique SPIT-FRI

C.VI Réactivation

L'étape de réactivation réside dans une éventuelle régénération du système. Pour que la phase solide soit prête pour un nouveau dosage et une nouvelle lecture en continu (Figure 42). Elle s'effectue par une simple réintroduction d'une solution d'anticorps monoclonaux marqués jusqu'à recouvrement du niveau initial du signal de la fluorescence.

Contrairement aux méthodes immunologiques citées précédemment, la méthode SPIT-FRI présente l'avantage de pouvoir être mise en œuvre sous forme de kit. Elle ne nécessite ni l'introduction de différents réactifs ni le rinçage à chaque étape du processus de détection. Elle répond aux problèmes de la consommation exhaustive des solutions réactives de l'analyte et d'autres réactifs. De plus, cette méthode ne nécessite pas d'équipements très coûteux dans les laboratoires ni des agents expérimentés pour l'analyse des résultats. Elle fournit des résultats visuels clairs par l'utilisation d'un équipement supplémentaire pour la mesure de l'intensité de fluorescence en temps réel. Une durée d'analyse très courte et une automatisation aisée sont des caractéristiques particulièrement séduisantes pour que les industriels s'intéressent à cette technique.

D. Objectifs du projet de thèse

Le besoin de techniques fiables et peu coûteuses provient d'une part d'une demande des organismes de régulation mais aussi d'un plus grand intérêt porté par le consommateur à la fiabilité des produits qu'il consomme. Comme nous avons pu le voir dans ce chapitre, un des défis actuels dans le développement des méthodes de détection des mycotoxines est la miniaturisation du dispositif tout en conservant une rapidité, une simplicité d'analyse et un

Introduction

coût contrôlé. Pour cela, les méthodes de détection par fluorescence de type « OFF-ON » sont de bonnes candidates à développer.

En particulier, la méthode SPIT-FRI précédemment décrite est le cœur de ce projet de thèse. Il s'agit du développement d'un biocapteur immunologique par la méthode immunoanalytique par compétition de type SPIT-FRI pour la détection des mycotoxines principalement de type aflatoxines **AFs** ou patuline **PAT**. Cette thèse s'inscrit dans la continuité des projets déjà effectués au sein de notre laboratoire par d'anciens doctorants, notamment le Dr. Guillaume Clavé.

Nous verrons au cours du premier chapitre, les réactifs hétérobifonctionnels ainsi que les deux différents tripodes que nous avons synthétisés. Pour ces tripodes, nous avons choisi trois fonctions orthogonales entre elles (azoture, oxyamine et thiol) pour leur compatibilité avec la méthode SPIT-FRI. Il s'agit d'une synthèse convergente nécessitant tout d'abord la synthèse de différents synthons portant chacun la fonction cible à introduire. Les deux tripodes synthétisés vont se différencier par leur fonction dédiée à l'immobilisation sur la surface d'or. Le 1^{er} tripode portant un thiol libre et le 2^{ème} un pont disulfure.

Par la suite, nous passons au deuxième chapitre qui concerne l'application des réactifs multifonctionnels, préalablement synthétisés, à la détection des mycotoxines cibles par la méthode SPIT-FRI. Ceci se fait par le greffage de différents éléments nécessaires comme le fluorophore d'un côté et les analogues de toxines **AFB2** et Patuline de l'autre côté. Ainsi que le marquage des anticorps spécifiques par des quenchers adaptables au fluorophore choisi sera discuté.

Nous finissons par le troisième chapitre consacré à la stratégie de fonctionnalisation des surfaces d'or et à la caractérisation des surfaces modifiées par les réactifs hétérobifonctionnels et les tripodes.

Chapitre 1 :

Synthèse des réactifs multifonctionnels

"Pour tout chemin menant à l'échec, il existe une autre voie plus prometteuse. C'est à vous de la trouver. Lorsque vous vous heurtez à un barrage, faites un détour"

Mary KAY ASH

Comme nous venons de le citer, une grande partie de ce projet réside dans la synthèse de différents réactifs multifonctionnels. Au cours de ce chapitre, nous nous intéresserons principalement à la synthèse des « linkers » proposés pour ce dispositif. Il s'agit d'un squelette hétérotrifonctionnel, que l'on nommera « tripode » dans la suite de cet exposé, qui porte trois fonctions chimiques distinctes, orthogonales entre elles et conjugables de façon indépendante, et séquentielle, sans étape de déprotection intermédiaire (Figure 45). Le design de cette molécule s'appuie sur un connecteur central portant trois branches fonctionnalisées (Espaceur + groupe fonctionnel). Le choix de l'espaceur et des groupes fonctionnels peut varier selon l'utilisation de ce tripode en fonction des diverses applications envisagées (immobilisation sur surface, détection des biomolécules via l'introduction d'un marqueur radioactif ou de plusieurs marqueurs suivant différentes modalités de détection).

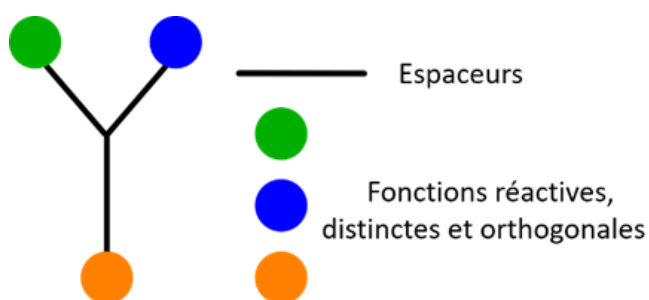


Figure 45 : Design général d'un tripode hétérotrifonctionnel

Tout d'abord, nous commencerons par étudier des exemples tirés de la littérature sur le développement des réactifs de bio-conjugaison hétérofonctionnels, puis les travaux du laboratoire qui ont conduit au développement de plusieurs générations de tripodes. Pour finir, nous aborderons le choix de la structure du tripode retenu pour ce projet et, enfin, nous discuterons des résultats obtenus.

A. Etat de l'art

A.I Généralités des différents composés hétérofonctionnels décrits dans la littérature

Le développement des molécules hétérofonctionnelles que ce soit bifonctionnelles (bipodes), trifonctionnelles (tripodes) ou tétrafonctionnelles (tétrapodes) donnent une certaine flexibilité dans la formation d'une boîte à outils (« toolbox ») de différentes architectures moléculaires orthogonales entre elles, et, si possible bio-orthogonales. Cette évolution est associée au développement de réactions chimiques accessibles pour la chimie de bio-conjugaison permettant l'introduction de différentes fonctions réactives (Voir introduction).¹⁷⁶

Les différentes synthèses décrites dans la littérature montrent une large palette d'applications de ces composés avec des substrats biocompatibles, que ce soit pour un usage thérapeutique ou analytique.¹⁷⁷ Le but est de lier de manière covalente des biomolécules sans altérer leurs propriétés biologiques. La formation de liaisons stables et irréversibles (ou potentiellement clivables sous stimulus externe), est nécessaire. Ces molécules multifonctionnelles peuvent servir dans la délivrance ciblée de biomolécules actives, la caractérisation de phénomènes biologiques, la purification de biomolécules,¹⁷⁸ ou leur détection dans des milieux biologiques complexes.

A.I.1. Réactifs hétérobifonctionnels

Les réactifs hétérobifonctionnels sont des réactifs comprenant deux groupements fonctionnels distincts l'un de l'autre (Figure 46).

¹⁷⁶ a) Singh, Y.; Spinelli, N.; Defrancq, E.; Dumy, P. A Novel Heterobifunctional Linker for Facile Access to Bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4 (7), 1413-1419. b) Clavé, G.; Volland, H.; Flaender, M.; Gasparutto, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. A Universal and Ready-to-Use Heterotrifunctional Cross-Linking Reagent for Facile; Synthetic Access to Sophisticated Bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (19), 4329. c) Wilbur, D. S.; Sandberg, B. E. B.; trifunctional reagent for conjugation to a biomolecule. U.S. Patent. **2005**. d) Beal, D. M.; Albrow, V. E.; Burslem, G.; Hitchen, L.; Fernandes, C.; Laphorn, C.; Roberts, L. R.; Selby, M. D.; Jones, L. H. Click-Enabled Heterotrifunctional Template for Sequential Bioconjugations. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, 10 (3), 548-554.

¹⁷⁷ a) Watson, H. M.; Gentry, L. E.; Asuru, A. P.; Wang, Y.; Marcus, S.; Busenlehner, L. S. Heterotrifunctional Chemical Cross-Linking Mass Spectrometry Confirms Physical Interaction between Human Frataxin and ISU. *Biochemistry* **2012**, 51 (35), 6889-6891. b) Wilbur, D. S.; Chyan, M.-K.; Hamlin, D. K.; Kegley, B. B.; Nilsson, R.; Sandberg, B. E. B.; Brechbiel, M. Trifunctional Conjugation Reagents. Reagents That Contain a Biotin and a Radiometal Chelation Moiety for Application to Extracorporeal Affinity Adsorption of Radiolabeled Antibodies. *Bioconjug. Chem.* **2002**, 13 (5), 1079-1092. c) Toyokuni, T.; Walsh, J. C.; Dominguez, A.; Phelps, M. E.; Barrio, J. R.; Gambhir, S. S.; Satyamurthy, N. Synthesis of a New Heterobifunctional Linker, N -[4-(Aminoxy)Butyl]Maleimide, for Facile Access to a Thiol-Reactive ¹⁸F-Labeling Agent. *Bioconjug. Chem.* **2003**, 14 (6), 1253-1259. d) Nury, C.; Redeker, V.; Dautrey, S.; Romieu, A.; van der Rest, G.; Renard, P.-Y.; Melki, R.; Chamot-Rooke, J. A Novel Bio-Orthogonal Cross-Linker for Improved Protein/Protein Interaction Analysis. *Anal. Chem.* **2015**, 87 (3), 1853-1860.

¹⁷⁸ Frei, A. P.; Moest, H.; Novy, K.; Wollscheid, B. Ligand-based receptor identification on living cells and tissues using TRICEPS. *Nat. Protoc.* **2013**, 8 (7), 1321-1336.

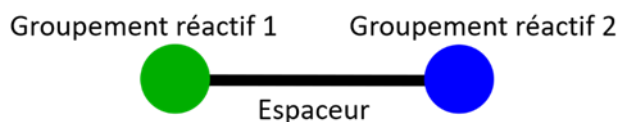


Figure 46 : Design général d'un réactif hétérobifonctionnel

Il existe plusieurs catégories d'agents hétérobifonctionnels, parmi lesquels une quarantaine d'association de fonctions réactives ont été actuellement décrites, et se développent suivant plusieurs variations concernant soit la nature de l'espaceur, soit l'introduction de nouvelles fonctions réactives.¹⁷⁹ Une grande partie de ces réactifs est disponible commercialement auprès de la société Thermo Fisher Pierce. Les réactifs hétérobifonctionnels les plus connus et développés sont ceux possédant des extrémités qui sont réactives vis-à-vis des amines, des carbonyles, des acides carboxyles, des thiols, de guanidines (arginine) ou qui sont photoréactives.

Une liste de l'ensemble de ces réactifs va au-delà des objectifs de cette introduction et le lecteur intéressé pourra se rapporter aux revues et aux ouvrages cités. A titre d'exemple, le Tableau 5 récapitule quelques exemples représentatifs de ces réactifs (**SPDP**,¹⁸⁰ **MBS**, **MPBH**,¹⁸¹ **NHS-ASA**,¹⁸² **SANPAH**,¹⁸³ **APDP**,¹⁸⁴ **ASBA**,¹⁸⁵ **APG**,¹⁸⁶...). Ces modèles ont été développés de façon à combiner les différentes fonctions spécifiques possibles afin qu'ils soient utilisés dans différentes applications en biochimie.

¹⁷⁹ Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*; Academic Press, **2013**, (6), 318-358.

¹⁸⁰ Carlsson, J.; Drevin, H.; Axén, R. Protein Thiolation and Reversible Protein-Protein Conjugation. N-Succinimidyl 3-(2-Pyridyldithio) Propionate, a New Heterobifunctional Reagent. *Biochem. J.* **1978**, 173 (3), 723–737.

¹⁸¹ Li, C.; Zolotarevsky, E.; Thompson, I.; Anderson, M. A.; Simeone, D. M.; Casper, J. M.; Mullenix, M. C.; Lubman, D. M. A Multiplexed Bead Assay for Profiling Glycosylation Patterns on Serum Protein Biomarkers of Pancreatic Cancer. *Electrophoresis* **2011**, 32 (15), 2028–2035.

¹⁸² Ji, T. H.; Ji, I. Macromolecular Photoaffinity Labeling with Radioactive Photoactivable Heterobifunctional Reagents. *Anal. Biochem.* **1982**, 121 (2), 286–289.

¹⁸³ Ballmer-Hofer, K.; Schlup, V.; Burn, P.; Burger, M. M. Isolation of in Situ Crosslinked Ligand-Receptor Complexes Using an Anticrosslinker Specific Antibody. *Anal. Biochem.* **1982**, 126 (2), 246–250.

¹⁸⁴ Yasui, N.; Koide, T. Collagen-Protein Interactions Mapped by Phototriggered Thiol Introduction. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125 (51), 15728–15729.

¹⁸⁵ Gowda, A. S. P.; Madhunapantula, S. V.; Achur, R. N.; Valiyaveetil, M.; Bhavanandan, V. P.; Gowda, D. C. Structural Basis for the Adherence of *Plasmodium Falciparum*-Infected Erythrocytes to Chondroitin 4-Sulfate and Design of Novel Photoactivable Reagents for the Identification of Parasite Adhesive Proteins. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (2), 916–928.

¹⁸⁶ Chong, S. A. C.; Lee, W.; Arora, P. D.; Laschinger, C.; Young, E. W. K.; Simmons, C. A.; Manolson, M.; Sodek, J.; McCulloch, C. A. Methylglyoxal Inhibits the Binding Step of Collagen Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282 (11), 8510–8520.

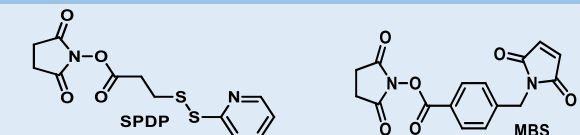
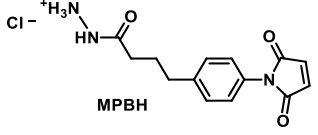
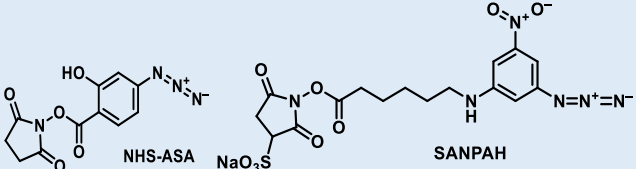
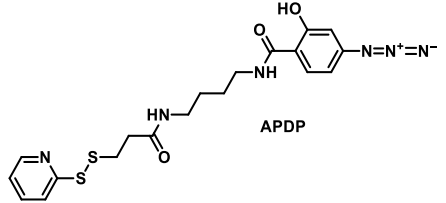
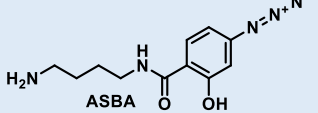
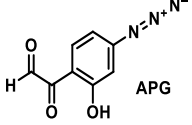
Réactifs hétérobifonctionnels	Réactivité	
	Amine	Thiol
	Carbonyle/aldéhyde	Thiol
	Amine	Photoréactive
	Thiol	Photoréactive
	Carboxyle	Photoréactive
	Guanidine	Photoréactive

Tableau 5 : Quelques exemples des réactifs hétérobifonctionnels commercialisés en France par la société Pierce

La diversité de ces réactifs donne la possibilité aux chercheurs de développer d'autres agents hétérobifonctionnels plus complexes et élaborés mettant en œuvre des applications spécifiques pour la modification des biomolécules.¹⁸⁷ Quelques exemples sélectionnés pour leur pertinence vis-à-vis des objectifs de cette thèse sont présentés ci-après.

¹⁸⁷ a) Singh, Y.; Spinelli, N.; Defrancq, E.; Dumy, P. A Novel Heterobifunctional Linker for Facile Access to Bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4 (7), 1413 b) Toyokuni, T.; Walsh, J. C.; Dominguez, A.; Phelps, M. E.; Barrio, J. R.; Gambhir, S. S.; Satyamurthy, N. Synthesis of a New Heterobifunctional Linker, N-[4-(Aminoxy)Butyl]Maleimide, for Facile Access to a Thiol-Reactive ¹⁸F-Labeling Agent. *Bioconjug. Chem.* **2003**, 14 (6), 1253–1259 c) Ahad, A. M.; Jensen, S. M.; Jewett, J. C. A Traceless Staudinger Reagent To Deliver Diazirines. *Org. Lett.* **2013**, 15 (19), 5060–5063 d) Walko, M.; Hewitt, E.; Radford, S. E.; Wilson, A. J. Design and Synthesis of Cysteine-Specific Labels for Photo-Crosslinking Studies. *RSC Adv.* **2019**, 9 (14), 7610–7614.

Les chercheurs Misra et Dwivedi ont développé un réactif hétérobifonctionnel **TPMC** (N-(3-triéthoxysilylpropyl)-4-(N'-maleimidylmethyl)cyclohexanamide).¹⁸⁸ Il porte une fonction triéthoxysilyl permettant son immobilisation sur une surface en verre et un groupement maléimide réactif vis-à-vis d'oligonucléotides préalablement fonctionnalisés par un thiol (Figure 47). Dans cet exemple, le réactif **TPMC** a été utilisé pour étudier l'hybridation de brins d'ADN complémentaires afin de développer par la suite une puce à ADN.

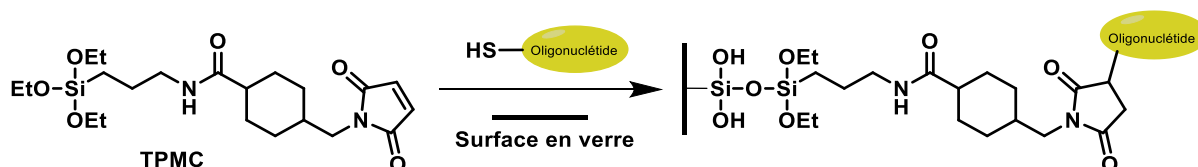


Figure 47 : Immobilisation d'oligonucléotides sur une surface en verre¹⁸⁸

L'utilisation d'autres surfaces d'immobilisation a également fait l'objet de nombreux travaux comme ceux de l'équipe de Wang.¹⁸⁹ Le **SSTN** (pour « Succinic acid Succinimidyl ester 5-Thioxyloxy-2-Nitrobenzyl ester ») développé dans cet exemple est un réactif hétérobifonctionnel photoclivable (Figure 48).

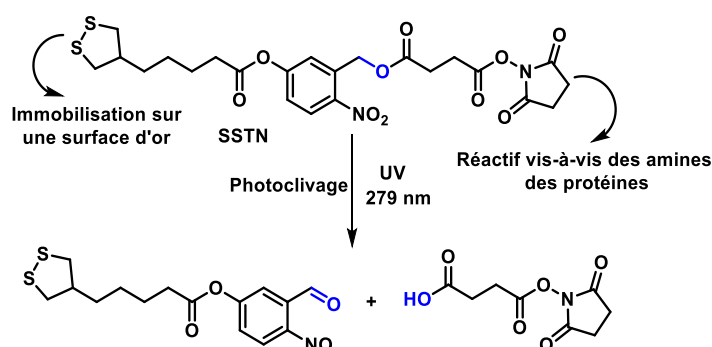


Figure 48 : Principe de l'application de la **SSTN**

La fonction 1,2-dithiolane (un dérivé de l'acide thiooctique), après sa réduction *in situ*, permet l'immobilisation de la molécule sur une surface d'or, tandis que le groupement ester de succinimide, réactif vis-à-vis des amines, permet l'accroche d'une protéine d'intérêt. Sous irradiation lumineuse, le linker **SSTN** photoréactif au niveau de la liaison C-O de l'ester de 2-nitrobenzyle peut être clivé en deux parties ce qui permet de libérer la protéine en solution de manière contrôlée.

¹⁸⁸ Misra, A.; Dwivedi, P. Immobilization of Oligonucleotides on Glass Surface Using an Efficient Heterobifunctional Reagent through Maleimide–Thiol Combination Chemistry. *Anal. Biochem.* **2007**, 369 (2), 248–255.

¹⁸⁹ Yan, F.; Chen, L.; Tang, Q.; Wang, R. Synthesis and Characterization of a Photocleavable Cross-Linker and Its Application on Tunable Surface Modification and Protein Photodelivery. *Bioconjug. Chem.* **2004**, 15 (5), 1030–1036.

La validation du concept de photoclivage a été démontrée par l'utilisation d'une biotine marquée par un fluorophore Alexa 488. Cette biotine possède une forte affinité pour l'avidine immobilisée sur une surface d'or via le « crosslinker » **SSTN** (Figure 49) ce qui conduit à une surface fortement fluorescente. Suite à la photo-irradiation et à la rupture de la liaison photoclivable, la fluorescence de la surface disparaît démontrant le relargage en solution du complexe avidine/biotine.

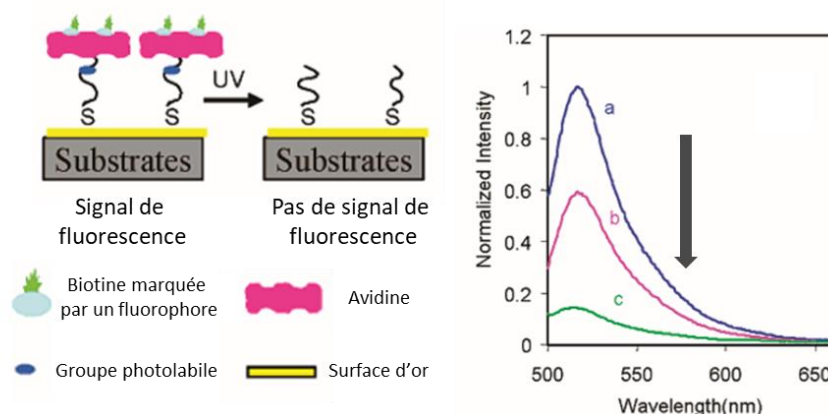


Figure 49 : Libération photoinduite d'une protéine sur une surface d'or¹⁸⁹

Pour étendre et diversifier le champ des applications biologiques de ces réactifs hétérofonctionnels, il s'est avéré incontournable d'adapter le design de ces réactifs de bio-conjugaison à des réactifs hétérotrifonctionnels portant trois fonctions orthogonales et non pas deux. Ceci est d'ailleurs indispensable pour la mise en œuvre de notre méthode SPIT-FRI.

A.1.2. Réactifs hétérotrifonctionnels

L'étude bibliographique effectuée montre une large palette de réactifs hétérotrifonctionnels dans la littérature, même si les réactifs « prêts à l'emploi », et donc ne nécessitant pas de réaction de déprotection, sont beaucoup plus rares. Nous allons décrire quelques exemples, parmi les plus représentatifs, afin de présenter leurs différences structurales ainsi que leurs applications.

Une première famille de connecteur possédant trois fonctions modifiables sur lesquelles greffer les trois fonctions de bio-conjugaison requises pour les réactifs hétérotrifonctionnels est constituée par les acides aminés. Vingt acides aminés protéinogéniques existent dans la nature, mais seuls ceux possédant une chaîne latérale portant une troisième fonction réactive en plus de l'acide carboxylique et de l'amine sont employés pour réaliser des réactions de bioconjugaison,¹⁹⁰ ou pour la construction de

¹⁹⁰ Koniev, O.; Wagner, A. Developments and Recent Advancements in the Field of Endogenous Amino Acid Selective Bond Forming Reactions for Bioconjugation. *Chem Soc Rev* **2015**, 44 (15), 5495–5551.

réactifs trifonctionnels. Il s'agit principalement de la Lysine, la Cystéine, la Serine, les Acides Aspartique et Glutamique, l'Arginine et la Tyrosine. Chacun d'entre eux possède une particularité structurale (Figure 50), au niveau de leur charge, de leur capacité à établir des liaisons hydrogènes, de leur réactivité, ou de leur potentiel d'hydrosolubilité. Dans leur état non protoné (ou déprotoné), leur chaîne latérale peut constituer un site nucléophile capable de se lier à d'autres fonctions possédant un site électrophile. L'acide aminé le plus utilisé en bioconjugaison est la lysine pourvue de trois fonctions modifiables (deux amines en positions α et ϵ et un acide carboxylique).¹⁹¹

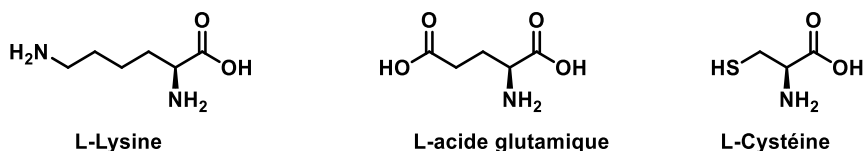


Figure 50 : Structures de quelques acides aminés utilisés dans la synthèse des réactifs hétérotrifonctionnels

A.I.2.1 Premiers exemples de réactifs hétérotrifonctionnels : Réactifs de photocross-link à cœur lysine

L'**ABNP** (4-Azido-2-nitrophenylBiocystin-4-NitroPhenyl), dont la structure est représentée dans la Figure 51, peut être considérée comme le premier modèle de type hétérotrifonctionnel bien qu'il ne comporte formellement que deux fonctions réactives, le troisième site d'interaction avec des biomolécules étant une biotine. Il a été développé en 1989 par l'équipe de Wedekind afin de mettre en évidence le récepteur associé à une hormone, et le site spécifique de liaison du ligand de ce récepteur hormonal, celui associé à l'insuline (NB-insuline).¹⁹²

¹⁹¹ Stephanopoulos, N.; Francis, M. B. Choosing an Effective Protein Bioconjugation Strategy. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7 (12), 876–884.

¹⁹² Wedekind, F.; Baer-Pontzen, K.; Bala-Mohan, S.; Choli, D.; Zahn, H.; Brandenburg, D. Hormone Binding Site of the Insulin Receptor: Analysis Using Photoaffinity-Mediated Avidin Complexing. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* **1989**, 370 (1), 251–258.

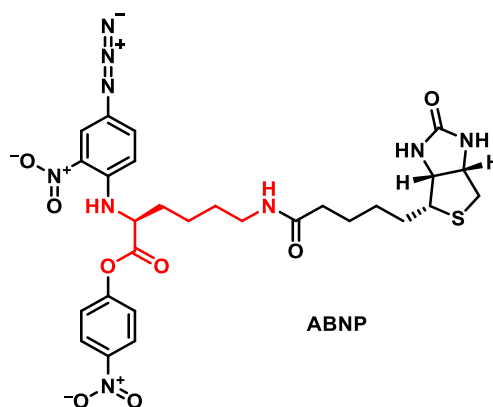


Figure 51 : Structure de l'**ABNP**

Le cœur de ce réactif hétérotrifonctionnel est une lysine modifiée au niveau de ses trois fonctions afin d'incorporer :

- Un réactif de « photocrosslink », l'azoture d'aryle qui est réactif vis-à-vis des nucléophiles une fois activé sous irradiation UV ($\lambda > 300$ nm), afin de générer une liaison covalente avec le récepteur s'il est à sa proximité (sinon, il réagit avec l'eau). En effet, l'activation par UV permet la décomposition de l'azoture **AZ** en nitrène **NIT** qui se réarrange par extension de cycle en déshydroazépine **DHDiaz** permettant l'incorporation d'un nucléophile **Nu-DHDiaz** (Figure 52).

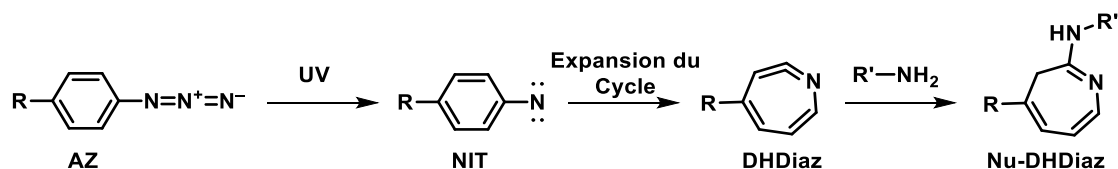


Figure 52 : Principe de l'activation d'un azoture d'aryle

- Un ester activé de para-nitrophényle réactif vis-à-vis des nucléophiles, spécifiquement vis-à-vis des amines des protéines, et donc de l'insuline, le ligand du récepteur. Ce motif est introduit au niveau de la fonction amine en position α .
- Un motif biotine introduit au niveau de la fonction acide carboxylique. Il possède une forte affinité avec l'avidine ou la streptavidine pour former des complexes stables¹⁹³ permettant de purifier et d'isoler les récepteurs ayant lié l'insuline par chromatographie d'affinité.

Associé à différentes hormones, ce réactif permet de lier de façon covalente le récepteur spécifique de cette hormone à la biotine, et donc d'isoler puis d'identifier ce récepteur. Cependant, l'**ABNP** possède plusieurs inconvénients qui limitent son utilisation

¹⁹³ Diamand, P. The Biotin-(Strept)Avidin System: Principles and Applications in Biotechnology. Clin. Chem. **1991**, 37 (5), 625-636.

d'une manière simple parmi lesquels sa structure hydrophobe qui oblige à le solubiliser dans un milieu organique (DMF ou DMSO par exemple) avant de rajouter le milieu aqueux. Dans cet exemple, les chercheurs ont par exemple dû travailler avec un mélange DMF/H₂O (9 :1 v/v). L'ajout d'un grand volume de solvant organique peut engendrer la dénaturation des protéines lors de leur dérivatisation.

Pour améliorer la solubilité de ce réactif hétérotrifonctionnel, Ed Fujimoto a développé le **Sulfo-SBED** (Sulfosuccinimidyl-2-[6-(biotinamido)-2-(pazidobenzamido)hexanoamido] ethyl-1,3'- dithiopropionate) (Figure 53).¹⁹⁴ Ce réactif est un dérivé de biocytine formé à partir de la biotine et de la lysine.

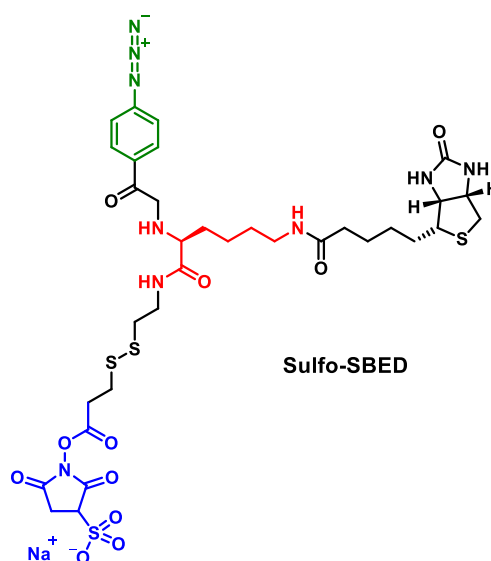


Figure 53 : Structure du **Sulfo-SBED**

Ce réactif possède un groupement *N*-hydroxysuccinimide sulfonaté (un groupe ester de NHS, réactif avec des amines primaires à pH 7-9), ce qui le rend hydrosoluble et biocompatible dans des milieux biologiques, et permet d'accrocher le ligand dont on cherche à identifier le récepteur spécifique. Le **Sulfo-SBED** porte aussi :

- Une fonction azoture d'aryle photoactivable par irradiation UV.
- Un motif biotine introduit comme un ligand affiné pour le marquage avec une streptavidine portant un fluorophore, ou la purification par chromatographie d'affinité.

Sa spécificité est le pont disulfure porté sur le même bras que l'ester activé. Le clivage de ce pont (en présence d'agents réducteurs classiques tels que le DTT ou le TCEP) permet de séparer le ligand du récepteur, et donc facilite les étapes d'identification du récepteur.

¹⁹⁴ Fujimoto, E. K. Biotin containing heterobifunctional cleavable compounds. US Patent **1996**.

Une des applications les plus marquantes du **Sulfo-SBED** a été proposée par l'équipe de L. S. Busenlehner.¹⁹⁵ Le but était de comprendre le mécanisme d'une maladie neurodégénérative héréditaire appelée l'ataxie de Friedreich (FA). Elle est principalement la conséquence d'une déficience en frataxine (Fxn) (une protéine mitochondriale provoquant un stress oxydatif) ainsi qu'un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, provoquant ainsi une accumulation de fer mitochondrial. Cette approche a permis de comprendre le rôle joué par Fxn et de fournir une liste des interactions transitoires de Fxn avec d'autres protéines mitochondriales comme la protéine ISU qui ont été identifiées par spectrométrie de masse.

Pour identifier les interactions physiques (directes et transitoires) entre Fxn et la protéine ISU, le **Sulfo-SBED** a été utilisé comme un « cross-linker » photoactivable (Figure 54). L'ester activé (sulfonaté) a été utilisé pour lier Fxn au **Sulfo-SBED**, la photoactivation de l'azoture de phényle permet de lier de façon covalente Fxn avec les protéines (dont la protéine ISU) avec lesquelles elle est proche spatialement, donc potentiellement interagit. Le complexe est purifié grâce à la biotine, puis la réduction du pont disulfure permet la séparation du complexe biotine-ISU d'un côté et le bras portant le peptide Fxn de l'autre côté afin de faciliter l'analyse des différents produits issus de la ligation photoactivée.

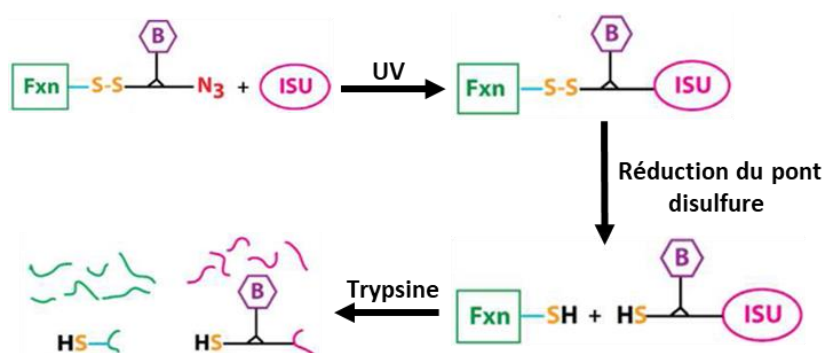


Figure 54 : Etapes des identifications des interactions par utilisation du **Sulfo-SBED**

Deux autres réactifs hétérotrifonctionnels (Figure 55) qui ressemblent au **Sulfo-SBED** ont également été décrits : **Mts-Atf-Biotin** pour « Methanethiosulfonate- Azidotetrafluoro-Biotin » et **Mts-Atf-LC-Biotin** pour « Methanethiosulfonate-Azidotetrafluoro-Long Chain-Biotin ».

¹⁹⁵ Watson, H. M.; Gentry, L. E.; Asuru, A. P.; Wang, Y.; Marcus, S.; Busenlehner, L. S. Heterotrifunctional Chemical Cross-Linking Mass Spectrometry Confirms Physical Interaction between Human Frataxin and ISU. *Biochemistry* **2012**, 51 (35), 6889–6891.

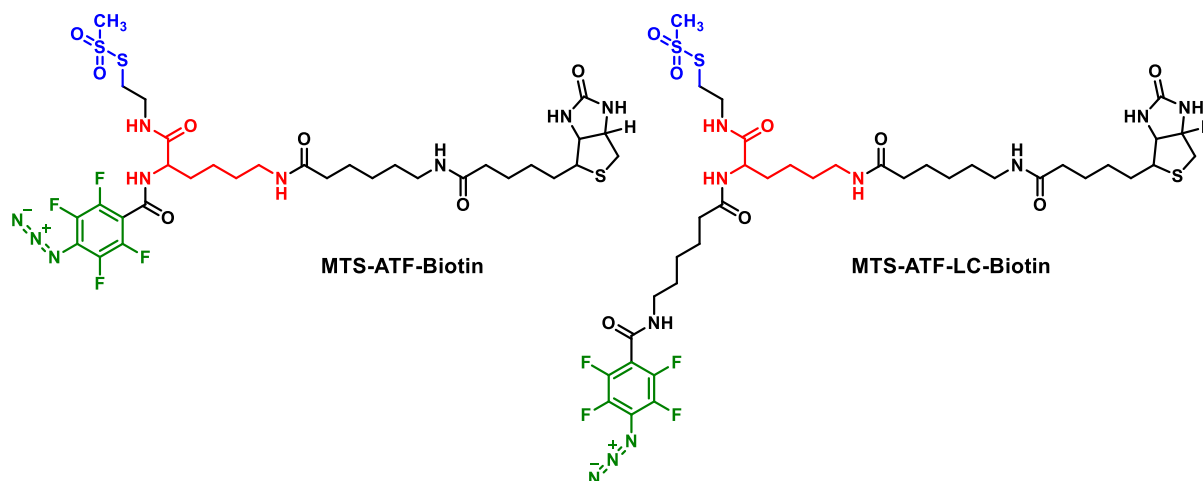


Figure 55 : Structures du **Mts-Atf-Biotin** et du **Mts-Atf-LC-Biotin**

Leur spécificité est la présence d'un dérivé azoture d'aryle perfluoré (Atf).¹⁹⁶ Ce groupe photoréactif permet de limiter l'étape d'expansion de cycle du nitrène, qui requiert un nucléophile pour réaliser la liaison covalente, ce qui réduit considérablement l'efficacité du photo-crosslink. Le nitrène perfluoré, moins réactif mais plus stable que son analogue hydrogéné, est capable, lui, de former des aziridines en s'additionnant directement sur des doubles liaisons ou donne lieu à des réactions d'insertion dans des liaisons N-H et C-H. De plus, l'ester activé du **Sulfo-SBED** est remplacé par un groupe méthaneethiosulfonate (Mts) réactif vis-à-vis des thiols.¹⁹⁷ La variation de la longueur des chaînes sur les deux structures permet d'obtenir une flexibilité supplémentaire sur la distance entre les protéines en interaction.

Les réactifs hétérotrifonctionnels commerciaux à cœur lysine, précédemment présentés, possèdent un certain nombre de limites : tout d'abord, l'hydrophobie de certains composés nécessite d'effectuer les réactions de bio-conjugaison en milieu comportant une proportion importante de solvant organique. Ensuite, la présence des groupements d'azoture d'aryle photoactivables est aussi une vraie contrainte car ils nécessitent une instrumentation particulière pour leur activation sous lumière UV ($\lambda > 350$ nm) afin de limiter la dégradation photoinduite des biomolécules. En effet, les azotures d'aryle ainsi que les benzophénones, autres groupements photoactivables utilisés dans les photocrosslinkers sont moins amenés à des incorporations métaboliques vues leurs tailles importantes. Et

¹⁹⁶ a) Peled, A.; Naddaka, M.; Lellouche, J.-P. Smartly Designed Photoreactive Silica Nanoparticles and Their Reactivity. *J. Mater. Chem.* **2011**, 21 (31), 11511 b) Pinney, K. G.; Katzenellenbogen, J. A. Synthesis of a Tetrafluoro-Substituted Aryl Azide and Its Protio Analog as Photoaffinity Labeling Reagents for the Estrogen Receptor. *J. Org. Chem.* **1991**, 56 (9), 3125–3133.

¹⁹⁷ Kenyon, G. L.; Bruice, T. W. [40] Novel Sulfhydryl Reagents. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, **1977**, 47, 407–430.

enfin, la fonction Mts et les esters activés sont sensibles à l'hydrolyse en solution aqueuse et la biotine n'offre que peu de possibilités en termes de bio-conjugaison.

Ainsi, de nombreux chercheurs se sont intéressés au développement de réactifs hétérotrifonctionnels novateurs permettant de pallier ces limitations, et d'offrir plus de flexibilité et de perspectives d'utilisation des réactifs hétérotrifonctionnels.

A.I.2.2 Les réactifs hétérotrifonctionnels en littérature

Toujours en se fondant sur un cœur lysine, l'équipe de Beal a mis au point un réactif hétérotrifonctionnel **TB** répondant aux exigences des applications visées : la formation de plusieurs liaisons d'une manière simple, rapide et séquentielle avec des substrats biocompatibles (Figure 56). Ce réactif permet une bio-conjugaison séquentielle des biomolécules en « one pot », même s'il nécessite une déprotection d'un thioester pour libérer une des trois fonctions réactives, et requiert d'effectuer les ligations dans un ordre bien précis pour différencier les deux alcynes.^{176d}

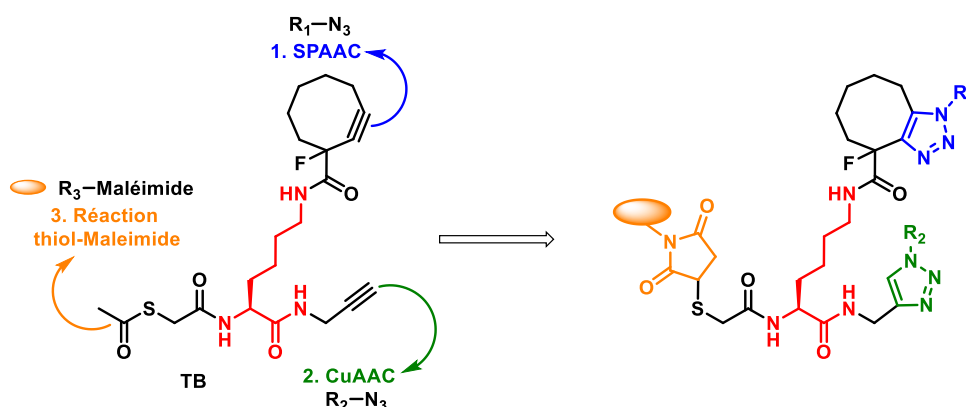


Figure 56 : Réactivité de **TB**

Ce réactif hétérotrifonctionnel a été utilisé pour différentes applications, comme la création d'une bibliothèque d'épitopes discontinus sur des surfaces protéiques, ou la création de réseaux de glycanes pour le ciblage tissulaire et pour la délivrance thérapeutique ce qui pourra amener à la création des vaccins synthétiques. De même, l'équipe de Beal a introduit sur le tripode une biotine, un fluorophore et un marqueur fluoré.

La synthèse de cette molécule est basée sur un connecteur principal -Lys(Boc)-OH permettant l'incorporation de trois groupements différents :

- La propargylamine afin de générer une fonction azoture pour la cycloaddition 1,3-dipolaire (CuAAC).
- Un cyclooctyne (acide 1-fluorocyclooct-2-yne carboxylique), un bon candidat pour la réaction SPAAC.

- Un thiol permettant le greffage de n'importe quel substrat contenant un motif maléimide. Mais la déprotection du thioester nécessite l'ajout d'hydroxylamine en dernière étape, ce qui peut être une limitation.

L'ordre d'ajout de ces réactifs n'était pas aléatoire en raison de l'instabilité du cyclooctyne en milieu acide. Cependant, le choix de cette synthèse en utilisant la réaction SPAAC conduit à la formation de quatre isomères à la fin de la synthèse, difficiles à séparer.

En 2013, une collaboration entre les équipes de recherche de l'ETH de Zurich (Wollscheid et Erick Carreira) a permis de créer un réactif multifonctionnel et biocompatible, le **TRICEPS** « Trifunctional Chromoproteomic Reagent », conçu pour l'étude des interactions ligands-récepteurs (Figure 57).¹⁹⁸

Il comprend :

- Un ester activé sous forme NHS pour le couplage des protéines et des ligands peptidiques via leurs fonctions amines primaires terminales.
- Une hydrazine, protégée par un groupement trifluoroacétyle, réactive vis-à-vis des aldéhydes.
- Un motif biotine qui possède une affinité avec la streptavidine. Il sert pour la purification des glycopeptides capturés par chromatographie d'affinité et leur caractérisation par spectrométrie de masse quantitative.

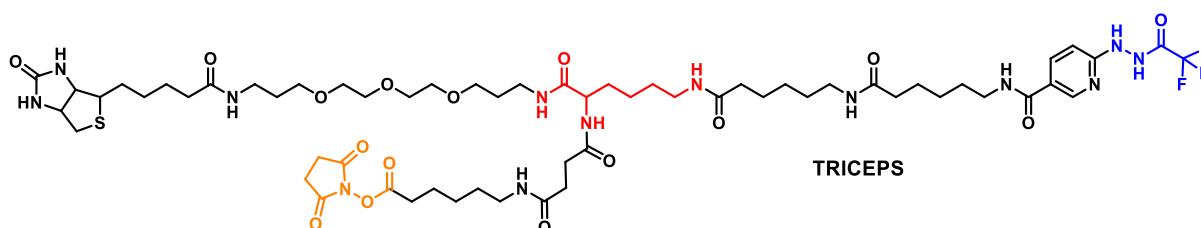


Figure 57 : Structure de **TRICEPS**

Ce motif **TRICEPS** est un motif biocompatible. Son marquage sur des virus a permis de mettre en évidence plusieurs ligands protéiques sur les membranes de certaines cellules humaines.¹⁹⁸

En 2015, l'équipe de Swarts a mis au point un réactif de photomarquage d'affinité associé à une biotine, le **BCN-DAZ-Biotin** (Figure 58), utilisable *in vivo* sur des biomolécules modifiées avec un motif azoture. L'application visée est orientée sur l'identification d'interactions avec des sucres portant des motifs azotures incorporés par voie métabolique,

¹⁹⁸ Frei, A. P.; Jeon, O.-Y.; Kilcher, S.; Moest, H.; Henning, L. M.; Jost, C.; Plückthun, A.; Mercer, J.; Aebersold, R.; Carreira, E. M.; Wollscheid, B. Direct Identification of Ligand-Receptor Interactions on Living Cells and Tissues. *Nat. Biotechnol.* **2012**, 30 (10), 997–1001.

présents à la surface de la mycobactérie *Mycobacterium tuberculosis* responsable de la tuberculose.¹⁹⁹ Ainsi, l'introduction d'une chaîne PEG dans ce réactif le rend hydrosoluble dans des milieux biologiques pour faciliter les tests sur cellules vivantes. La seule limitation à améliorer sur ce réactif est sa taille pour avoir une meilleure réactivité de l'azoture d'une manière plus sélective et plus rapide.

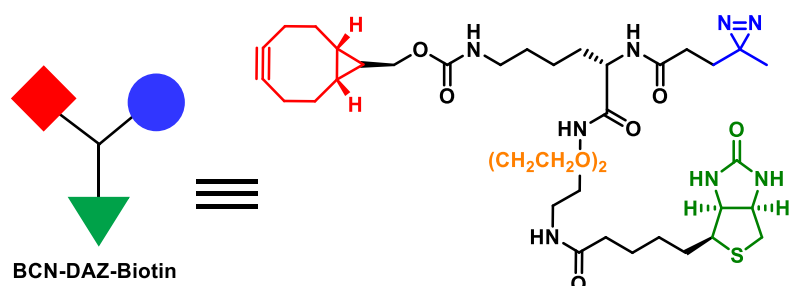


Figure 58 : Structure du photoréactif hétérotrifonctionnel **BCN-DAZ-Biotin**

Il a été conçu pour mettre en évidence une interaction entre deux biomolécules dans une cellule vivante par deux modifications bio-orthogonales (Figure 59). La 1^{ère} biomolécule est modifiée par l'introduction d'un azoture (sur un sucre ou une protéine). Ensuite, le ligand **BCN-DAZ-Biotin** est incorporé via une réaction SPAAC entre son groupement cyclooctyne et la fonction azoture de la 1^{ère} biomolécule marquée. La fonction diazirine, espèce photoactivable libérant un carbène, permet de former une liaison covalente avec la seconde biomolécule d'intérêt si elle interagit avec la première. Comme dans les autres réactifs de photomarquage d'affinité hétérotrifonctionnels présentés précédemment, la biotine est introduite pour la détection ou la purification du complexe par affinité avec l'avidine.

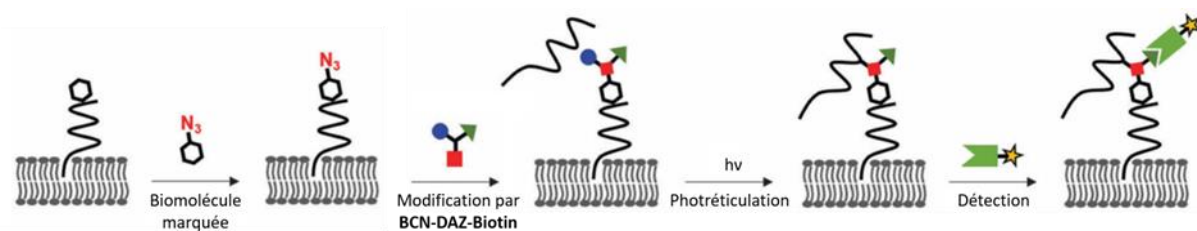


Figure 59 : Principe de l'utilisation de **BCN-DAZ-Biotin** pour l'approche des interactions biomoléculaire¹⁹⁹

Comme nous venons de le voir, l'intérêt d'utiliser la biotine, ici, est d'exploiter ses propriétés de reconnaissance spécifique vis-à-vis de l'avidine et de la streptavidine de façon non covalente et réversible, dans la purification de protéines.

¹⁹⁹ Stewart, J. A.; Piligian, B. F.; Rundell, S. R.; Swarts, B. M. A Trifunctional Cyclooctyne for Modifying Azide-Labeled Biomolecules with Photocrosslinking and Affinity Tags. *Chem. Commun.* **2015**, 51 (99), 17600–17603.

Globalement, tous ces exemples de réactifs hétérotrifonctionnels sont fondés sur un cœur lysine, et tirent parti d'une série de protection/déprotection sélective des deux amines pour introduire les trois fonctions de bioconjugaison. Mais d'autres connecteurs ont été décrits.

Récemment, une autre approche pour la synthèse d'un réactif hétérotrifonctionnel **TK** (Figure 60) a été développée par l'équipe du Dr Knall.²⁰⁰

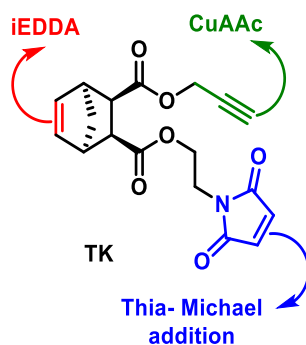


Figure 60 : Structure du composé **TK**

Elle est basée sur la chimie click en « one pot », le connecteur étant constitué par l'un des réactifs, à savoir le norborène. Effectivement, la stratégie repose sur la combinaison de trois fonctions différentes orthogonales qui vont réagir selon trois types de réactions de la chimie click : une réaction de type Diels-Alder à demande inverse en électrons (iEDDA) entre une tétrazine et un alcène tendu (ici un dérivé de norbornène), une cycloaddition de Huisgen entre un alcyne vrai et un azoture, une addition de type thia-Michael entre un thiol et un maléimide.

D'autres édifices moléculaires hétérotrifonctionnels ont été développés par les équipes de Goody et Waldmann fondés sur un cœur benzénique pour des fonctionnalisations de surface et des applications protéomiques.²⁰¹ Comme l'illustre la Figure 61, cette approche a permis le marquage d'une protéine par un fluorophore Cy5.0 et son immobilisation sur une surface solide via une ligature de type Staudinger.

²⁰⁰ Knall, A.-C.; Hollauf, M.; Saf, R.; Slugovc, C. A Trifunctional Linker Suitable for Conducting Three Orthogonal Click Chemistries in One Pot. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (45), 10576–10580.

²⁰¹ Watzke, A.; Gutierrez-Rodriguez, M.; Kohn, M.; Wacker, R.; Schroeder, H.; Breinbauer, R.; Kuhlmann, J.; Alexandrov, K.; Niemeyer, C.; Goody, R. S.; Waldmann, H. A Generic Building Block for C- and N-Terminal Protein-Labeling and Protein-Immobilization. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14* (18), 6288–6306.

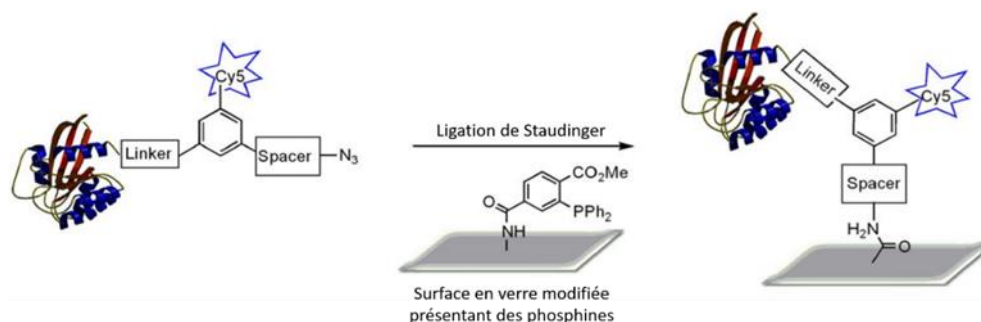


Figure 61 : Principe du tripode développé par l'équipe de Waldmann et Goody²⁰¹

Cependant, lors de ces travaux, une limitation principale est à relever : la non-orthogonalité des trois fonctions de bioconjugaison utilisées, ce qui nécessite des étapes de déprotection non compatibles avec l'ensemble des partenaires. Si on analyse plus précisément la publication, il s'avère que ces équipes n'ont pas réussi à utiliser réellement le dispositif décrit. En effet, après l'immobilisation du réactif hétérotrifonctionnel sur résine, une première dérivatisation a été tentée. Malheureusement, le couplage peptidique avec la fonction acide carboxylique du fluorophore Cy5.0 n'a pas abouti, pas plus que l'immobilisation du dérivé sur une surface solide via une ligation de type Staudinger. En effet, une adsorption non spécifique de la Cy5.0 sur la résine a été observée expliquant pourquoi le couplage n'a pas pu être effectué. Ceci a amené les équipes à faire la preuve du concept en solution et sur surface par différentes dérivatisations sur le tripode à cœur benzénique en changeant les conditions opératoires, et en jouant sur les groupes protecteurs. Dans ce cas-là, l'introduction de la cyanine pour rendre la protéine fluorescente a été effectuée en une 2^{ème} étape en introduisant un anticorps anti-protéine, marqué au préalable par Cy5.0 (Cy5-anti-RAS).

Ces travaux montrent bien la difficulté à mettre au point des réactifs hétérotrifonctionnels et à les utiliser d'une manière efficace en bio-conjugaison séquentielle.

A.I.2.3 Les réactifs hétéromultifonctionnels développés au sein de l'équipe

Au fil des années, l'équipe de chimie bio-organique de l'UMR 6014 CNRS COBRA a développé et optimisé la synthèse d'une nouvelle famille de réactifs hétérotrifonctionnels « tripodes » et de réactif hétérotétrafonctionnel « tétrapode ». Ils permettent l'association covalente, contrôlée et séquentielle de trois ou quatre partenaires dans des conditions douces et compatibles avec la stabilité des molécules d'intérêt biologique.

L'objectif est d'obtenir des tripodes « prêts à l'emploi », ne nécessitant pas d'étapes de protection / déprotection / purification intermédiaire, et de pouvoir greffer sur un connecteur unique des fonctions orthogonales entre elles, voire bio-orthogonales. En

parallèle à la diversification des trois fonctions de bioconjugaison présentes sur le tripode, plusieurs cœurs différents ont été évalués, afin d'adapter l'orientation spatiale des trois fonctions, et le choix a été fait d'incorporer un ou plusieurs motifs éthylène glycol afin de pouvoir moduler à la fois l'hydrosolubilité du tripode, et la distance entre les trois fonctions. Un des inconvénients des exemples cités précédemment est le manque de solubilité des tripodes dans des tampons aqueux. Afin d'améliorer cet aspect, l'utilisation d'espaceurs hydrophiles est primordiale. Le polyéthylène glycol (PEG) et ses dérivés ont été choisis comme des espaceurs neutres, mais hydrosolubles à l'extrémité desquelles les fonctions de greffage peuvent être fixées. D'une part, l'utilisation des chaînes PEG comme bras espaceurs dans une architecture moléculaire permet de faire varier la longueur de cette chaîne en fonction de son application. Ceci nous permettrait d'optimiser la distance entre les trois fonctions greffées et notamment la distance entre le tripode et la surface du dispositif. D'autre part, le choix des chaînes PEG modifiées comme espaceur apporterait un minimum de rigidification de la structure afin d'éviter le repliement sur la surface.

La finalité de cette stratégie est d'obtenir une molécule, constituée d'un connecteur central sur lequel sont assemblés, de façon covalente, trois bras espaceurs portant à leurs extrémités trois fonctions orthogonales et bio-conjugables. Ces fonctions doivent réagir avec différents partenaires de manière séquentielle et sélective. Cette approche est basée sur la synthèse de trois synthons rassemblés via des liaisons covalentes par différentes réactions chimiques simples. Plusieurs générations de tripodes ont été développées afin de correspondre aux exigences et aux paramètres de l'application SPIT-FRI.

Les 1^{ers} travaux au sein de l'équipe ont été brevetés en 2007 en collaboration avec le Dr. Hervé Volland²⁰² du CEA-Saclay sous l'intitulé "Réactif pseudo-peptidique trifonctionnel, ses utilisations et applications".

Les tripodes de 1^{ère} génération synthétisés au sein de l'équipe ont reposé sur une architecture basée sur un squelette di-peptidique comprenant une cystéine, une lysine et deux chaînes PEG.

La stratégie de la synthèse consistait à préparer indépendamment trois blocs conjugables portant des fonctions réactives qui sont ensuite assemblées séquentiellement sur le tripode (Figure 62) :

- Une fonction thiol protégée sous forme de disulfure, sur la cystéine, capable de réagir sélectivement avec tout substrat comportant un groupement électrophile mou comme un maléimide, un iodoacétyle ou un disulfure activé.

²⁰² Volland, H.; Clavé, G.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Three-Functional Pseudo-Peptidic Reagent, and Uses and Applications Thereof. EP2178834A1, April 28, **2010**.

- Une oxyamine, préalablement protégée (par exemple sous forme d'oxycarbamate par un groupement Fmoc) permettant, après déprotection, une ligation oxime avec tout substrat portant une fonction carbonyle, et en particulier aldéhyde. Le choix de cette fonction était dicté par la technologie brevetée par le CEA-LETI, de modification d'une surface de verre avec des fonctions aldéhyde.
- Finalement, une fonction amine primaire libre destinée à réagir avec des biomolécules portant des acides carboxyliques.

La synthèse du tripode **T1.1** s'effectue en 13 étapes dont 7 étapes pour la synthèse de synthon **A1.1**, 1 étape pour la synthèse de synthon **B1.1**, 2 étapes pour **C1.1** et 3 étapes pour l'assemblage de ces trois blocs moléculaires, avec un rendement global (sur les 3 étapes) de 54% sur une échelle de quelques milligrammes.

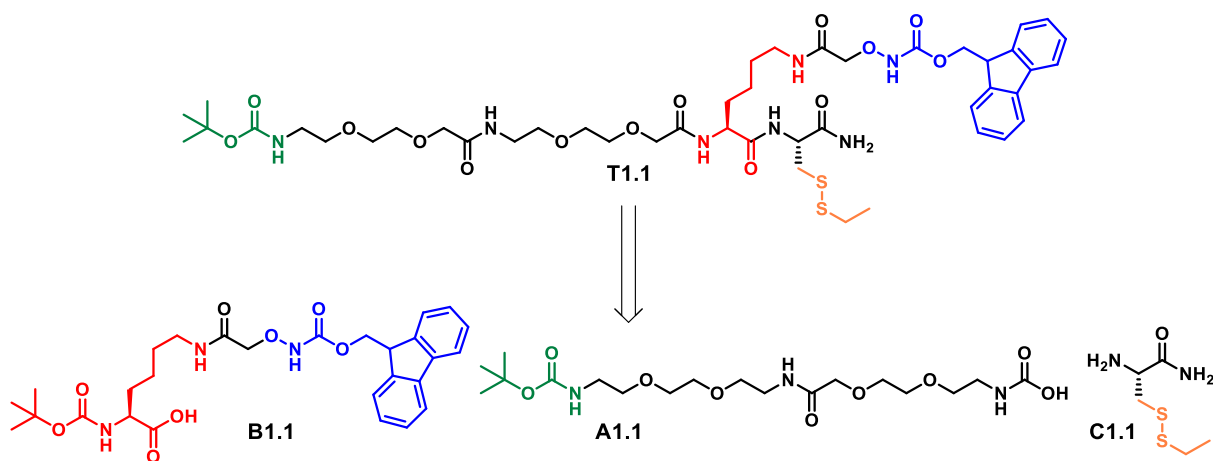


Figure 62 : Rétrosynthèse du tripode de 1^{ère} génération **T1.1**

A partir de **T1.1**, le tripode **T1.2** a été également synthétisé (Figure 63) par déprotection du groupement Boc au TFA avec un rendement global sur 4 étapes de 46%. Il est aussi possible de convertir la fonction amine libre du tripode **T1.2** en carbamate activé, réactif vis-à-vis des nucléophiles durs (en l'occurrence des amines) pour aboutir à un 3^{ème} tripode **T1.3** de la même génération portant deux fonctions protégées et une amine activée avec un rendement global de 34%. Ceci donne une certaine flexibilité pour modifier la réactivité des bras sans la nécessité de resynthétiser tout le tripode. Le carbamate de NHS a été choisi de par sa plus grande stabilité aqueuse qu'un ester de NHS.

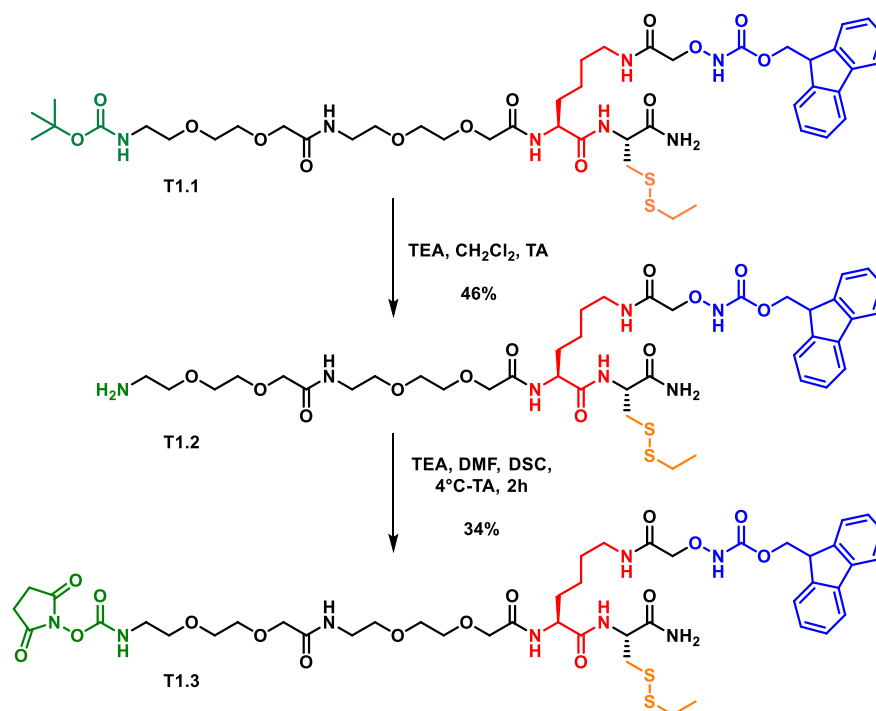


Figure 63 : Tripodes **T1.1**, **T1.2** et **T1.3** de 1^{ère} génération

Cette stratégie est basée sur des réactions de couplage peptidique bien contrôlées entre des synthons pré-synthétisés. Bien que la synthèse de ces tripodes ait été obtenue avec de bons rendements, il a fallu prendre plusieurs paramètres en considération surtout au niveau du choix des groupements protecteurs et la séquence d'assemblage des blocs. La protection de l'oxyamine par un groupement Fmoc présente une contrainte majeure puisqu'il s'est révélé extrêmement labile lors de la synthèse et la bio-conjugaison. De plus, ce groupe protecteur sur l'oxyamine se dégrade rapidement et ce de façon quantitative en présence d'amines secondaires et d'amines tertiaires. De même, nous avons constaté que, comme décrit dans la littérature, la fonction oxyamine protégée peut aussi être le siège de réactions secondaires de bis-acylation.²⁰³

Différents groupements de protection de la famille des uréthanes comme le groupement Pydec²⁰⁴ et le groupement Azoc,²⁰⁵ ont été testés mais ils présentent également

²⁰³ Decostaire, I. P.; Lelièvre, D.; Zhang, H.; Delmas, A. F. Controlling the Outcome of Overacylation of N-Protected Aminoxyacetic Acid during the Synthesis of an Aminoxy-Peptide for Chemical Ligation. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47 (39), 7057–7060.

²⁰⁴ Lapeyre, M.; Leprince, J.; Massonneau, M.; Oulyadi, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A.; Turcatti, G.; Vaudry, H. Aryldithioethyloxycarbonyl (Ardec): A New Family of Amine Protecting Groups Removable under Mild Reducing Conditions and Their Applications to Peptide Synthesis. *Chem. – Eur. J.* **2006**, 12 (13), 3655–3671.

²⁰⁵ Pothukanuri, S.; Winssinger, N. A Highly Efficient Azide-Based Protecting Group for Amines and Alcohols. *Org. Lett.* **2007**, 9 (11), 2223–2225.

une instabilité.²⁰⁶ Par contre, le groupement Phtalimide s'est avéré être un bon candidat pour la protection de la fonction oxyamine (Figure 64).

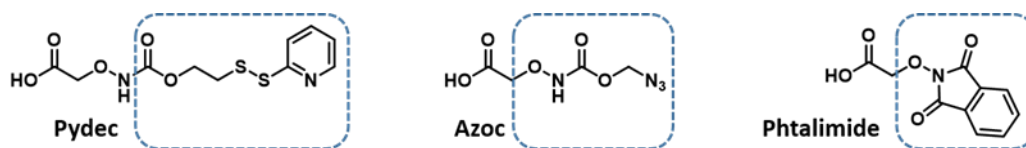


Figure 64 : Groupements protecteurs possibles pour la fonction oxyamine

Le phtalimide a été utilisé avec succès dans des applications SPPS²⁰⁷ pour « Solid Phase Peptide Synthesis », lors de l'immobilisation de bio-polymères et aussi en bio-conjugaison. Sa déprotection peut se faire dans des conditions relativement douces via l'utilisation d'un bis-nucléophile alpha comme l'hydrazine dans un solvant protique (Figure 65).

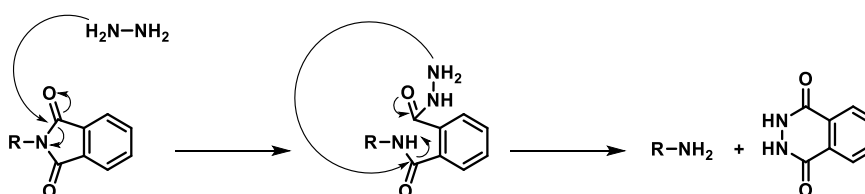


Figure 65 : Mécanisme de déprotection d'un motif phtalimide à l'hydrazine

Le but du changement du groupement protecteur est de trouver un compromis entre la stabilité du groupe protecteur de l'oxyamine au cours de la synthèse et la facilité de déprotection du tripode dans des conditions bio-compatibles sans conduire à des réactions secondaires. De ce fait, une 2^{ème} génération de tripode a été conçue en modulant le groupement protecteur de l'oxyamine.

Ceci a amené à la synthèse de façon reproductible et fiable d'un nouveau tripode **T2** qui ne diffère des squelettes des autres tripodes de 1^{ère} génération (**T1.1**, **T1.2** et **T1.3**) qu'au niveau du groupement protecteur de l'oxyamine (Figure 66). Le tripode **T2** a été obtenu en 17 étapes avec un rendement de 25% sur une échelle de 50mg.

²⁰⁶ Bonnet, D.; Grandjean, C.; Rousselot-Pailley, P.; Joly, P.; Bourel-Bonnet, L.; Santraine, V.; Gras-Masse, H.; Melnyk, O. Solid-Phase Functionalization of Peptides by an α -Hydrazinoacetyl Group. *J. Org. Chem.* **2003**, 68 (18), 7033–7040.

²⁰⁷ Katajisto, J.; Virta, P.; Lönnberg, H. Solid-Phase Synthesis of Multiantennary Oligonucleotide Glycoconjugates Utilizing On-Support Oximation. *Bioconjug. Chem.* **2004**, 15 (4), 890–896.

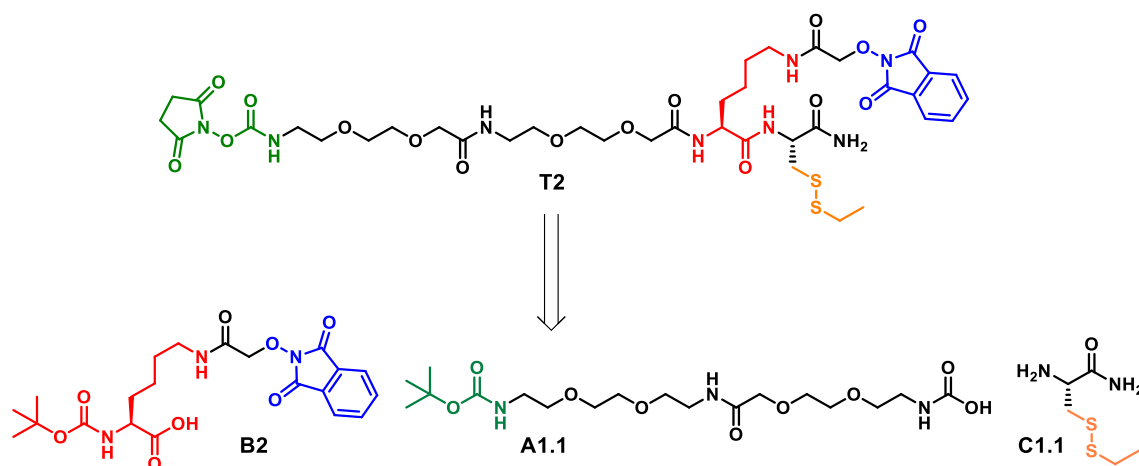


Figure 66 : Rétrosynthèse du tripode de 2^{ème} génération **T2**

Ce linker peptidique hétérotrifonctionnel **T2** a ensuite été dérivatisé. Après l'optimisation des conditions de déprotection de ce tripode, la dérivatisation a été effectuée en effectuant des déprotections séquentielles, en premier lieu en déprotégeant les fonctions thiol et oxyamine.

Le principe de dérivatisation totale a été démontré par une immobilisation rapide et sélective du tripode **T2** (sous sa forme d'amine protégée par un groupement Boc **T2'**) sur une surface de verre SiO₂ préalablement modifiée par des fonctions aldéhydes.²⁰⁸ Ceci a été effectuée suite au greffage d'un réactif fluorescent tel que la rhodamine 6G iodoacétylée dotée d'un linker sulfonaté pour augmenter son hydrosolubilité (R6G-WS) via la fonction thiol libre après déprotection du tripode issu de la chaîne cystéine (Figure 67). Ce tripode fonctionnalisé montre de bonnes réponses de fluorescence sur surface, ce qui valide une parfaite orthogonalité entre le thiol et l'oxyamine.²⁰⁹

²⁰⁸ Rochat, N.; Troussier, A.; Hoang, A.; Vinet, F. Multiple Internal Reflection Spectroscopy for Quantitative Infrared Analysis of Thin-Film Surface Coating for Biological Environment. *Mater. Sci. Eng. C* **2003**, 23, 99–103.

²⁰⁹ Clavé, G.; Boutal, H.; Hoang, A.; Perraut, F.; Volland, H.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. A Novel Heterotrifunctional Peptide-Based Cross-Linking Reagent for Facile Access to Bioconjugates. Applications to Peptide Fluorescent Labelling and Immobilisation. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6 (17), 3065-3078.

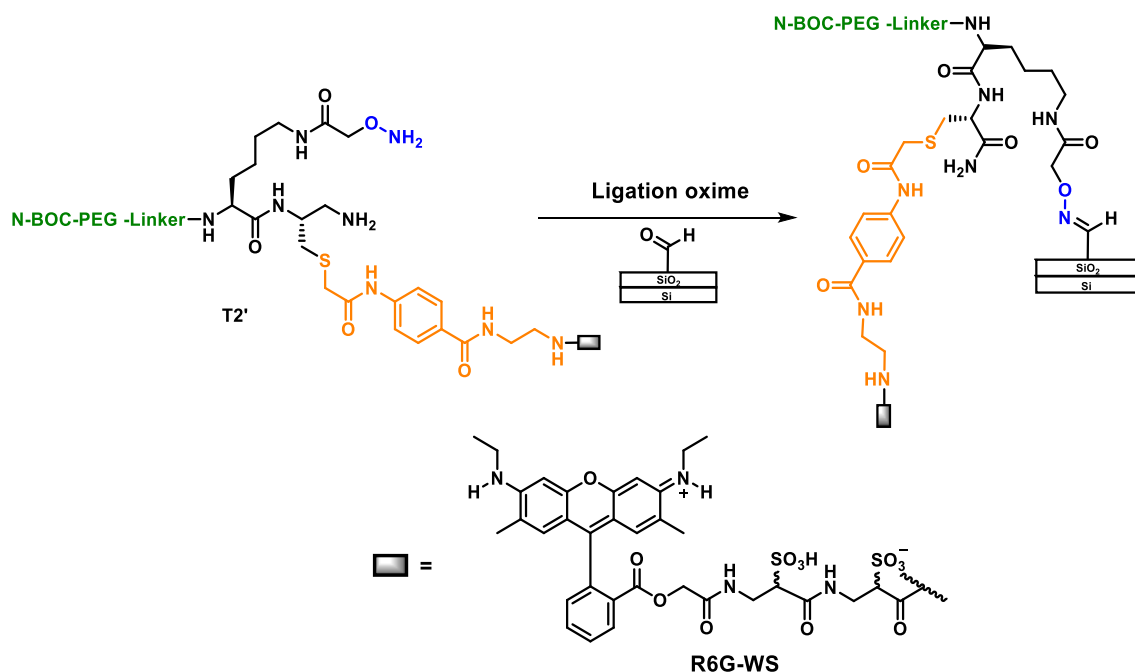


Figure 67 : Immobilisation du tripode **T2'** dérivatisé sur une surface de verre par une ligation oxime²⁰⁹

Afin de mettre en œuvre la méthode SPIT-FRI, ce tripode a été testé dans un format de biocapteur dans un milieu biologique pour la détection du neuropeptide SP (Substance P), responsable de la régulation des troubles d'humeur.²⁰⁹ De plus, il a été utilisé pour la détection de microcystine MC-LR dans de l'eau potable contaminée.²¹⁰

De même, ce tripode a été aussi appliqué pour la détection des aflatoxines, par greffage d'un dérivé de l'**AFB2** sur la fonction amine. Néanmoins, l'architecture de ce tripode **T2** ne s'est pas avérée optimale pour la dérivation : l'hydrazine monohydrate comme agent de déprotection du phthalimide, est un nucléophile α qui peut interagir sur le motif lactone de l'analogue **AFB2** (déjà greffé sur le tripode).^{176b} Autrement dit, ceci peut engendrer l'ouverture de la lactone réduisant considérablement le rendement final en produit désiré (Figure 68).

²¹⁰ Clavé, G.; Ronco, C.; Boutal, H.; Kreich, N.; Volland, H.; Franck, X.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. Facile and Rapid Access to Linear and Truncated Microcystin Analogues for the Implementation of Immunoassays. *Org Biomol Chem* **2010**, *8* (3), 676–690.

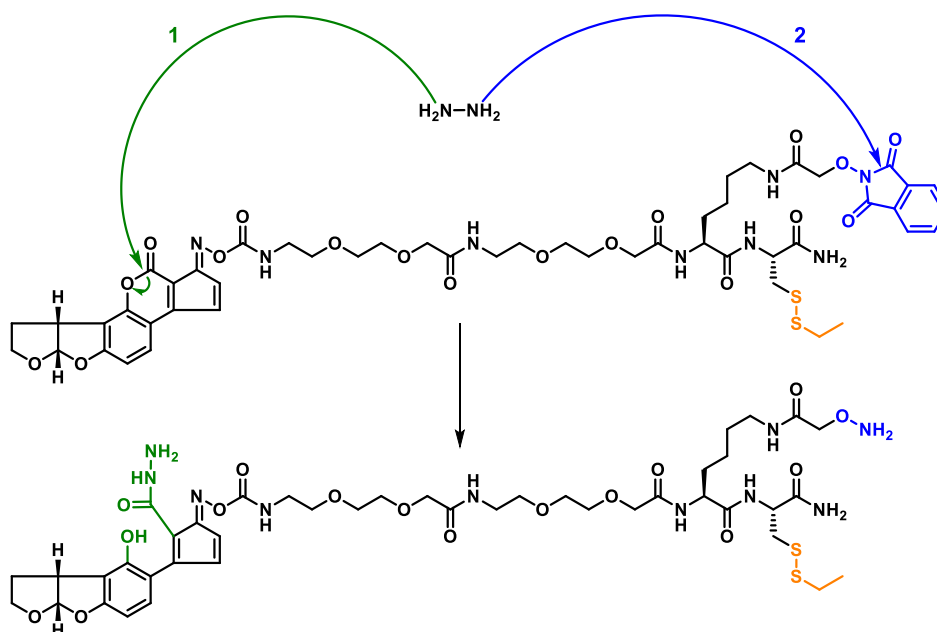


Figure 68 : Mécanisme d'obtention du produit d'ouverture de la lactone de l'analogue **AFB2**

Pour s'affranchir de l'incompatibilité potentielle avec d'autres biomolécules, il était important de réfléchir à une nouvelle stratégie pour revisiter ce tripode pour qu'il soit apte à la détection d'une gamme plus large de biomolécules en éliminant le risque de réactions secondaires lors des étapes de déprotection et lors de la dérivatisation. Autrement dit, le but ultime est de mettre au point un tripode « prêt à l'emploi » ne nécessitant aucune étape de déprotection et aussi de s'affranchir de l'utilisation de l'hydrazine lors de la déprotection de l'oxyamine.

Le nouveau tripode de 3^{ème} génération comprend une fonction oxyamine, un thiol et enfin une fonction azoture (Figure 69). Vu le caractère électrophile du groupement NHS-carbamate qui pourrait poser problème une fois l'oxyamine déprotégée, la fonction amine a été remplacée par un groupement azoture inerte, non nucléophile, bio-conjugable et bio-orthogonal. La fonction azoture peut réagir via une ligation de Staudinger ou une cycloaddition 1,3-dipolaire (CuAAC ou SPAAC). De plus, le groupement protecteur, phthalimide, de la fonction oxyamine a été remplacé par deux groupements Boc introduits sur l'acide aminooxyacétique (Aao). Ce tripode **T3-P** a été obtenu en 3 étapes à partir de trois précurseurs **A3**, **B3** et **C1.1** synthétisés respectivement en 4 étapes, 5 étapes et 2 étapes.

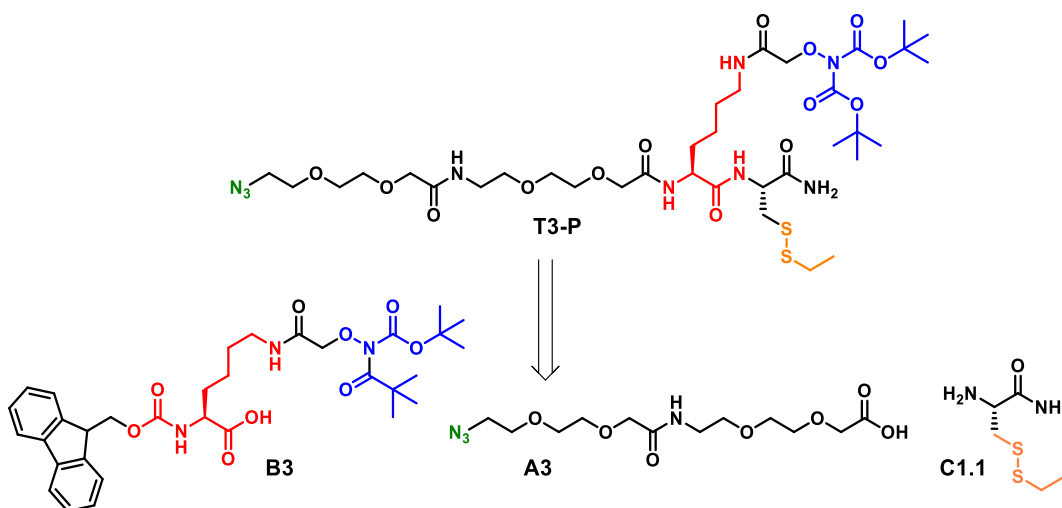


Figure 69 : Rétrosynthèse du tripode de 3^{ème} génération **T3-P**

Le tripode fonctionnel est **T3**, où le thiol et l'oxyamine sont libres (Figure 70), obtenu avec un rendement de 5% après purification par chromatographie en phase inverse. Il peut directement être utilisé tel quel. Cependant, nous avons pu observer que cette forme déprotégée était sensible à deux réactions de dégradation : la dimérisation par formation de disulfures à partir du thiol libre par oxydation liée à l'oxygène de l'air, et la formation d'oximes avec les vapeurs d'acétone sur l'oxyamine. Afin de limiter ces réactions, il est préférable de le déprotéger juste avant utilisation (et ceci pouvant avoir lieu sans purification finale pour limiter les pertes de produits). La dérivatisation séquentielle de ce « tripode » a été effectuée après déprotection de l'oxyamine par traitement TFA puis du thiol par traitement au DTT.

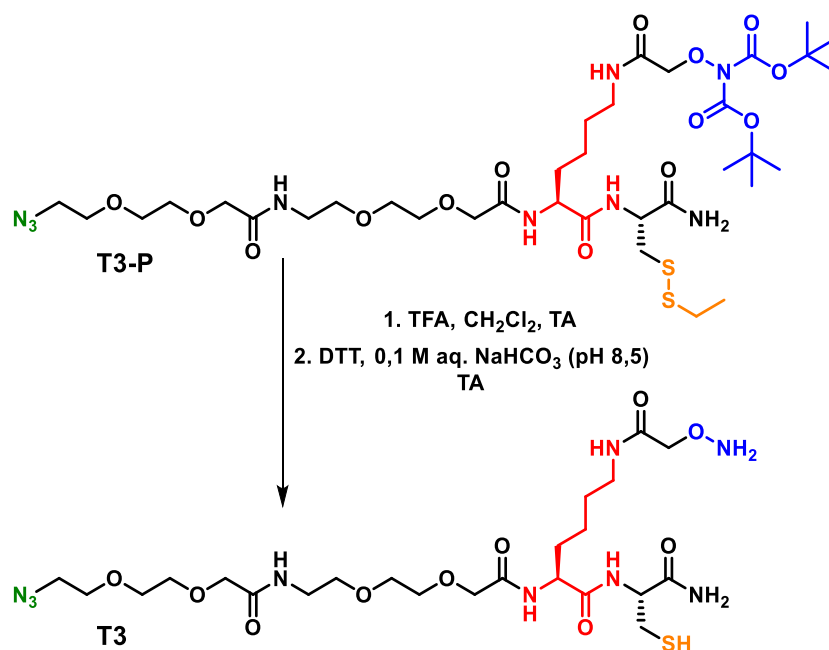


Figure 70 : Structure du Tripode **T3** de 3^{ème} génération

Ceci a permis de l'appliquer dans différentes bio-conjugaisons pour la mise au point de cassettes FRET et de biopuces.^{176b} Notamment dans la détection de l'aflatoxine **AFB1** par la méthode SPIT-FRI en greffant un analogue d'aflatoxine **AFB2**, moins toxique de l'**AFB1** sur la fonction azoture.

Une version « tétrapode » comportant quatre fonctions bioconjuguables et orthogonales (Figure 71) a également été synthétisée, dérivatisée et brevetée²¹¹ par le Dr. Guillaume Viault lors de son stage post-doctoral suivant la même stratégie de cœur « lysine ». La quatrième fonction, bioorthogonale et orthogonale aux autres trois fonctions (oxyamine, thiol et azoture), étant un alcène contraint introduit en présence d'un composé norbornène permettant la fonctionnalisation via une ligation iEDDA avec une tetrazine par une cycloaddition type hétéro Diels-Alder.

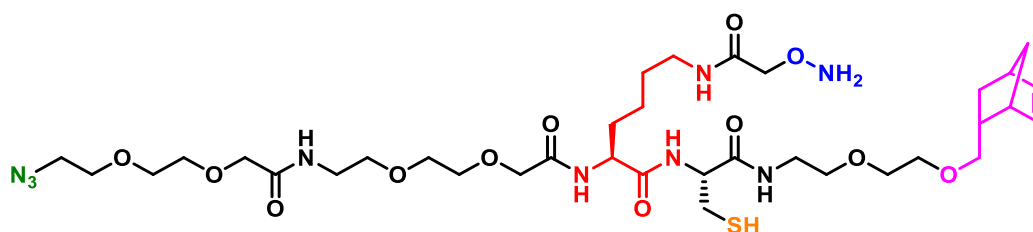


Figure 71 : Structure du tétrapode

Parmi les travaux effectués au sein de notre équipe, une nouvelle stratégie de synthèse a été développée également par le Dr. Guillaume Viault basée sur un choix judicieux de groupements protecteurs, pour réduire à une étape la déprotection finale du tripode avant utilisation, et à la présence du cœur benzénique comme chromophore facilitant les purifications par chromatographie.²¹² Il s'agit d'un « cross-linker » aromatique utilisé dans plusieurs applications par sa dérivatisation en trois étapes ou séquentielle en « one pot » (Figure 72). Ce tripode **T4** a été choisi comme base pour ce projet de thèse, et je reviendrai dans le paragraphe suivant sur l'optimisation de sa synthèse. Il a été utilisé pour la synthèse d'un système luminescent d'une cassette FRET par greffage de trois fluorophores de type cyanines Cy3.0, Cy5.0, Cy7.0. Cette composition permet d'avoir un fluorophore donneur de luminescence et un fluorophore accepteur de luminescence émettant de l'énergie à des longueurs d'onde plus élevées.

De plus, ce tripode a été utilisé pour obtenir des conjugués luminescents à base de peptide-oligonucléotide (POCs).

²¹¹ Viault, G.; Dautrey, S.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Eur. Pat. Appl. **2014**, n° 14 50478.

²¹² Viault, G.; Dautrey, S.; Maindron, N.; Hardouin, J.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. The First "Ready-to-Use" Benzene-Based Heterotrifunctional Cross-Linker for Multiple Bioconjugation. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11 (16), 2693.

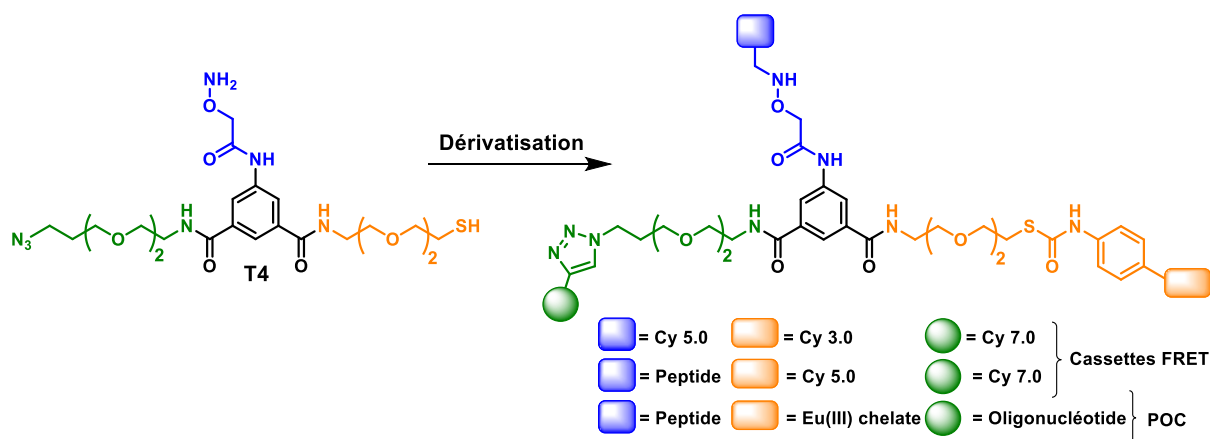


Figure 72: Structure du tripode **T4** et ses dérivatisations relatives

Deux applications dérivées du même cœur benzénique ont également été mise en œuvre au laboratoire. D'une part, une diversification des fonctions bioconjugables dans le cadre du projet confidentiel avec la société BioSIMS pour le développement de puces à protéines a été effectuée. Trois versions possédant l'association de fonctions de bioconjugaison suivantes ont été obtenus : amine/ azoture/ iodoamide, acide carboxylique/ iodacetamide/ azoture et enfin maléimide/ azoture/ carbamate de N-hydroxylamine. D'autre part, en collaboration avec le Dr J. Chamot-Rooke de l'institut Pasteur, la synthèse de réactifs de cross-link clickable pour l'étude d'interactions protéine-protéine par spectrométrie de masse a été mis au point via la molécule **NNP9**, constituée de deux moitiés NHS-carbamate et un groupement azoture (Figure 73), étant le tripode donnant les meilleurs résultats en analyse protéomique.

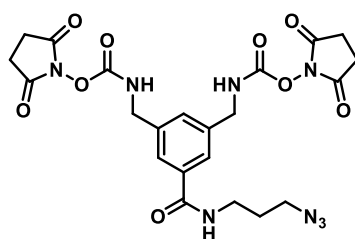


Figure 73 : Structure de **NNP9**^{177d}

B. Résultats et discussion

Comme indiqué précédemment, trois générations de tripodes à structure peptidique **T1**, **T2** et **T3** ont été développées au laboratoire et appliquées dans différents systèmes SPIT-FRI pour la détection de différentes biomolécules. Dans cette thèse, notre méthode SPIT-FRI repose sur la ligation, sur une même structure, d'un fluorophore, d'un analogue de la toxine à détecter, le tout accroché sur un support métallique. Le choix de support métallique s'est porté sur une surface d'or. Pour cela, il a été nécessaire de développer une nouvelle architecture qui correspond au réactif hétérotrifonctionnel principal de notre

dispositif. Ce réactif doit porter trois fonctions chimiques distinctes qui sont orthogonales entre elles (Figure 74), sans interférer en même temps avec d'autres fonctions chimiques et conjuguables de façon indépendante, comme nous avons pu le montrer précédemment :

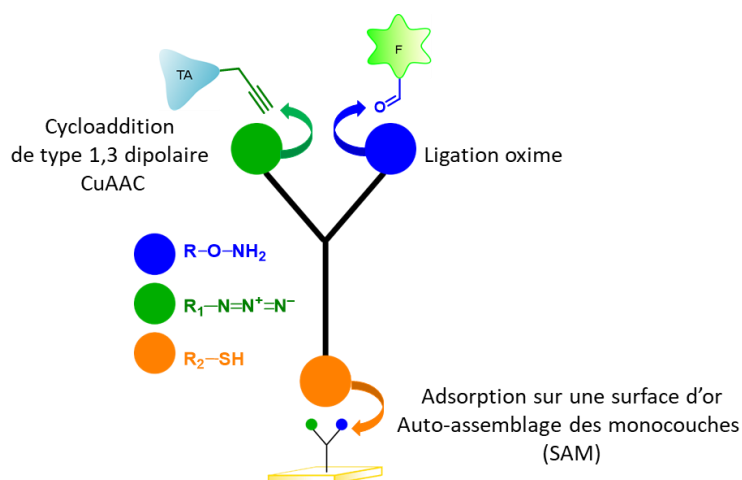


Figure 74 : Schéma de la structure envisagée du tripode portant les trois fonctions cibles

- Tout d'abord, une fonction thiol. Elle a été choisie car c'est une fonction aurophile, afin d'assurer l'immobilisation du tripode sur une surface d'or par SAM, et grâce à son orthogonalité avec un nucléophile dur comme les oxyamines (vide infra). Différentes structures ont été envisagées : soit un thiol libre, soit un disulfure cyclique (Chapitre 3).
- Une fonction oxyamine, nucléophile dur réactif vis-à-vis des cétones ou des aldéhydes. Elle a été choisie pour greffer un fluorophore organique via une ligation oxime.
- Pour avoir trois fonctions qui coexistent entre elles, nous avons opté pour une fonction azoture sur le 3^{ème} bras du tripode. C'est sur cette fonction qu'a été envisagé le greffage de l'analogue de toxine à détecter. L'avantage de l'azoture est que l'on peut envisager l'accroche de plusieurs façons différentes : par cycloaddition de type 1,3 dipolaire (catalysée au cuivre ou non) ou par ligation Staudinger.

Comme noyau central, nous avons choisi de travailler avec un cœur benzénique en s'inspirant de la stratégie à blocs précédemment décrite par Waldmann et coll.²⁰¹ et par Dr. G. Viault au sein de notre équipe.²¹² Ce cœur benzénique a été choisi pour, entre autre, faciliter les étapes de purification grâce au caractère chromophorique du noyau aromatique.

Cette partie est consacrée à l'optimisation de la synthèse de ces nouveaux réactifs hétérotrifonctionnels et hétérobifonctionnels à cœur benzénique. Ils ont servi comme une plateforme de notre dispositif. Nous aborderons les différentes stratégies de synthèse effectuées permettant l'obtention de deux tripodes **T4-P** et **T5-P** ainsi que deux bipodes **D4-P** et **D5-P** sous leurs formes protégées.

B.1 Stratégie de la synthèse des tripodes T4-P et T5-P

Outre les différentes applications du tripode **T4**, ce tripode s'est révélé comme un bon candidat pour notre projet puisqu'il est caractérisé par une bonne hydrosolubilité grâce aux chaînes PEG. De plus, il comporte trois fonctions chimiques orthogonales et conjugables nécessaires à l'incorporation de différents groupements du système SPIT-FRI.

Afin d'obtenir cette molécule hétérotrifonctionnelle **T4-P**, il a été nécessaire de synthétiser indépendamment trois bras fonctionnalisés, chacun d'eux portant une fonction cible. Le schéma rétrosynthétique proposé pour accéder aux tripodes sous leurs formes protégées est représenté en Figure 75. Il s'agit donc d'optimiser l'accès à **T4-P** tel que déjà décrit au laboratoire par le Dr. G. Vault, mais sur une échelle de quelques mg, et de synthétiser le tripode **T5-P** qui devrait permettre de pallier à la fois les difficultés liées à la présence d'une fonction thiol libre, qui limite la stabilité du tripode en présence d'oxygène, et augmenter l'efficacité de la fixation sur la surface d'or.

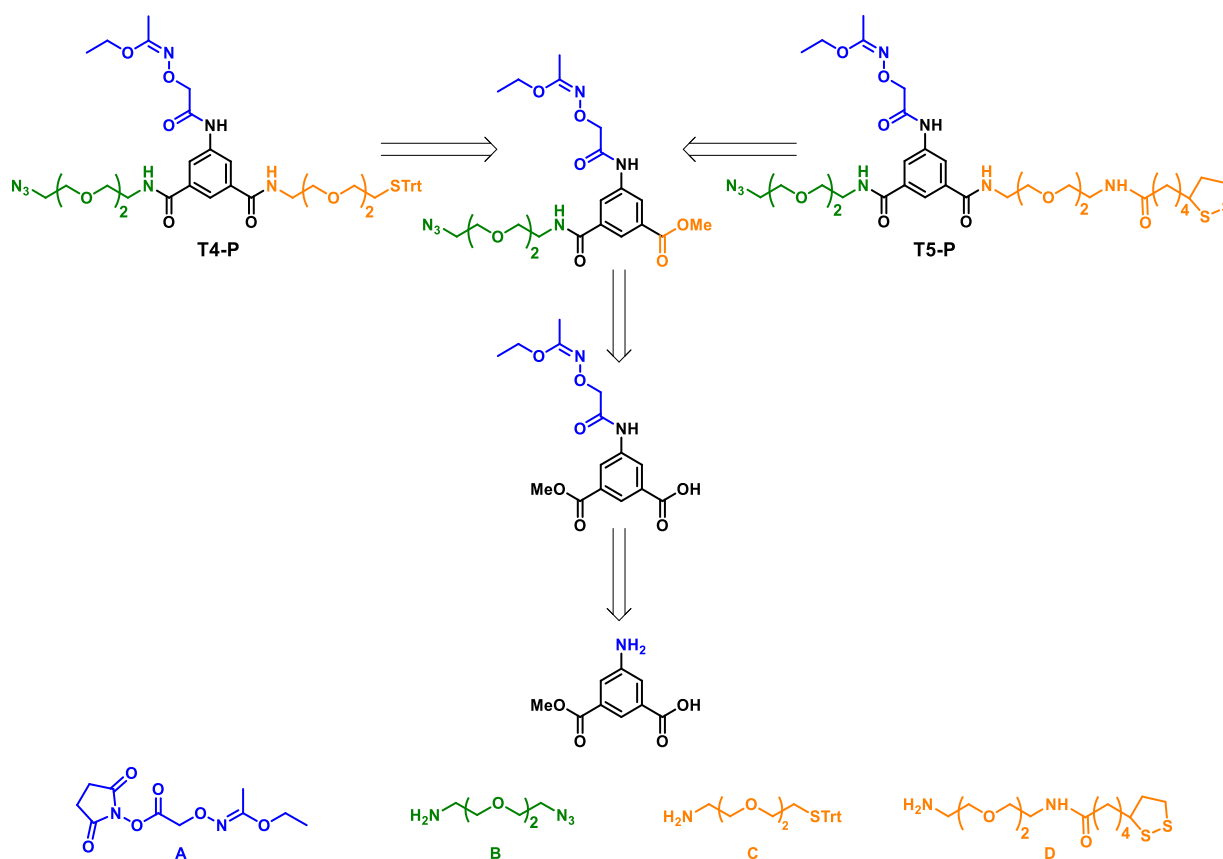


Figure 75 : Schéma rétrosynthétique pour l'accès aux tripode **T4-P** et **T5-P**

Cette synthèse fait intervenir la préparation de quatre blocs **A**, **B** et **C** (et **D**) qui sont ensuite greffés sur le cycle benzénique par des liens amides. Les précurseurs **A**, **B** et **C** comportent respectivement une fonction oxyamine protégée sous la forme d'acétimide

d'éthyle, une fonction azoture et une fonction thiol protégée par un groupement trityle. Les deux groupes protecteurs ont été choisis en fonction de l'expérience acquise sur les groupes protecteurs des oxyamines, et car elles peuvent être toutes les deux déprotégées en une seule étape finale de traitement en milieu acide faible, ce qui permet de conserver le tripode sous sa forme di-protégée pour sa conservation à long terme, et d'effectuer une seule et unique étape de déprotection avant utilisation.

Par ailleurs, pour éviter des éventuels problèmes de dimérisation du tripode **T4** portant une fonction thiol libre après déprotection et pour améliorer les propriétés d'accroche sur la surface d'or, nous avons envisagé la synthèse d'un 2^{ème} tripode **T5-P** à partir des précurseurs et des intermédiaires précédemment synthétisés pour **T4-P** (Figure 75). Il s'agit d'un tripode comportant le précurseur **A** et le précurseur **B**, tout en changeant le précurseur **C** par un précurseur **D** où la fonction thiol est remplacée par un dérivé d'acide thioctique présentant un pont disulfure cyclique capable de générer deux fonctions thiols par réduction.²¹³

B.I.1. Synthèse du précurseur A

Les travaux précédents dans notre équipe ont élaboré différentes générations du tripode en variant les groupements protecteurs de la fonction oxyamine tels que les groupements Fmoc et phthalimide. Comme mentionné précédemment, ces groupements sont sensibles à une N-suracylation du fait du caractère fortement nucléophile de l'azote de l'oxyamine. Nous avons donc opté pour la protection de cette fonction sous la forme d'acétimide car il résiste bien aux conditions expérimentales choisies pour les autres étapes. De plus, contrairement aux autres groupements protecteurs, celui-ci peut être déprotégé de façon concomitante au groupe protecteur choisi pour le thiol par un clivage en milieu acide faible, et sans engendrer des réactions secondaires. Il nous permet donc d'économiser une étape de déprotection en fin de synthèse.

La synthèse du précurseur **A** a été réalisée en deux étapes (Figure 76) :²¹⁴ une étape de substitution nucléophile entre l'acide iodoacétique et le *N*-hydroxyacétimide d'éthyle suivie d'une activation de la fonction acide par un groupement *N*-Hydroxysuccinimide (NHS).

²¹³ a) Joly, K. M.; Mirri, G.; Willener, Y.; Horswell, S. L.; Moody, C. J.; Tucker, J. H. R. Synthesis of an Achiral Isomer of Lipoic Acid As an Anchor Group for SAM Formation on Gold Surfaces. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (7), 2395–2398 b) Wang, W.; Ji, X.; Du, L.; Mattoussi, H. Enhanced Colloidal Stability of Various Gold Nanostructures Using a Multicoordinating Polymer Coating. *J. Phys. Chem. C* **2017**, 121 (41), 22901–22913.

²¹⁴ Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturyn, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, 73 (3), 983–991.

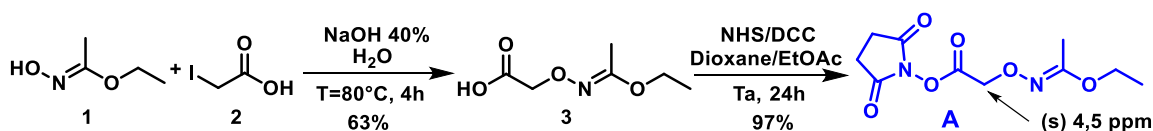


Figure 76 : Synthèse du précurseur A

Ainsi, la première étape a été réalisée par une substitution nucléophile d'ordre 2 (S_N2) entre le N-hydroxyacétimide d'éthyle et l'acide iodoacétique en condition basique. L'acétimide **3** a été obtenu avec 63% de rendement après isolement du produit par extraction à pH= 2. La précision du pH s'est avérée très importante lors de l'extraction, car nous avons observé une variation importante du rendement entre 34% et 63% s'il n'était pas scrupuleusement contrôlé. La formation de ce produit a été confirmée par RMN ^1H , via l'apparition d'un singulet à 4,5 ppm, qui correspond au pic caractéristique du CH_2 entre l'acide et l'oxyamine. Le composé **3** a été directement engagé dans la 2^{ème} étape d'activation de la fonction acide par le NHS en présence de dicyclohexylcarbodiimide (DCC), avec un rendement de 97% après un lavage basique. Le précurseur **A** a été obtenu à l'échelle de plusieurs grammes avec un rendement global de 61%.

B.I.2. Synthèse du précurseur B

Le précurseur **B** portant la fonction azoture a été obtenu en trois étapes à partir du triéthylène glycol **TEG** (Figure 77).

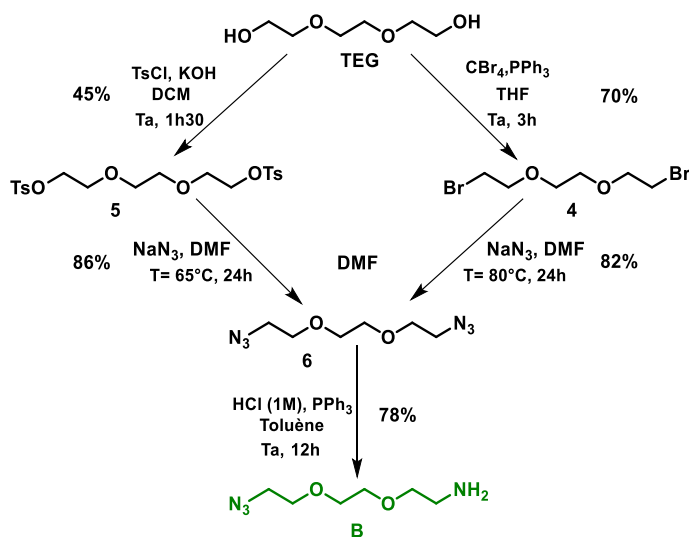


Figure 77 : Synthèse du précurseur B

Pour la 1^{ère} étape de cette synthèse, deux voies ont été testées afin d'introduire deux groupements nucléofuges sur le **TEG**. La 1^{ère} voie fait intervenir une bromation dans les conditions d'Appel, afin de former le composé dibromé **4** avec un rendement de 70%. La

2^{ème} voie a permis l'obtention du dérivé ditosylé **5** en engageant le **TEG** dans une ditosylation en condition basique, avec un rendement de 45%.

Par la suite, une réaction de substitution nucléophile de type S_N2 que ce soit sur le composé **4** ou **5** en présence d'azoture de sodium, a permis la formation du composé **6** diazido avec des rendements respectifs de 82% et 86%. Enfin, le précurseur **B** a été obtenu par mono-réduction du diazido **6** via une réaction de Staudinger en condition acide avec un rendement de 78%. Les purifications par chromatographie sur colonne n'ont posé aucune difficulté, ce qui a permis d'obtenir le précurseur **B** à l'échelle de 2 g avec un rendement global de 30% sur trois étapes en passant par l'intermédiaire di-tosylé et de 45% en passant par le dibromé.

B.I.3. Synthèse du précurseur C

Notre intérêt est de synthétiser les précurseurs en grande quantité pour minimiser les efforts de synthèse. Pour la synthèse du précurseur **C**, deux voies de synthèse ont été envisagées. La 1^{ère} stratégie est basée sur la bromation et la 2^{ème} stratégie sur la tosylation.

Comme l'indique la Figure 78, dans la 1^{ère} stratégie, nous avons tout d'abord formé le composé **8** monobromé via une réaction d'Appel avec un rendement de 20%. Ensuite, en présence d'azoture de sodium nous avons obtenu un monoazido **9** avec un rendement de 74%. Une deuxième bromation sur ce dernier nous a permis d'obtenir le composé **10** avec un rendement de 14%. Vu les faibles rendements obtenus après purification, nous avons abandonné cette stratégie dès la 3^{ème} étape. Nous avons ainsi choisi la 2^{ème} stratégie par tosylation puisque la 1^{ère} étape nous a permis d'avoir en même temps le produit ditosylé **6** que nous avons engagé dans la synthèse du synthon **B**.

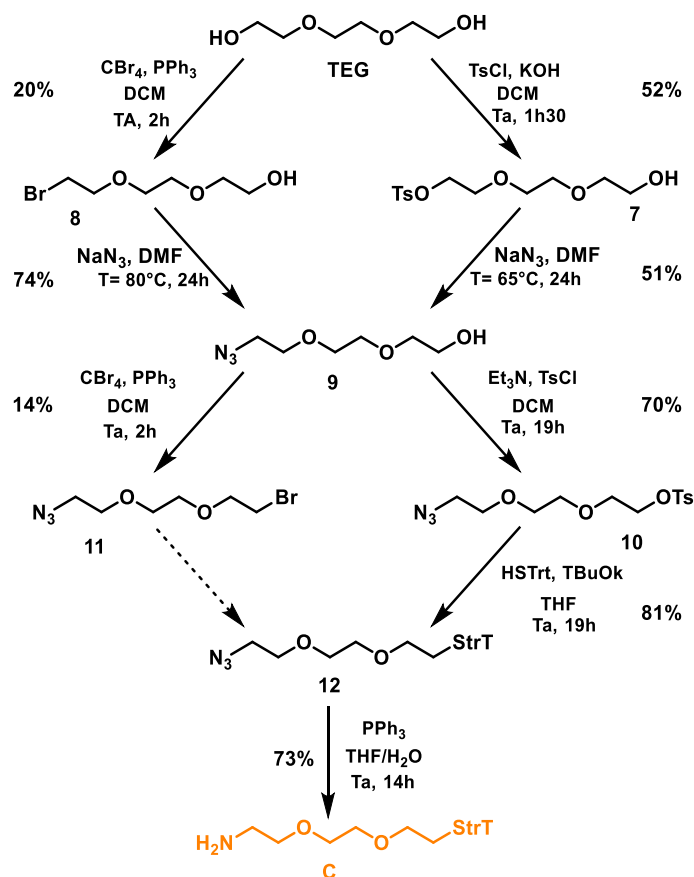


Figure 78 : Synthèse du précurseur **C**

La synthèse du précurseur **C** a été réalisée en quatre étapes selon une stratégie similaire au synthon **B** (Figure 78). Celle-ci, débute également par le **TEG** qui a été engagé en premier lieu dans une monotosylation. Cette réaction nous a permis d'obtenir le monotosyle **7** avec un rendement de 52% (et le composé ditosylé **5** avec un rendement de 45%). Cette étape est suivie d'une réaction S_N2 en présence d'azoture de sodium afin de générer le dérivé azoture **9** avec un rendement de 26% sur deux étapes. Ensuite, ce dernier a été engagé dans une deuxième réaction de tosylation, puis dans une réaction S_N2 pour former le thiol protégé **12** par un groupement trityle (Trt). Finalement, la fonction azido a été réduite en amine, selon une réaction de Staudinger afin d'obtenir le précurseur **C** avec un rendement global de 11% sur 5 étapes.

B.I.4. Synthèse du précurseur **D**

Inspirée des protocoles dans la littérature,²¹⁵ la voie de synthèse adoptée pour le précurseur **D** (un dérivé de l'acide thioctique) est basée sur deux étapes à partir du synthon **B** sur lequel l'acide thioctique **13** est couplé pour obtenir le composé **14** avec un très bon

²¹⁵ Guo, Y.; Sakonsinsiri, C.; Nehlmeier, I.; Fascione, M. A.; Zhang, H.; Wang, W.; Pöhlmann, S.; Turnbull, W. B.; Zhou, D. Compact, Polyvalent Mannose Quantum Dots as Sensitive, Ratiometric FRET Probes for Multivalent Protein-Ligand Interactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55 (15), 4738–4742.

rendement de 95%. Cette étape est suivie par une étape de réduction de la fonction azoture. Elle permet d'obtenir le précurseur **D** portant une fonction amine et un pont disulfure avec un rendement global de 30% (Figure 79).

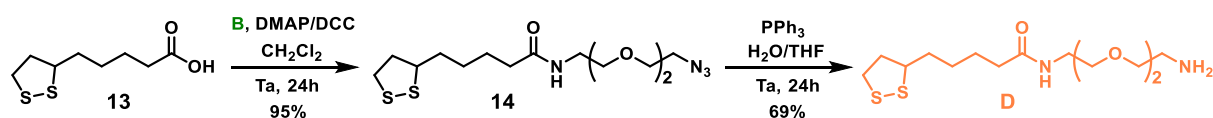


Figure 79 : Synthèse du précurseur **D**

B.1.5. Synthèse des tripodes T4-P et T5-P

Une fois les quatre précurseurs **A**, **B**, **C** et **D** obtenus, nous sommes passés à la synthèse principale des tripodes **T4** et **T5** sous leurs formes protégées **T4-P** et **T5-P** dont les quatre premières étapes sont communes. Ces dernières constituent l'assemblage des deux précurseurs **A** et **B** sur un cœur benzénique (Figure 80). Au cours de cette synthèse, certaines réactions se sont montrées difficiles à reproduire et ont nécessité une longue mise au point qui sera discutée plus avant dans ce manuscrit.

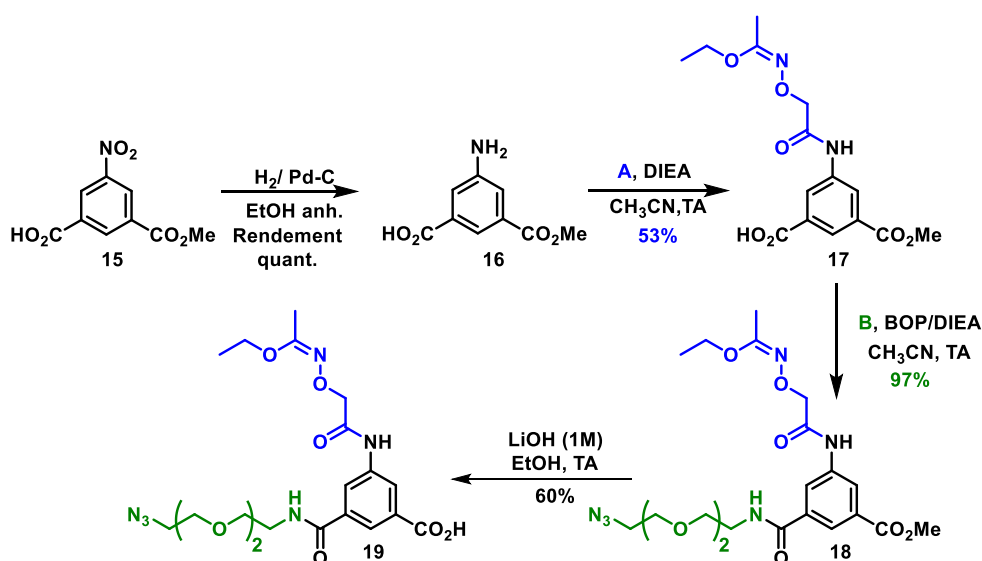


Figure 80 : Synthèse de l'acide commun **19**

Rappelons qu'un dérivé benzénique a été choisi pour jouer le rôle de connecteur entre les différents synthons préalablement obtenus. Nous avons utilisé le mono-acide carboxylique **15** commercial comme synthon de départ. Il présente sur le cycle benzénique une fonction ester, un acide carboxylique et un groupement nitro. La synthèse a commencé par une réduction du groupement nitro en amine via une hydrogénation catalytique pour former quantitativement l'aniline **16**.

Le précurseur **A**, sous sa forme d'ester activé, a ensuite été additionné sur l'aniline **16** pour obtenir l'amide **17** avec un rendement de 53%. Ensuite, un couplage peptidique classique a permis d'incorporer le précurseur **B** au niveau de l'acide carboxylique du composé **17**, ce qui a permis d'obtenir l'ester **18** avec un rendement de 97%.

Afin d'ancrer le précurseur **C** sur l'ester **18**, la fonction ester a tout d'abord été hydrolysée pour obtenir l'acide **19**. Bien que cette étape ait déjà été réalisée auparavant,²¹² nous avons rencontré des difficultés lors de cette hydrolyse par la lithine dans le méthanol. Les conditions décrites (LiOH/H₂O (5 éq), MeOH, 5h à température ambiante) se sont révélées peu reproductibles.

Une étude méthodologique a montré la dégradation complète du composé **18** observée dans les différents essais réalisés dans le MeOH. En gardant les mêmes conditions expérimentales décrites tout en changeant le pH à l'étape de l'extraction de 4 à 2, nous avons observé une dégradation au niveau du bras oxyamine. De même, un essai qui a été effectué dans le MeOH avec une agitation de 24h a abouti à une dégradation totale du produit.

Conditions réactionnelles	Observations
LiOH/H ₂ O (5 éq), MeOH TA, 5h	Formation d'un autre produit : la fonction éthoxy du groupe protecteur de l'oxyamine est partiellement remplacée par un méthoxy → Dégradation
LiOH/H ₂ O (5 éq), MeOH TA, 5h Acidification à différents pH de 4 à 2	Dégradation du bras oxyamine
LiOH/H ₂ O (5 éq), MeOH Ajout de la lithine goutte à goutte T=0°C (1h) → TA (5h)	Formation du produit désiré Problème d'extraction à pH=2
LiOH/MeOH (5 éq), MeOH TA, 24h	Dégradation

Tableau 6 : Conditions des essais de la réaction en présence de MeOH

Pour bien suivre la réaction et comprendre le mécanisme de la dégradation, nous avons suivi l'évolution du milieu réactionnel par RMN ¹H en changeant le MeOH par CD₃OD.

L'hydrolyse de l'ester de méthyle a bien lieu et est confirmée par l'apparition du singulet caractéristique du MeOH à 3,34 ppm. D'autre part, l'apparition des pics caractéristiques de l'éthanol (triplet à 1,18 ppm, quadruplet à 3,6 ppm) a été observée. Cette dernière observation indiquerait la formation du composé **18'**, pour lequel le groupe éthoxy du groupe protecteur de l'oxyamine serait remplacé par un méthoxy (Figure 81). Au

bout de 5h, d'autres signaux sont apparus dans la partie aromatique du spectre et indiqueraient une dégradation partielle du produit.

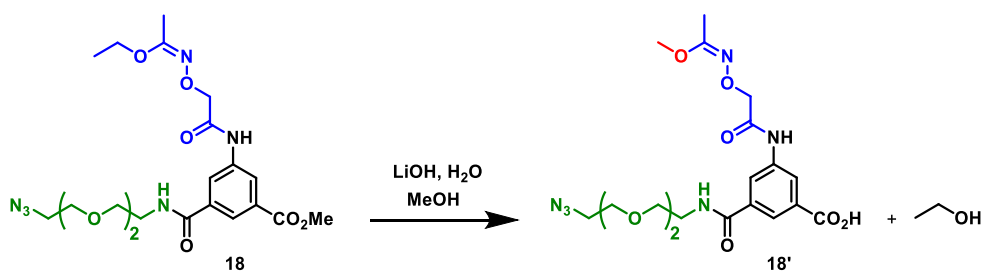


Figure 81: Hypothèse de la dégradation au niveau de l'acétimide dans le MeOH

D'autres essais d'hydrolyse ont été effectués en s'inspirant des travaux de l'équipe de Nicolaou (Tableau 7).²¹⁶ Une agitation du milieu réactionnel toute une nuit avec 3 équivalents de Me₃SnOH à 60°C, n'a pas conduit à la moindre réaction. Des conditions plus dures ont été tentées en augmentant la température à 80°C et en doublant le nombre d'équivalent de Me₃SnOH. Mais, dans ces conditions, nous avons observé la dégradation complète du produit de départ après 2h.

Conditions réactionnelles	Observations
Me ₃ SnOH (3 éq) / DCM T=60°C, Une nuit	Pas de réaction
Me ₃ SnOH (6 éq) / DCM T=80°C, 2h	Dégradation

Tableau 7 : Tests d'hydrolyse effectués en présence de Me₃SnOH

Nous avons donc choisi d'utiliser de l'éthanol comme solvant lors de la réaction d'hydrolyse de l'ester méthylique, en lieu et place du méthanol, ce qui a donné de meilleurs résultats et a permis d'obtenir le composé **19** avec un rendement de 60%. Néanmoins, ce rendement reste moyen, et est lié à une dégradation au niveau du fragment comportant l'oxyamine protégée qui a été observée après l'évaporation du milieu réactionnel.

Comme l'indique la Figure 82, après l'optimisation des conditions d'hydrolyse, et obtention de l'acide carboxylique **19** en quantité satisfaisante, la voie de synthèse diverge pour conduire aux tripodes **T4-P** et **T5-P**. L'acide carboxylique résultant **19** a ensuite été engagé dans une réaction de couplage peptidique avec le précurseur **C**. Ceci nous a permis d'obtenir le tripode **T4** sous sa forme protégée **T4-P** avec un rendement de 70%. Parallèlement, le précurseur **D** a été couplé dans les mêmes conditions pour aboutir au tripode **T5-P** avec un rendement de 60%.

²¹⁶ Nicolaou, K. C.; Estrada, A. A.; Zak, M.; Lee, S. H.; Safina, B. S. A Mild and Selective Method for the Hydrolysis of Esters with Trimethyltin Hydroxide. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44* (9), 1378–1382.

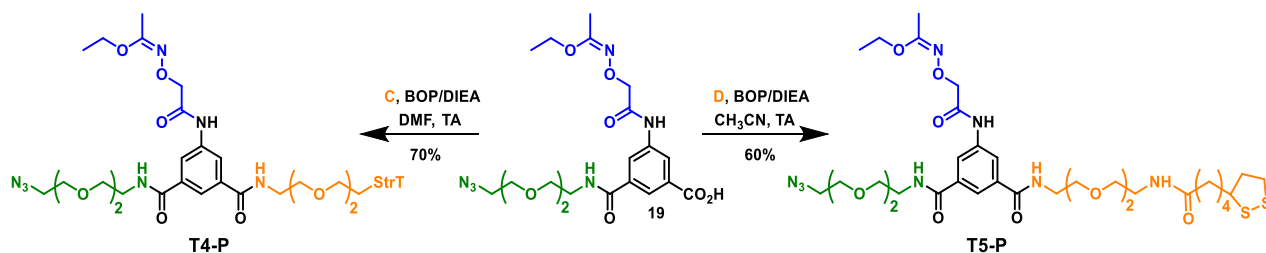


Figure 82 : Synthèse des tripodes **T4-P** et **T5-P** sous leurs formes protégées

Ces deux tripodes ainsi que leurs précurseurs ont été caractérisés, sans ambiguïté, par RMN ¹H et ¹³C dans CDCl₃, IR et HRMS.

Le spectre du tripode **T4-P** (Figure 83) montre les différents signaux caractéristiques de ce composé. Dans la partie aliphatique, les différents signaux sont attribués aux précurseurs greffés **B** (vert), **C** (orange) (pics caractéristiques au niveau de leurs chaînes PEG) et **A** (bleu). Les pics caractéristiques du précurseur **A** apparaissent (1, 2, 3) et particulièrement le pic 4 caractéristique de CH₂ entre l'acide et l'oxyamine à 4,45 ppm. Dans la partie aromatique du spectre, les deux massifs entre 7,14 ppm et 7,4 ppm sont attribués au groupement trityle protecteur du thiol. Ainsi que les pics à 7,93 ppm et 8,16 ppm sont attribués au noyau aromatique.

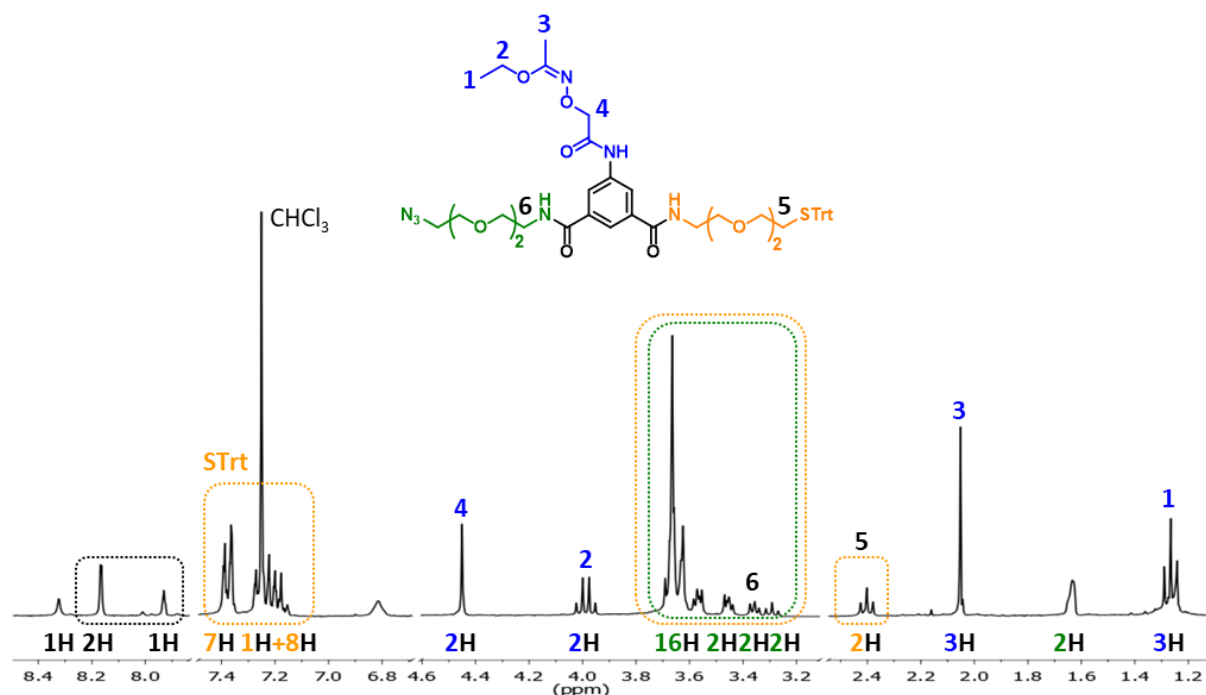


Figure 83 : Spectre RMN ¹H de **T4-P** (CDCl₃, TA)

L'interprétation du spectre du tripode **T5-P** (Figure 84) montre les différents signaux caractéristiques de ce composé. Dans la partie aliphatique du spectre sont rassemblés les différents signaux des trois précurseurs **A**, **B** et **D**. En plus des pics caractéristiques des deux

précurseurs **A** et **B**, nous attribuons de nouveaux pics (orange) avec des déplacements chimiques et des intégrales qui correspondent au précurseur **D**. Parmi ces pics, un triplet à 2,16 ppm correspond au CH₂ lié au carbonyle de l'acide thioctique. Dans la partie aromatique du spectre, les pics à 8,18 ppm et 8,21 ppm sont attribués au noyau aromatique et un 3^{ème} pic à 8,29 ppm correspond à NH.

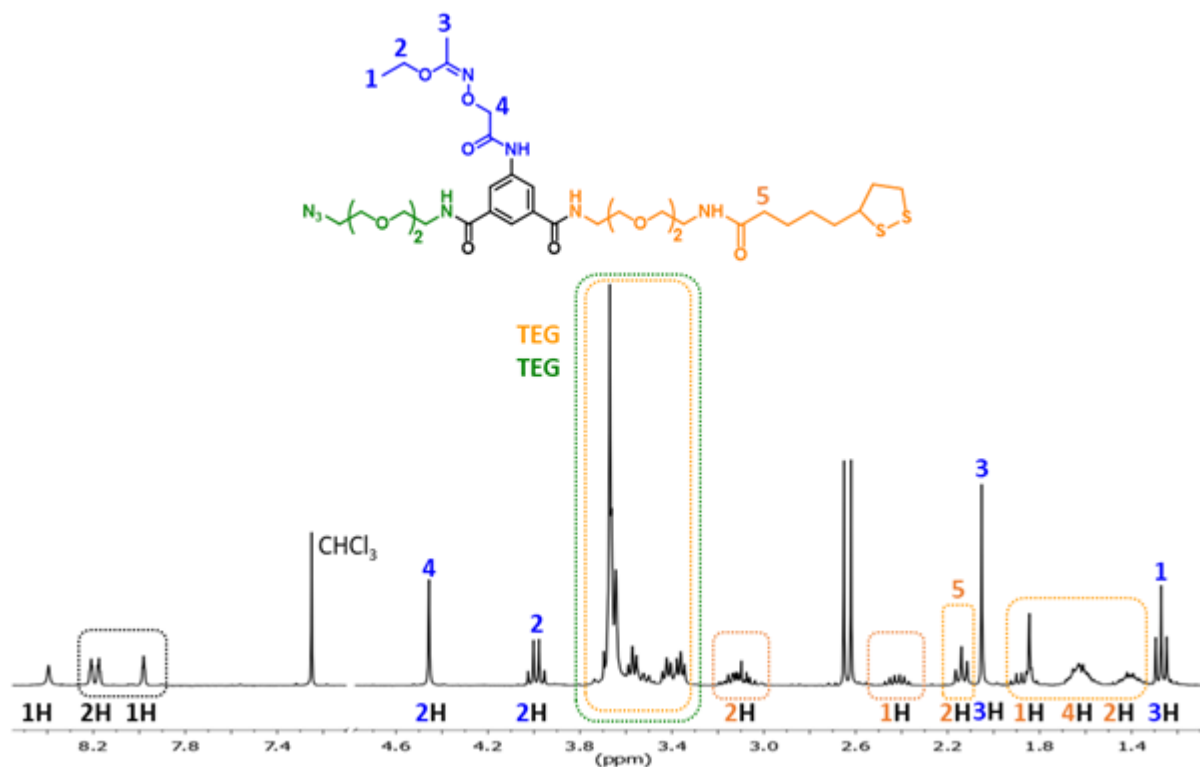


Figure 84 : Spectre RMN ¹H de **T5-P** (CDCl₃, TA)

B.II Synthèse des réactifs hétérobifonctionnels **D4-P** et **D5-P**

Comme la synthèse des tripodes détaillée précédemment, cette synthèse est multi-étapes. Elle a nécessité un temps considérable pour obtenir des composés finaux à l'échelle du milligramme. Pour la suite du projet et notamment toute la mise au point de l'immobilisation, nous avons décidé de synthétiser deux composés modèles hétérobifonctionnels **D4** et **D5** relatifs à **T4** et **T5** respectivement, afin d'économiser du temps et des efforts de synthèse. Ces composés modèles portent les deux fonctions utiles dans ces tests (la fonction thiol et la fonction oxyamine). Les composés **D4-P** et **D5-P**, qui présentent les composés **D4** et **D5** sous leurs formes protégées, ont été obtenus par couplage entre l'acide **17** et les intermédiaires **C** et **D**, respectivement (Figure 85). Aucun problème n'est survenu lors de ces étapes de couplages et les composés ont été obtenus avec 65% et 45% de rendement, respectivement.

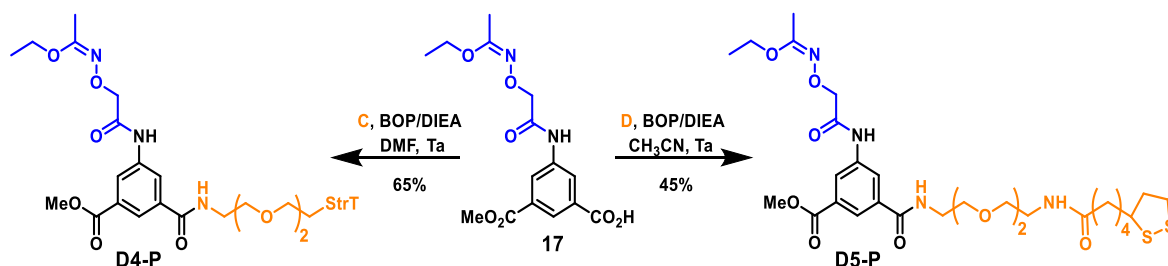


Figure 85 : Synthèse des réactifs hétérobifonctionnels modèles **D4-P** et **D5-P**

C. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons effectué la synthèse de deux réactifs hétérotrifonctionnels cibles. Le 1^{er} est le **T4-P** qui a été synthétisé en 16 étapes avec un rendement global de 21%. Lors de cette synthèse nous avons effectué une étude méthodologique afin de résoudre le problème de dégradation lors de l'hydrolyse d'un intermédiaire avancé de synthèse, et optimisé la montée en échelles des autres étapes de synthèse.

Afin d'améliorer la qualité d'accroche à l'étape de fonctionnalisation de notre dispositif SPIT-FRI, nous avons effectué la synthèse d'un 2^{ème} réactif hétérotrifonctionnel portant un pont disulfure. Ce tripode **T5-P** a été synthétisé à partir de la 5^{ème} étape de la synthèse du **T4-P** tout en gardant les deux 1^{ers} bras portant respectivement la fonction oxyamine et le groupement azoture. Tandis que le 3^{ème} bras a été remplacé par l'intermédiaire **D** portant un pont disulfure cyclique issu de l'acide thioctique. Cet intermédiaire a été synthétisé à partir de l'intermédiaire **B** en deux étapes. Cette synthèse a permis d'utiliser les intermédiaires préalablement engagés dans la synthèse du tripode **T4-P**. La synthèse totale du **T5-P** a été effectuée en 14 étapes avec un rendement global de 18%.

Ce travail était très fastidieux vu que toutes les synthèses effectuées ont été basées sur la synthèse à multi-étapes et qui ont abouti à des quantités de composés finaux à l'échelle du mg. Pour valider les étapes d'accrochage sur phase solide (Chapitre 3), notre stratégie a été basée sur la synthèse de deux réactifs hétérobifonctionnels **D4-P** et **D5-P** comprenant l'intermédiaire **A** pour le greffage du fluorophore adéquat et respectivement l'intermédiaire **C** et **D** qui servent à l'immobilisation de chaque molécule sur surface d'or. Ces réactifs **D4-P** et **D5-P** ont été synthétisés respectivement en 12 et 11 étapes avec un rendement global de 34% et 24%.

Afin d'améliorer cette synthèse, des modifications doivent être faites au niveau de la structure afin de faciliter la synthèse sans modifier le cœur benzénique qui facilite le suivi des manipulations et aussi leurs caractérisations. Il est important de trouver une autre

structure facilitant la dérivation du tripode tout en minimisant les étapes de déprotection.

Parmi les trois bras greffés sur le cœur benzénique, deux fonctions peuvent être conservées : D'une part, le bras contenant la fonction thiol est nécessaire pour l'immobilisation sur surface d'or. Le groupement azoture est aussi utile pour la « chimie click » et permet d'effectuer la dérivation du tripode par l'analogue toxine adéquat. Cependant, le groupement oxyamine pourrait être remplacé par un groupement plus stable et orthogonal aux autres fonctions présentes. Nous pouvons avoir recours à des cycloalcynes qui permettent une dérivation par une réaction SPAAC. Il serait également possible d'utiliser des réactifs de ligation iEDDA comme des nitrones, des ylures d'azométhines générés par des imines, des iminiums ou des azirdines.

Chapitre 2 :

Application des réactifs multifonctionnels au SPIT-FRI

"N'abandonnez jamais vos rêves. La persévérance est ce qu'il y a de plus important. Si vous n'avez pas assez de désir et de foi en vous-même pour continuer d'essayer après qu'on vous a dit de lâcher prise, vous n'y arriverez jamais"

Tawni O'DELL

Ce chapitre est consacré à la mise au point de la dérivatisation des réactifs hétérobifonctionnels **D4-P** et du réactif hétérotrifonctionnel **T4-P** après leur déprotection. La dérivatisation nécessite la synthèse et le greffage de façon orthogonale d'un fluorophore adéquat ainsi que d'un analogue de toxine à détecter sur les fonctions présentes de ces réactifs. Dans cette partie, nous nous exposerons le choix du fluorophore et son quencher à utiliser dans notre système SPIT-FRI ainsi que les analogues de toxines à greffer. En amont des résultats obtenus lors de la dérivatisation, une deuxième partie de ce chapitre sera dédiée au marquage des anticorps spécifiques par un quencher afin de remplir les conditions du FRET, principe photochimique sur lequel est basé notre dispositif.

A. Etat de l'art

A.I Choix du fluorophore

Il existe une large palette de fluorophores utilisés dans plusieurs applications (Introduction B.III.2.2). D'une manière plus générale, nous pouvons les classer en deux familles de fluorophores : D'une part, les fluorophores intrinsèques produits naturellement comme les acides aminés aromatiques (tryptophane tyrosine et phenylalanine), le NADH, et la chlorophylle. D'autre part, les fluorophores extrinsèques comme les coumarines, les fluorescéines, le dansyle, les rhodamines, les cyanines et Alexa Fluor (Figure 86).²¹⁷ Ils sont fréquemment additionnés aux molécules d'intérêt comme des biomolécules ou autres réactifs pour que ces dernières soient marquées par un chromophore.²¹⁸

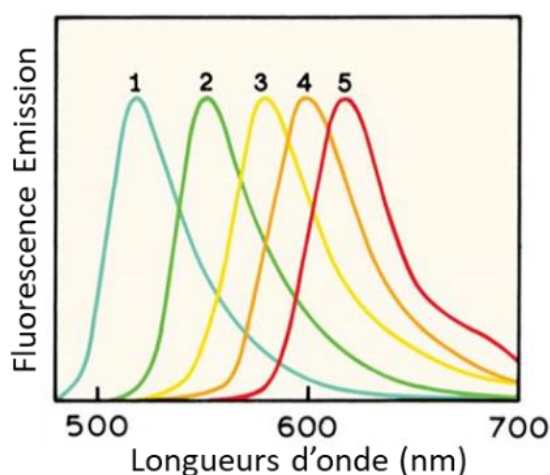


Figure 86 : Exemples de spectres d'émission de différents fluorophores conjugués à des anticorps dans le domaine du visible : (1) fluorescéine (2) rhodamine 6G (3) tétraméthylrhodamine (4) lissamine rhodamine B et (5) Colorant Texas Red²¹⁷

²¹⁷ Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; Springer, MA, **2006**.

²¹⁸ Wysocki, L. M.; Lavis, L. D. Advances in the Chemistry of Small Molecule Fluorescent Probes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2011**, 15 (6), 752–759.

Chapitre 2 : Application des réactifs multifonctionnels au SPIT-FRI

Dans ce projet, nous nous intéressons aux rhodamines. Elles sont constituées par un cœur xanthène substitué par deux anilines (Figure 87). Cette famille de chromophores est un bon candidat pour notre application.²¹⁹ En effet, les rhodamines sont stables chimiquement et thermiquement et elles sont peu sensibles aux phénomènes de photoblanchiment.

De plus, elles disposent des propriétés photophysiques intéressantes : des maxima d'absorption favorablement élevés entre 480 et 600 nm et des longueurs d'onde d'émission entre 510 et 615 nm. De plus, ils disposent de bons rendements quantiques (généralement supérieur à 95%) et des coefficients d'extinction molaire élevés (près de 80 000 M⁻¹.cm⁻¹).

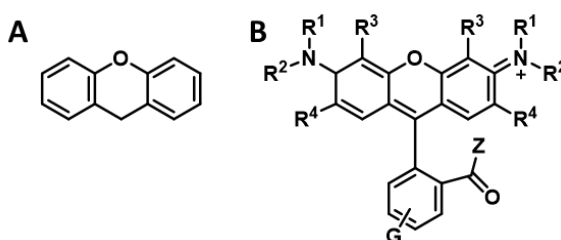


Figure 87 : Structures de xanthène (A) et des rhodamines (B)²¹⁹

Dans le cadre de ce projet, nous avons principalement choisi la Rhodamine **R6G** comme fluorophore pour notre sonde fluorogénique SPIT-FRI. Ce fluorophore a une longueur d'onde d'émission maximale de 533 nm et est facile à caractériser sur surface. La R6G est un fluorophore commercial, peu coûteux, peu sensible à l'environnement, chimiquement et thermiquement stable et facilement fonctionnalisable. Ce composé est commercialisé sous sa forme ester à partir de laquelle nous pouvons accéder à différents dérivés comportant des fonctions de bioconjugaison diverses, comme un carbonyle (aldéhyde en l'occurrence) pour le dérivé **R6G-AL** que nous avons ciblé pour nos applications.

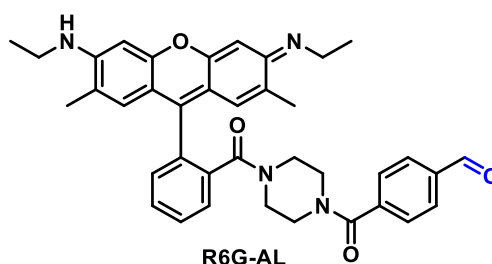


Figure 88 : Structure de la rhodamine 6G cible (**R6G-AL**)

²¹⁹ Beija, M.; Afonso, C. A. M.; Martinho, J. M. G. Synthesis and Applications of Rhodamine Derivatives as Fluorescent Probes. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38 (8), 2410-2433.

A.II Analogues de mycotoxines

Nous ciblons principalement la détection de deux types de mycotoxines les aflatoxines (**AFB1** et **AFB2**) et la patuline **PAT** (Figure 89). Ce sont des mycotoxines de petite taille, peu compatibles avec les méthodes de dosage « Sandwich » qui sont les plus prometteuses dans le domaine (cf. Introduction). De plus, le retour d'expérience du laboratoire sur le dosage de l'**AFB1** avec un tripode à cœur lysine, via des anticorps anti-**AFB2** disponibles chez notre partenaire du CEA Saclay permettra de comparer les deux propositions de tripode.

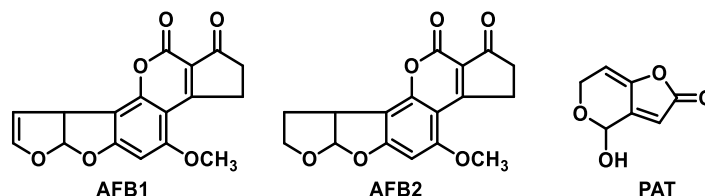


Figure 89 : Structures des mycotoxines **AFB1**, **AFB2** et **PAT**

Dans le cadre de notre méthode de détection SPIT-FRI, il est important de sélectionner les analogues de ces analytes à synthétiser qui doivent présenter des fonctions adéquates aussi bien pour leur greffage sur le tripode que pour la formation d'haptènes nécessaires à la production d'anticorps spécifiques.

A.II.1. Analogues AFB2 et AFB1

Les aflatoxines **AFB1** et **AFB2** sont produites naturellement et ont pu être isolées et purifiées de sorte à être commerciales pour diverses applications pharmaceutiques et biologiques. Au laboratoire, nous avons déjà démontré l'intérêt de l'**AFB2** commerciale pour des applications en SPIT-FRI visant à détecter l'**AFB1**, plus toxique.²²⁰ Dans la littérature, plusieurs travaux ont montré la synthèse de différents dérivés d'aflatoxines **AFB1** et **AFB2** (Figure 90).²²¹ Par exemple, en 1989, l'équipe de Dean²²² a décrit la synthèse d'un analogue de **AFB2** en formant une liaison oxime entre le groupement cétone de l'**AFB2** et la fonction oxyamine de l'acide aminooxyacétique (Aao). Spécifiquement, ces mycotoxines ont été modifiées par différentes fonctions afin d'être liées à des protéines pour leur utilisation *in vivo* et aussi pour la formation d'haptènes dans le but de produire des anticorps anti-**AFB2** ou anti-**AFB1**.

²²⁰ Schultz, E.; Perraut, F.; Flahaut, T.; Planat-Chretien, A.; Galland, R.; Lesbre, F.; Hoang, A.; Boutal, H.; Volland, H. A Robust Fluorescence Multiplex Immunoassay Biosensor Designed for Field Applications. Solid State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, **2007**, 955–958.

²²¹ a) Swenson, H.; Miller, A.; Miller, C. The Reactivity and Carcinogenicity of Aflatoxin B₁-2,3-Dichloride, a Model for the Putative 2,3-Oxide Metabolite of Aflatoxin B₁. *Cancer Research*, **1975**, 35, 3811-3823. b) Cervino, C.; Knopp, D.; Weller, M.; Niessner, R. Novel Aflatoxin Derivatives and Protein Conjugates. *Molecules* **2007**, 12, 641–653 c) Groopman, J. D.; Croy, R. G.; Wogan, G. N. In Vitro Reactions of Aflatoxin B₁-Adducted DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1981**, 78 (9), 5445-5449.

²²² Hastings, K. L.; Hagler, W. M.; Harris, T. M.; Voyksner, R. D.; Dean, J. H. Production and Characterization of Aflatoxin B₂ Oximinoacetate. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, 37 (2), 393–400.

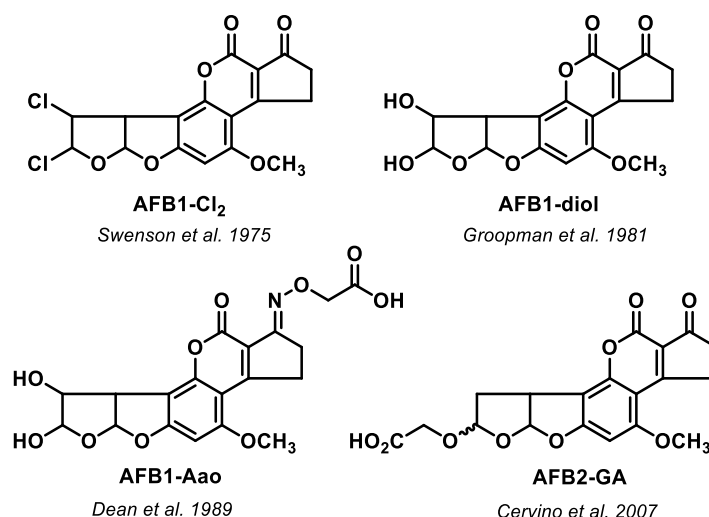


Figure 90 : Exemples de structures des dérivés des Aflatoxines **AFB1** et **AFB2**

Au laboratoire, nous avons développé un analogue de **AFB2** portant une fonction alcyne de sorte à pouvoir le greffer sur le tripode **T1.1** par une réaction CuAAC.²²³ Ce composé a ensuite pu être greffé sur une surface de verre pour réaliser un biocapteur à aflatoxine **AFB1**.

Dans notre projet, nous avons choisi de travailler avec l'**AFB2** plutôt qu'avec l'**AFB1** car cette dernière présente une toxicité plus élevée que l'**AFB2** (Introduction A.I.1). Il a été choisi de synthétiser un dérivé d'**AFB2** fonctionnalisé par une fonction alcyne (Figure 91). Des anticorps monoclonaux anti-**AFB1** ont été obtenus en utilisant le même type de dérivatisation à partir de l'**AFB1**.²²⁴ Cet analogue **AFB2-Alcyne** servira dans la construction du capteur SPIT-FRI pour retenir l'anticorps anti-**AFB1** en surface.

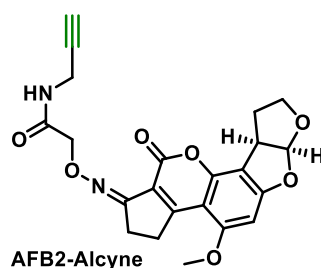


Figure 91 : Structure de l'analogue **AFB2-Alcyne** cible

²²³ Clavé, G.; Volland, H.; Flaender, M.; Gasparutto, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. A Universal and Ready-to-Use Heterotrifunctional Cross-Linking Reagent for Facile Synthetic Access to Sophisticated Bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (19), 4329-4345.

²²⁴ Scholl, P. F.; Musser, S. M.; Groopman, J. D. Synthesis and Characterization of Aflatoxin B₁ Mercapturic Acids and Their Identification in Rat Urine. *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 10, 1144-1151.

A.II.2. Analogues de Patuline

Plusieurs analogues de **PAT** (Figure 92) ont été développés dans la littérature principalement pour la formation des haptènes qui ont servi à la production d'anticorps spécifiques anti-PAT.

Afin d'étudier la synthèse de ces dérivés ainsi que leur bioactivité, l'équipe de Ghisalberti²²⁵ a élaboré en 2000, l'identification des dérivés de patuline par une purification par chromatographie. Le premier dérivé identifié est sous forme d'un dimère de patuline. Ensuite, une tentative de synthèse du 2^{ème} dérivé 3,4-époxyapatuline **20** par époxydation de la patuline en présence de diméthylidioxirane. Cependant, cette réaction a amené à l'obtention de 3,4-dihydroxyapatuline acétonide **21** plutôt qu'à **20** (Figure 92A).

L'équipe de Sabato d'Auria²²⁶ a également synthétisé deux dérivés de patuline **22** et **23** (Figure 92B) portant des fonctions carboxyles en utilisant la L-arabinose comme précurseur. Ces analogues ont été par la suite accrochés à la protéine BSA (sérum albumine bovine) afin de produire des anticorps polyclonaux anti-PAT utilisés dans la détection de patuline par un immunodosage fluorescent.

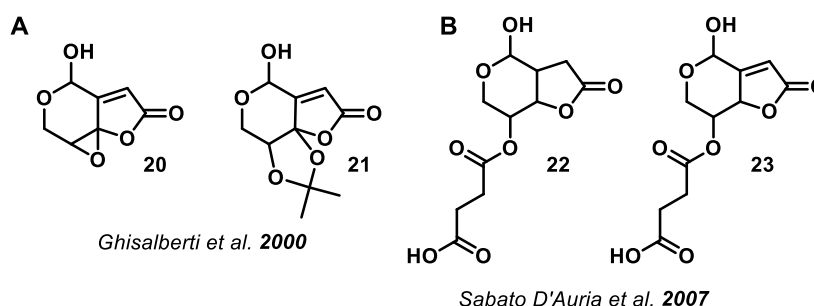


Figure 92 : Structures des dérivés de Patuline décrits dans la littérature

Pour notre projet, nous avons choisi de modifier la patuline **PAT** (Figure 93) afin d'y introduire l'alcyne nécessaire au greffage sur le tripode.

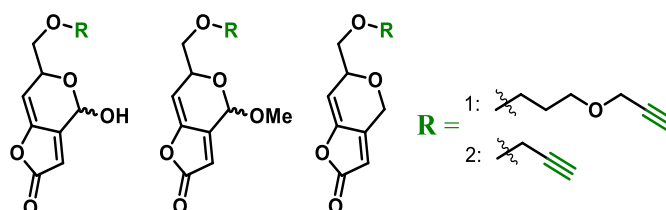


Figure 93 : Structures des analogues de patuline cibles

²²⁵ Ghisalberti, E. L.; Hargreaves, J. R.; Skelton, B. W.; White, A. H. New Patulin Derivatives. *Aust. J. Chem.* **2000**, 53, 995-997.

²²⁶ De Champdoré, M.; Bazzicalupo, P.; De Napoli, L.; Montesarchio, D.; Di Fabio, G.; Coccozza, I.; Parracino, A.; Rossi, M.; D'Auria, S. A New Competitive Fluorescence Assay for the Detection of Patulin Toxin. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 751-757.

Ces analogues de mycotoxines, une fois introduits dans notre dispositif SPIT-FRI, devront être reconnus par des anticorps marqués par un quencher de fluorescence afin d'effectuer des tests d'affinité entre anticorps-analogue de toxine (étape d'activation) afin de rendre possible la quantification des mycotoxines présentes en solution alimentaire (étape de compétition immunologique). Pour cela, il est important de produire des anticorps spécifiques aux mycotoxines à détecter **AFB1**, **AFB2** ou **PAT**.

A.III Les anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines qui appartiennent à la famille des immunoglobulines (Ig).²²⁷ Ils sont produits par les plasmocytes (stade finale de la différenciation des lymphocytes B).²²⁸ Ces protéines sont impliquées dans la réponse immunitaire, lors de l'introduction d'un antigène particulier et étranger dans l'organisme d'un animal. Ils sont responsables de la reconnaissance et de la fixation non covalente d'antigènes.

L'unité de base de ces anticorps est composée de quatre chaînes polypeptidiques (deux chaînes lourdes (H pour « heavy ») de masse moléculaire 55 kDa constituées de trois domaines constants appelés C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} et deux chaînes légères (L pour « light ») de masse moléculaire 25 kDa) reliées entre elles par des ponts disulfures. On distingue cinq classes d'isotypes d'anticorps : IgA, IgD, IgE, IgG, et IgM qui se distinguent respectivement par la composition en acides aminés de ces chaînes polypeptidiques. Les immunoglobulines de type G sont les plus présentes dans le réseau vasculaire et sont donc en première intervention pour lutter contre les toxines.²²⁹ Ces IgG sont constituées de deux régions :

- Une région appelée Fc (fragment cristallisable) qui comprend 4 domaines constants et qui est conservée dans tous les anticorps.
- Une région Fab qui comprend deux domaines constants et deux domaines variables en charge de la reconnaissance de l'antigène. Cette région est dédoublée pour chaque anticorps de sorte qu'une IgG peut se lier à deux antigènes.

²²⁷ Lipman, N. S.; Jackson, L. R.; Trudel, L. J.; Weis-Garcia, F. Monoclonal Versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information Resources. *ILAR J.* **2005**, 46 (3), 258–268.

²²⁸ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. B Cells and Antibodies. *Mol. Biol. of the Cell. 4th Ed.* **2002**.

²²⁹ Evtugyn, G.; Subjakova, V.; Melikishvili, S.; Hianik, T. Affinity Biosensors for Detection of Mycotoxins in Food. In *Ad. in Food and Nut. Research*; Elsevier, **2018**, 85, 263–310.

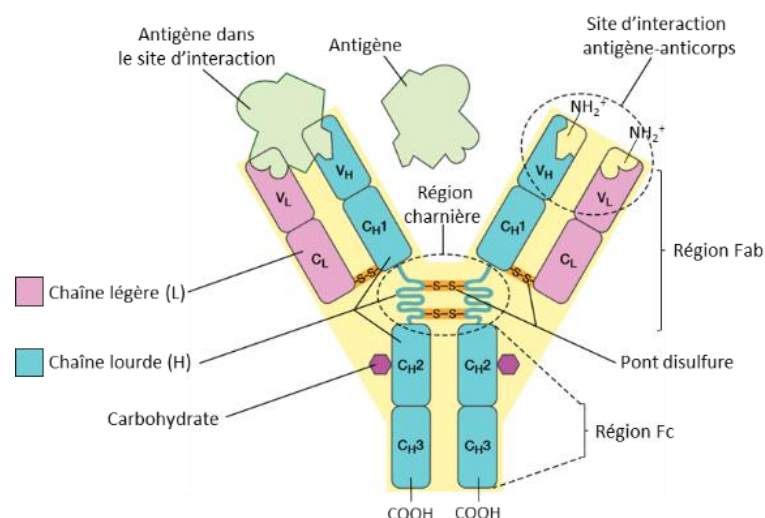


Figure 94 : Représentation schématique de l'immunoglobuline IgG²³⁰

Comme beaucoup de molécules biologiques, les anticorps sont sensibles au changement de la température ou de pH, à la concentration élevée des anticorps (agrégation et précipitation), au stockage à long terme, la vitesse d'agitation, le processus de congélation/décongélation et aussi au processus de lyophilisation.²³¹ De mauvaises conditions d'utilisation peuvent conduire à l'agrégation, la dénaturation, l'isomérisation, l'hydrolyse et/ou l'oxydation.

Nous distinguons deux types d'anticorps qui peuvent être produits et utilisés dans les biocapteurs²³²: les anticorps monoclonaux et les anticorps polyclonaux qui se différencient par leur spécificité et leur affinité à l'antigène et leur méthode de production.²²⁷

Les **anticorps polyclonaux** sont obtenus en immunisant à plusieurs reprises un animal (par exemple un lapin, une chèvre...) par injection d'antigènes et d'adjuvant. Le système immunitaire de l'animal va produire des anticorps dirigés contre les différents épitopes de l'antigène. Le sérum de l'animal est ensuite prélevé et purifié en laboratoire sur des colonnes d'affinité sur lesquelles sont greffées l'haptène à reconnaître. Ces anticorps obtenus sont hétérogènes et avec des spécificités variées permettant de reconnaître une multitude d'épitopes antigéniques. Ils sont faciles à produire et moins coûteux. De plus, ils sont stables sur une large gamme de pH et à différentes concentrations de sel mais restent moins sélectifs.

²³⁰ antibody | Definition, Structure, Function, & Types <https://www.britannica.com/science/antibody>.

²³¹ Wang, W.; Singh, S.; Zeng, D. L.; King, K.; Nema, S. Antibody Structure, Instability, and Formulation. *J. Pharm. Sci.* **2007**, 96 (1), 1–26.

²³² Conroy, P. J.; Hearty, S.; Leonard, P.; O'Kennedy, R. J. Antibody Production, Design and Use for Biosensor-Based Applications. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2009**, 20, 10–26.

Les **anticorps monoclonaux** sont des anticorps monospécifiques et identiques qui ne reconnaissent qu'un seul épitope. La production de ces anticorps se fait à partir des plasmocytes. L'inconvénient des plasmocytes étant qu'ils ont une durée de vie courte et un faible taux de division. Pour cela, Köhler et Milstein²³³ en 1975 ont développé une méthode de production massive et constante des anticorps monoclonaux *in vivo* qui a permis d'immortaliser les lymphocytes B produisant les anticorps.

Ces anticorps sont obtenus *in vitro* à partir des cellules hybrides appelées les hybridomes provenant de la fusion entre les lymphocytes B et des cellules tumorales, myélome de la même espèce. Cette fusion a permis d'immortaliser les lymphocytes B vu que le myélome se divise de façon rapide et régulière. De ce fait, chaque clone cellulaire hybride permet la production d'une quantité illimitée d'un même type d'anticorps donnant un aspect de biorécepteur bien spécifique.

Plus précisément, un certain nombre d'étapes est nécessaire pour la synthèse des anticorps monoclonaux (Figure 95) :²³⁴

Tout d'abord, l'étape d'**immunisation** s'effectue par une injection (1) de l'antigène d'intérêt à un animal de laboratoire qui permet la production des plasmocytes sécrétant à leur tour des anticorps dirigés contre cet antigène. C'est une étape qui correspond à la même étape de production des anticorps polyclonaux.

Dans le cas des petites molécules telles que les mycotoxines, ces molécules ne sont pas antigéniques (anti-immunogéniques). De telles molécules non immunogéniques sont appelées haptènes. Pour optimiser les conditions de production des anticorps, il est nécessaire de les conjuguer et de les lier à des protéines porteuses comme la BSA, l'hémocyanine de patelle (KLH pour « Keyhole Limpet Hemocyanin »), l'ovalbumine.... L'injection de ces espèces antigéniques (haptènes conjugués aux protéines porteuses) permet d'exercer une réponse immunitaire par production des anticorps contre les antigènes (donc en partie contre les mycotoxines) cibles que ce soit des anticorps polyclonaux après purification ou des anticorps monoclonaux.

La 2^{ème} étape (2, 3) correspond à la purification des lymphocytes B de la rate, en sacrifiant l'animal, et de les **fusionner** (4) avec des cellules de myélome. Ceci permet la **propagation** et la récupération de nouvelles cellules hybrides cultivées dans un milieu sélectif en présence de l'aminoptérine ou tout antagoniste de l'acide folique (thymine,

²³³ Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, 256, 495–497.

²³⁴ a) Marx, U.; Embleton, M. J.; Fischer, R.; Gruber, F. P.; Heuer, J.; de Leeuw, W. A.; Logtenberg, T.; Merz, W.; Portetelle, D.; Romette, J.-L.; Straughan, W. Monoclonal Antibody Production. *ATLA* **1997**, 25, 121-137. b) Leenaars, M.; Hendriksen, C. F. M. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. *ILAR J.* **2005**, 46 (3), 269–279.

hypoxantine). Cet agent permet d'inhiber la multiplication des cellules de myélome non fusionnées. De ce fait, trois types de cellules sont présents dans le milieu de culture : les lymphocytes B non fusionnés, qui ont une durée de vie très limitée, les cellules de myélome incapables de se multiplier et les cellules d'hybridome qui elles seront capables de croître.

Pour vérifier la sécrétion des anticorps spécifiques souhaités contre l'antigène cible, il est important de procéder à un **criblage** (5) comme une étape de sélection en utilisant différentes procédures d'immunodosage comme l'ELISA.

Afin d'obtenir des clones avec une population d'hybridomes capable de produire une seule espèce d'anticorps, une étape (6) de dilutions limites est nécessaire pour atteindre un stade clonal avec une lignée cellulaire pure des anticorps d'intérêt par une reconnaissance spécifique à l'haptène. Cette étape de **clonage** est très longue allant de 3 à 9 mois. Les souches d'hybridomes sont par la suite cryoconservées et les clones obtenus sont injectés à l'animal immunodéficient dans l'abdomen (7) pour la production des anticorps qui se trouvent en liquide ascitique récupérés par purification.²³⁵

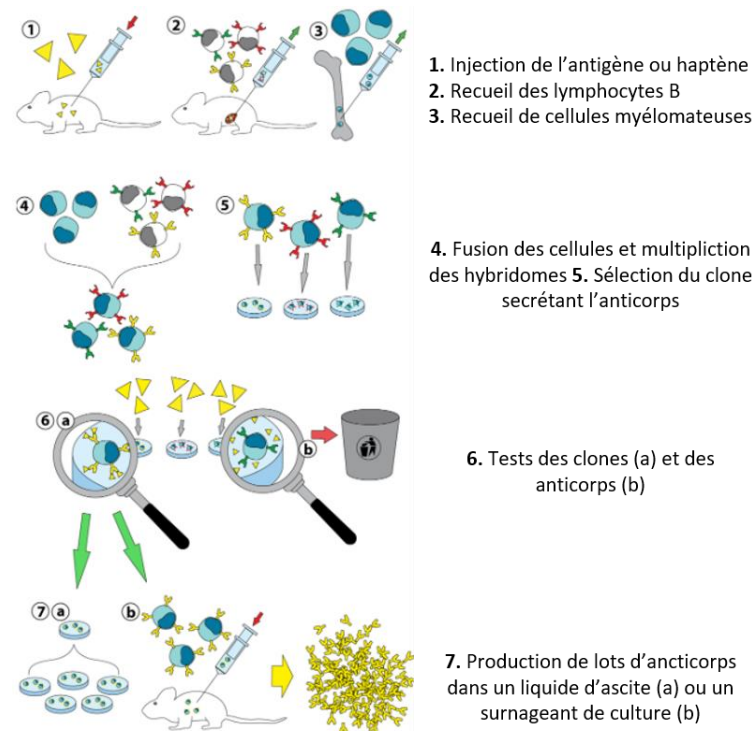


Figure 95 : Représentation schématique de la technologie hybridome pour le processus de la production des anticorps monoclonaux²³⁶

²³⁵ Liu, H. F.; Ma, J.; Winter, C.; Bayer, R. Recovery and Purification Process Development for Monoclonal Antibody Production. *mAbs* **2010**, 2 (5), 480–499.

²³⁶ Anticorps monoclonaux. *Wikipédia*. **2020**.

La structure des anticorps comporte de nombreuses fonctions carboxyles ($-\text{CO}_2\text{H}$) et amines (NH_2) qui permettent leur marquage par un quencher adéquat au fluorophore choisi. Pour cela, il est important d'étudier les familles des quenchers existants.

Il existe différentes méthodes pour conjuguer un composé sur un anticorps (drogue, fluorophore, enzyme...). Le point clef est d'éviter d'effectuer la bio-conjugaison sur la partie de l'anticorps reconnaissant l'antigène (épitope). Diverses méthodes ont été développées à partir de la bioconjugaison sur la partie glycosidique des anticorps ou sur les ponts disulfures, qui ne sont pas sur la partie variable des anticorps. C'est un domaine en soi de recherche pour pouvoir arriver, en particulier pour les anticorps thérapeutiques ou les ADC (antibody-drug conjugate) à des biomédicaments homogènes pouvant passer les différentes étapes des essais cliniques.²³⁷ Il n'est pas ici l'objet de ce manuscrit de détailler ces différentes méthodes spécifiques puisque nous avons choisi d'utiliser une méthode de bioconjugaison non spécifique consistant à utiliser les amines des lysines présentes en surface des anticorps, et à utiliser une quantité suffisamment faible de quencher pour statistiquement ne pas toucher toutes les lysines accessibles si, par malchance, des lysines se situent près du site de liaison de l'anticorps. Des expériences de déplacement des anticorps marqués par le quenchers avec l'analogue de toxine fluorescent (en l'occurrence le tripode) permettront de vérifier que ces capacités de liaisons n'ont pas été modifiées par la bioconjugaison du quencher.

A.IV Choix du quencher

Une large variété de substances peut jouer le rôle de quencher pour différentes combinaisons Donneur-Accepteur d'énergie.²¹⁷ Etant donné que c'est le FRET qui a été choisi comme processus d'extinction de fluorescence, il faut choisir un quencher compatible c'est-à-dire qu'il faut qu'il présente une bande d'absorption aux mêmes longueurs d'onde que la luminescence du fluorophore.

Dans le cadre de ce projet, nous nous intéressons principalement aux quenchers de fluorescence de la famille des azobenzènes. Ce sont des dérivés thermostables de diazènes, caractérisés par des groupes phényles reliés entre eux par un motif diazo $\text{N}=\text{N}$, responsable de l'extinction de fluorescence, via une isomérisation Z/E déclenchée photochimiquement. Ce sont des molécules sans fluorescence native déjà utilisées dans le domaine des pigments et des colorants et qui sont fréquemment utilisées pour le développement des sondes fluorogéniques FRET.²³⁸

²³⁷ Sochaj, A. M.; Świdarska, K. W.; Otlewski, J. Current Methods for the Synthesis of Homogeneous Antibody–Drug Conjugates. *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33 (6), 775–784.

²³⁸ Chevalier, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Azo-Based Fluorogenic Probes for Biosensing and Bioimaging: Recent Advances and Upcoming Challenges. *Chem. – Asian J.* **2017**, 12 (16), 2008–2028.

Dans leur état excité, ces molécules ont la particularité de s'isomériser. De ce fait, nous pouvons les observer sous deux configurations possibles Z et E (Figure 96). Cette photoisomérisation, du pont diazo, contrôlée en fonction de la longueur d'onde appliquée est rendue possible grâce à la rupture de la liaison π .²³⁹ Ce phénomène est la raison principale de la désexcitation du chromophore et à la dissipation non radiative de l'énergie absorbée.²⁴⁰

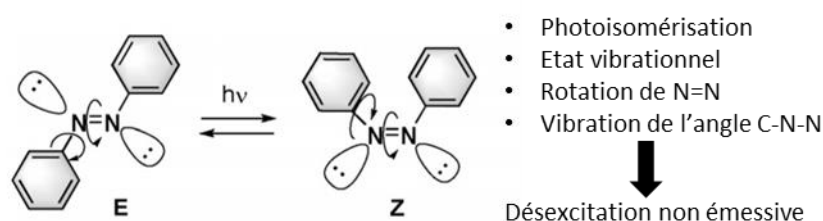


Figure 96 : Photoisomérisation E-Z des azobenzènes²³⁸

Les coefficients d'extinction molaire importants de ce type de quenchers assurent une bonne absorption de la lumière. De plus, leur gamme de longueur d'onde (≥ 100 nm) leur permet une compatibilité avec différents fluorophores.

Une variété de quenchers diazoïques est commercialement disponible auprès de la société américaine Biosearch Technologies parmi lesquels la gamme des **BHQ** pour « Black Hole Quencher », le **DABCYL** (4-(DiméthylAminoazo) Benzene-4-CarboxYLic acid) et le **BBQ** « Black Berry Quencher ».

²³⁹ Bandara, H. M. D.; Burdette, S. C. Photoisomerization in Different Classes of Azobenzene. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41 (5), 1809–1825.

²⁴⁰ Santos, F. da S.; Descalzo, R. R.; Gonçalves, P. F. B.; Benvenuto, E. V.; Rodembusch, F. S. Evidence for Excited State Intramolecular Charge Transfer in Benzazole-Based Pseudo-Stilbenes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 10994–11001.

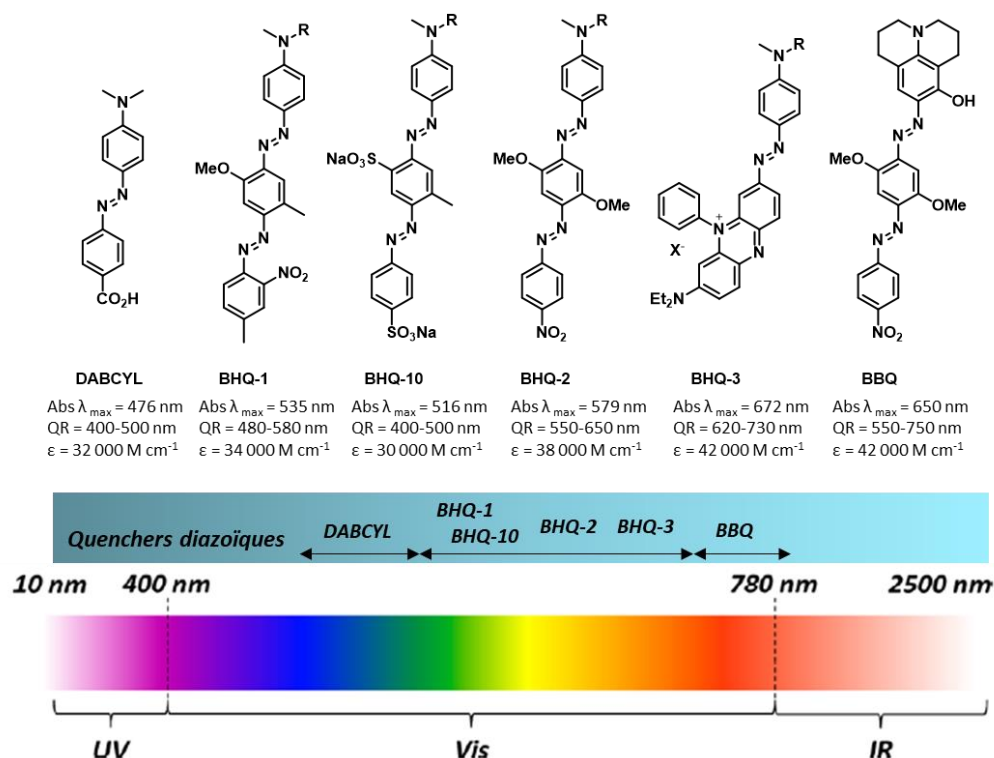


Figure 97 : Structures et bandes d'absorbance de Black Hole Quenchers à base d'azobenzène (QR= Quenching Range)²³⁸

Pour étendre les applications des BHQ dans des sondes fluorogéniques avec une large gamme de fluorophores, il est possible d'obtenir ces molécules polybenzéniques par une substitution électrophile aromatique S_EAr entre un sel de diazonium et un dérivé de N,N-dialkyle aniline portant la fonction de bioconjugaison à introduire (Figure 98).

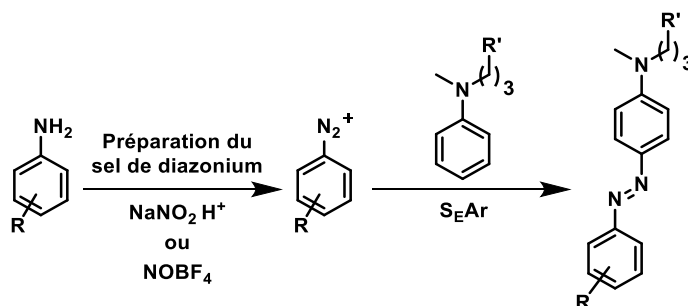


Figure 98 : Préparation des quenchers fonctionnalisés à base d'azobenzène

Au fil des années, notre équipe a développé une large gamme de dérivés bioconjuguables de type **BHQ-1** et **BHQ-2** portant différentes fonctions R de bioconjugaison comme un azoture, un alcyne ou un maléimide.²⁴¹

²⁴¹ a) Chevalier, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Straightforward Synthesis of Bioconjugatable Azo Dyes. Part 1: Black Hole Quencher-1 (BHQ-1) Scaffold. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55 (50), 6759–6763. b) Straightforward

Un autre quencher universel bioconjuguable multiazoïque hydrosoluble **UDQ** a été aussi développé en tant qu'un dérivé de nitroDABCYL hétérotrifonctionnel via une dérivatisation séquentielle de **DABCYL** par deux autres quenchers **BHQ-1** et **BHQ-3**.²⁴² Ceci a pour but d'élargir la bande d'absorbance du quencher permettant l'extinction d'un grand nombre de fluorophores possibles émettant en UV-Visible et le Proche Infra-rouge (NIR).

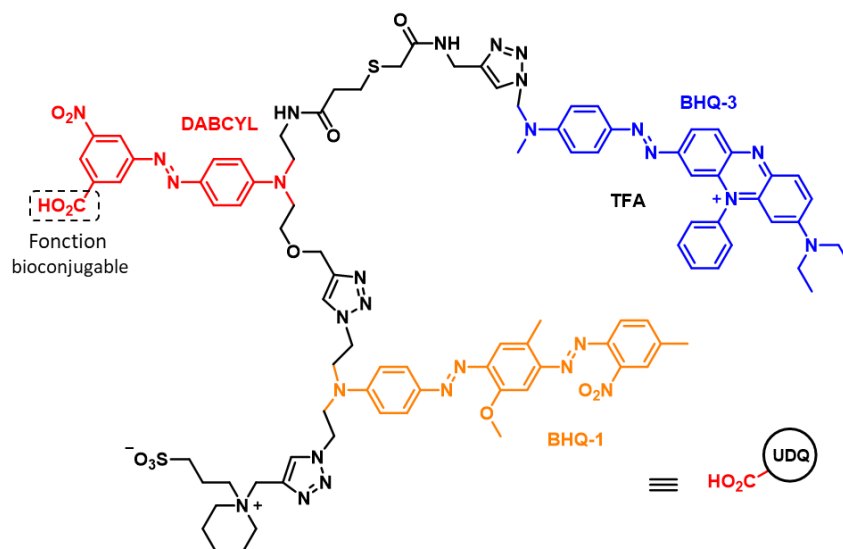


Figure 99 : Structure du quencher **UDQ**

Malgré ces différentes caractéristiques photophysiques intéressantes (largeur de spectre 460 nm allant de 250 à 710 nm avec un rendement d'extinction au-delà de 97% pour une grande variété de fluorophores), ce quencher d'une taille importante nécessite une synthèse fastidieuse à multi-étapes. Pour cela une nouvelle famille de quencher diazoïque a été développée à base du sulfo-rhodamine. C'est un quencher universel **SR101-Q** hydrosoluble de type sulfo-xanthène. Il a été aussi élaboré avec des rendements entre 32% et 65% à partir d'une aniline tertiaire portant une fonction conjugable (azoture, maléimide, acide carboxylique, alcyne et amine) et une arylamine primaire qui présente un dérivé de sulfo-rhodamine 101.²⁴³

Synthesis of Bioconjugatable Azo Dyes. Part 2: Black Hole Quencher-2 (BHQ-2) and BlackBerry Quencher 650 (BBQ-650) Scaffolds. *Tetrahedron Lett.* **2014**, 55 (50), 6764–6768.

²⁴² Chevalier, A.; Hardouin, J.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Universal Dark Quencher Based on "Clicked" Spectrally Distinct Azo Dyes. *Org. Lett.* **2013**, 15 (23), 6082–6085.

²⁴³ Chevalier, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Azo-Sulforhodamine Dyes: A Novel Class of Broad Spectrum Dark Quenchers. *Org. Lett.* **2014**, 16 (15), 3946–3949.

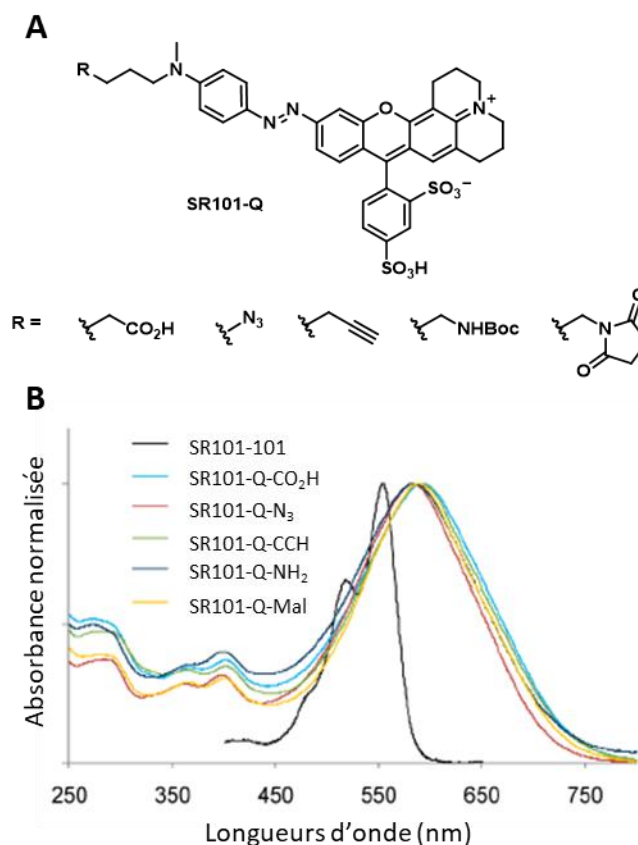


Figure 100 : (A) Structure des quencher **SR101-Q** et les différentes fonctions possibles. (B) Spectres d'absorption **SR101-Q-X** en PBS à 25°C.

Après avoir testé l'efficacité de ce quencher dans des sondes fluorogéniques à base de FRET, il a été observé que **SR101-Q** possède un potentiel d'extinction de fluorescence de plusieurs fluorophores couvrant une large gamme de longueurs d'onde du spectre visible jusqu'au domaine du Proche Infra-Rouge.

B. Résultats et discussion

B.I.1. Choix du système FRET

Pour remplir les conditions nécessaires du système FRET, il est important de choisir le fluorophore (donneur d'énergie) et le quencher (accepteur d'énergie) de façon à avoir un recouvrement spectral entre les deux (Introduction B.III.2.3.1). Pour ce projet, c'est la Rhodamine 6G qui a été choisie pour ses bonnes caractéristiques photophysiques, sa photostabilité, sa résistance aux différentes conditions de pH, et pour sa modification aisée.

B.I.1.1 Synthèse du fluorophore

Dans le but de créer ce dispositif fondé sur le phénomène de fluorescence, il est nécessaire de choisir la voie adéquate pour la synthèse du dérivé de la R6G que nous avons

choisi portant une fonction aldéhyde. Cette fonction servira pour le greffage du fluorophore sur l'oxyamine par une ligation oxime du dipode **D4** et du tripode **T4** après déprotection.

Il existe différentes formes limites de la rhodamine fluorescente (Figure 101). Il est connu que dans un milieu basique, nous pouvons observer une lactonisation intramoléculaire de la rhodamine par une cyclisation au niveau de la fonction amide ce qui aboutit à une forme non conjuguée et non fluorescente.²⁴⁴

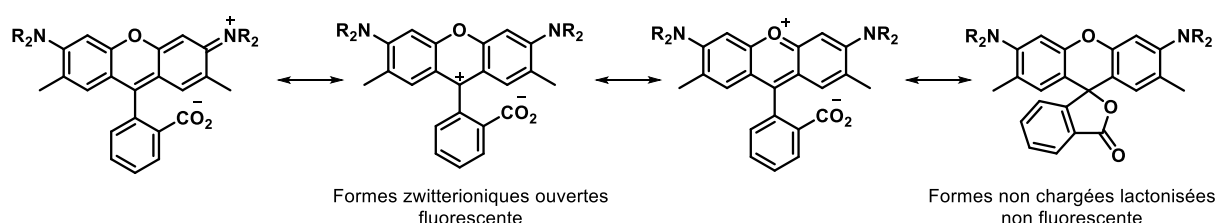


Figure 101 : Différentes formes limites des rhodamines et leurs propriétés fluorescentes associées²⁴⁵

En tenant compte de cette limite, la stratégie de la synthèse de la **R6G-AL** a été d'introduire la fonction aldéhyde sur l'acide carboxylique ce qui permet non seulement d'éviter la lactonisation mais également de conserver les propriétés photophysiques de la R6G.²⁴⁶ Cette synthèse a été réalisée en 4 étapes représentées dans la Figure 102 B.

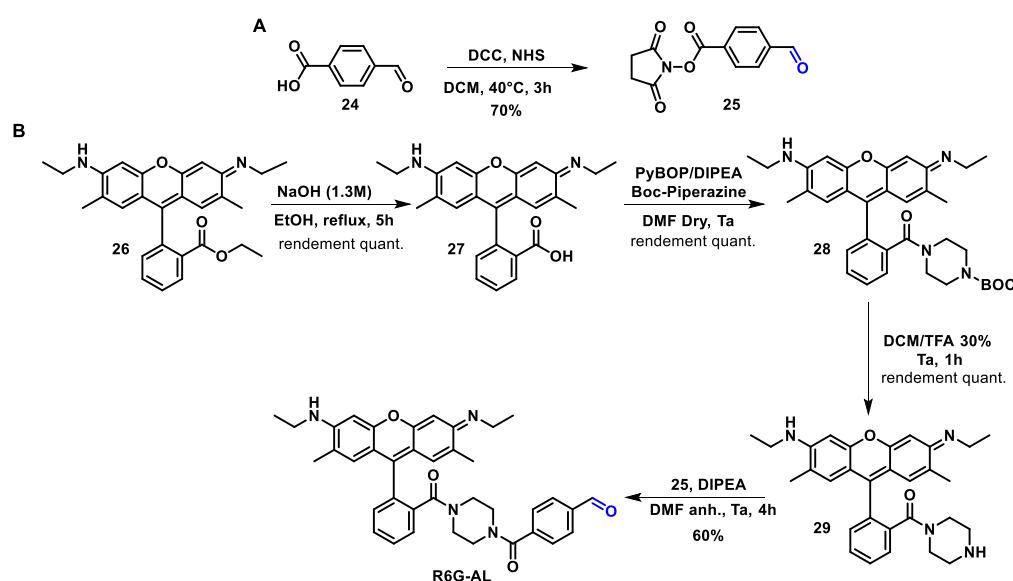


Figure 102 : Synthèse de la Rhodamine **R6G-AL**

²⁴⁴ a) Giuliano, K. A.; Taylor, D. L. Fluorescent-Protein Biosensors: New Tools for Drug Discovery. *Trends Biotechnol.* **1998**, 16 (3), 135–140. b) Chen, X.; Pradhan, T.; Wang, F.; Kim, J. S.; Yoon, J. Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives. *Chem. Rev.* **2012**, 112 (3), 1910–1956.

²⁴⁵ Chevalier, A. Développement de nouveaux outils chimiques pour la synthèse de sondes optiques fluorogéniques pour la détection d'activités enzymatiques en milieu biologique. **2014**.

²⁴⁶ Nguyen, T.; Francis, M. B. Practical Synthetic Route to Functionalized Rhodamine Dyes. *Org. Lett.* **2003**, 5 (18), 3245–3248.

Ainsi, la R6G commerciale **26** portant un ester éthylique a été engagée dans une réaction d'hydrolyse en présence d'hydroxyde de sodium pour donner le composé **27**, suivi d'une réaction de couplage peptidique afin d'introduire une pipérazine monoprotégée par un groupement de type tert-butoxycarbonyl (Boc). La déprotection de cette pipérazine a été réalisée par un traitement avec l'acide trifluoroacétique (TFA) dans le dichlorométhane pour former le composé **29** avec un rendement quantitatif. Ce dernier a ensuite été engagé dans une réaction d'amidation en présence de l'aldéhyde **25**, préalablement synthétisé (Figure 102 A).²⁴⁷ La rhodamine **R6G-AL** a été obtenue avec un rendement global de 58% sur quatre étapes.

Les propriétés de la Rhodamine **R6G-AL** ont été mesurées à température ambiante dans l'éthanol (EtOH). Le profil d'absorption présente deux bandes principales centrées à 250 et 520 nm. Le coefficient d'extinction molaire de ce fluorophore est de 75000 M⁻¹.cm⁻¹. La rhodamine **R6G-AL** possède une émission centrée à 533 nm avec un rendement quantique de 90 % dont le profil d'émission est l'image miroir de la bande d'absorption de plus basse énergie.

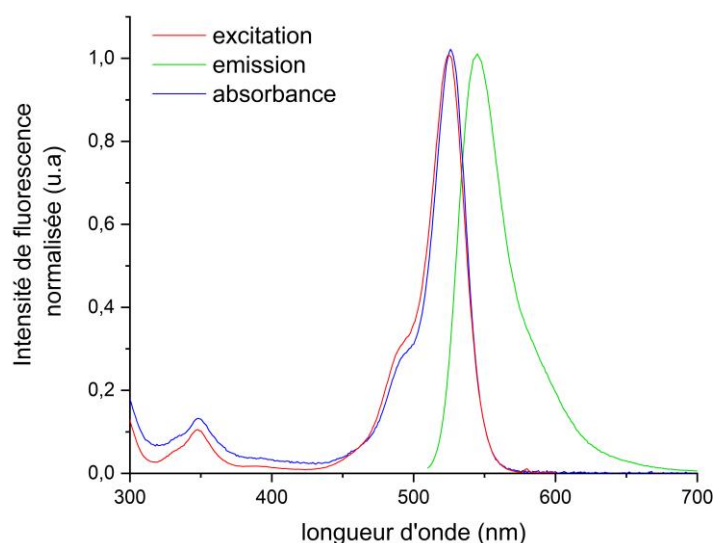


Figure 103 : Propriétés spectroscopiques de R6G-AL (CH₂Cl₂, TA)

B.I.1.2 Synthèse du quencher

Plusieurs quenchers peuvent remplir les conditions requises pour notre système FRET. Notre objectif est d'obtenir les quenchers adéquats avec une fonction acide carboxylique terminale afin de permettre son greffage sur les lysines de l'anticorps, via la formation in situ de l'ester de NHS. Parmi les différents quenchers répondant aux critères de sélection, c'est

²⁴⁷ E. Herbst, D. Shabat, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 3715-3728.

le quencher **BHQ-1** qui a été choisi. Bien que ce quencher soit commercial, nous avons fait le choix de le synthétiser (Figure 104). Il a été obtenu par substitution électrophile aromatique S_EAr entre le sel de diazonium (Fast Corinth V Salt) commercial et l'aniline **30** qui était synthétisée au laboratoire.²⁴⁸ Le composé **BHQ-1** a été obtenu avec un rendement de 45%.

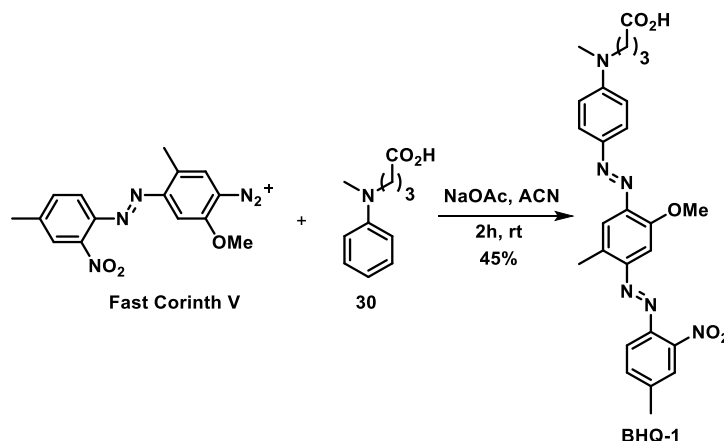


Figure 104: Synthèse du dérivé **BHQ-1** par une réaction de type S_EAr

Ce quencher possède les propriétés photophysiques qui correspondent à notre système FRET. Cependant, nous avons rencontré un problème de solubilité lors de sa dissolution dans un milieu aqueux (tampon PBS). Une précipitation est observée lors de l'ajout de **BHQ-1** dans le tampon. Pour éviter cela, deux autres quenchers ont été envisagés (Figure 105). D'une part, la sulforhodmaine **SR101-Q-CO₂H** préalablement synthétisée dans notre laboratoire ou le **BHQ-10**, un quencher commercial similaire au **BHQ-1** portant des groupements sulfonates ce qui le rend soluble en milieu aqueux.

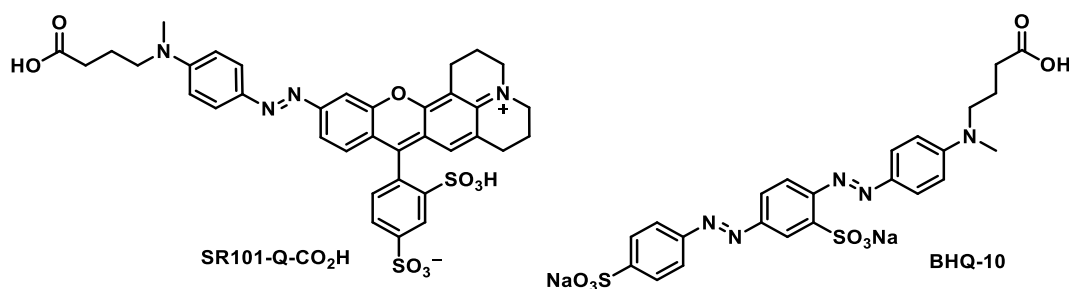


Figure 105 : Structures de **SR101-CO₂H** et **BHQ-10**

Les caractérisations photophysiques (Figure 106) de ces deux quenchers montrent qu'ils respectent les conditions du système FRET avec le Fluorophore choisi **R6G-AL**. Un recouvrement spectral est observé entre le donneur et l'accepteur d'énergie.

²⁴⁸ J. Murray, D. Nowak, L. Pukenas, R. Azhar, M. Guillorit, C. Wälti, K. Critchley, S. Johnson, R. S. Bon, *J. Mat. Chem. B*, **2014**, 2, 3741-3744.

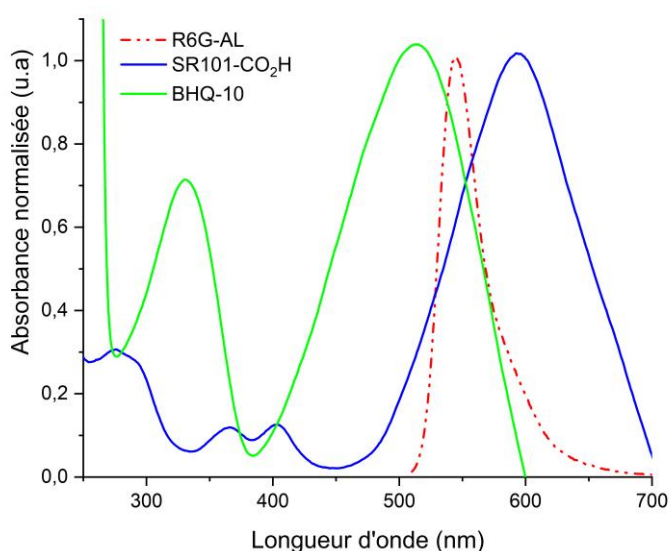


Figure 106 : Spectres d'absorption **SR101-CO₂H** et **BHQ-10** et spectre d'émission **R6G-AL**

Après avoir choisi notre système FRET, il est important de synthétiser les analogues de toxines qui, dans un 2^{ème} temps, vont être greffés sur le tripode via l'azoture. Dans ce manuscrit, nous allons aborder uniquement la synthèse des analogues de toxine sans décrire l'étape de greffage.

B.1.2. Synthèse des analogues de mycotoxines

Nous avons envisagé de greffer les analogues de toxine sur la fonction azoture du tripode via une réaction CuAAC (cette étape ne sera pas abordée dans ce manuscrit, n'ayant pu être réalisée par manque de temps). Il est donc nécessaire de synthétiser des analogues de mycotoxines cibles (**AFB2** et **PAT**) portant une fonction alcyne.

B.1.2.1 Synthèse analogue AFB2

Il est important de noter que nous effectuons la synthèse des analogues de l'**AFB2**, pour que l'analogue soit reconnu par les anticorps anti-**AFB1**, mais avec une affinité moindre que l'**AFB1** elle-même présente dans les solutions alimentaires. De plus, pour des raisons de sécurité l'**AFB2** est privilégiée puisqu'elle est moins toxique que l'**AFB1**.²⁴⁹ Dans notre cas, nous nous sommes intéressés à synthétiser un dérivé d'**AFB2** portant un groupement alcyne (**AFB2-alcyne**).

La méthode que nous avons adoptée (Figure 107) se base sur trois étapes à partir de l'**AFB2** commercial et l'acide aminoxyacétique :²²² tout d'abord, un couplage peptidique a

²⁴⁹ Clavé, G.; Volland, H.; Flaender, M.; Gasparutto, D.; Romieu, A.; Renard, P.-Y. A Universal and Ready-to-Use Heterotrifunctional Cross-Linking Reagent for Facile Synthetic Access to Sophisticated Bioconjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8 (19), 4329.

Chapitre 2 : Application des réactifs multifonctionnels au SPIT-FRI

été effectué entre l'intermédiaire **A** (utilisé pour la synthèse du tripode) et la propargylamine en présence de DIPEA pour générer l'alcyne **31** avec un rendement de 55%. Ensuite, une déprotection de la fonction oxyamine a été réalisée par un traitement au TFA afin d'obtenir le précurseur **32** avec un rendement de 15%. Ce faible rendement est expliqué car le produit obtenu est hydrophyle, et resté majoritairement dans la phase aqueuse. Une lyophilisation de la phase aqueuse ne nous a pas permis de le récupérer, du fait de sa volatilité. Finalement, le greffage de l'**AFB2** commerciale a été effectué en présence de pyridine pour obtenir **AFB2-alcyne**. Le rendement global est de 6% sur quatre étapes après une purification en RP-HPLC phase inverse (System D).

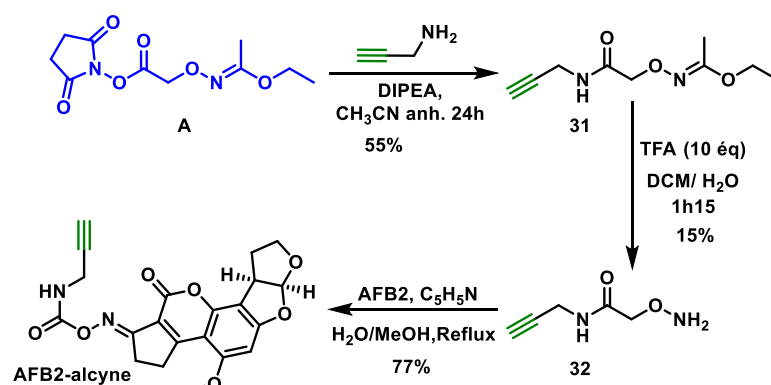


Figure 107 : Synthèse de l'analogue de l'**AFB2-alcyne**

Le chromatogramme issu de la purification de **AFB2-alcyne** est représenté dans la Figure 108 avec une pureté de 90 % à $t_r = 7,26$ min. On observe aussi une impureté à 7,89 min non identifiable.

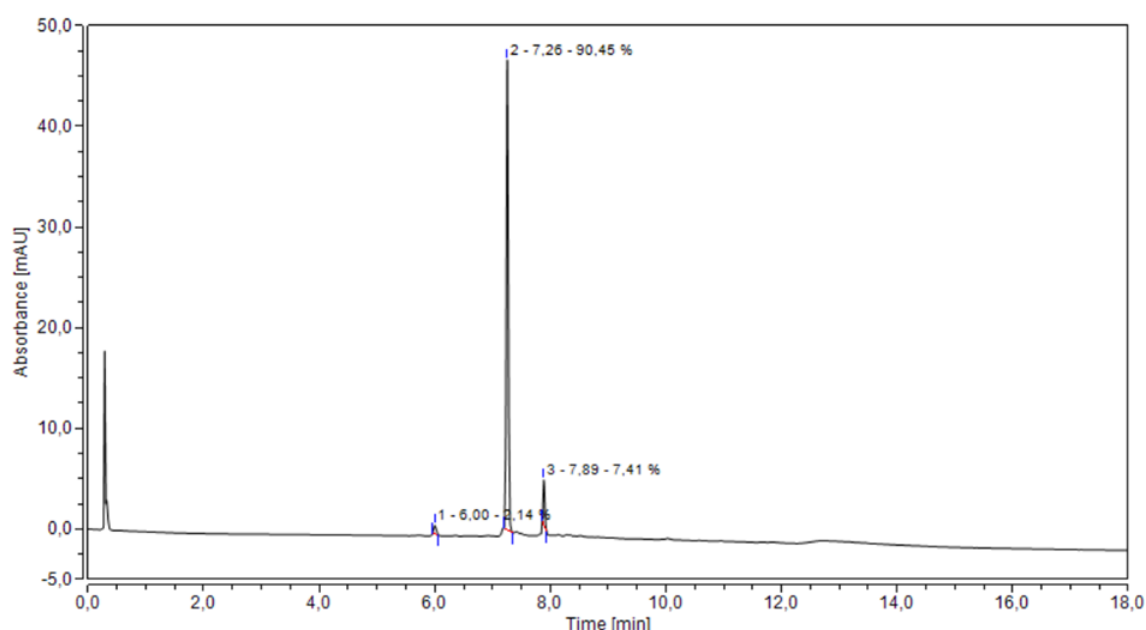


Figure 108 : Chromatogramme RP-HPLC de **AFB2-alcyne** après purification (System A- cf partie expérimentale)

B.I.2.2 Synthèse des analogues de Patuline

Plusieurs analogues de patuline ont été synthétisés par Dr. Abdelaziz Ouahrouch lors de son stage post-doctoral au laboratoire. Les synthèses effectuées ont été inspirées par plusieurs travaux décrits en littérature.²⁵⁰

Deux types d'analogues portant chacun un groupement différent : un groupement propargyle ou un groupement éther propargylique (Figure 109). Trois dérivés de chaque type d'analogue ont été obtenus en 7 et 8 étapes. Ils seront utilisés pour sélectionner des anticorps anti-patuline, et pour greffer sur le tripode. Il nous a paru important d'avoir une famille de dérivés de la patuline permettant de pouvoir ajuster les affinités relatives entre anticorps anti-patuline et la patuline ou ses analogues, afin de pouvoir optimiser les étapes de déplacement du SPIT-FRI.

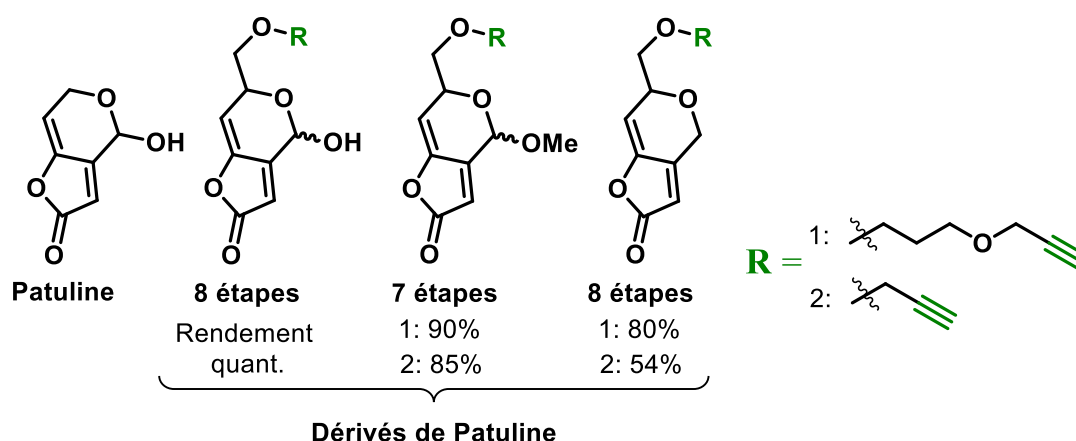


Figure 109: Analogues de patuline synthétisés

Comme l'indique la

Figure 110, la synthèse de ces dérivés a commencé avec la formation du diacétal **34** obtenu à partir du D-mannopyranose commercial **33**. Une substitution nucléophile a été effectuée afin d'introduire l'alcyne menant au(x) produit(s) **35**. Ces derniers sont par la suite placés en condition acide dans le méthanol afin de libérer les alcools jusqu'ici protégés sous forme d'acétal. Cette déprotection a également conduit à la formation d'un groupement méthoxy sur le carbone anomérique du cycle pyranose. Le sucre **36** est alors engagé dans une étape de protection sélective des fonctions alcool en position 3 et 4 sous la forme d'un

²⁵⁰ a) Bennett, M.; Gill, G. B.; Pattenden, G.; Shuker, A. J.; Stapleton, A. Ylidenebutenolide Mycotoxins. Concise Syntheses of Patulin and Neopatulin from Carbohydrate Precursors. *J. Chem. Soc.* **1991**, 4, 929-937. b) Rychlik, M.; Schieberle, P. Synthesis of ¹³C-Labeled Patulin [4-Hydroxy-4 H -Furo[3,2- c]Pyran-2(6 H)-One] To Be Used as Internal Standard in a Stable Isotope Dilution Assay. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46 (12), 5163-5169. c) Bryon Gill, G.; Pattenden, G.; Stapleton, A. A Concise Synthesis of Patulin from Arabinose. *Tetrahedron Lett.* **1988**, 29 (23), 2875-2878. d) Tada, M.; Ohtsu K.; Chiba, K.; Synthesis of Patulin and Its Cyclohexane Analogue from Furan Derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **1994**, 42 (10), 2167-2169.

diméthylacétal. L'alcool libre du composé **37** ainsi obtenu est oxydé en cétone en présence d'IBX, dérivé d'iode hypervalent puis engagé dans une réaction de Wittig afin d'obtenir le composé **38**. Le groupement acétal de ce dernier est hydrolysé en alcool qui réagit ensuite avec l'ester éthylique via une transestérification pour former la lactone **39**, molécule à partir de laquelle nous avons obtenu les dérivés cibles. Une substitution nucléophile suivie d'une élimination ont conduit au dérivé de la patuline **40**. A partir de celui-ci, nous avons obtenu deux autres analogues : le dérivé **41** issu d'une hydrolyse, et le dérivé **42** issu d'une réduction.

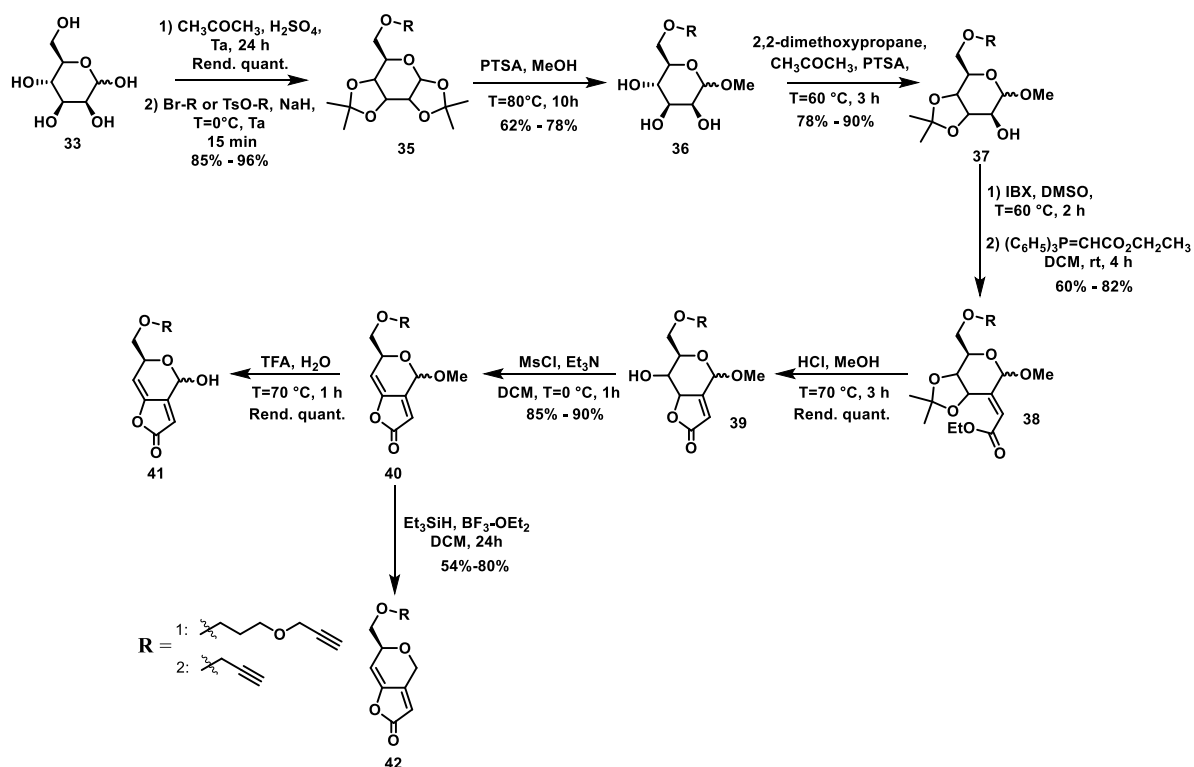


Figure 110 : Synthèse des analogues de Patuline

B.I.3. Fonctionnalisation du dipode D4-P et du tripode T4-P :

Afin de passer à l'étape de greffage du fluorophore **R6G-AL**, il est important de déprotéger le tripode. La déprotection du réactif hétérotrifonctionnel **T4-P** au niveau de la fonction thiol et de l'oxyamine a été tout d'abord testée sur le composé **D4-P**. Une fois déprotégée, la fonction oxyamine libre réagit de façon non réversible avec les cétones et les aldéhydes notamment avec l'acétone pouvant se trouver dans l'environnement du laboratoire. Ceci pourrait poser des problèmes de « dégradation ». De plus, en présence du thiol libre, une dimérisation peut avoir lieu via la formation d'un pont disulfure, ce qui empêcherait la fonctionnalisation de la surface d'or. Pour éviter ces inconvénients, le produit déprotégé est engagé directement à l'étape de dérivatisation.

Dans un premier temps, nous avons suivi le protocole décrit par Dr Guillaume Clavé dans sa thèse de doctorat. Il s'agit d'un traitement avec un mélange de TFA/TES/H₂O (95:2,5:2,5 v/v/v). Malheureusement, le produit obtenu que ce soit dans la phase aqueuse ou la phase organique ne correspond pas au réactif déprotégé.

Pour cette raison, il a été nécessaire d'optimiser les conditions de déprotection (Figure 111). Inspiré par des travaux dans la littérature,²⁵¹ une optimisation du nombre d'équivalents de TFA/TES (10 éq/ 6 éq) et aussi du solvant (dichlorométhane en lieu et place de l'eau) a permis d'obtenir le réactif hétérobifonctionnel **D4** déprotégé par simples lavages, ce qui a permis d'éviter en particulier l'étape de purification qui réduit systématiquement les rendements. Le rendement précis sur cette étape n'a pas été déterminé, car le produit est ensuite directement engagé dans l'étape de dérivatisation par greffage de la rhodamine **R6G-AL** par une ligation oxime entre la fonction oxyamine de **D4** et la fonction aldéhyde de la **R6G-AL**. Cette dérivatisation directe a pour but de limiter les réactions secondaires de formation de l'oxime avec les vapeurs d'acétone résiduelles présentes dans le laboratoire et la dimérisation du thiol.

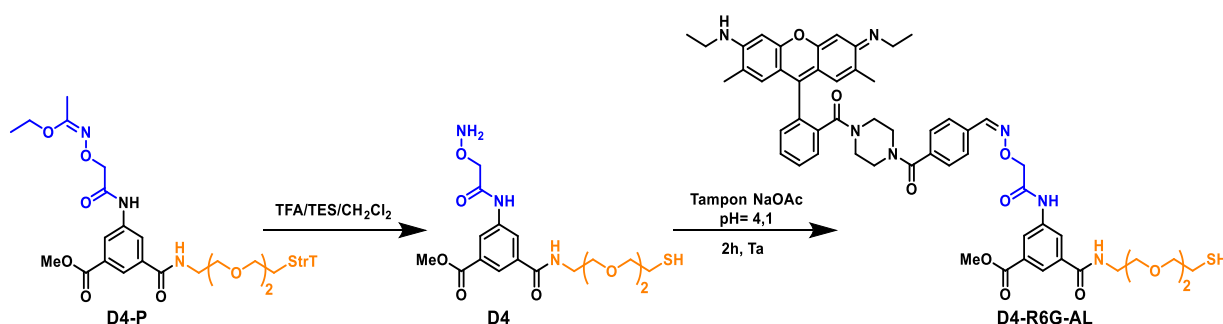


Figure 111 : Etapes de dérivatisation du réactif hétérobifonctionnel **D4-P** par **R6G-AL**

²⁵¹ Southan, A.; Hoch, E.; Schönhaar, V.; Borchers, K.; Schuh, C.; Müller, M.; Bach, M.; Tovar, G. E. M. Side Chain Thiol-Functionalized Poly (Ethylene Glycol) by Post-Polymerization Modification of Hydroxyl Groups: Synthesis, Crosslinking and Inkjet Printing. *Polym Chem* **2014**, 5 (18), 5350–5359.

Le chromatogramme issu de la purification de **D4-R6G-AL** est représenté dans la Figure 112 avec une pureté de de **82 %** à $t_r = 3,86$ min.

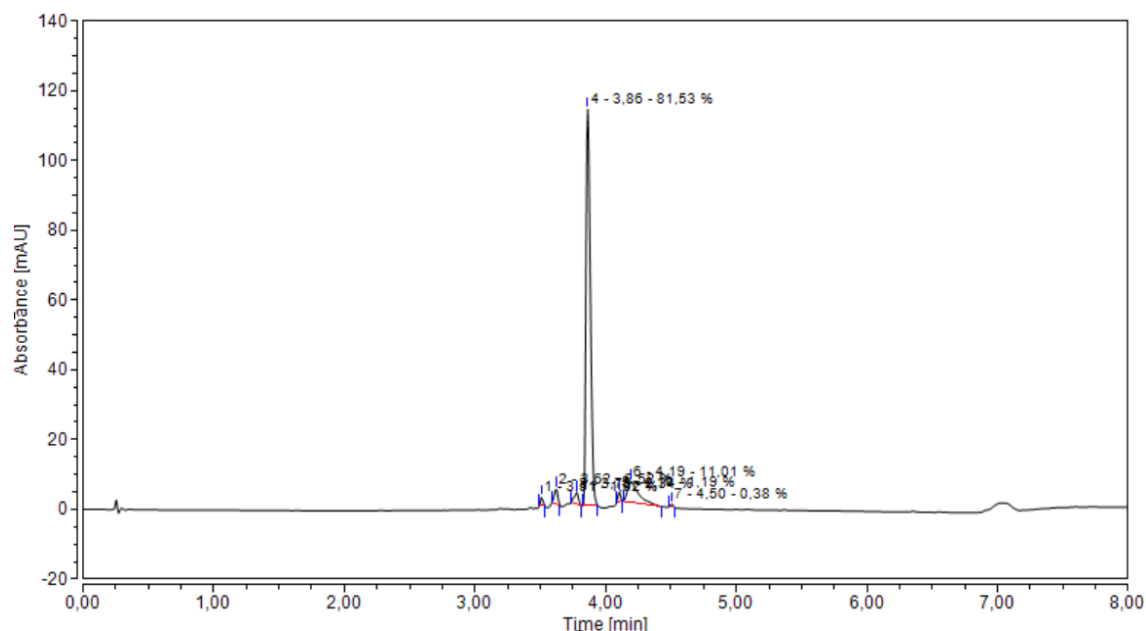


Figure 112 : RP-HPLC de **D4-R6G** après purification (System B- cf partie expérimentale)

Les conditions de déprotection par un traitement avec un mélange de TFA/TES/H₂O (95:2,5:2,5 v/v/v) n'ont donné le tripode **T4** qu'avec un rendement de 23% et avec une répétabilité de la réaction très limitée. La réaction n'a en effet donné uniquement 15% du produit désiré en travaillant à une échelle supérieure de quelques dizaines de mg suivi par une purification par RP-HPLC semi-préparative.

En tenant compte de l'optimisation effectuée sur le modèle hétérobifonctionnel **D4**, nous avons utilisé les mêmes conditions de déprotection pour **T4-P** (Figure 113). Afin d'éviter des problèmes de « dégradation », cette étape de déprotection a été réalisée peu de temps avant la dérivatisation avec le fluorophore. Celle-ci a été effectuée dans un tampon acétate de sodium NaOAc à pH= 4,1 afin d'obtenir le composé **T4-R6G-AL** après purification par HPLC en phase inverse.

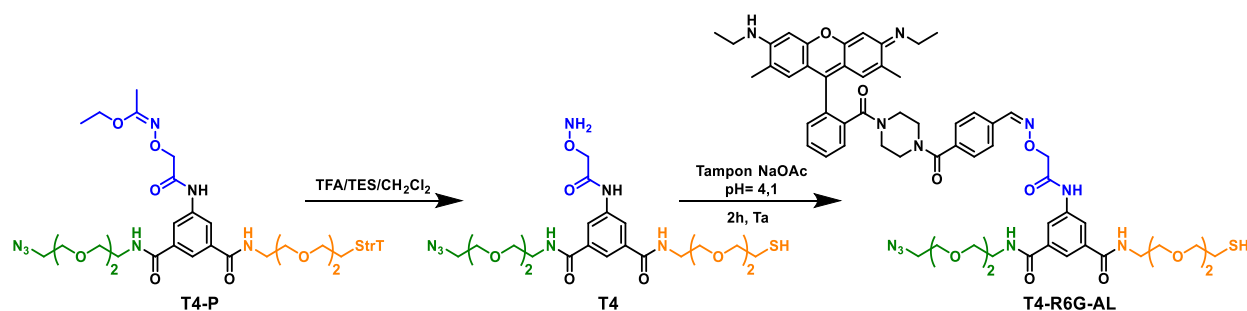


Figure 113 : Etape de dérivatisation de **T4**

Le chromatogramme issu de la purification de **T4-R6G-AL** est représenté dans la Figure 114 avec une pureté < 99 % à $t_r = 4,18$ min.

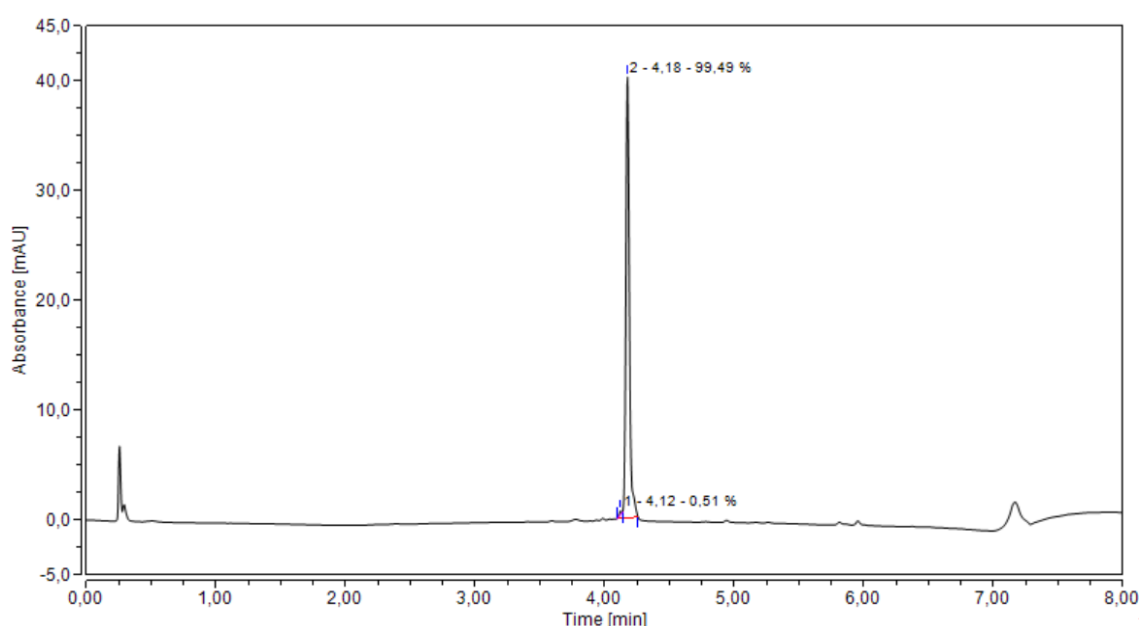


Figure 114 : Chromatogramme de **T4-R6G-AL** après purification par RP-HPLC (System B- cf partie expérimentale)

B.I.4. Synthèse et marquage des anticorps

Dans cette partie seront exposés les résultats de préparation des anticorps spécifiques et de leur marquage par un quencher compatible répondant aux paramètres de FRET sur surface, à savoir un bon recouvrement des spectres entre le spectre d'émission du fluorophore R6G et le spectre d'absorption du quencher.

B.I.4.1 Synthèse des anticorps ATX2 et ATX9

Les anticorps anti-AFB1 ont été obtenus par l'équipe d'Hervé Volland au CEA-DSV-SPI-LERI. Deux types d'anticorps monoclonaux ont été produits **ATX2** et **ATX9** et ils nous ont été fournis en deux lots de concentrations 920 µg/mL et 800 µg/mL respectivement

B.I.4.2 Synthèse d'anticorps anti-PAT

La synthèse d'anticorps anti-PAT a été effectuée auprès de l'entreprise Agro-Bio afin de produire des anticorps polyclonaux purifiés de lapin. Avant cela, il a été nécessaire de préparer un antigène spécifique **KLH-PAT** pour l'immunisation des lapins.

Pour cela, un analogue de patuline pré-synthétisé, qui joue le rôle d'haptène, a été greffé sur la KLH, protéine connue pour ses propriétés immunogéniques.

Pour l'immunisation, nous avons choisi de travailler avec les analogues de patuline possédant un linker alcyne « long », afin de greffer ceux possédant une chaîne plus courte sur le tripode, et minimiser la reconnaissance du bras de liaison par les anticorps. La formation de cet antigène se fait par une liaison amide entre un acide carboxylique présent sur l'haptène et un résidu amine de la protéine. Pour cela, il a été nécessaire d'introduire une fonction acide carboxylique par la dérivatisation de l'analogue de patuline **40** via une réaction CuAAC (Figure 115) en présence de l'acide 2-azidoacétique **43** pour obtenir le composé **44** avec un rendement de 65%. Ce dernier est directement engagé dans une étape d'activation de la fonction acide sous la forme d'un ester de NHS en présence de DCC pour obtenir le composé **45** permettant le couplage peptidique avec l'amine primaire des résidus lysines présents sur la KLH.

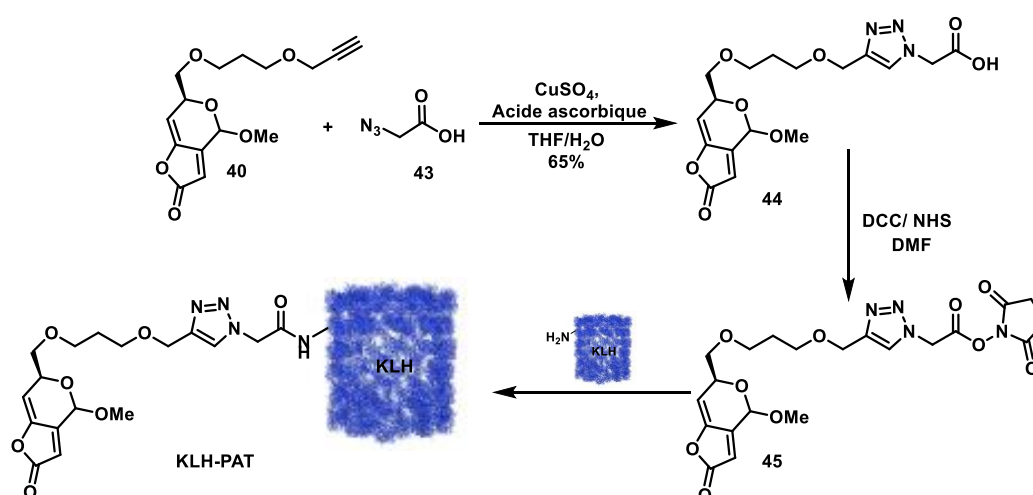


Figure 115 : Synthèse de l'antigène **KLH-PAT**

Le développement des anticorps polyclonaux cibles dans les locaux de l'entreprise Agro-Bio a été effectué tout d'abord par immunisation de deux lapins avec l'antigène **KLH-PAT**. Par la suite, le pré-immun a été prélevé afin de vérifier le pourcentage de couplage et contrôler la réponse immunitaire par ELISA. L'immunosérum de l'animal est par la suite prélevé et purifié par affinité. La pureté de ces anticorps a été validée par électrophorèse. Ensuite les anticorps purifiés ont été titrés et nous ont été fournis en deux lots (le premier

lot de volume 6 mL et à une concentration de 2,8 mg/mL et le 2^{ème} lot de volume 62,9 mL et à une concentration de 8,7 mg/mL).

B.I.4.3 Marquage des anticorps anti-AFB1

Dans cette partie nous nous intéressons uniquement au marquage des anticorps anti-AFB1 de type **ATX2**. En effet, par manque de temps, les essais de marquage des anticorps anti-PAT n'ont pas pu être réalisés.

Nous n'avions en notre possession qu'une très petite quantité d'anticorps, aussi, nous avons préféré mettre au point les conditions de marquage sur une protéine modèle : le lysozyme humain. Cette protéine a été choisie car elle ne présente qu'un seul résidu lysine (K33) réactif à pH physiologique et aucun résidu cystéine libre. Vu que cette protéine est connue par sa fonctionnalisation difficile,²⁵² l'utilisation des conditions d'un marquage réussi sur cette protéine auraient de bonnes chances d'aboutir sur les anticorps.

Avant de passer au marquage des anticorps, il est important de noter que deux essais d'activation du quencher **BHQ-10** ont été effectués. L'un en présence de EDCI.HCl et HOBT et le 2^{ème} essai en présence de TSTU.

Essais	Conditions
1	EDCI. HCl / DIPEA / HOBT / DMF, toute la nuit
2	TSTU (1,1 equiv) / DIPEA (3 equiv) / DMSO, 3h

*Tableau 8 : Conditions d'activation de **BHQ-10***

Cependant, le suivi d'activation par UPLC (system A, cf. la partie expérimentale pour la description du système d'élution) montre bien que les premières conditions mises en œuvre n'ont pas abouti, le **BHQ-10** est récupéré intact ($t_r=2.36$ min).

²⁵² Renault, K.; Guillou, C.; Renard, P.-Y.; Sabot, C. Investigation of Tetrazine Reactivity towards C-Nucleophiles: Pyrazolone-Based Modification of Biomolecules. *Org. Biomol. Chem.* **2019**, 17 (2), 388–396.

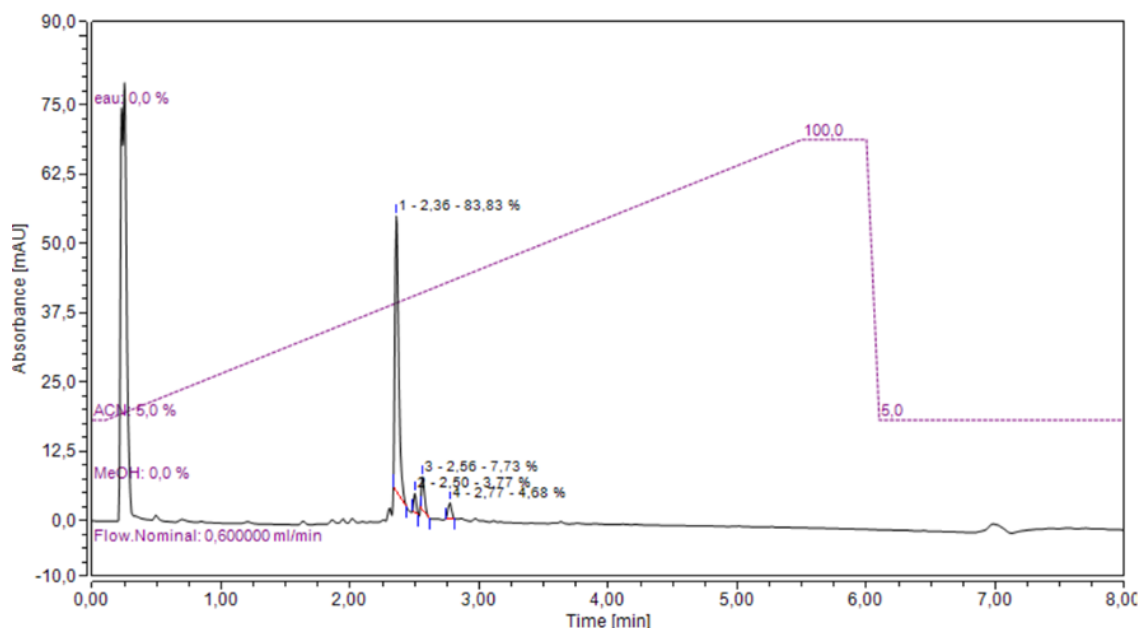
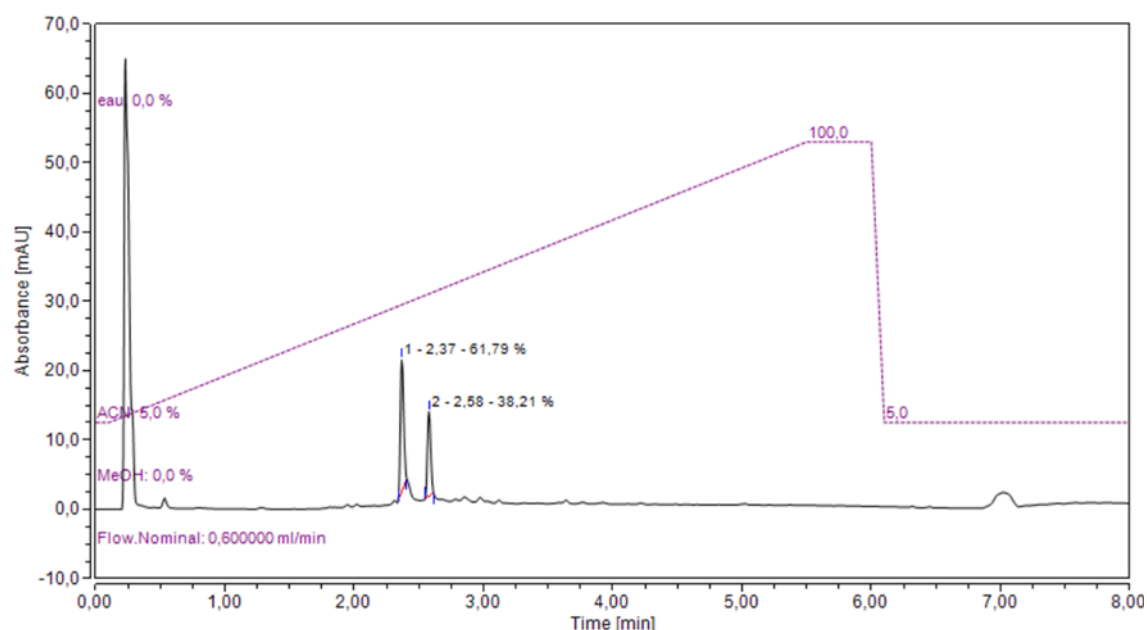


Figure 116 : Chromatogramme de suivi d'activation **BHQ-10** (Essai 1) (System A- cf partie expérimentale)

Pour cela, nous avons décidé d'utiliser un agent d'activation de type uronium pour former directement l'ester actif, et en présence de TSTU et nous avons bien confirmé l'activation par RP-UPLC. Le chromatogramme issu de ce suivi (Figure 117) montre une conversion de 38% au **BHQ-10** activé sous forme ester ($t_r = 2.58$ min). La quantité d'ester actif réellement formée est sans doute sous-estimée, car l'élution se déroule en milieu acide (présence d'acide formique (0,1% FA) dans les différentes phases d'élution), qui peut conduire à une hydrolyse partielle de l'ester activé, ce qui rend son pic minoritaire.



Chapitre 2 : Application des réactifs multifonctionnels au SPIT-FRI

Figure 117 : Chromatogramme de suivi d'activation **BHQ-10** (Essai 2) (System A- cf partie expérimentale)

Le test de couplage a été réalisé en ajoutant une solution d'anticorps fortement concentrée (2,5 mg/mL dans un tampons PBS pH 7 0,1 M) à une quantité de quencher (5 équivalents en DMF). Après réaction durant 18 h à TA, sous agitation (agitateur rotateur) et à l'obscurité, une purification par dialyse (en utilisant une membrane de porosité 10 000 Da) a été effectuée pour obtenir la protéine marquée purifiée (Figure 118).

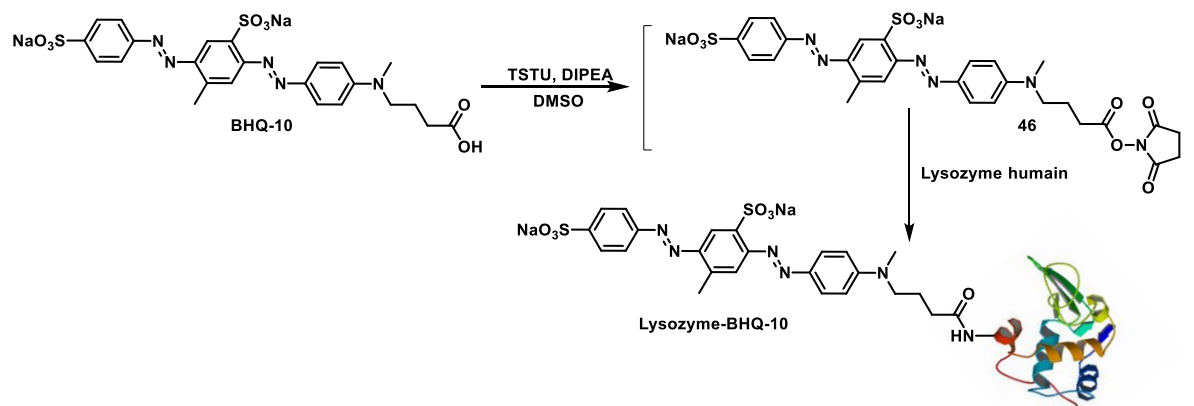


Figure 118 : Marquage du lysozyme humain par **BHQ-10**

Les spectres UV-Vis (Figure 119) du quencher **BHQ-10** marqué et du lysozyme et du quencher libre, montrent que ce greffage a été bien réussi.

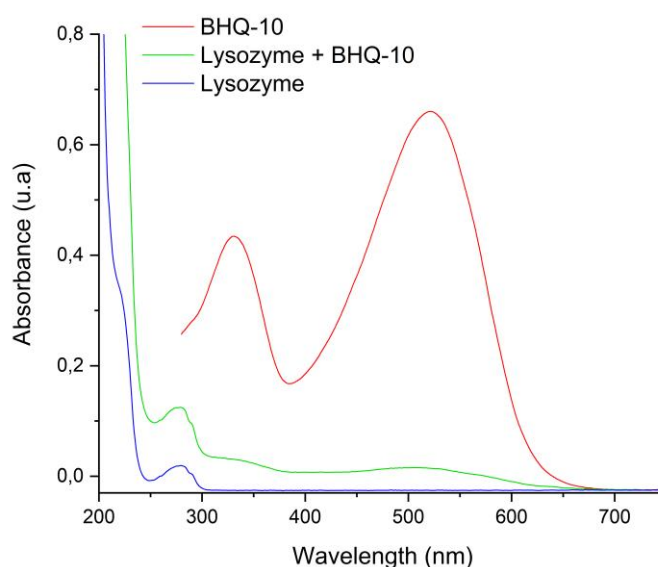


Figure 119 : Spectres d'absorbance du lysozyme (bleu), **BHQ-10** (rouge) et lysozyme marqué (vert)

Chapitre 2 : Application des réactifs multifonctionnels au SPIT-FRI

On observe un pic qui apparaît sur le spectre UV du lysozyme marqué à 516 nm qui correspond au marquage avec **BHQ-10**. Nous pouvons estimer à partir des absorbances UV mesurées à 280 nm et à 516 nm du lysozyme libre, du **BHQ-10** et du conjugué, que le taux de marquage est d'environ 40%.

Une fois le marquage réussi sur le lysozyme humain, les mêmes conditions d'activation de **BHQ-10** ont été utilisées *in situ* et appliquées au marquage des anticorps **ATX2**.

Avant d'engager notre quencher **46** activé sous sa forme NHS, nous avons tout d'abord mis nos anticorps **ATX2** dans un milieu contenant les mêmes conditions d'activation (TSTU, DIPEA, DMSO) afin de vérifier si ce milieu organique pourrait provoquer la dénaturation des anticorps. De ce fait, les résultats obtenus par UV-Vis montre aucune modification des anticorps. Ceci est observé par la présence d'un pic caractéristique à 280 nm correspondant aux tryptophanes et tyrosines des anticorps.

Deux tests de couplage ont été réalisés en ajoutant une solution d'anticorps ATX 2 (PBS pH 7,4) tout d'abord à une quantité de quencher 5 équivalents en DMSO puis 10 équivalents de quencher. Après réaction durant 18 h à TA, sous agitation (agitateur rotateur) et à l'obscurité, une purification par dialyse (en utilisant une membrane de 10 000 Da en PBS 0,1 M pH= 7,4) a été effectuée pour chaque essai.

Cependant, après plusieurs conditions testées d'activation et de marquage, les résultats obtenus par **UV-Vis** ne montrent aucune bande à 516nm, le marquage ne semble pas avoir été effectif.

Il reste donc à optimiser la stratégie de formation des anticorps marqués ATX2-BHQ-10, et plusieurs paramètres peuvent être variés, le pH peut être augmenté jusqu'à une valeur de 9, si les anticorps le supporte, pour maximiser le nombre d'amines déprotonnées sur l'anticorps, le nombre d'équivalents de quencheur peuvent également être largement augmentées, et d'autres agents d'activations peuvent être utilisés, ou d'autres esters actifs (ester de p-nitrophenol par exemple, ce qui permettrait de caractériser complètement le quencheur activé, et de le purifier afin de ne plus utiliser de phase organique).

C. Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre nous ont permis de mettre en avant l'application des réactifs multifonctionnels synthétisés dans le cadre de notre système SPIT-FRI. Nous avons tout d'abord choisi la stratégie de synthèse adéquate pour le fluorophore **R6G-AL** portant une fonction aldéhyde afin de permettre par la suite le greffer sur le tripode cible. Pour répondre aux conditions du système FRET, trois quenchers qui remplissent les conditions nécessaires en présence du fluorophore R6G-AL ont été étudiés.

Chapitre 2 : Application des réactifs multifonctionnels au SPIT-FRI

La stratégie de dérivatisation du tripode par la **R6G-AL** a tout d'abord commencé par la déprotection des fonctions thiol et oxime du tripode T4-P afin d'obtenir le tripode T4 qui a permis la ligation oxime en présence du fluorophore. Avant d'engager notre tripode T4, nous avons optimisé les conditions de déprotection et de dérivatisation sur une molécule modèle D4-P.

Nous avons également décrit la synthèse des différents analogues de mycotoxines cibles. Nous avons effectué la synthèse d'un analogue d'**AFB2** pour greffage sur le tripode, et la synthèse de différents dérivés de Patuline portant une fonction alcyne. Cette fonction va servir dans la dérivatisation du tripode dans un 2^{ème} temps.

Afin de valider l'étape d'activation du système SPIT-FRI, il a été nécessaire d'être fourni des anticorps cibles anti-AFB2 et anti-PAT et aussi de les marquer par le quencher adéquat. Pour cela, nous nous sommes focalisés sur l'optimisation du marquage des anticorps anti-AFB1 par le quencher **BHQ-10**. Cependant, les conditions de marquage efficace des anticorps n'ont pas pu être mises au point.

Plusieurs perspectives à ces travaux sont envisageables, notamment sur le greffage des analogues **AFB2** et **PAT** sur les réactifs hététrifonctionnels **T4-R6G-AL** par une réaction de cycloaddition CuAAC, mais le plus important sera de trouver des conditions reproductibles de marquage des anticorps.

Chapitre 3 :

Stratégie de fonctionnalisation de surface

"Dans la vie rien n'est à craindre tout est à comprendre "

Marie Curie

Ce troisième chapitre est consacré à l'immobilisation du tripode sur la surface solide choisie (surface d'or). Il s'articulera autour d'une étude bibliographique sur les méthodes d'immobilisation des réactifs hétéromultifonctionnels ainsi que les méthodes conventionnelles de caractérisation des surfaces modifiées. Nous aborderons ensuite, dans la partie résultats et discussions, la stratégie adoptée pour l'optimisation de la fonctionnalisation de notre surface par les réactifs hétérobifonctionnels et ainsi que les réactifs hétérotrifonctionnels préalablement synthétisés.

A. Etat de l'art

Pour construire des dispositifs performants à l'échelle moléculaire, tel que notre dispositif basé sur la méthode SPIT-FRI, il est impératif de maîtriser la méthode d'immobilisation. Elle joue un rôle crucial sur la sensibilité du dispositif. Pour cela, le tripode doit être immobilisé efficacement sur le support solide (la surface d'or). Une grande variété de méthodes physico-chimiques, sont disponibles pour le greffage de molécules en surface d'un capteur. Dans notre application, nous avons choisi de travailler avec une méthode d'auto-assemblage des monocouches (SAM pour « Self Assembled Monolayers ») utilisant la chimie des thiols.

A.I Monocouches auto-assemblées (SAM)

La modification d'une surface solide par auto-assemblage de molécules organiques sur se retrouve dans de nombreux domaines d'applications tels que le photovoltaïque, les biomatériaux, l'électronique moléculaire. Cette technique possède un grand potentiel surtout dans les applications de type fluide. Il s'agit d'une stratégie nanotechnologique ascendante type « Bottom up ». Dans cette approche, les molécules sont assemblées spontanément en monocouches sur une surface sans apport d'énergie et par simple adsorption à partir d'une phase liquide ou gazeuse.

Les entités moléculaires propices à l'auto-assemblage et intéressantes pour une post-fonctionnalisation comporteront trois parties (Figure 120) :

- Un groupement d'accroche afin de former une liaison robuste et stable avec la surface.
- Un groupement d'organisation (généralement une chaîne alkyle ou un polyéthylène glycol PEG).
- Un groupement terminal qui va apporter des propriétés nouvelles à la surface.

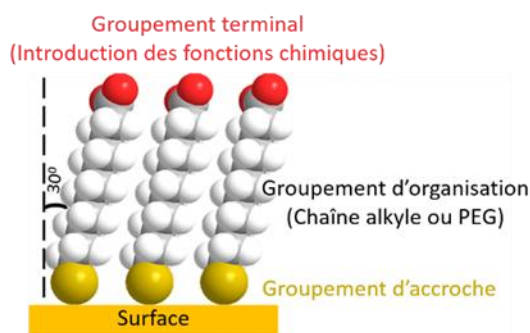


Figure 120 : Représentation d'une monocouche auto-assemblée²⁵³

Pour la formation des SAMs, quatre méthodes sont principalement décrites.²⁵³

A.I.1. Méthodes connues de la formation des SAM :

A.I.1.1 La silanisation

La silanisation est une méthode mise au point par E.P. Plueddemann²⁵⁴ qui permet la formation des monocouches à base d'organosilanes (Figure 121) sur une surface d'oxydes métalliques, initialement utilisée sur des surfaces de verre. Le verre est au préalable pré-traité pour que sa surface soit recouverte de silanols, indispensables pour la silanisation.

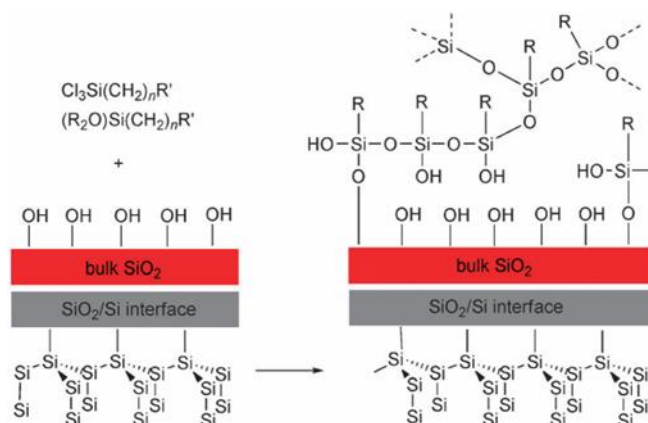


Figure 121 : Système des monocouches auto-assemblées d'organosilanes²⁵³

Un organosilane est un composé organique portant un groupement hydrolysable (des alcoxys (OMe, OEt) ou des carboxylates ($R'CO_2$) ou des halogénures)²⁵⁵ et un groupement organique portant une fonction chimique d'intérêt. L'organosilane est de formule $R_nSiX_{(4-n)}$.

²⁵³ Gooding, J. J.; Ciampi, S. The Molecular Level Modification of Surfaces: From Self-Assembled Monolayers to Complex Molecular Assemblies. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40 (5), 2704-2718.

²⁵⁴ Farzan, V. M.; Kvach, M. V.; Aparin, I. O.; Kireev, D. E.; Prikazchikova, T. A.; Ustinov, A. V.; Shmanai, V. V.; Shipulin, G. A.; Korshun, V. A.; Zatsepin, T. S. Novel Homo Yin-Yang Probes Improve Sensitivity in RT-QPCR Detection of Low Copy HIV RNA. *Talanta* **2019**, 194, 226-232.

²⁵⁵ Sagiv', J. Organized Monolayers by Adsorption. 1. Formation and Structure of Oleophobic Mixed Monolayers on Solid Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 92-98.

Comme l'indique la Figure 122, la formation de monocouches autoassemblées à partir d'organoalcooxysilanes de formule $R_nSi(OR')_{(4-n)}$ sur une surface de silice est un procédé en plusieurs étapes.

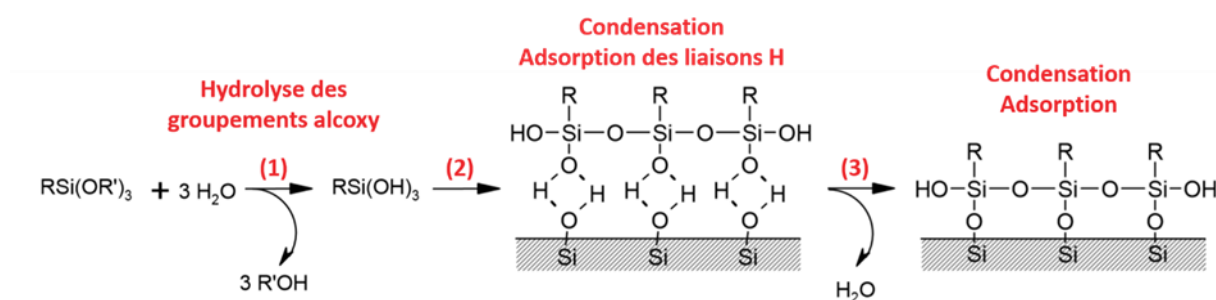


Figure 122 : Etapes du mécanisme du greffage à la surface de silice²⁵⁶

La 1^{ère} étape **(1)** consiste en une hydrolyse d'un ou de plusieurs groupements alcoxy du silane. Ensuite, des groupements hydrolysés s'organisent sur la surface de silice par physisorption/condensation et adsorption via des liaisons hydrogènes **(2)**. Dans une troisième étape **(3)**, une condensation horizontale entre le silane hydrolysé et les groupements silanols de la silice a lieu afin d'obtenir des monocouches ancrées chimiquement par des liaisons Si-O (425 kJ/mol).²⁵⁷

Cette méthode est compatible avec des supports à base de silicium mais également sur des surfaces de verre silanisées, des surfaces oxydées d'aluminium Al_2O_3 , de zinc, de fer, d'ITO, de polyéthylène ou de polyvinylalcool.²⁵⁸

A.I.1.2 L'hydrosilylation

L'hydrosilylation est une méthode qui permet la formation des monocouches auto-assemblées sur des surfaces de silice. Elle consiste dans l'immobilisation d'un composé insaturé par la présence d'un hydrogénosilane Si-H sur une surface.

Cette méthode repose sur deux types de mécanismes possibles : Le premier mécanisme utilise un procédé radicalaire en présence d'une irradiation UV ou d'un chauffage ($T > 110^\circ C$) de la surface. Cette activation conduit à la création d'un radical sur la surface capable de réagir avec des composés insaturés que l'on souhaite immobiliser par

²⁵⁶ Id, H. Interaction Organosilanes / Silice de précipitation du milieu hydro-alcoolique au milieu aqueux.

²⁵⁷ a) Azzopardi, M. J.; Arribart, H. In Situ FTIR Study of the Formation of an Organosilane Layer at the Silica/Solution Interface. *J. Adhes.* **1994**, 46 (1-4), 103-115. b) Daniels, M. W.; Francis, L. F. Silane Adsorption Behavior, Microstructure, and Properties of Glycidoxypolytrimethoxysilane-Modified Colloidal Silica Coatings. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, 205 (1), 191-200.

²⁵⁸ Ulman, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem. Rev.* **1996**, 96 (4), 1533-1554.

une liaison Si-C. Dans le second mécanisme, on utilise une lumière blanche et un mécanisme photochimique (Figure 123).²⁵⁹

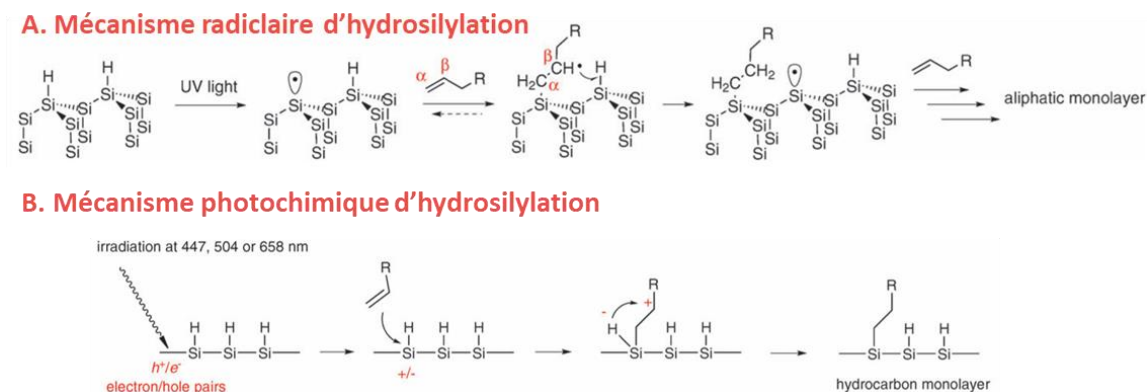


Figure 123 : Les mécanismes d'hydrosilylation²⁵⁹

A.I.1.3 Modification covalente par sels d'aryldiazoniums aromatiques :

Les sels de diazonium permettent également le greffage de molécules sur surface. Dans cette chimie, la fonctionnalisation de la surface se fait par voie radicalaire. Il existe peu de sels de diazonium aromatiques commerciaux. Ils peuvent en revanche être facilement synthétisés et isolés à partir d'un précurseur aniline. Dans ce cas, le groupement fonctionnel doit se trouver en para de la fonction diazonium. Ces sels aromatiques ont pu être greffés aussi bien sur des surfaces conductrices, semi-conductrices ou polymériques.

La fonctionnalisation de surface par un sel d'aryldiazonium se fait en plusieurs étapes (Figure 124) : La 1^{ère} étape réside dans une réduction de la fonction N_2^+ . Cette réduction peut être électro-induite si la surface ciblée est conductrice. Dans ce cas, la surface est utilisée comme électrode. Sinon, la réduction chimique est provoquée par l'introduction d'un réducteur chimique en solution. La formation d'un intermédiaire radical aryle très réactif est accompagnée par le départ de N_2 . Ceci va aboutir rapidement à la formation d'une liaison covalente entre le radical aryle et un atome de la surface. Du fait de la réactivité du radical aryle, il est difficile d'obtenir une monocouche stricte. En effet, le radical, peut créer une liaison covalente avec un dérivé benzénique déjà immobilisé sur la surface conduisant à une multicouche. Ce phénomène peut être contrôlé en modulant le nombre de cycle en tension appliqué sur la surface de l'électrode ou en ajoutant des molécules pièges « scavenger » qui pourront capter les électrons surproduits.

²⁵⁹ Ciampi, S.; Harper, J. B.; Gooding, J. J. Wet Chemical Routes to the Assembly of Organic Monolayers on Silicon Surfaces via the Formation of Si-C Bonds: Surface Preparation, Passivation and Functionalization. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39 (6), 2158-2183.

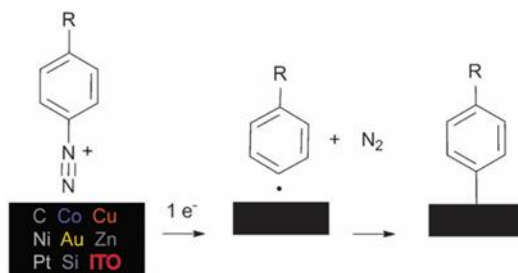


Figure 124 : Mécanisme de fonctionnalisation de surface par des sels d'aryles de diazonium²⁵³

A.I.1.4 Modification par des alcanethiols et des organosulfures

En complément de ces méthodes, il existe une 4^{ème} méthode qui consiste dans l'immobilisation des alcanethiols et des organosulfures. Ces composés sont fréquemment utilisés pour la fonctionnalisation des surfaces d'argent, platine, cuivre ou or.²⁶⁰ L'interaction métal-Soufre permet d'obtenir des SAM selon un mécanisme d'adsorption moléculaire qui dépend de la réactivité de chaque métal avec le thiol. Les travaux de Nuzzo et Allara²⁶¹ ont accentué l'application de cette méthode sur surface d'or et depuis les applications ne cessent de proliférer.

Dans la partie suivante, nous focalisons notre discussion sur la fonctionnalisation de surface d'or par adsorption d'organosulfure.

A.II Fonctionnalisation d'une surface d'or

Les monocouches SAM à base de thiols et de disulfures sur l'or sont devenues un système modèle grâce à leur facilité de préparation et de mise en œuvre. L'or est un matériau très souvent utilisé comme surface modèle dans le développement de biocapteur (optique, chimique, ou électrochimique) du fait de ses propriétés physico-chimiques uniques (conductivité, résistance à l'oxydation, réflectivité...).²⁶²

A.II.1. Aspect général

Les surfaces mono-cristallines Au (111) sont les plus utilisées en SAM.²⁶³ Il s'agit de la surface ayant la plus faible énergie ce qui favorise la croissance des films minces.²⁶⁴ Pour une meilleure compréhension du mécanisme de formation d'une monocouche auto-assemblée,

²⁶⁰ 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.* **2005**, 105 (4), 1103–1170.

²⁶¹ Nuzzo, R. G.; Allara, D. L. Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105 (13), 4481–4483.

²⁶² Vericat, C.; Vela, M. E.; Benitez, G.; Carro, P.; Salvarezza, R. C. Self-Assembled Monolayers of Thiols and Dithiols on Gold: New Challenges for a Well-Known System. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 1805–1834.

²⁶³ Poirier, G. E. Characterization of Organosulfur Molecular Monolayers on Au (111) Using Scanning Tunneling Microscopy. *Chem. Rev.* **1997**, 97 (4), 1117–1128.

²⁶⁴ Schreiber, F. Structure and Growth of Self-Assembling Monolayers. *Prog. Surf. Sci.* **2000**, 65 (5–8), 151–257.

les alcanethiols sont souvent pris comme un modèle.²⁶⁵ Ce processus d'adsorption est divisé en différentes étapes basées sur la physisorption et la chimisorption (Figure 125).

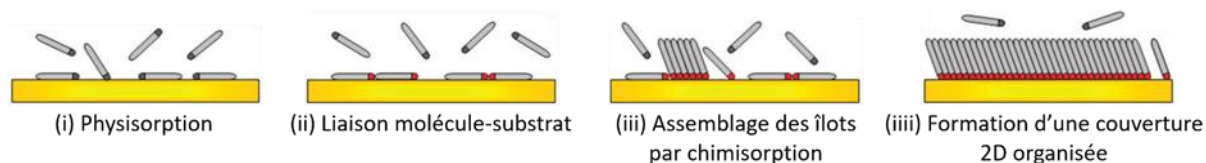


Figure 125 : Mécanisme de la formation des SAM²⁶²

La 1^{ère} étape est la physisorption. Elle réside dans l'interaction entre les chaînes alkyles des alcanethiols à adsorber et la surface d'or via des liaisons faibles de type Van Der Waals de l'ordre de 40-100 kJ/mol. Ensuite, une liaison chimique se forme par chimisorption entre les dérivés thiolés et le substrat. Des liaisons intermoléculaires stables vont ensuite se former entre les greffons ce qui va conduire à une structuration des molécules à la surface selon des couches auto-assemblées organisées et ordonnées.²⁶⁵ Il est important de souligner que cette présentation du mécanisme est idéalisée et dépend des conditions expérimentales utilisées et de la qualité de la surface.²⁶⁶

L'adsorption impliquée dans ce système offre une bonne stabilité des monocouches à différents pH et températures. Il s'agit de la formation de liaisons de coordination. Contrairement aux liaisons covalentes où deux atomes participent chacun par un électron, la spécificité de ces liaisons datives est qu'elles sont formées par deux électrons provenant d'un seul atome : l'atome du soufre est caractérisé par une sous-couche électronique 2p incomplète qui le rend plus électronégatif que l'or, ce qui explique la polarisation de cette liaison. Plusieurs études ont montré que la liaison Au/thiolate (Au^+-S^-) est une forte liaison polaire pseudo-covalente de l'ordre de 209 kJ/mol. A titre de comparaison, la force de liaison homolytique d'un disulfure S-S est de 260 kJ/mol.²⁶⁷

Pour obtenir une couche moléculaire organisée et fonctionnelle en vue d'une post-fonctionnalisation de biomolécules, il faut que les greffons qui composent la SAM intègrent trois groupements spécifiques, à savoir un groupement d'accroche, une chaîne de séparation et un groupement terminal.

²⁶⁵ Poirier, G. E.; Pylant, E. D. The Self-Assembly Mechanism of Alkanethiols on Au(111). *Science* **1996**, 272 (5265), 1145–1148.

²⁶⁶ Schwartz, D. K. Mechanisms And Kinetics Of Self -Assembled Monolayer Formation. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, 52, 107–137.

²⁶⁷ Nuzzo, R. G.; Zegarski, B. R.; Dubois, L. H. Fundamental Studies of the Chemisorption of Organosulfur Compounds on Au (111). Implications for Molecular Self-Assembly on Gold Surfaces. *Am. Chem. Soc.* **1987**, 109 (3), 733-740.

A.II.1.1 Groupement d'accroche

La chimisorption d'un dérivé thiolé, spécifiquement sur un substrat métallique or, se fait par deux types de groupement d'accroche : soit la fonction thiol (-SH), soit la fonction disulfure (-S-S-R).²⁶⁰ En présence d'une fonction thiol, le mécanisme de l'adsorption consiste en une transition de l'état de physisorption à l'état de chimisorption. L'or zérovalent est le plus utilisé en raison de leur inertie vis-à-vis la corrosion et l'oxydation. La chimisorption se déroule, en milieu basique, entre Au (0) et la fonction thiol pour conduire à Au (I) lié à un thiolate (Figure 126).

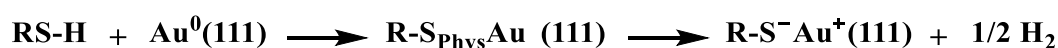


Figure 126 : Mécanisme d'adsorption d'un composé thiolé sur or

Plusieurs groupements chimiques porteurs de soufre peuvent conduire à la formation d'un thiolate en vue d'une adsorption sur le substrat d'or (Tableau 9).

Fonction	Formule	Commentaires relatifs
Thiol ²⁶⁰	R-S-H	Valable commercialement en plusieurs formules. Cette fonction est la plus étudiée et la plus utilisée dans plusieurs travaux dans la littérature.
Thioacetyl ²⁶⁸	R-S-C(=O)CH_3	Elle permet de protéger les thiols en cas d'oxydation. L'adsorption s'effectue par hydrolyse sans la présence d'une base ou dans des conditions basiques (l'utilisation de NH_4OH est la plus fréquente).
Sulfure ²⁶⁹	R-S-R'	La présence de dialcyle de sulfure ne nécessite pas la rupture de la liaison C-S. Il s'agit de la formation d'une liaison dative Au-S. Cette formule est efficace dans la formation des SAM mixtes où R est différent de R'.
Episulfure ²⁷⁰	$\text{R}-\triangle_{\text{S}}$	Cette formule est utilisée en tant qu'un adhésif pour les alliages de métaux précieux en dentisterie. L'ouverture du cycle d'épisulfure donne un groupe $\text{CH}_2=\text{C}$ et une liaison C-S noncyclique pour l'immobilisation sur une surface Au.
Dithiol/Polythiols ²⁷¹	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{SH}$	Cette formule est fréquemment utilisée par rapport au thiol libre puisqu'elle conduit à une meilleure stabilité grâce au double ancrage possible en surface.

Tableau 9 : Différents groupements d'accroche possibles à base de thiol

²⁶⁸ Tour, J. M.; Burgin, T. P.; Whitesides, G. M.; Parikh, A. N. Self-Assembled Monolayers and Multilayers of Conjugated Thiols, α,ω -Dithiols, and Thioacetyl-Containing Adsorbates. Understanding Attachments between Potential Molecular Wires and Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9529-95346.

²⁶⁹ Troughton, E. B.; Bain, C. D.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G.; Allara, D. L.; Porter, M. D. Monolayer Films Prepared by the Spontaneous Self-Assembly of Symmetrical and Unsymmetrical Dialkyl Sulfides from Solution onto Gold Substrates: Structure, Properties, and Reactivity of Constituent Functional Groups. *Langmuir* **1988**, *4* (2), 365-385.

²⁷⁰ Suzuki, M.; Miyazaki, T.; Hisamitsu, H.; Kadoma, Y.; Morioka, Y. Study on Chemical Reaction of Methylthiirane on Gold Colloid by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Langmuir* **1999**, *15* (21), 7409-7410.

²⁷¹ Colorado, R.; Villazana, R. J.; Lee, T. R. Self-Assembled Monolayers on Gold Generated from Aliphatic Dithiocarboxylic Acids. *Langmuir* **1998**, *14* (22), 6337-6340.

Pour améliorer la stabilité du greffage au cours du temps et éviter le risque de photo-oxydation, il peut être judicieux d'utiliser des polythiols linéaires ou cycliques (Figure 127).^{272,273}

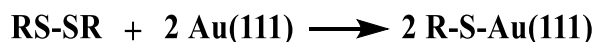


Figure 127 : Réaction de chimisorption d'un composé portant une fonction disulfure sur Au

Plusieurs composés chimiques portant un groupement d'accroche à base de disulfure permettent aussi d'avoir des liaisons stables avec des thiols sur une surface d'or (Tableau 10).

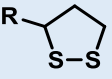
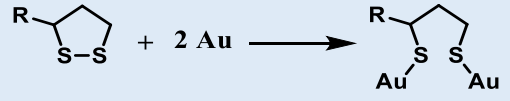
Nom	Formule	Commentaires relatifs
Disulfure linéaire ²⁶¹	R-S-S-R'	La réduction de disulfure conduit à deux thiols libres capables de s'accrocher sur une surface d'or. Cette formule permet aussi la formation de SAM mixtes.
S-Sodium thiosulfate ²⁷⁴	$\text{R-S-S-O}_3^- \text{Na}^+$	L'obtention S-dodecylthiosulfate permet la formation des SAMs identiques sur une surface d'or pour aboutir à des dodecanethiols.
Disulfure cyclique ²⁷⁵		Le clivage de liaison S-S permet d'obtenir un analogue de dithiol. 

Tableau 10 : Différents groupements d'accroche possibles à base de disulfure

A.II.1.2 Chaînes de séparation

La chaîne de séparation est constituée généralement par une chaîne alkyle $(\text{CH}_2)_n$ ou PEG $(\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O})_m$. La stabilité de la surface dépend étroitement de l'organisation et de la longueur des chaînes.²⁷⁶

²⁷² Lereau, M.; Fournier-Wirth, C.; Mayen, J.; Farre, C.; Meyer, A.; Dugas, V.; Cantaloube, J.-F.; Chaix, C.; Vasseur, J.-J.; Morvan, F. Development of Innovative and Versatile Polythiol Probes for Use on ELOSA or Electrochemical Biosensors: Application in Hepatitis C Virus Genotyping. *Anal. Chem.* **2013**, 85 (19), 9204–9212.

²⁷³ Volkert, A. A.; Subramaniam, V.; Ivanov, M. R.; Goodman, A. M.; Haes, A. J. Salt-Mediated Self-Assembly of Thiocetic Acid on Gold Nanoparticles. *ACS Nano* **2011**, 5 (6), 4570–4580.

²⁷⁴ Rouhana, L. L.; Moussallem, M. D.; Schlenoff, J. B. Adsorption of Short-Chain Thiols and Disulfides onto Gold under Defined Mass Transport Conditions: Coverage, Kinetics, and Mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133 (40), 16080–16091.

²⁷⁵ a) Joly, K. M.; Mirri, G.; Willener, Y.; Horswell, S. L.; Moody, C. J.; Tucker, J. H. R. Synthesis of an Achiral Isomer of Lipoic Acid As an Anchor Group for SAM Formation on Gold Surfaces. *J. Org. Chem.* **2010**, 75 (7), 2395–2398. b) Willey, T. M.; Vance, A. L.; Bostedt, C.; van Buuren, T.; Meulenberg, R. W.; Terminello, L. J.; Fadley, C. S. Surface Structure and Chemical Switching of Thiocetic Acid Adsorbed on Au(111) As Observed Using Near-Edge X-Ray Absorption Fine Structure. *Langmuir* **2004**, 20 (12), 4939–4944. c) Li, Z.; Niu, T.; Zhang, Z.; Feng, G.; Bi, S. Studies on the Effect of Solvents on Self-Assembly of Thiocetic Acid and Mercaptohexanol on Gold. *Thin Solid Films* **2011**, 519 (13), 4225–4233.

Le nombre de chaînes de méthylène peut varier de 1 à 21. La parité du nombre de méthylène peut influencer sur l'organisation des chaînes immobilisées avec la génération de défaut sur la surface pour des nombres impairs. De plus, l'auto-organisation de ces chaînes s'effectue via des interactions de Van der Waals (VdW). De ce fait, les espaceurs alkyles plus longs ($n > 10$) forment des SAM plus stables.²⁶⁰

Les chaînes PEG sont bien connues par leurs propriétés de passivation de la surface. Comme on peut aussi former des SAMs mixtes portant des chaînes alkyles et des chaînes PEG sur la même surface.

Les travaux de Porter et coll.²⁷⁷ ont démontré par des mesures de diffraction par microscopie à effet tunnel que l'arrangement des alcanethiols se fait en une couche compacte selon un réseau hexagonal ($\sqrt{3} \times \sqrt{3}$) R30°. Les thiols attachés sont inclinés de 30° par rapport à la surface normale (Figure 120) avec une distance de 5 Å entre les chaînes.²⁷⁸

A.II.1.3 Groupements terminaux

L'objectif de fonctionnaliser une surface est de pouvoir, entre autres, y greffer des biomolécules par une post-fonctionnalisation. Pour cela, il faut que les chaînes accrochées à la surface soient porteuses de groupements terminaux fonctionnels compatibles avec une bioconjugaison (Figure 128).

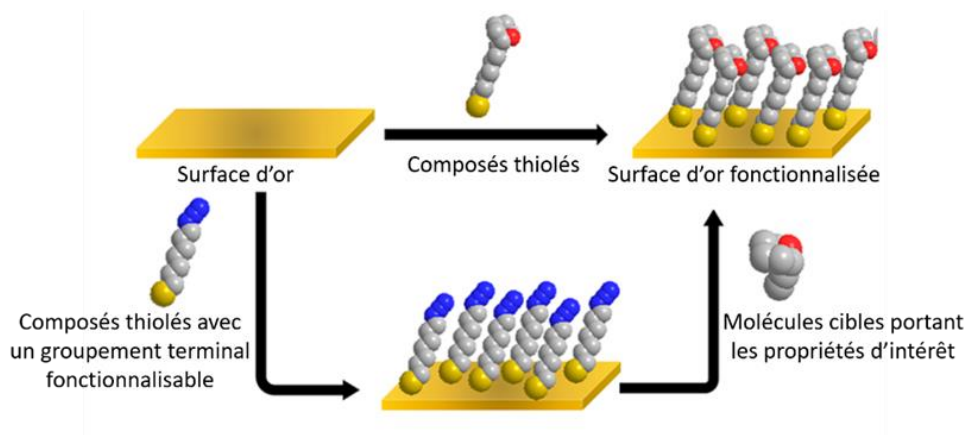


Figure 128 : Fonctionnalisation d'une surface d'or²⁷⁹

²⁷⁶ 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.* **1987**, *109* (12), 3559–3568.

²⁷⁷ Widrig, C. A.; Alves, C. A.; Porter, M. D. Scanning Tunneling Microscopy of Ethanethiolate and N-Octadecanethiolate Monolayers Spontaneously Absorbed at Gold Surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113* (8), 2805–2810.

²⁷⁸ Saha, J. K.; Ahn, Y.; Kim, H.; Schatz, G. C.; Jang, J. Small Size Limit to Self-Assembled Monolayer Formation on Gold(111). *J. Phys. Chem.* **2011**, *115* (27), 13193–13199.

²⁷⁹ Bhattarai, J. K.; Neupane, D.; Mikhaylov, V.; Demchenko, A. V.; Stine, K. J. Self-Assembled Monolayers of Carbohydrate Derivatives on Gold Surfaces. *Carbohydrate* **2017**.

Il est important que les fonctions terminales utilisées pour la bioconjugaison soient orthogonales à la fonction thiol qui servira à l'interaction en surface de sorte à éviter d'éventuelles compétitions. Sullivan et Huck²⁸⁰ ont décrit dans leur revue toutes les réactions possibles en monocouches. A titre d'exemple, la présence de maléimide ou un disulfure comme groupement terminal permet de réagir avec les peptides, les carbohydrates, voir les fragments d'ADN présentant un thiol.

De plus, les fonctions terminales contribuent à la stabilité de la surface. Ainsi, l'équipe de Leggett et coll.²⁸¹ a montré que les groupements terminaux type hydroxyle et acide carboxylique étaient plus stables que des groupements terminaux méthyles. Ceci est expliqué par la forte interaction des liaisons hydrogènes existantes entre les chaînes adjacentes ce qui augmente l'auto-organisation de l'adsorbat et diminue la vitesse de diffusion des espèces oxygénées vers l'interface Au-S.

Certaines liaisons requièrent une pré-activation pour assurer un couplage covalent. Ainsi, les réactions des amines avec les hydroxyles et les acides carboxyliques nécessitent une étape d'activation :²⁸² Pour les hydroxyles, l'activation se fera par conversion de la fonction hydroxyle en aldéhyde en présence d'anhydride trifluoroacétique pour aboutir à des imines. Pour les acides carboxyliques, l'activation se fera par conversion de la fonction acide en une fonction ester en utilisant par exemple du NHS pour former une fonction amide après addition d'une biomolécule aminée. La substitution nucléophile par un échange avec un halogène en présence de nucléophiles forts (SCN^- et N_3^-) est également une voie de fonctionnalisation pour greffer un ligand sur surface.

Si l'on a besoin de conserver les fonctions amines, hydroxyles, thiol des biomolécules pour l'application ou si l'on a des problèmes de sélectivité, il est possible d'utiliser la « chimie click ». La réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire pour former un triazole ainsi que la réaction de Staudinger (phosphanes substitués et azoture aboutissent à la formation des liaisons amides) sont bien décrites dans la littérature.^{253,260}

A.II.1.4 Stabilité et désorption

La désorption de la monocouche sur une surface d'or peut être engendrée par la modification irréversible de la liaison Au-S. Ce phénomène peut avoir lieu en présence d'un chauffage à une température supérieure à 100°C (au-dessous de cette température, la

²⁸⁰ Sullivan, T. P.; Huck, W. T. S. Reactions on Monolayers: Organic Synthesis in Two Dimensions. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 17-29.

²⁸¹ Cooper, E.; Leggett, G. J. Static Secondary Ion Mass Spectrometry Studies of Self-Assembled Monolayers: Influence of Adsorbate Chain Length and Terminal Functional Group on Rates of Photooxidation of Alkanethiols on Gold. *Langmuir* **1998**, *14* (17), 4795–4801.

²⁸² Hutt, D. A.; Leggett, G. J. Functionalization of Hydroxyl and Carboxylic Acid Terminated Self-Assembled Monolayers. *Langmuir* **1997**, *13* (10), 2740–2748.

liaison Au-S est stable).²⁶⁴ Il est également possible de désorber les molécules par photo-oxydation sous une irradiation à 193 nm ou par une irradiation plus large (de 150 à 400 nm) pour une durée de 15 à 40 min.²⁸³ La production de l’ozone lors de ce processus, par la photolyse²⁸⁴ ultra-violette du dioxygène sous UV, amène à l’oxydation du thiol sous la forme de sulfonate —SO_3^- ou sous la forme de sulfinate —SO_2 (Figure 129).

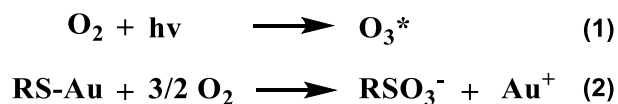


Figure 129 : Réaction de génération d’ozone (1) et de photooxydation des fonctions thiols (2)²⁸¹

La possibilité que l’oxygène pénètre à l’interface et attaque la liaison Au-S va dépendre étroitement de la longueur des chaînes.²⁸⁵ De ce fait, les chaînes longues avec un nombre de carbone plus important seront plus stables que les chaînes courtes. Ces dernières favorisent le phénomène de photo-oxydation.^{260,281}

La désorption peut être également obtenue par réduction électrochimique²⁸⁶ de la liaison thiol (Figure 130).

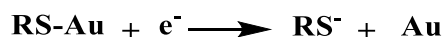


Figure 130 : Mécanisme de la désorption réductrice

A.II.1.5 Méthodes d’immobilisation

L’étape d’immobilisation sur une surface d’or des dérivés soufrés (préalablement synthétisés sous leur forme thiol ou disulfure) nécessite tout d’abord l’élaboration d’un protocole rigoureux afin de contrôler les différents paramètres et obtenir des SAM reproductibles.

Les SAM peuvent être préparées : soit en phase gazeuse sous ultravide,²⁸⁷ soit en phase liquide par une simple immersion d’une surface d’or dans une solution contenant

²⁸³ a)Huang, J.; Hemminger, J. C. Photooxidation of Thiols in Self-Assembled Monolayers on Gold. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115 (8), 3342–3343. b) English, R. D.; Van Stipdonk, M. J.; Sabapathy, R. C.; Crooks, R. M.; Schweikert, E. A. Characterization of Photooxidized Self-Assembled Monolayers and Bilayers by Spontaneous Desorption Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2000**, 72 (24), 5973–5980.

²⁸⁴ Johnson, R. E.; Quickenden, T. I. Photolysis and Radiolysis of Water Ice on Outer Solar System Bodies. *J. Geophys. Res. Planets* **1997**, 102 (E5), 10985–10996.

²⁸⁵ Hutt, D. A.; Leggett, G. J. Influence of Adsorbate Ordering on Rates of UV Photooxidation of Self-Assembled Monolayers. *J. Phys. Chem.* **1996**, 100 (16), 6657–6662.

²⁸⁶ Yang, D.-F.; Morin, M. Chronoamperometric Study of the Reductive Desorption of Alkanethiol Self-Assembled Monolayers. *J. Electroanal. Chem.* **1998**, 441 (1–2), 173–181.

²⁸⁷ Schreiber, F.; Eberhardt, A.; Leung, T. Y. B.; Schwartz, P.; Wetterer, S. M.; Lavrich, D. J.; Berman, L.; Fenter, P.; Eisenberger, P.; Scoles, G. Adsorption Mechanisms, Structures, and Growth Regimes of an Archetypal Self-Assembling System: Decanethiol on Au(111). *Phys. Rev. B* **1998**, 57 (19), 12476–12481.

l'adsorbat que nous souhaitons immobiliser. L'adsorption en phase gazeuse est moins courante que l'adsorption en phase liquide, car elle est plus difficile à mettre en œuvre et donne souvent des SAM moins denses vu que la qualité du dépôt dépend de la pression de vapeur appliquée.²⁶⁰

Suite à la fonctionnalisation de surface d'or par des dérivés thiolés, il est important de passer à la caractérisation des monocouches auto-assemblées.

A.II.2. Techniques de caractérisation d'une surface d'or

De nombreuses techniques de caractérisation de surface peuvent être mises en œuvre afin d'étudier les surfaces modifiées par les molécules cibles. Cependant, en chimie de surface, il n'est pas possible de se contenter d'une seule et unique méthode analytique. L'ensemble de ces techniques étant complémentaire les unes des autres pour étayer toutes les informations nécessaires à la caractérisation de la surface modifiée. Les techniques abordées dans cette partie sont les techniques que j'ai utilisées au cours de mon projet de thèse.

A.II.2.1 Spectroscopie Infrarouge

La spectroscopie d'absorption infrarouge IR est une technique d'analyse physico-chimique simple et qualitative qui donne des informations sur les vibrations moléculaires qui sont caractéristiques de l'environnement local des liaisons chimiques et de leur nature dans l'IR moyen de 400 à 4000 cm^{-1} . Lorsque les molécules sont soumises à une radiation infrarouge, leurs liaisons vont vibrer, ce qui va induire une modification du moment dipolaire électrique de la molécule et une absorption de l'énergie apportée par l'onde incidente. Ces vibrations peuvent être liées à des mouvements d'élongation qui engendrent des modifications au niveau des distances interatomiques ou des mouvements de déformations au niveau des angles de liaison. Comme la fréquence de vibration est liée aux atomes, à la constante de force de la liaison et aussi à l'environnement des atomes, on va pouvoir utiliser cette technique pour avoir des informations sur la structure et la composition chimique des échantillons étudiés.

La spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier FTIR pour « Fourier Transform InfraRed spectroscopy » est une technique qui utilise une source de lumière large bande et un interféromètre de Michelson. Elle permet d'enregistrer simultanément la quantité d'énergie absorbée pour différentes fréquences émises. L'interférogramme obtenu est ensuite traité par transformée de Fourier de sorte à obtenir un spectre en transmission en fonction du nombre d'onde. Chaque bande détectée correspond à une fréquence de vibration spécifique d'un mouvement pour une liaison donnée.

Il existe différentes catégories de spectroscopie par réflexion infrarouge. Les deux variantes les plus fréquemment utilisées pour l'étude de molécules immobilisées sur une surface solide sont : la spectroscopie d'absorption Infrarouge en réflexion par modulation de polarisation (**PM-IRRAS** pour « Polarization Modulation-Infrared Reflection-Absorption Spectroscopy ») et la mono-réflexion totale atténuée à un angle d'incidence variable (**ATR** pour « infrared-Attenuated Total Reflexion »).

Le **PM-IRRAS** est recommandé pour l'analyse de films très minces, des monocouches à l'interface solide-gaz ou des couches organiques sur des surfaces réfléchissantes. Il utilise une lumière polarisée positionnée selon un angle rasant (80°). Les polarisations « s » et « p » vont être modulées à haute fréquence de sorte que les deux signaux puissent être enregistrés simultanément.

L'**IR-ATR** consiste en un phénomène de réflexion totale du rayonnement IR sur l'échantillon à analyser. Le faisceau se propage au travers d'un cristal d'indice de réfraction élevée (diamant, Silicium, ZnSe ou Ge). A chaque réflexion, une onde évanescente est générée à l'interface échantillon-cristal du niveau dense (cristal) au niveau moins dense (échantillon) (Figure 131). Si l'échantillon absorbe une partie de l'énergie de l'onde évanescente, elle revient atténuée au niveau du cristal avant d'être détectée. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente dans l'échantillon dépend étroitement de la longueur d'onde, des indices de réfraction du cristal et aussi de l'angle d'incidence du faisceau incident.

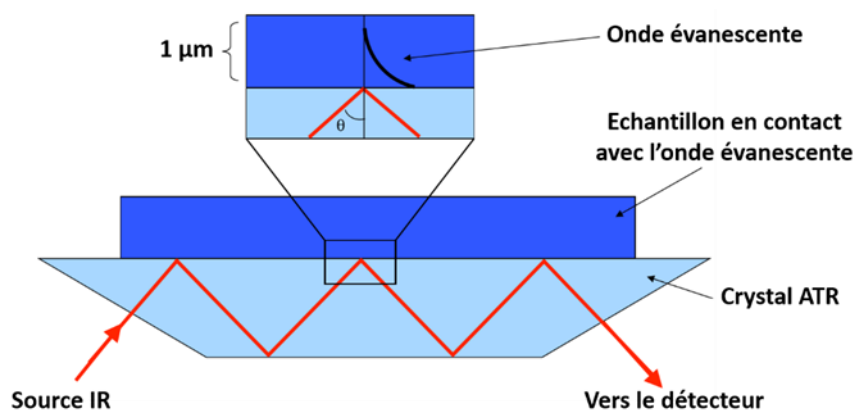


Figure 131 : Principe de la spectroscopie **IR-ATR** multi-réflexion

La spectroscopie **IR-ATR** peut aussi être utilisée pour l'analyse des liquides ou des poudres. La seule limite est la profondeur de pénétration de l'onde évanescente, qui est de l'ordre de $1\ \mu\text{m}$, et ne permet donc pas d'analyser des surfaces moins épaisses et ne donne pas d'informations quantitatives pour la globalité du substrat.

Cependant, dans le cas de nos échantillons l'épaisseur des couches n'était pas suffisant pour qu'on puisse observer toutes les fonctions chimiques caractéristiques par IR-ATR. De plus, la méthode PM-IRRAS n'est pas accessible dans notre laboratoire.

A.II.2.2 Voltampérométrie cyclique

Les techniques électrochimiques permettent d'étudier le comportement en solution d'espèces électro-actives au voisinage d'électrodes reliées à un potentiostat. Les performances des électrodes sont fortement dépendantes de leurs états de surface. Il est donc possible d'utiliser ce type d'analyse pour évaluer la modification de surface d'un substrat métallique que l'on utiliserait comme électrode de travail. Parmi les différentes techniques électrochimiques disponibles, la voltampérométrie cyclique permet d'imposer une rampe de tension continue et de mesurer le courant électrique circulant. Cette méthode analytique repose sur la variation continue du potentiel E au niveau de l'électrode de travail (surface d'or) à une vitesse constante de balayage entre deux limites (Figure 132).²⁸⁸ Une élévation du courant correspondra à une oxydation et une diminution du courant à une réduction des molécules en solution. Si lors d'un cycle de tension, les deux vagues d'oxydation et de réduction sont obtenues, le système redox sera identifié comme réversible.

Les cellules électrochimiques comportent trois électrodes (une électrode de travail, une électrode de référence et une contre électrode). La mesure du potentiel de l'électrode du travail se fait par rapport à une électrode de référence qui maintient un potentiel constant. La contre-électrode intervient comme anode et est le siège de l'oxydation.

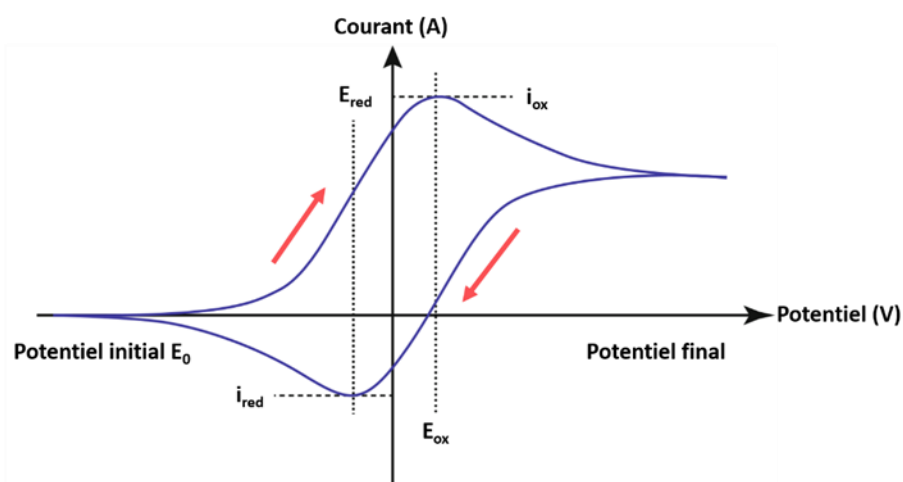


Figure 132 : Voltampérogramme cyclique enregistré pour Fe^{3+}/Fe^{2+} dans une solution aqueuse²⁸⁸

²⁸⁸ Schumm, B., Kreysa, G., Ota, K., Savinell, R. F. Carbon-Zinc Batteries. In *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*, Springer New York, **2014**, 149–152.

A.II.2.1 Spectrométrie photoélectronique à rayons X

La spectrométrie de photoélectrons induits par rayon X (XPS pour « X-ray Photoelectron Spectroscopy ») est une méthode analytique développée par l'équipe de Kai Siegbahn²⁸⁹ à Uppsala dans les années 50. Elle a été récompensée par le prix Nobel en physique en 1981.

Cette technique d'analyse est non destructive, et permet de déterminer la composition chimique d'une surface d'un matériau sur une épaisseur de 10 et 100 Å. Tous les éléments chimiques peuvent être identifiés exceptés l'Hydrogène et l'Hélium.

L'irradiation d'une surface de matériau par un rayonnement de photon X déstabilise les atomes de la surface (Figure 133). De ce fait, les électrons qui gravitent autour du noyau des atomes quittent leurs orbitales et passent dans le vide environnant. Les photoélectrons émis possèdent une certaine énergie cinétique qui va être caractéristique de l'orbitale sur laquelle il se trouvait et donc de l'atome auquel ils étaient liés. On obtient donc des informations sur la nature des liaisons chimiques, les structures électroniques du système et le degré d'oxydation pour les atomes identifiés.

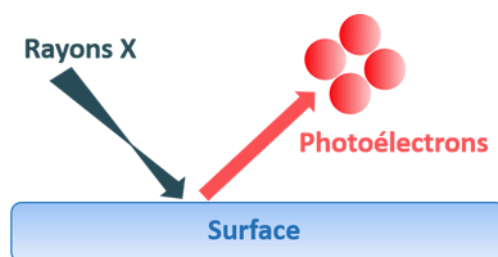


Figure 133 : Ejection des photoélectrons

A.II.2.2 Microscopie à force atomique (AFM)

La microscopie à force atomique (AFM pour « Atomic Force Microscopy ») est un mode de détection optique des surfaces. Il a été élaboré en 1986 par Gerd Binnig, Calvin Quate et Christoph Gerber.²⁹⁰ Ce microscope à haute résolution peut être utilisé pour imager la surface d'un matériau point par point. Il fournit des informations sur l'état de surface d'un matériau, c'est-à-dire sa topologie tridimensionnelle ainsi que sur les molécules qui y sont adsorbées.

L'AFM permet de mesurer des forces d'interactions (VdW, électrostatiques) entre les atomes surfaciques de l'échantillon et une pointe fine nanométrique qui va jouer le rôle de sonde. Cette pointe est reliée à un levier flexible sur lequel est focalisé un laser (Figure 134).

²⁸⁹ Siegbahn, K.; Nordling, C.; Fahlman, A. *ESCA, Atomic, Molecular and Solid State Structure Studied by Means of Electron Spectroscopy*; **1967**.

²⁹⁰ a) Gerber, Ch.; Binnig, G.; Fuchs, H.; Marti, O.; Rohrer, H. Scanning Tunneling Microscope Combined with a Scanning Electron Microscope. *Rev. Sci. Instrum.* **1986**, 57 (2), 221–224. b) Binnig, G.; Quate, C. F.; Gerber, Ch. Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 56 (9), 930–933.

La pointe va scanner point par point la surface du matériau à analyser. Si les forces d'interaction changent au cours de l'analyse, le levier va être déplacé conduisant à un déplacement du faisceau laser réfléchi sur le photodétecteur à quadrant. L'intensité des forces d'interaction étant proportionnelle à l'amplitude déplacement de la sonde.²⁹¹

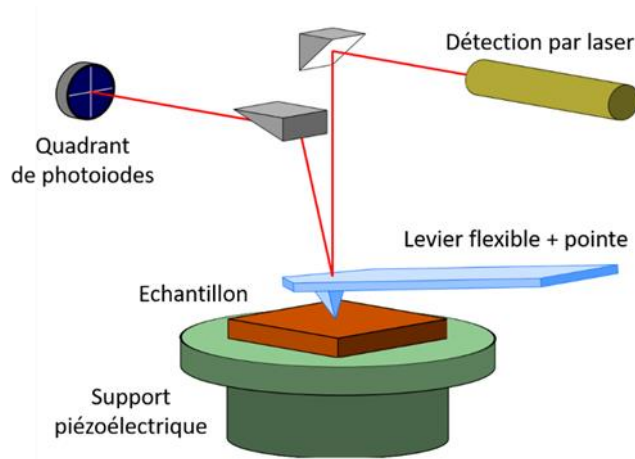


Figure 134 : Principe de la microscopie à force atomique (AFM)

Trois modes de fonctionnement ont principalement été développés :

- Le **mode contact** est le mode le plus couramment utilisé. Ce mode est basé sur des forces répulsives. La pointe est en contact avec la surface à des distances faibles ($\leq 0,3$ nm). Elle suit la topographie sur la surface et le levier est donc infléchi. L'appareil mesure alors la déviation, ce qui donne aussi un accès à la hauteur de l'échantillon.
- Le **mode sans-contact** ou **en modulation des fréquences** repose sur une distance échantillon/surface plus importante, entre 1 et 100 nm. Autrement dit, la pointe ne touche pas l'échantillon et le levier oscille avec une fréquence proche de sa fréquence de résonance. La pointe est donc toujours à la même distance par rapport à la surface et les déviations du levier sont dues uniquement aux forces attractives (électrostatiques, magnétiques ou van de Waals).
- Le **mode tapping** est un mode de contact intermittent. Il combine les deux modes précédemment décrits. La distance pointe/surface est entre 0,3 et 100 nm. Le levier vibre à une fréquence de l'ordre de 50 à 100 Hz avec une amplitude constante de manière à ce que la pointe touche la surface. En suivant la morphologie de surface, l'amplitude de l'oscillation varie. Cette variation est considérée comme un rétrocontrôle du déplacement z pour conserver une amplitude (ou hauteur) constante. La différence de cette amplitude permet d'avoir des informations sur l'échantillon comme la hauteur selon l'axe z.

²⁹¹ Meyer, G.; Amer, N. M. Novel Optical Approach to Atomic Force Microscopy. *Appl. Phys. Lett.* **1988**, 53 (12), 1045–1047.

Ces variantes permettent donc d'obtenir une image topologique et nanométrique des surfaces. Dans le cadre de notre projet, nous avons choisi de caractériser nos surfaces d'or par le mode contact puisque cette méthode s'adapte bien à nos échantillons pour obtenir une meilleure résolution.

A.II.2.3 Microscopie à épi-fluorescence

La méthode d'analyse à base de fluorescence est une technique de microscopie qui a été développée au début du 20^{ème} siècle. Cette caractérisation est spécifique aux échantillons comprenant des molécules fluorescentes ou rendues fluorescentes dans le cas où elles ne peuvent pas être visualisées par microscopie optique conventionnelle. Cette méthode utilise des sources d'excitation à courte longueur d'onde telle que des lampes à vapeur de mercure. Ces sources d'excitation sont souvent très puissantes pour illuminer les surfaces à imager. Malheureusement, l'émission de fluorescence des objets microscopiques est souvent très faible et il faut donc avoir recours à une optique particulière et à un jeu de filtre optique (filtre d'excitation, miroir dichroïque et filtre d'émission) pour pouvoir améliorer le rapport signal fluorescent sur bruit d'excitation (Figure 135). Dans un système à épi-fluorescence, la fluorescence émise est collectée par réflexion par rapport à la lumière excitatrice ce qui rend possible une détection très sensible.

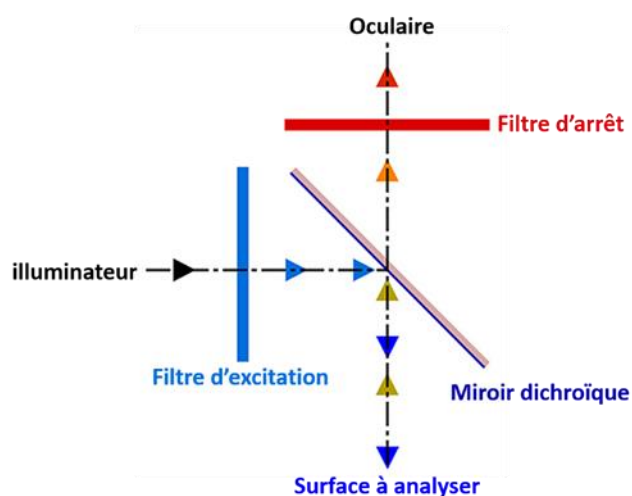


Figure 135 : Système de fonctionnement d'un microscope à épi-fluorescence²⁹²

Dans notre application, nous utilisons la microscopie à épi-fluorescence pour valider l'immobilisation sur surface d'or de nos molécules hétéro (di- ou tri-) fonctionnelles modifiées avec des fluorophores. La microscopie nous permettra d'évaluer la formation d'agrégats en surface et de pouvoir évaluer l'homogénéité du recouvrement de la surface par les molécules d'intérêt.

²⁹²Techniques microscopiques - Principe de l'épifluorescence http://optique-ingenieur.fr/fr/cours/OPI_fr_M03_C04/co/Contenu90.html.

B. Résultats et discussion

Cette partie est consacrée à la description de la stratégie qui a mené à la fonctionnalisation d'une surface d'or par les réactifs multifonctionnels cibles. Pour que le capteur développé puisse être facilement transféré au niveau industriel, il est important que cette stratégie soit simple à mettre en œuvre, peu coûteuse et transposable à grande échelle.

Au cours de cette partie, je présenterai les différentes phases d'optimisation des conditions d'immobilisation pour ancrer les différentes molécules d'intérêt (**D4-R6G**, **T4-R6G**, **D5-P** et **T5-P**) en surface d'électrode. Comme mentionné dans les chapitres 2 et 3, ces molécules ont été synthétisées puis assemblées en solution avant d'être immobilisées sur surface. La synthèse en solution nous a permis de garantir la pureté et la structure chimique des produits avant la fonctionnalisation des surfaces.

B.1 Stratégie et protocole de fonctionnalisation du tripode T4-R6G

Avant d'engager nos molécules, nous avons tout d'abord commencé par optimiser les conditions d'immobilisation d'une molécule commerciale. Dans un premier temps, nous avons travaillé avec des dérivés alcanethiols simples tels que l'acide 11-mercapto-undécanoïque **MUA**. Nous avons ensuite transposé ces conditions expérimentales sur un dérivé hétéorobifonctionnel **D4-R6G** avant de tester le tripode **T4-R6G** (Figure 136).

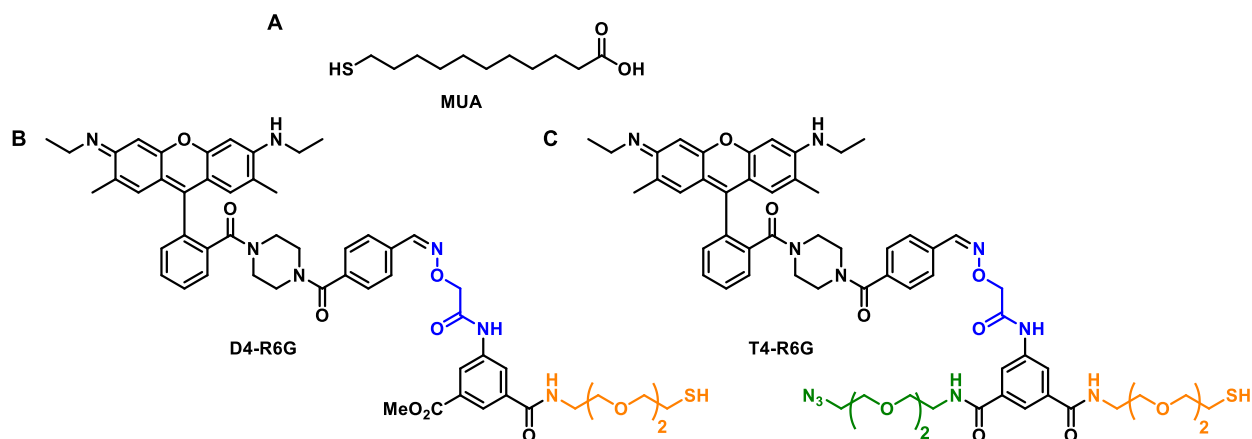


Figure 136 : Structures de **MUA** (A), **D4-R6G** (B), **T4-R6G** (C)

B.1.1. Fonctionnalisation des molécules modèles MUA et D4-R6G

Pour évaluer l'influence du temps de greffage des molécules absorbées sur électrode d'or, j'ai réalisé une étude sur un composé commercial l'acide 11-mercapto-undécanoïque **MUA** à différents temps sur une durée de 24 heures et j'ai caractérisé les surfaces modifiées par des méthodes de caractérisation adéquates par spectroscopie IR et voltammétrie

cyclique. Le choix de cette molécule a été basé sur sa faible toxicité et la facilité de la manipuler pour l'accrocher sur une surface d'or.

Ainsi, une électrode d'or préalablement lavée par une solution de piranha, plongée dans une solution contenant le composé **MUA** a été préparée à une concentration de 5 mM dans l'éthanol. L'électrode ainsi obtenue est ensuite rincée par l'éthanol et eau. Ensuite, séchée par l'azote et puis conservée à l'abri de la lumière sous azote (le protocole général est décrit dans la partie matériels et méthodes).

Dans un premier temps, j'ai choisi d'utiliser la spectroscopie IR-ATR pour confirmer en première approche, la présence des molécules adsorbées.

Une bande caractéristique à 1700 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'élongation du groupement C=O de l'acide carboxylique doit être observée afin de confirmer l'adsorption de la molécule **MUA** sur la surface d'or. Bien que l'IR-ATR ne soit que semi-quantitatif, on peut l'utiliser pour suivre un taux d'adsorption de la molécule **MUA** si l'on compare les variations d'intensité d'une bande d'intérêt rapportées à une bande d'intensité constante. Les variations d'intensité relatives à des variations de pressions au niveau de la presse ou au niveau du contact cristal-or sont donc corrigées. Cependant, la faible intensité du signal de la bande correspondant obtenue ne nous laisse pas présenter la superposition des spectres IR obtenus après différents temps de greffage. L'épaisseur des couches n'était pas suffisante pour étudier la fonctionnalisation de surface par IR.

Une méthode complémentaire de ces premières observations nous donne des résultats plus concrets. J'ai utilisé une seconde méthode de caractérisation des surfaces complémentaire à la spectroscopie IR. L'analyse par voltampérométrie cyclique à partir d'une solution de ferrocène. Cette méthode va nous permettre d'étudier la conductivité de notre surface d'or en l'utilisant comme une électrode de travail et elle permettra aussi d'obtenir le taux de recouvrement par l'étude de la désorption électrochimique.²⁹³

Voltampérométrie cyclique

Les électrodes ainsi obtenues sont plongées dans une solution de ferrocène de concentration 10 mM contenant de l'électrolyte support (NaBu_4PF_6 , 100 mM). Les réponses électrochimiques sont alors évaluées par voltampérométrie cyclique, l'électrode de référence utilisée est Platine et la contre électrode Ag/AgCl.

²⁹³ a) Ahmad, A.; Moore, E. Electrochemical Immunosensor Modified with Self-Assembled Monolayer of 11-Mercaptoundecanoic Acid on Gold Electrodes for Detection of Benzo[a]Pyrene in Water. *The Analyst* **2012**, 137 (24), 5839. b) Cecchet, F.; Marcaccio, M.; Margotti, M.; Paolucci, F.; Rapino, S.; Rudolf, P. Redox Mediation at 11-Mercaptoundecanoic Acid Self-Assembled Monolayers on Gold. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110 (5), 2241–2248.

Les résultats obtenus (Figure 137) montrent que plus le temps d'immersion est important, plus l'intensité électrique mesurée au potentiel du ferrocène est faible. Ce comportement correspond à une baisse de la conductivité de notre électrode modifiée au cours du temps. Cette diminution s'explique par un dépôt plus épais ou un plus grand nombre de molécules **MUA** adsorbées à la surface de l'électrode. L'électrode d'or se retrouve donc passivée par l'adsorption de **MUA**.

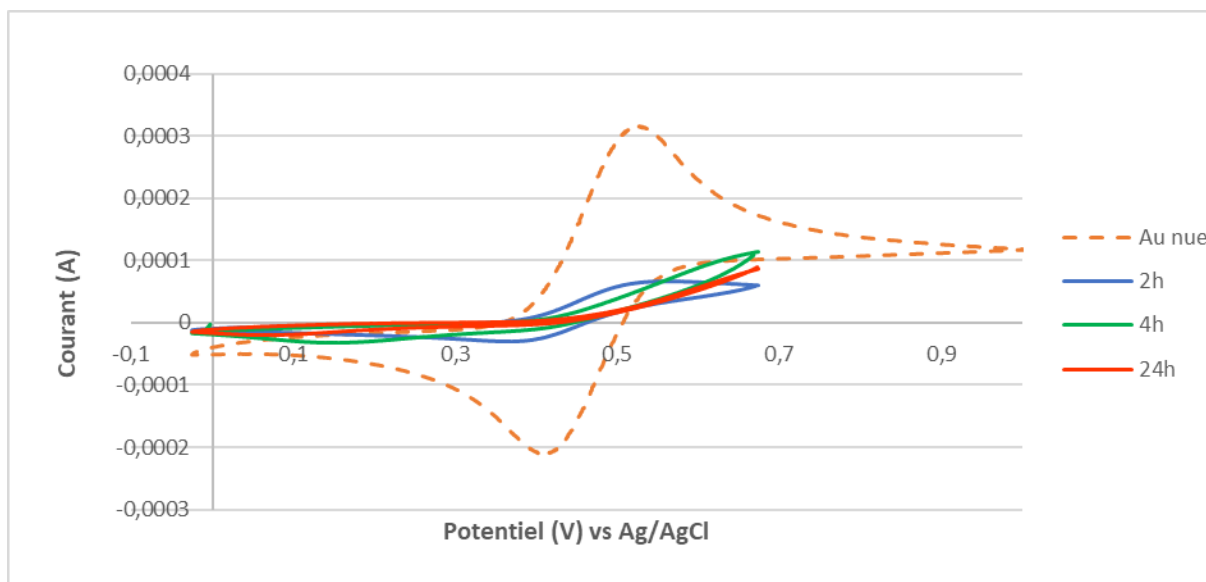


Figure 137 : Voltampérogrammes cycliques de l'analyse de ferrocène en présence d'une électrode d'or avant modification (orange en pointillés) et après modification (Temps d'immersion dans une solution **MUA** 2h (bleu), 4h (vert), 24h (rouge)). Vitesse de scan $0,1 \text{ V.s}^{-1}$

La surface sous les pics obtenus lors de la réduction électrochimique du ferrocène représente la charge électrique C de notre système électrique (Figure 137). A partir de cette charge et grâce à l'équation (1), je peux déterminer la quantité de molécules électroactives adsorbées par unité de surface (tableau 10). Donc plus le taux de molécules électroactives adsorbées est faible, plus la surface de mon électrode sera passivée et donc plus grand sera mon nombre de molécules de **MUA** immobilisées sur ma surface.

Ainsi, en utilisant l'équation (2), je peux estimer le taux de recouvrement de mon électrode c'est-à-dire la densité de surface modifiée par mes molécules de **MUA**.

$$(1) \text{ Quantité des molécules adsorbées par unité de surface} = \frac{\text{Charge électrique}}{n \times F \times A}$$

$$(2) \text{ Taux de recouvrement} = \frac{I(\text{or non modifié}) - I(\text{or modifié})}{I(\text{or non modifié})} * 100$$

$$= \frac{\text{surface d'électrode modifiée}}{\text{surface d'électrode non modifiée}} * 100$$

Avec

C : Charge déterminée (en C) n : nombre d'électrons échangés

F : Constante de Faraday A : Surface de l'électrode

F = 96 485 C/mol n = 1 A = 1,21 cm²

Le Tableau 11 dessous montre la quantité de molécules adsorbées pour chaque temps d'immersion.

Temps d'immersion	2h	4h	24h
Quantité de molécules adsorbées par unité de surface (mol.cm ⁻²)	4,8. 10 ⁻⁹	3,9.10 ⁻⁹	2,6.10 ⁻⁹
Taux de recouvrement (%)	85	88	92

Tableau 11 : Quantité de **MUA** adsorbées et le taux de recouvrement pour chaque temps d'immersion

D'après ces résultats, nous remarquons que la densité de la molécule **MUA** sur la surface évolue d'une manière significative en augmentant le temps d'immersion de 2h à 24h en allant de 4,8.10⁻⁹ mol.cm⁻² à 2,6.10⁻⁹ mol.cm⁻². Les taux de recouvrement calculés montrent aussi une augmentation progressive jusqu'à 24h.

De ce fait, après cette étude de faisabilité et les résultats analytiques obtenus, nous avons adopté un temps optimum de greffage de 4h pour l'immobilisation des molécules cibles. Afin de confirmer notre stratégie, nous sommes passés à l'immobilisation du 1^{er} dipode modèle **D4-R6G** préalablement synthétisé. Il se rapproche de la structure du tripode que nous souhaitons immobiliser en surface du capteur. Il va donc nous permettre de prendre en compte l'encombrement stérique du tripode **T4-R6G** sans gaspiller ce produit difficile à synthétiser. En outre, le fait que le **D4-R6G** soit dérivé avec la **R6G-AL** ceci nous permet d'étudier l'homogénéité du dépôt par microscopie à épi-fluorescence.

La fonctionnalisation d'un substrat d'or a été effectuée pendant 4h dans une solution de **D4-R6G** à une concentration 2 mM dans l'acétonitrile puisque cette molécule n'est pas bien soluble dans l'éthanol. Après rinçage et lavage de l'électrode dans l'acétonitrile et de l'éthanol, nous avons, par la suite, procédé à la caractérisation des monocouches formées par différentes méthodes analytiques (voltampérométrie cyclique, microscopie à épi-fluorescence, XPS).

Voltampérométrie cyclique

Les résultats obtenus par voltampérométrie cyclique sont indiqués dans la Figure 138 :

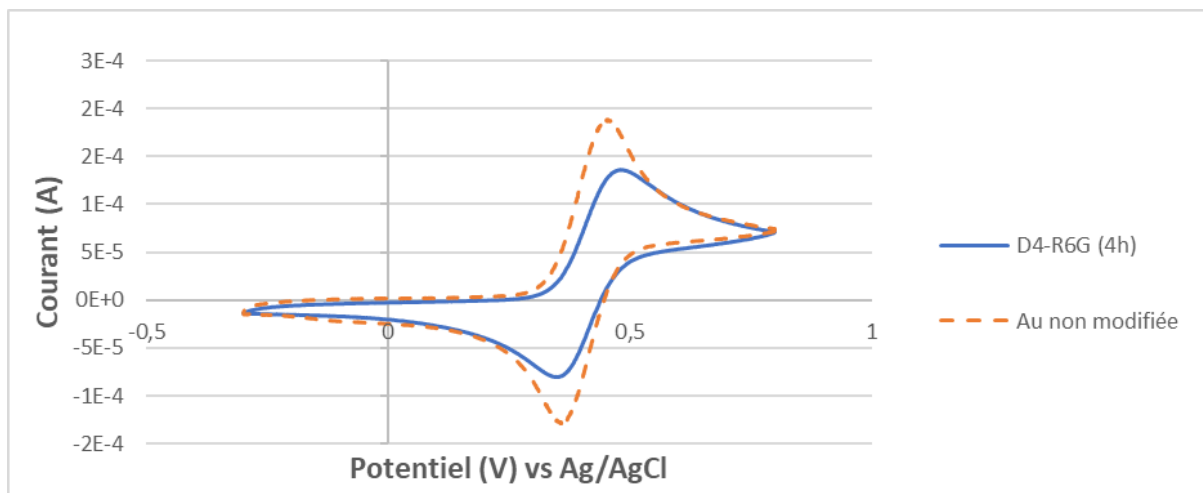


Figure 138 : Voltampérogrammes cycliques de l'analyse de ferrocène avant et après modification de l'électrode d'or par des SAM de **D4-R6G** (4h, ACN). Vitesse de scan 0,1 V.s⁻¹

De nouveau, le dépôt de l'électrode induit une passivation de l'électrode. Il est intéressant de noter que le voltampérogramme du ferrocène diffère selon que l'électrode est modifiée avec le **D4-R6G** ou avec le **MUA**. Cela peut provenir de la manière dont les molécules sont organisées à la surface de l'électrode.²⁷⁶ On peut également observer une intensité électrique pour le signal du ferrocène moins élevée en présence de **D4-R6G** qu'en présence de **MUA**. Cette différence peut également être imputée à un recouvrement différent des surfaces.

L'étude de la charge électrique (Tableau 12) nous permet de déterminer la quantité de molécules adsorbées et le taux de recouvrement. On voit que la densité de la molécule **D4-R6G** sur surface est plus importante puisqu'elle passe de $3,9 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$ avec la molécule **MUA** à $8,6 \cdot 10^{-9} \text{ mol.cm}^{-2}$.

Molécule	D4-R6G
Quantité de molécules adsorbées par unité de surface (mol.cm ⁻²)	$8,6 \cdot 10^{-9}$
Taux de recouvrement (%)	42

Tableau 12 : Quantité de **D4-R6G** adsorbées et taux de recouvrement sur électrode d'or

Microscopie à épi-fluorescence

La caractérisation des molécules **D4-R6G** par microscopie à épi-fluorescence montre bien la présence des fluorochromes sur la surface d'une manière non homogène et

dispersée. Nous observons sur un fond noir, qui présente la surface d'or, la présence des zones non greffées et d'autres zones fluorescentes qui correspondent à des agrégats (Figure 139).

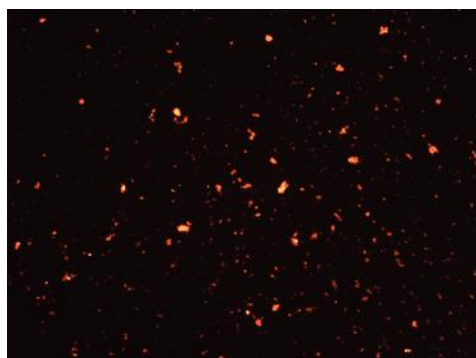


Figure 139 : Image épi-fluorescence de **D4-R6G** (x20/0,5 NA)

Comme nous observons aussi dans la Figure 140 une augmentation de l'intensité de fluorescence après modification dans les zones présentant des molécules fluorescentes.

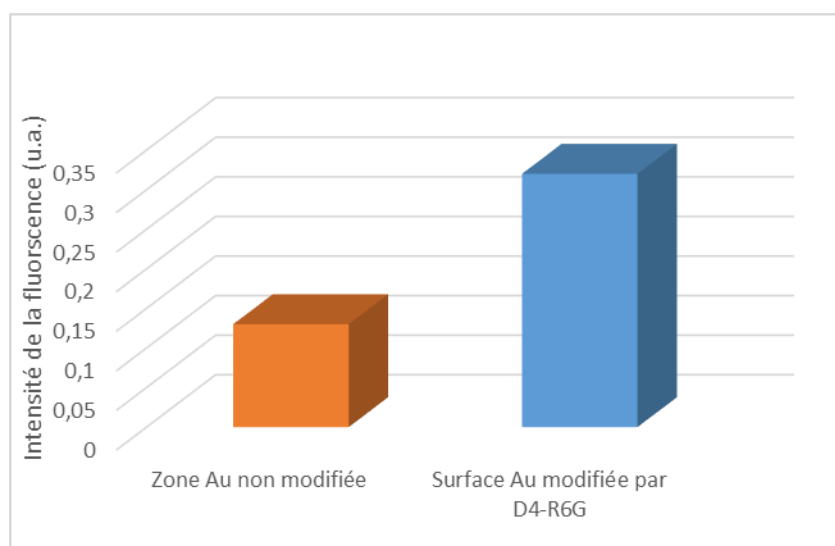


Figure 140 : Intensité de fluorescence en zone non greffée (orange) et zones greffées fluorescentes (bleu) par **D4-R6G**

Afin de définir les atomes présents à la surface de l'électrode modifiée ainsi que leurs environnements chimiques et leurs états d'oxydation, nous avons réalisé des analyses XPS au laboratoire ITODYS.

XPS

D'après le spectre XPS (Figure 141), nous retrouvons en surface en plus des atomes d'or, des atomes de carbone, d'azote, de soufre et d'oxygène pouvant provenir du **D4-R6G** adsorbés en surface.

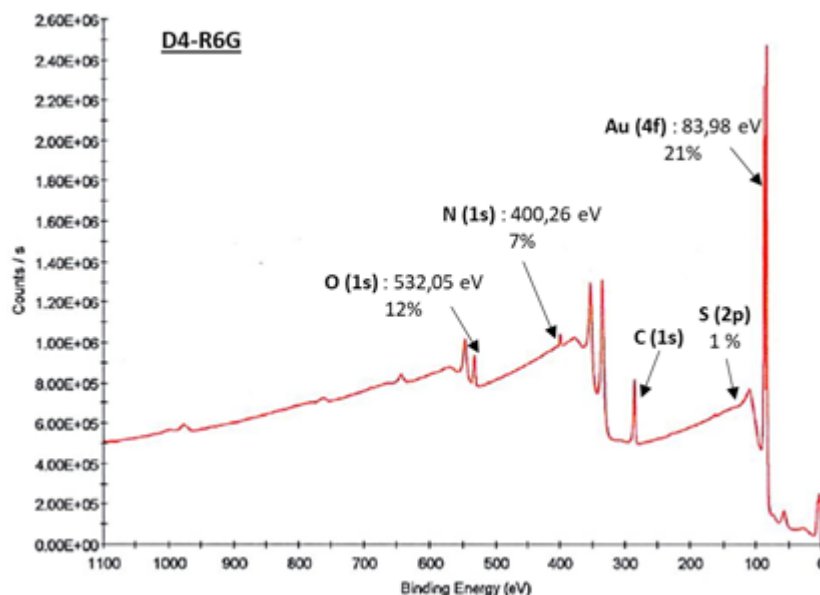


Figure 141 : Spectre XPS de la molécule **D4-R6G** ($C_{55}H_{61}N_7O_{10}S$)

La déconvolution des spectres XPS associés au carbone et au soufre vont nous permettre de caractériser l'environnement chimique de ces atomes :

Le spectre XPS du Carbone C1s (Figure 142 A) montre la présence de 4 types de carbone avec des intensités différentes. Le 1^{er} type de carbone C1s à 285,3 eV correspond aux alcanes CH_2 , présents dans la molécule. Les types C1s A C1s B avec des énergies de liaison respectives de 286,6 eV et 288,5 eV correspondent aux carbones liés à des atomes plus électronégatifs comme l'oxygène et l'azote. Le dernier type de carbone à une énergie de liaison de 291,3 eV pourrait correspondre au processus de la perte d'énergie du plasmon.²⁹⁴ Pour le reste des éléments présents dans notre échantillon Au4f, O1s et N1s, nous retrouvons les pics respectivement à 83,9 eV, 532 eV et 400,3 eV (Figure 142).

La déconvolution du pic S2p en Figure 142 B montre la présence de trois types d'atomes de soufre. Le 1^{er} type de soufre S2pA, donne lieu à un doublet à 161,87 eV ($S_{2p_{3/2}A1}$) et 163,07 eV ($S_{2p_{1/2}A2}$) distants de 1,2 eV qui correspond au thiol lié à l'or Au-S. Le ratio d'aire 1:2 correspond à l'absence de dimérisation du thiol sous forme de

²⁹⁴ Kelemen, S. R.; Freund, H. XPS Characterization of Glassy-Carbon Surfaces Oxidized by O_2 , CO_2 , and HNO_3 . *Energy Fuels* **1988**, 2 (2), 111–118.

disulfure.²⁹⁵ Le 2^{ème} type de soufre S2pB, donne aussi un doublet à 163,8 eV (S2p_{3/2}B1) et 165 eV (S2p_{1/2}B2) avec une séparation des pics de 1,2 eV et un ratio d'aire 1 :2. Ces pics d'énergie de liaison correspondent à la liaison soufre-carbone S-C. Finalement, le 3^{ème} type de soufre S2pC qui apparait avec une faible intensité en un doublet S2pC1 et S2pC2 avec des énergies de liaisons respectives 163,4 eV et 169,7 eV correspond à une éventuelle oxydation du thiol sous la forme SO₂⁻. Il semblerait donc qu'une partie des thiols aient subi une oxydation lors du processus d'immobilisation.

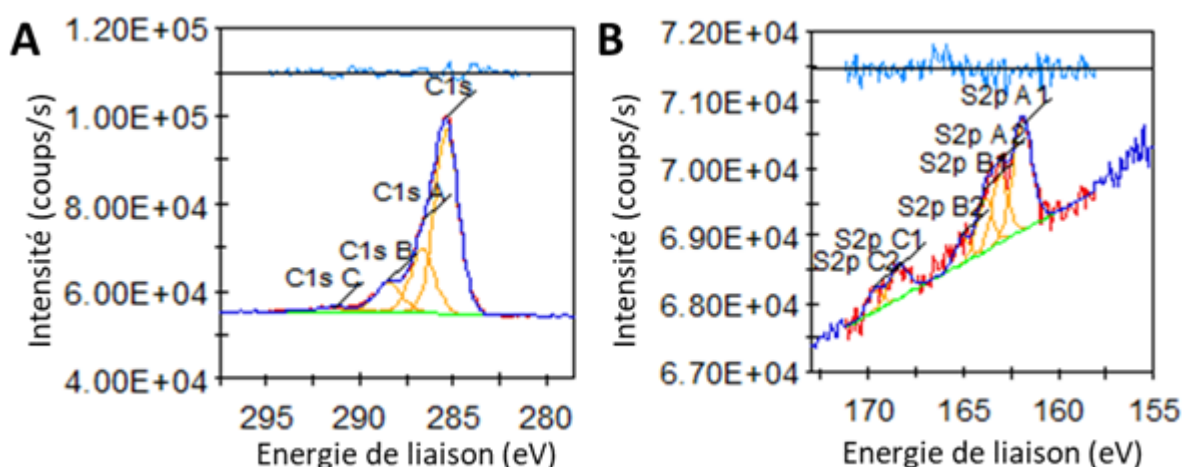


Figure 142 : Spectres XPS de C1s (A) et S2p (B) de la molécule **D4-R6G** (C₅₅H₆₁N₇O₁₀S) adsorbée à la surface Au (111).

B.I.2. Immobilisation du réactif hétérotrifonctionnel T4-R6G

A partir des résultats des deux expériences précédentes, qui montrent une bonne immobilisation du dipode fluorescent **D4-R6G**, l'immobilisation du tripode **T4-R6G** a été mise au point.

La solubilité de la molécule à immobiliser est un paramètre influant sur la qualité d'une immobilisation. Nous avons donc testé 4 solvants (éthanol, acétonitrile, eau, méthanol) pour évaluer l'influence de ce paramètre sur l'immobilisation du tripode (Tableau 13). L'éthanol a été exclu puisqu'il n'est pas un solvant optimal pour une bonne solubilité de ce tripode.

Expérience	Concentration	Temps d'immersion	Solvant
1	2 mM	4h	ACN/ H ₂ O
2	2 mM	4h	MeOH

Tableau 13 : Expériences effectuées pour l'optimisation de l'immobilisation de **T4-R6G**

²⁹⁵ Whelan, C. M.; Smyth, M. R.; Barnes, C. J.; Brown, N. M. D.; Anderson, C. A. An XPS Study of Heterocyclic Thiol Self-Assembly on Au(111). *App. Surf. Science* **1998**, 134, 144-158.

Compte tenu de la solubilité limitée du **T4-R6G** dans l'acétonitrile, il a été nécessaire d'ajouter 2% d'eau au solvant utilisé dans la 1^{ère} expérience afin d'assurer une bonne solubilité de la molécule.

Voltampérométrie cyclique

Comme l'indique la Figure 143, en présence d'une surface d'or non modifiée en tant qu'électrode de travail, l'analyse du ferrocène donne une courbe redox réversible avec une intensité proportionnelle à la conductivité de l'électrode de travail. L'analyse d'une solution de ferrocène avec une électrode d'or modifiée par le **T4-R6G** présente un décalage vers des potentiels plus bas et une intensité électrique réduite confirmant que l'immobilisation du **T4-R6G** est réussie.

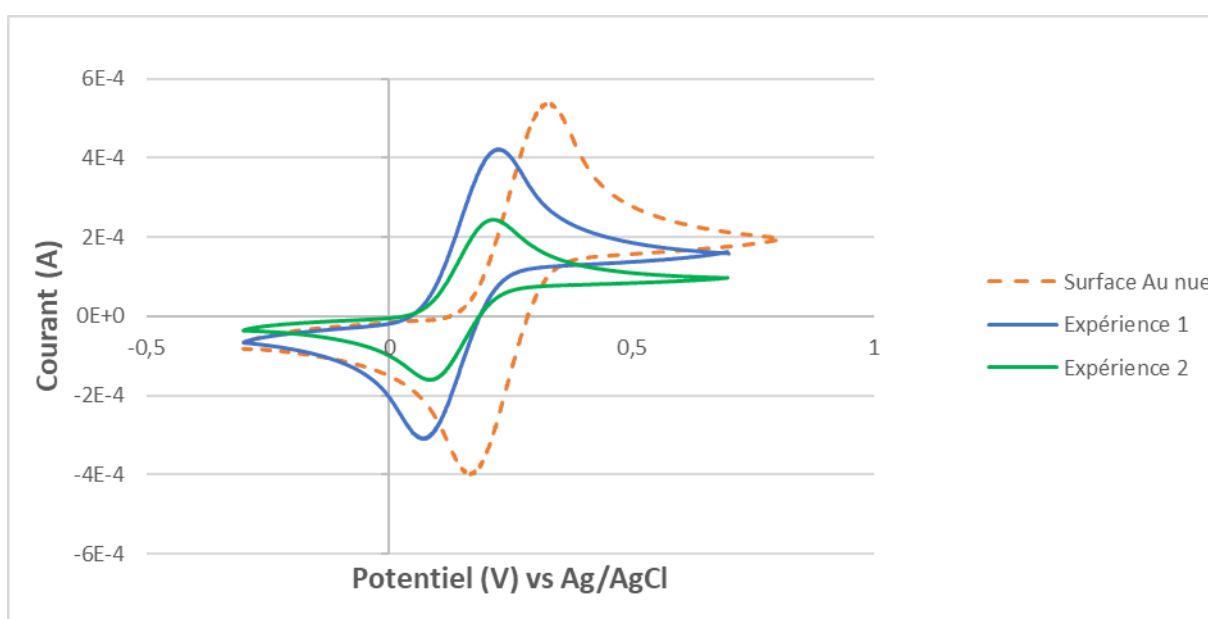


Figure 143 : Voltampérogrammes cycliques de l'analyse de ferrocène en présence d'une électrode d'or avant et après modification par des SAM de **T4-R6G** (**Expérience 1** : 4h, solvant ACN/H₂O et **expérience 2** : 4h, solvant MeOH). Vitesse de scan 0,1 V.s⁻¹

En calculant le taux de recouvrement (Tableau 14), nous remarquons que le taux de recouvrement est meilleur pour l'expérience 2 que l'expérience 1. Ce qui nous permet de conclure à une accroche plus efficace dans ces conditions.

Expériences T4-R6G	1	2
Quantité de molécules adsorbées par unité de surface (mol.cm ⁻²)	2,6 10 ⁻⁸	1,4 10 ⁻⁸
Taux de recouvrement (%)	21	51

Tableau 14 : Densité moléculaire et taux de recouvrement mesuré sur l'électrode modifiée au **T4-R6G** pour les expériences de 4h en présence d'acétonitrile/H₂O (1) et de méthanol (2)

Microscopie à épi-fluorescence

En utilisant la microscopie épi-fluorescence après fonctionnalisation de la surface par **T4-R6G**, nous obtenons les valeurs ci-dessous (Figure 144). Cette méthode optique nous révèle une intensité de fluorescence plus importante pour l'expérience 1 que l'expérience 2.

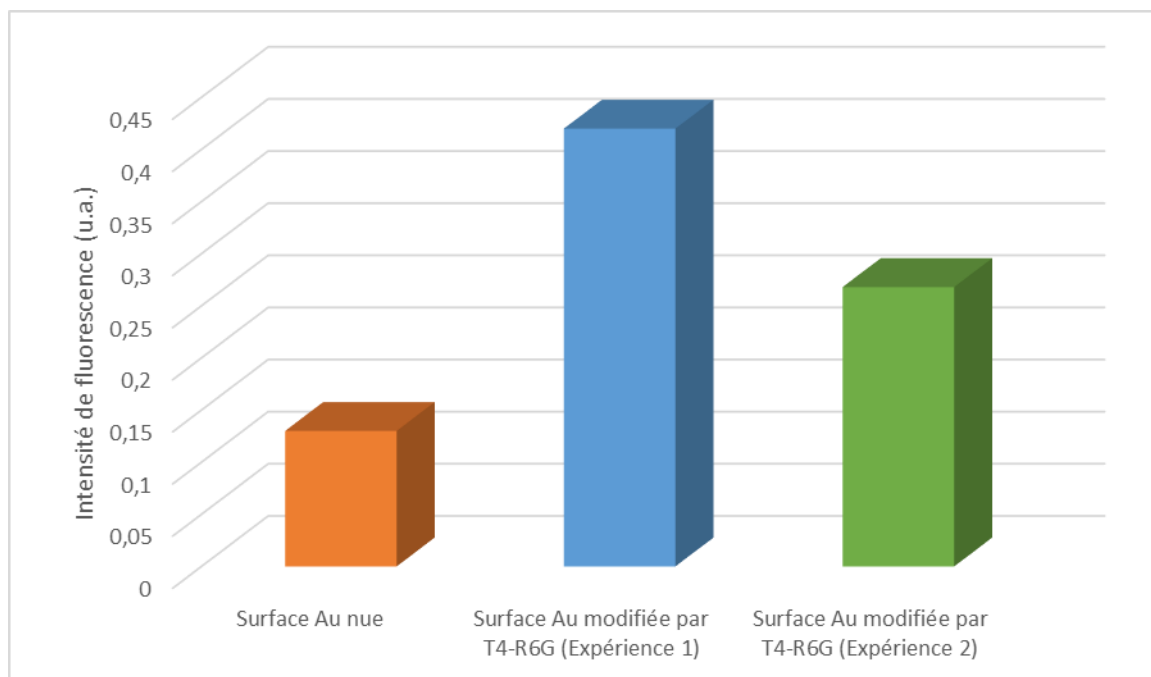


Figure 144 : Intensité de fluorescence avant (orange) et après modification par **T4-R6G** expérience 1 (Bleu) et expérience 2 (vert)

Cependant, en s'appuyant sur ces résultats nous ne pouvons pas conclure directement que l'expérience 1 donne des résultats d'accroche meilleurs. En effet, nous pouvons confirmer la présence d'agrégats d'une manière non homogène sur toute la surface en expérience 1 ce qui explique l'intensité de fluorescence importante. Les images prises par microscopie à épi-fluorescence confirment notre interprétation.

La Figure 145 montre que le **T4-R6G** est immobilisé dans les expériences 1 et 2. On voit sur ces deux photos que le greffage couvre l'ensemble de la surface avec des plots d'intensité plus importante qui pourraient correspondre à des agrégats. L'analyse de l'expérience 2 (Figure 145 B) montre un meilleur recouvrement de la surface et une plus grande homogénéité du dépôt.

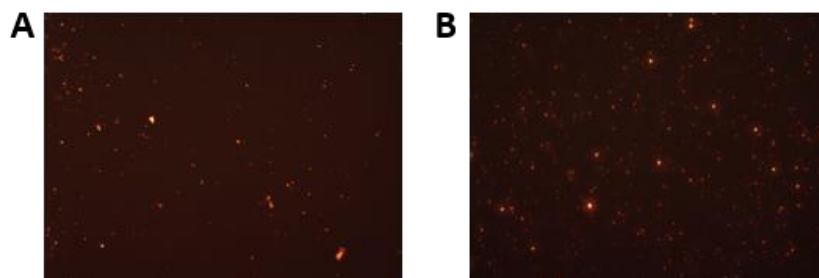


Figure 145 : **T4-R6G** (A) expérience 1 (B) expérience 2 (x20/0,5 NA)

En s'appuyant sur les résultats électrochimiques et ces observations microscopiques sont en accord avec les conclusions que nous avons faites suite aux caractérisations électrochimiques. Les conditions de l'expérience 2 sont donc plus adaptées que celles de l'expérience 1.

AFM

L'étude de la topographie de la surface d'or après fonctionnalisation a été effectuée par AFM pour confirmer les résultats observés en microscopie à épi-fluorescence. Comme dans les études précédentes, il est nécessaire de comparer la surface Au (111) fonctionnalisée par **T4-R6G** avec une surface de référence Au (111) native. Les images AFM sont présentées en Figure 146.

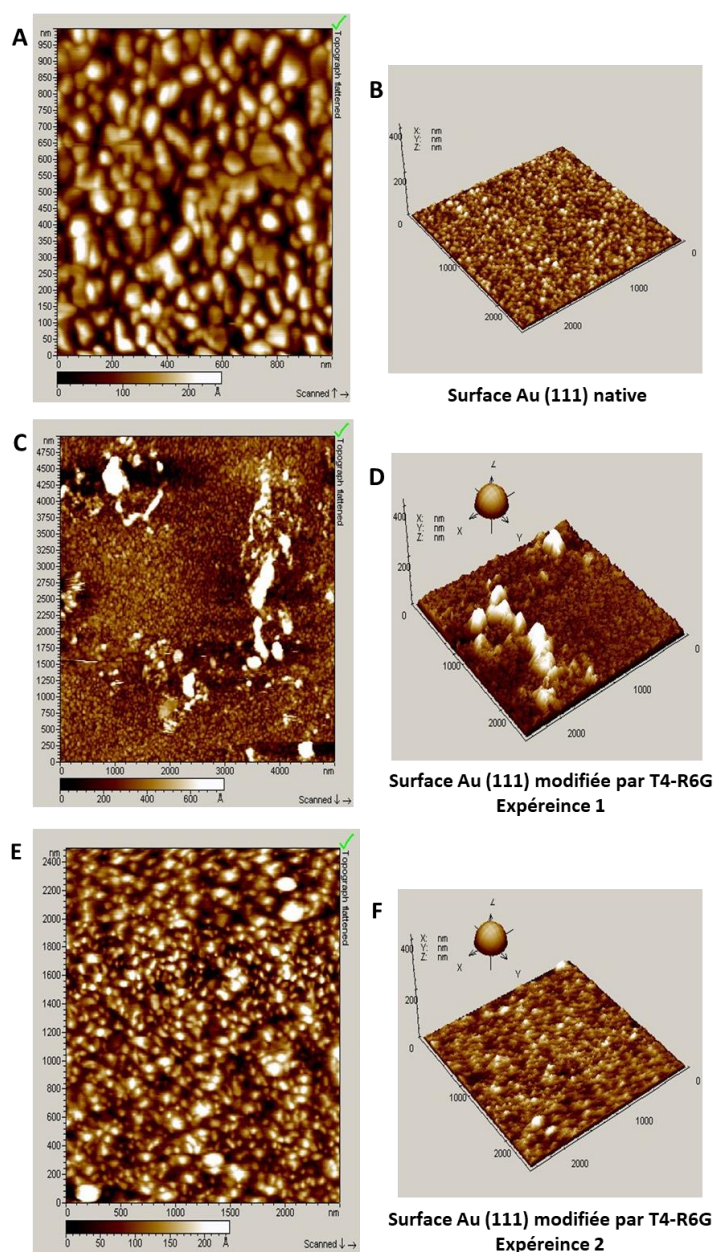


Figure 146 : (A) Image AFM 2D de $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ d'une surface Au (111) native (B) Image AFM 2D de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ d'une surface Au (111) modifiée (Expérience 1) (C) Image AFM 3D de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ d'une surface Au (111) native. (D) Image AFM 3D de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ d'une surface Au (111) modifiée (Expérience 1) (E) Image AFM 2D de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ d'une surface Au(111) modifiée (F) Image AFM 3D de $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}^2$ d'une surface Au(111) modifiée (Expérience 2)

En comparant ces images obtenues de la surface Au (111) non modifiée (Figure 146 A et B) avec la surface après modification par **T4-R6G** dans les deux expériences 1 et 2, nous observons pour l'expérience 1 (Figure 146 C et D) deux zones différentes non homogènes. Une première zone présente sur l'ensemble de la surface correspondant à un dépôt organique relativement homogène et une seconde zone présente à différents endroits pouvant correspondre à des agglomérats moléculaires. Les images obtenues par AFM pour l'expérience 2 sont en accord avec les résultats obtenus par microscopie à épi-fluorescence et voltamétrie cyclique. La Figure 146 E et F montrent la présence de dépôts beaucoup plus homogènes qu'avec l'expérience 1.

La hauteur de la couche organique de ces dépôts est en moyenne mesurée à 200 nm. Nous avons également observé des « agglomérats » dans certaines zones pouvant atteindre 200 nm de hauteur (Figure 147 A). Le taux d'agglomérats observés par unité de surface est quasiment nul dans les conditions de l'expérience 2 (Figure 147 B). De plus, la rugosité pic à pic mesurée dans cette expérience 2 n'est que de 15 nm en moyenne.

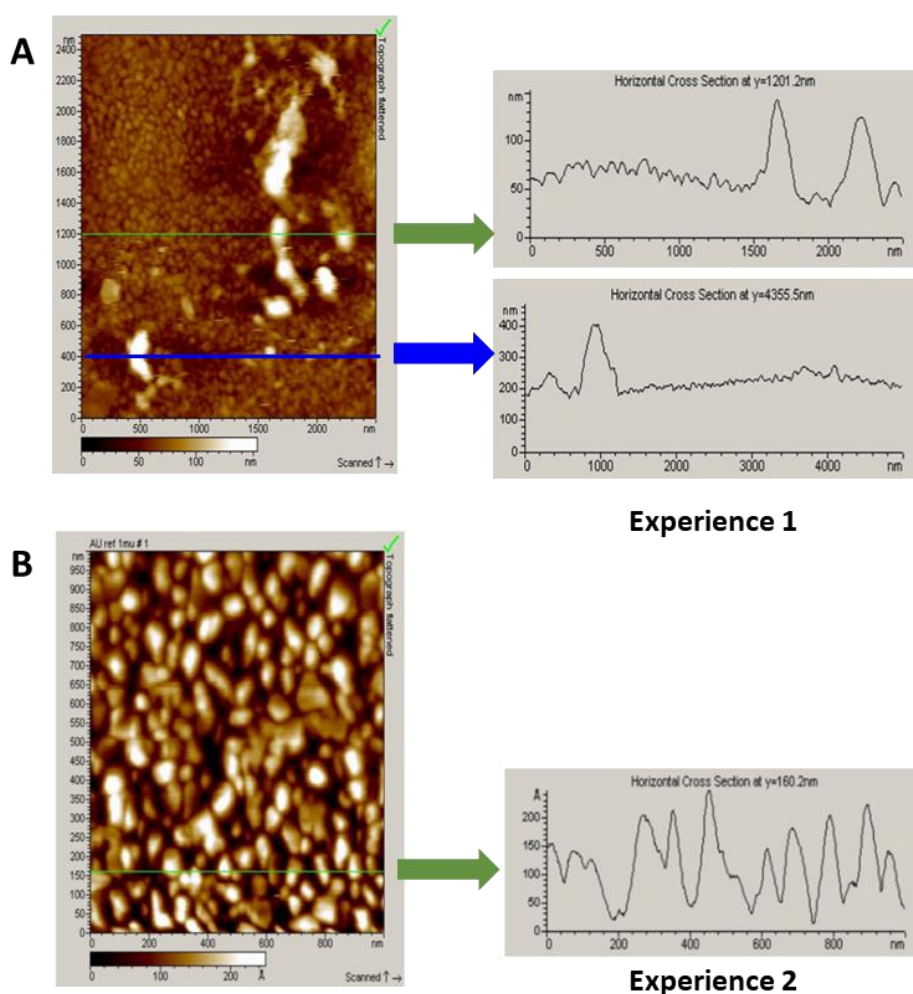


Figure 147 : (A) Mesure en Z sur une zone modifiée montre des agglomérats à différentes ΔZ (Expérience 1) (B) Mesure en Z sur une zone greffée qui montre des zones homogènes (expérience 2)

Ces résultats confirment un greffage plus homogène dans les conditions de l'expérience 2.

XPS

Afin d'analyser la composition chimique des SAMs formées, nous avons caractérisé la surface modifiée par **T4-R6G** en XPS. Le spectre XPS montre que des atomes d'Au, O et N sont cohérents avec la molécule immobilisée (Figure 148). Seul, l'atome de soufre se comporte différemment. Le pourcentage atomique du thiol oxydé est plus élevé dans les conditions de l'expérience 1 du **T4-R6G** qu'avec le dispositif modifié au **D4-R6G**. Il passe de 1% à 2%. Ceci est probablement dû à la présence des 2% d'eau mélangée avec l'acétonitrile pour le **T4-R6G**.

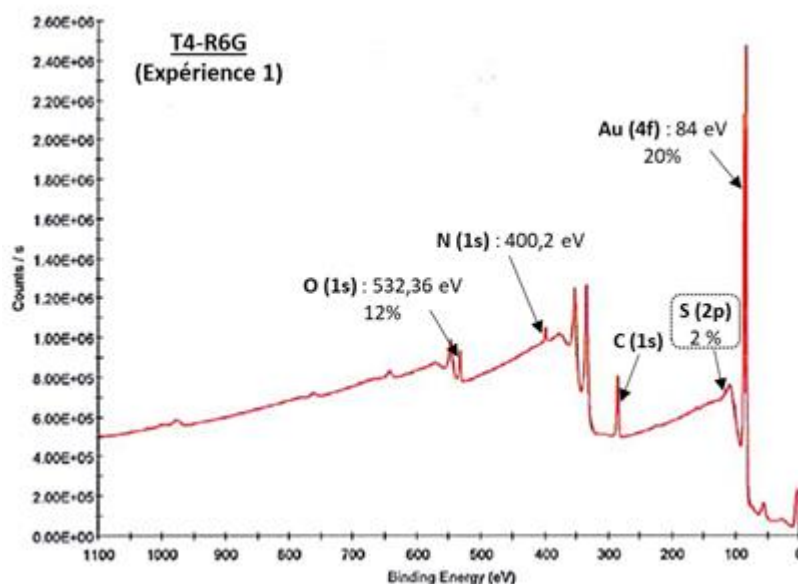


Figure 148 : Spectre XPS de **T4-R6G** (Expérience 1)

L'analyse de l'électrode modifiée avec la **T4-R6G** dans les conditions de l'expérience 1 montre la présence de deux types de Soufre dans la composition S2p contrairement aux 3 types observés lors de l'analyse des dispositifs préparés avec la **D4-R6G** (Figure 149). On retrouve le premier type de soufre correspondant à la liaison AU-S (S2pA1 à 161,9 eV et S2pA2 à 163,2 eV) et les pics correspondant à la présence de thiols oxydés (S2pB1 à 168 eV et S2pB2 à 169,2 eV).

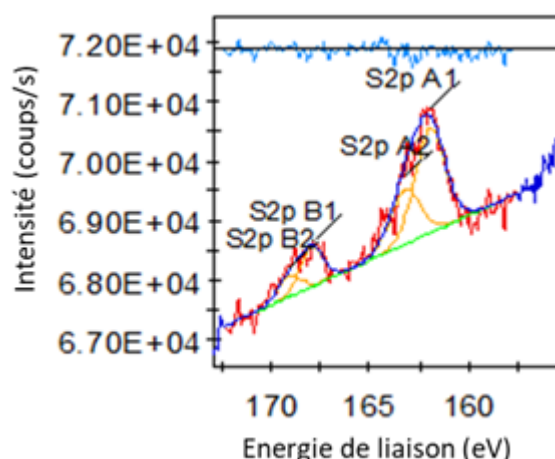


Figure 149 : Spectre XPS de S2p de la molécule **T4-R6G** (Expérience 1) adsorbée à la surface Au (111).

Pour l'expérience 2, les analyses XPS ont été effectuées sur deux zones différentes donne le spectre ci-dessous (Figure 150). On détecte les mêmes atomes d'Au, d'O, de C et de N que précédemment.

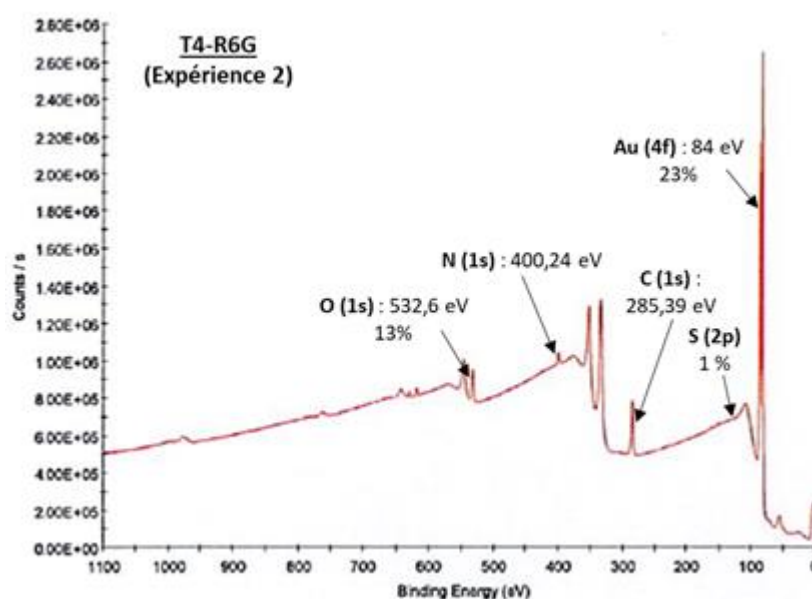


Figure 150 : Spectre XPS de **T4-R6G** (Expérience 2)

La déconvolution des signaux associés au soufre montre plusieurs types de soufre présents (Figure 151). Mais, cette fois-ci, les pics à 168,4 eV et 169,7 eV ne sont pas détectés indiquant qu'il n'y a pas de thiol oxydé. Les deux types d'atomes de soufre observés correspondent aux atomes de soufre impliqués dans les liaisons Au-S (S2pA1 à 161,9 eV et S2pA2 à 163,2 eV) et S-C (S2pB1 à 168 eV et S2pB2 à 169,2 eV). Un pic S2pBis est également détecté lors d'une analyse faite sur une autre zone de l'échantillon qui confirme aussi la présence des thiols liés sur la surface.

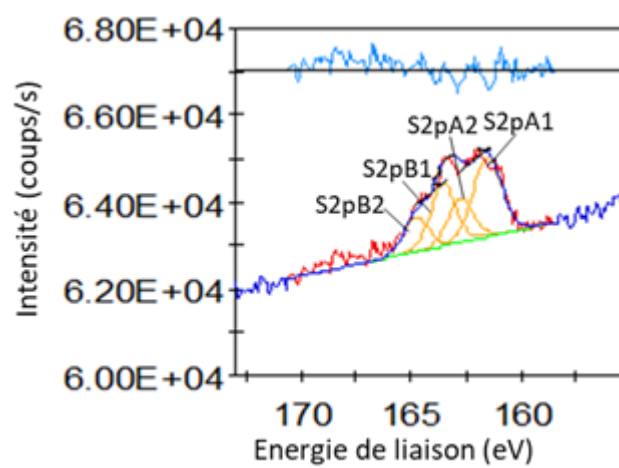


Figure 151 : Spectre XPS de S2p de la molécule **T4-R6G** (Expérience 2) adsorbée à la surface Au (111).

Afin de voir, si une immersion longue en présence de méthanol pouvait conduire à une oxydation du thiol, nous avons préparé nos lames en MeOH en présence de **T4-R6G** durant 24h (Tableau 15). Les dispositifs ainsi obtenus ont ensuite été caractérisés par XPS et comparés aux résultats obtenus précédemment en 4h.

Expérience	Concentration	Temps d'immersion	Solvant
3	2 mM	24h	MeOH

Tableau 15 : Expérience 3 effectuée pour l'optimisation de l'immobilisation de **T4-R6G**

XPS

Comme on peut le voir dans le spectre XPS **T4-R6G** (Expérience 3) (Figure 152), après 24h d'immersion, les pics correspondant aux atomes présentes sur la molécule (Au4f, C1s, O1s, N1s) ne sont pas modifiés.

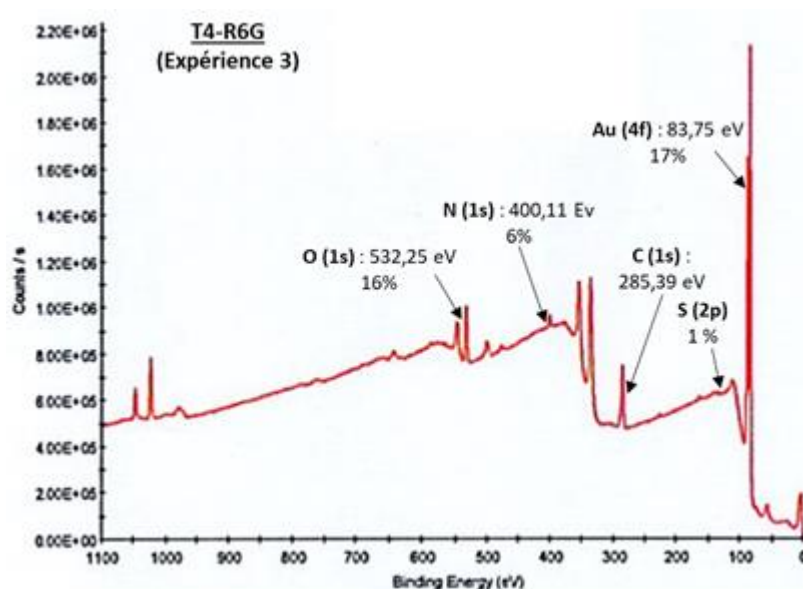


Figure 152 : Spectre XPS de **T4-R6G** (Expérience 3)

De plus, la déconvolution des signaux associés au soufre (Figure 153) montrent qu'on ne retrouve plus les pics observés avec acétonitrile/H₂O correspondant aux thiols oxydés. Le fait que l'on ne détecte que la présence des thiols impliqués dans les liaisons S-Au (S2pA1 à 161,49 eV et S2pA2 à 162,72 eV) et S-C (S2pB1 à 163,53 eV et S2pB2 à 164,79 eV) montre que 24h d'immersion en présence de MeOH pourrait être une solution optimale pour le **T4-R6G**.

Cependant, nous ne pouvons pas trancher si la fonctionnalisation de surface est meilleure à 24h puisque d'autres analyses complémentaires doivent être effectuées.

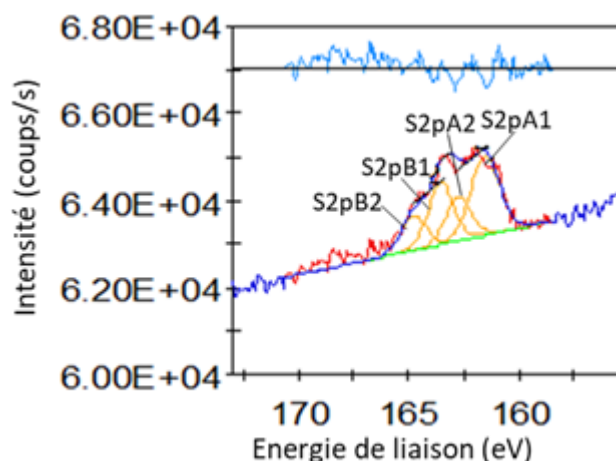


Figure 153 : Spectre XPS de S2p de la molécule **T4-R6G** (Expérience 3) adsorbée à la surface Au(111) (temps d'immersion 24h)

Au cours de cette étude, nous avons donc démontré qu'il était possible d'immobiliser une molécule hétérodifonctionnelle et hétérotrifonctionnelle sur une électrode d'or. L'étude de différentes conditions expérimentales nous a permis de définir les conditions les plus efficaces pour garantir une immobilisation réussie du **T4-R6G** sur une surface d'or. Bien que la liaison Au-S soit relativement forte, elle reste sensible aux conditions analytiques. Comme notre dispositif peut être amené à être utilisé dans des conditions difficiles, nous avons cherché à renforcer l'immobilisation du tripode en surface en utilisant un double ancrage grâce à l'acide thioctique qui porte un pont disulfure et au développement du tripode **T5**.²⁹⁶

B.II Stratégie et protocole de la fonctionnalisation du tripode T5

Comme la synthèse des tripodes est longue, nous allons tout d'abord valider le concept et la procédure d'immobilisation en présence d'un pont disulfure avec le **D5** qui est un réactif hétérobifonctionnel préalablement synthétisé.

B.II.1. Immobilisation du réactif hétérobifonctionnel D5

L'immobilisation du réactif hétérobifonctionnel **D5** (Figure 154) n'a pas nécessité la déprotection de la fonction thiol mais plutôt l'addition d'un agent réducteur qui peut être DTT²⁹⁷ ou TCEP.HCl pour ouvrir le cycle par réduction du pont disulfure.

²⁹⁶ Kolodziej, A.; Fernandez-Trillo, F.; Rodriguez, P. Determining the Parameters Governing the Electrochemical Stability of Thiols and Disulfides Self-Assembled Monolayer on Gold Electrodes in Physiological Medium. *J. Electroanal. Chem.* **2018**, 819, 51–57.

²⁹⁷ Konigsberg, W. [13] Reduction of Disulfide Bonds in Proteins with Dithiothreitol. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, **1972**, 25, 185–188.

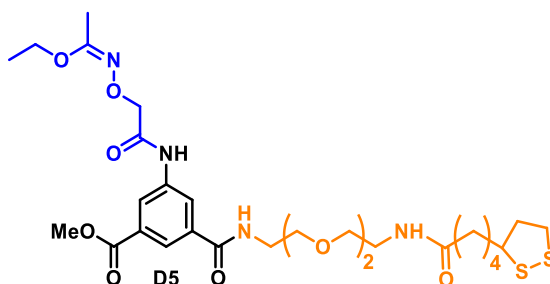


Figure 154 : Structure du réactif hétérobifonctionnel **D5**

Nous avons choisi de travailler avec une solution de **D5** à une concentration de 1,4 mM dans ACN/H₂O (95 :5 v/v) et 4 équivalents de TCEP.HCl. L'immersion de la lame d'or, préalablement lavée avec une solution de piranha, à une durée de 24h et à température ambiante. Après avoir nettoyé toutes les molécules résiduelles non greffées par une solution d'EtOH et ACN, nous avons caractérisé les électrodes modifiées par XPS.

XPS

Le spectre XPS (Figure 155) de **D5** montre que des atomes d'or, azote et oxygène sont conformes à la molécule immobilisée et aux résultats obtenus avec les électrodes décrites précédemment.

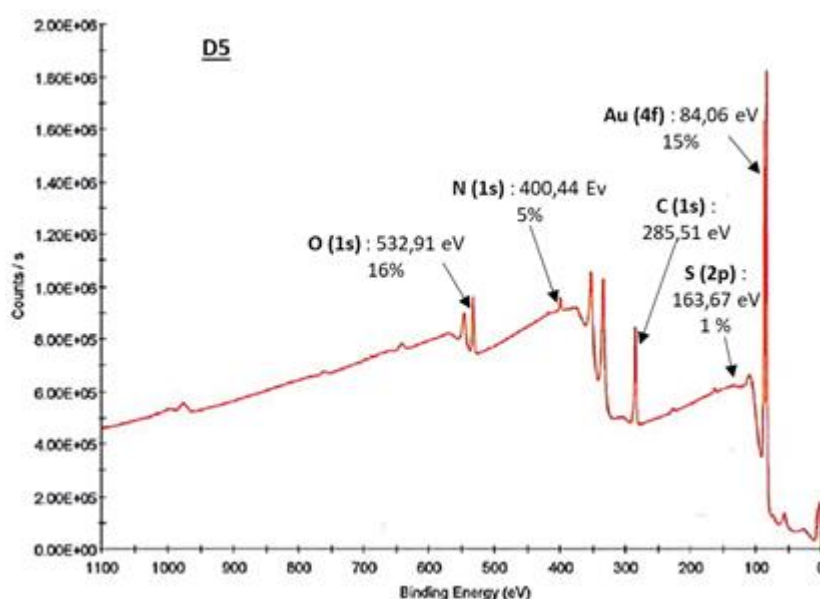


Figure 155 : Spectre XPS de **D5** (C₂₉H₄₄N₄O₉S₂)

Comme l'indique la Figure 156 A, la déconvolution des pics associés aux soufres montre deux populations : un doublet à 162 eV (S2p_{3/2}A1) et 163,32 eV à (S2p_{1/2}A2) correspondant à la liaison Au-S et un doublet à 163,9 eV (S2p_{3/2}B1) et 165,1 eV (S2p_{1/2}B2) correspondant à la liaison S-C. L'absence de pic à 168,4 eV et 169,7 eV nous confirment qu'il n'y a pas de thiol oxydé détecté.

La déconvolution des signaux associés au Carbone C1s (Figure 156 B) montre la présence de 5 types distincts de carbone avec des intensités différentes contre 4 observés avec les électrodes modifiées au **D4-R6G**. Les carbones impliqués dans des CH₂ (à 285,5 eV) sont bien détectés. En revanche, on détecte trois pics à 286,6 eV, 288,5 eV et 289,5 eV correspondant aux carbones liés à des atomes plus électronégatifs comme l'oxygène et l'azote. Enfin, le carbone à 291,3 eV correspondant à une perte d'énergie du plasmon est également détecté mais à une intensité quasiment nulle.

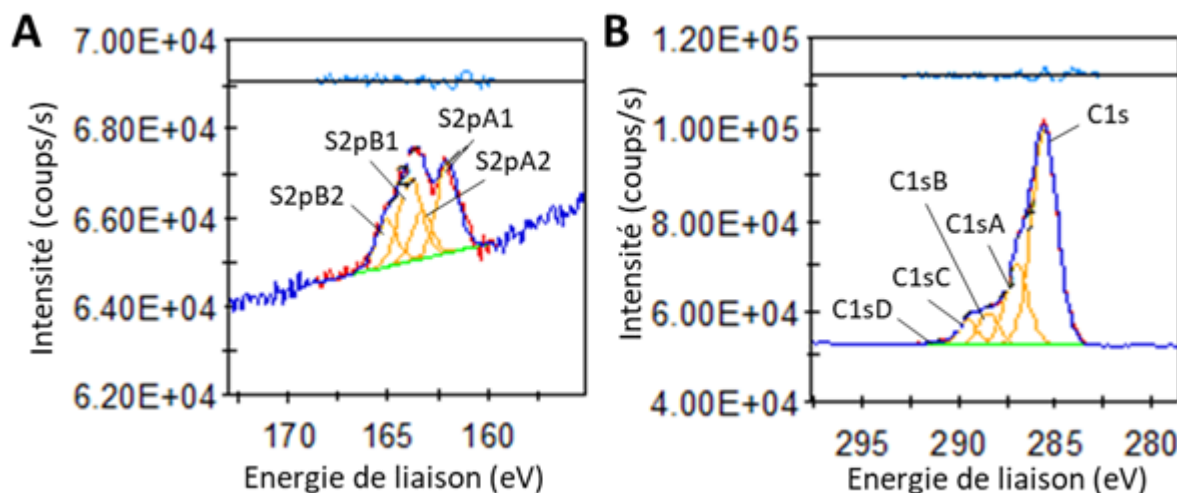


Figure 156 : Spectres XPS de S2p (A) et C1s (B) de la molécule **D5** adsorbée à la surface Au (111).

Les résultats obtenus par XPS sont très intéressants. Elles confirment que la composition chimique en C, N, O et S est bien compatible avec la formule chimique de la molécule greffée **D5**. De plus, ceci montre que la présence d'un pont disulfure dans la molécule **D5** la rend un bon candidat pour améliorer l'accroche sur la surface d'or du fait que nous n'avons pas observé d'oxydation sur la surface contrairement au **D4-R6G**.

B.II.2. Immobilisation du réactif hétérotrifonctionnel **T5**

A partir des résultats obtenus lors de l'immobilisation de **D5**, nous avons procédé à l'immobilisation du tripode **T5** (Figure 157).

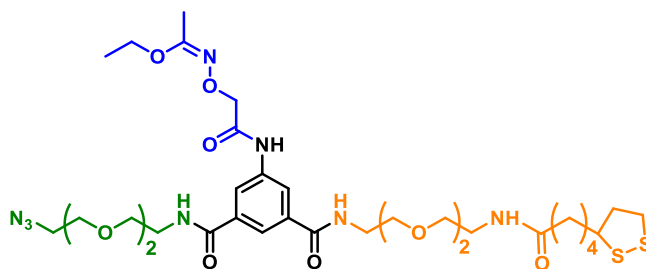


Figure 157 : Structure de **T5**

Une solution a été préparée du tripode **T5** à 2 mM dans un solvant ACN/H₂O (1:1). Par suite, 4 équivalents de TCEP.HCl ont été rajoutés. Le mélange a été agité pendant 15 min avant que la lame d'or ne soit immergée pour une durée de 24h. Nous avons par la suite caractérisé cette électrode modifiée par voltampérométrie cyclique et XPS.

Voltampérométrie cyclique

Les résultats obtenus par voltampérométrie cyclique sont indiqués dans la Figure 158. Le signal ferrocène après modification de surface par **T5** montre bien que l'électrode de travail est passivée. Un décalage des potentiels et une diminution de l'intensité par rapport à la courbe rédox de l'électrode non modifiée sont observées.

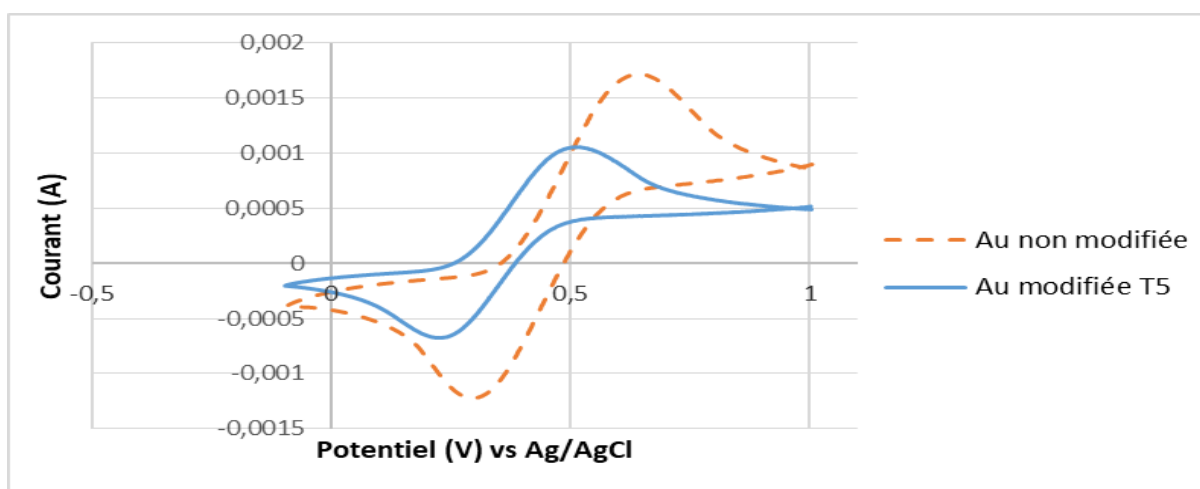


Figure 158 : Voltampérogrammes cycliques de l'analyse de ferrocène en présence d'une électrode d'or avant et après modification par des SAM de **T5**.

A partir de cette courbe nous pouvons déterminer le taux de recouvrement sur la surface d'or. Le Tableau 16 montre un taux de recouvrement à 41 % ce qui montre un bon résultat similaire au recouvrement observé avec le **T4-R6G**.

Molécule	T5
Quantité de molécules adsorbées par unité de surface (mol.cm ⁻²)	7,3 10 ⁻⁸
Taux de recouvrement (%)	41

Tableau 16 : Quantité de molécules **T5** adsorbées et le taux de recouvrement

XPS

Le spectre XPS (Figure 160) montre les pics qui ont été détectés sur l'électrode modifiée par le tripode **T5**. Aucun thiol oxydé n'est détecté, et l'on retrouve les pics correspondant aux C1s, N1s, O1s identifiés lors des analyses des électrodes précédentes. La composition atomique est en adéquation avec la structure du **T5** confirmant que notre molécule est bien immobilisée sur la surface.

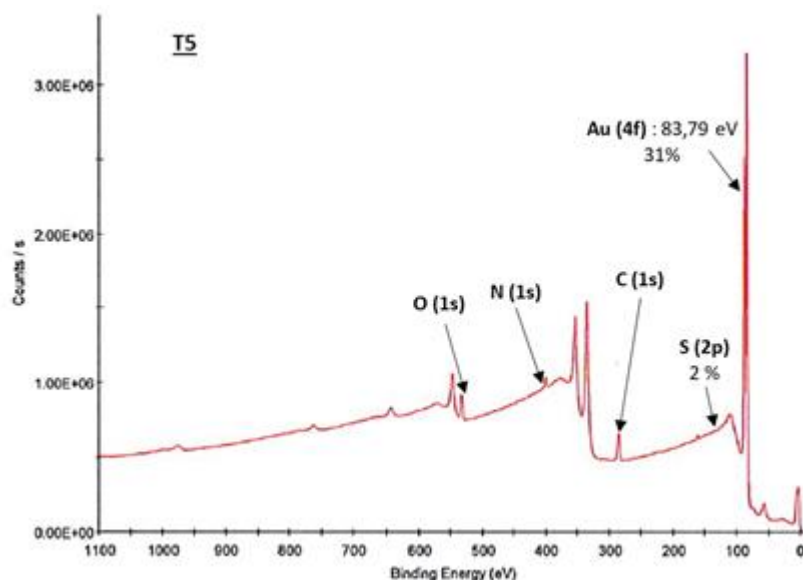


Figure 159 : Spectre XPS de **T5** ($C_{33}H_{53}N_8O_{10}S_2$) adsorbé sur surface d'or

La déconvolution du pic associé au soufre (Figure 160 A) montre un pic de soufre correspondant à la liaison Au-S, observé par la présence d'un doublet S2pA1 à 161,63 eV et S2pA2 à 162,86 eV.

La déconvolution des signaux associés au Carbone C1s (Figure 160 B) montre la présence de 4 types distincts de carbone avec des intensités différentes. Les carbones impliqués dans des CH_2 (à 284,8 eV) sont bien détectés. En revanche, on détecte trois pics à 286,29 eV, 288,08 eV et 290,56 eV correspondant aux carbones liés à des atomes plus électronégatifs comme l'oxygène et l'azote. Comme nous observons aussi la présence de deux pics relatifs pour l'oxygène O1s (Figure 160 C) à 531,48 eV et O1s A à 532,96 eV. Finalement, la déconvolution du signal associé à l'azote (Figure 160 D), nous donne deux pics N1s à 399,98 eV et un autre pic plus faible N1s A à 401,82 eV.

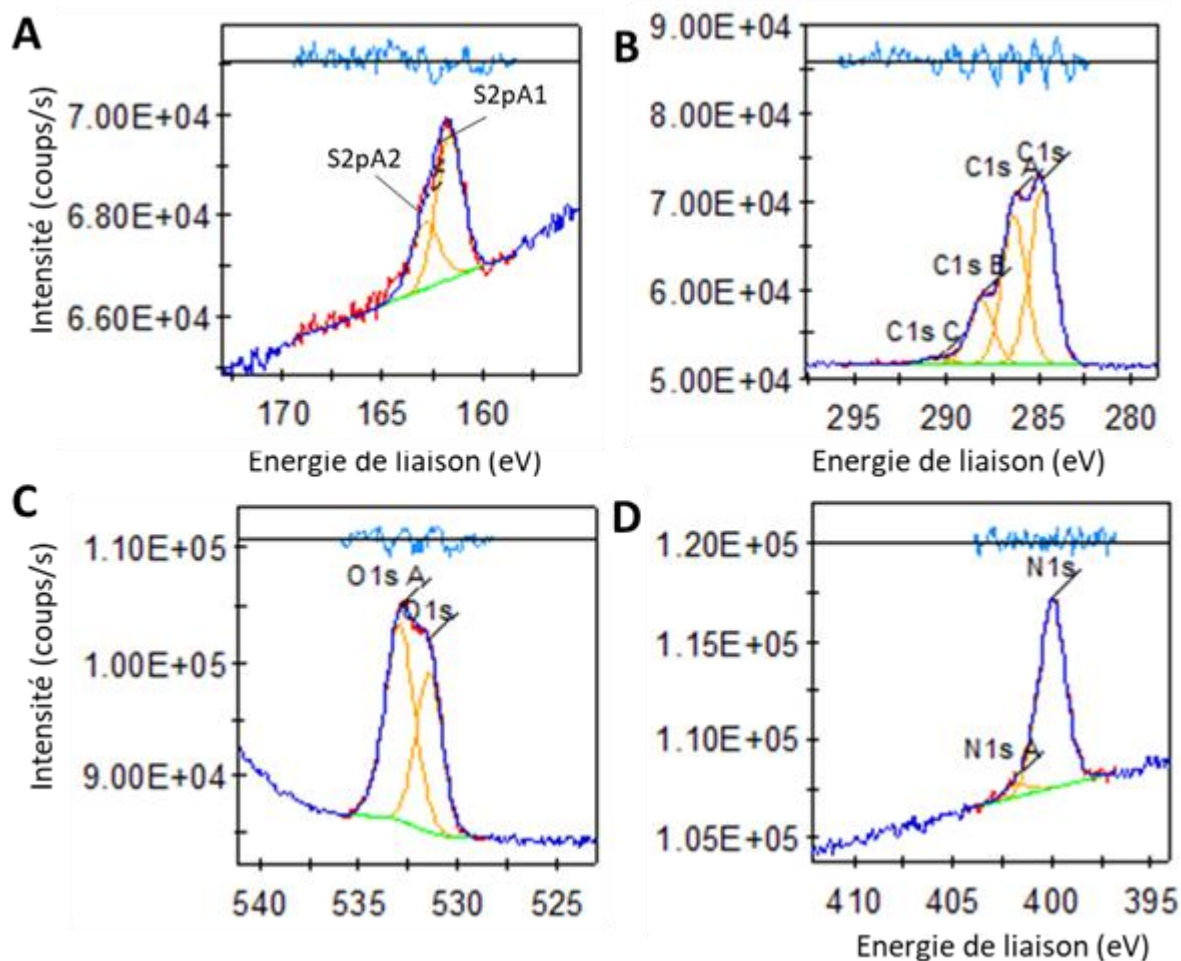


Figure 160 : Spectres XPS de S2p (A), C1s (B), O1s (C) et N1s(D) de la molécule **T5** ($C_{33}H_{53}N_8O_{10}S_2$) adsorbée à la surface Au (111).

C. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit l'étape de la fonctionnalisation du tripode sur la surface d'or afin d'étudier la faisabilité de notre système SPIT-FRI. La méthode choisie de fonctionnalisation permet d'obtenir des monocouches auto-assemblées sur phase solide. Il s'agit de l'immobilisation des réactifs multifonctionnels portant un thiol sur une surface d'or.

Nous avons tout d'abord effectué le greffage d'une molécule commerciale l'acide 11-mercapto-undécanoïque avant d'engager nos molécules synthétisées. Ceci nous a permis d'étudier la durée optimum d'immersion de la lame d'or. Par la suite, nous sommes passés à l'étude de fonctionnalisation de surface par nos réactifs préalablement synthétisés. Aux fins de cette étude, nous avons suivi une stratégie spécifique pour optimiser l'immobilisation du tripode sur la surface d'or.

Pour cela, avant d'engager le tripode **T4-R6G** qui présente une synthèse fastidieuse, nous avons effectué l'immobilisation du 1^{er} dipode modèle **D4-R6G** qui possède une

structure similaire du tripode afin de prendre en compte l'encombrement stérique. Par la suite, l'étape d'immobilisation de **T4-R6G** a été mise au point par optimisation du choix du solvant et la durée du temps d'immersion.

La nature des couches déposées tout au long de ces expériences a été confirmée par différentes méthodes de caractérisation : voltamétrie cyclique, XPS, AFM et microscopie à épi-fluorescence.

Bien que la liaison AU-S soit relativement forte, nous avons observé dans certains cas la présence du thiol oxydé. Pour cette raison et dans le but de renforcer l'accroche, nous avons effectué des tests de greffage par des molécules similaires mais qui portent un pont disulfure cyclique issu de l'acide thioctique. En suivant la même stratégie pour les réactifs précédemment immobilisés, nous avons commencé la procédure par l'immobilisation d'un réactif hétérobifonctionnel modèle **D5**. Les résultats de caractérisation de surface après modification ont bien validé l'immobilisation de **D5** sur surface d'or. Ceci nous a emmené à effectuer la fonctionnalisation de la surface par le tripode **T5**. De ce fait, nous pouvons dire que **T5** est un bon candidat pour notre système SPIT-FRI.

Conclusion générale et perspectives

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires développées par différentes espèces de champignons qui peuvent être présentes dans nos aliments. Ce sont des substances produites naturellement sur les plantes à la filière alimentaire avant et après la récolte. Les contaminations peuvent avoir lieu aux champs, pendant la récolte et aussi en présence de conditions de stockage non contrôlées. Il existe plus de 300 variétés de mycotoxines dont une trentaine est toxique pour l'Homme et l'animal. Elles ont tendance à persister dans l'organisme humain et peuvent causer des maladies chroniques comme la mycotoxicose voire le décès. De ce fait, des doses tolérables pour chaque mycotoxine ont été fixées par l'OMS et EFSA.

Pour se faire, différentes techniques de détection de ces mycotoxines ont été développées : des méthodes analytiques (Chromatographie sur Couche Mince (CCM), Chromatographie Gazeuse (CPG), chromatographie liquide à haute performance (HPLC), ...), et des méthodes immunochimiques (radio-immunologie (RIA), test ELISA et immunochromatographie). Malgré la diversité de ces méthodes, plusieurs problématiques restent non résolues. Effectivement, le coût élevé de mise en œuvre, le temps exigé, la nécessité d'avoir des équipements spécifiques ainsi que des manipulateurs expérimentés créent des obstacles applicatifs à l'échelle industrielle.

En addition à ces méthodes, la synthèse de biocapteurs est en plein essor. Nous avons vu que ces outils étaient plus avantageux et plus efficaces que les méthodes conventionnelles. Ce sont des systèmes analytiques compacts, simples d'utilisation, miniaturisés, autorisant des analyses fiables avec une option de portabilité afin de réduire au maximum les matériels à déplacer sur terrain. Ces biocapteurs peuvent se reposer sur différentes méthodes de détection, nous nous sommes d'ailleurs principalement intéressés, au cours de ce manuscrit, à la détection par fluorescence tout en employant des aptamères ou des anticorps.

Afin de mieux satisfaire les besoins du marché agroalimentaire, ce projet de thèse a eu pour but de développer une nouvelle méthode de détection des mycotoxines. Il s'est orienté vers la mise en place d'un système immunolanalytique microfluidique (en flux) basé sur la méthode SPIT-FRI pour « Solid-Phase Immobilized Tripod for Fluorescent Renewable Immunoassay ». En d'autres termes, il s'agit d'une détection fluorogénique de type « OFF-ON » reposant sur le phénomène de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). L'outil se compose d'un réactif hétérotrifonctionnel (tripode), localisé sur une surface, sur lequel sont greffés un fluorophore et un analogue de mycotoxine. Ici, notre choix s'est porté sur deux types de mycotoxines : les aflatoxines (**AFB1** et **AFB2**) et la patuline (**PAT**).

Cette technologie présente un formidable espoir pour pallier tous les inconvénients des techniques précédemment citées. Le principe paraît simple mais nécessite l'élaboration de plusieurs parties indépendantes à développer qui nous laisse se heurter à différents obstacles.

Dans une première partie, nous avons concentré nos efforts dans l'optimisation de la synthèse du « linker » principal, le tripode, selon une stratégie d'assemblage de blocs sur un cœur benzénique (Figure 161). Ce linker porte trois fonctions distinctes et orthogonales entre elles qui se différencient par la fonction qui permet la fonctionnalisation de surface

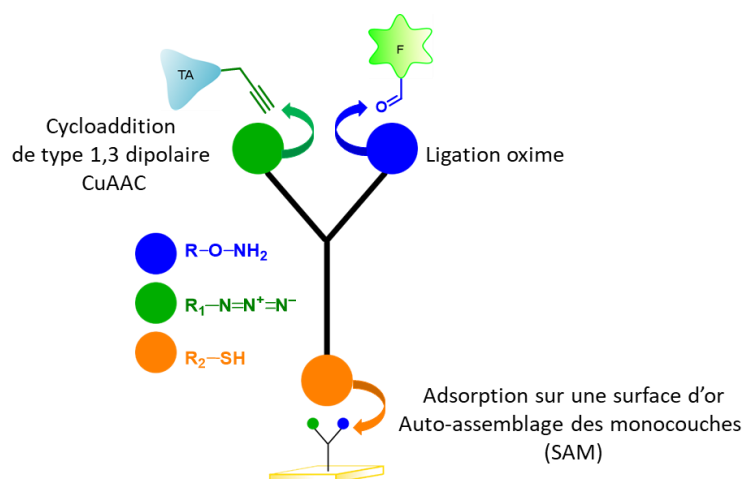


Figure 161 : Schéma de la structure envisagée du tripode portant les trois fonctions cibles

Comme l'indique la Figure 162, le 1^{er} réactif hétérotrifonctionnel **T4-P** comprend une fonction oxyamine a permis le greffage d'un fluorophore organique par une ligature oxime, une fonction azoture qui permettra le greffage d'un analogue de toxine par chimie-click et une troisième fonction permettant l'immobilisation de ce tripode sur une surface d'or. Nous avons choisi une fonction thiol protégée par un groupement trityle. Pour mieux renforcer l'immobilisation du tripode sur la surface d'or, nous avons opté pour la synthèse d'un 2^{ème} tripode **T5-P** portant deux points d'ancrage générés à partir d'un pont disulfure cyclique

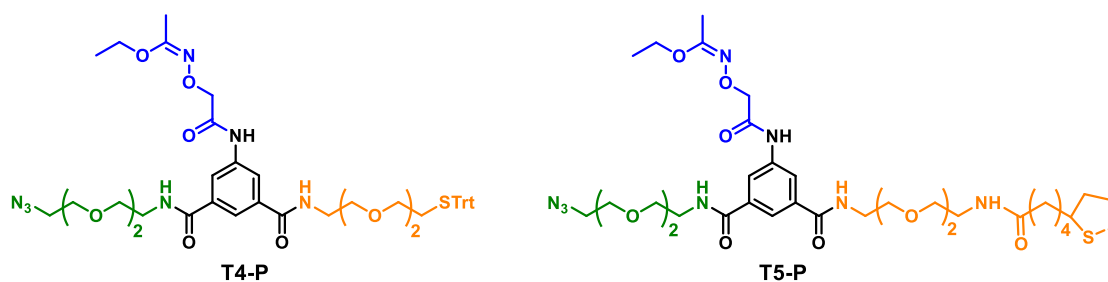


Figure 162 : Structure du 1^{er} tripode **T4-P** et du 2^{ème} tripode **T5-P**

La synthèse des réactifs décrits nécessite un temps considérable pour obtenir des composés finaux à l'échelle du milligrammes. Nous avons donc décidé de synthétiser des composés modèles hétérobifonctionnels **D4-P** et **D5-P** relatifs aux tripodes **T4-P** et **T5-P** respectivement.

Dans le 2^{ème} chapitre, nous avons décrit le choix d'un couple donneur et accepteur d'énergie répondant aux conditions du phénomène de FRET puisque le transfert d'énergie est un paramètre majeur pour l'efficacité de notre dispositif par le calcul du pourcentage de quenching. En effet, nous avons choisi la Rhodamine 6G portant une fonction aldéhyde (**R6G-AL**) comme donneur d'énergie et le quencher **BHQ-10** comme accepteur d'énergie assurant d'un recouvrement spectral entre eux.

Nous avons aussi décrit la synthèse des analogues de mycotoxines AFB2 et PAT portant une fonction alcyne permettant en 2^{ème} lieu leur greffage sur le tripode.

A une seconde étape, l'ensemble de ces outils a permis la dérivatisation du tripode après la déprotection des fonctions oxyamine et thiol (Figure 163). L'optimisation des conditions de déprotection du tripode **T4-P** a été effectuée uniquement, à ce jour, sur le composé modèle **D4-P**. Nous avons donc obtenu un réactif hétérobifonctionnel fluorescent, **D4-R6G-AL** et un tripode fluorescent, **T4-R6G-AL**. Par manque de temps, la dérivatisation du tripode par l'analogue de mycotoxine **AFB2** n'a pas été décrite dans ce manuscrit.

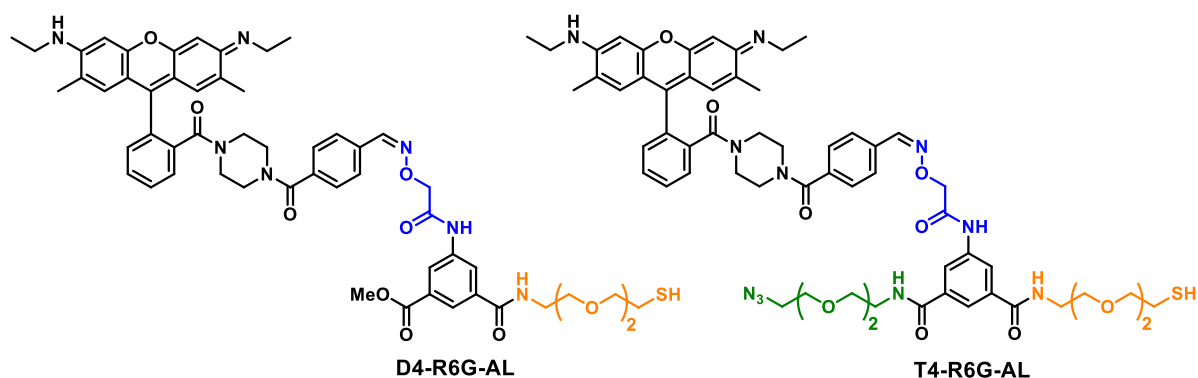


Figure 163 : Dérivatisation des réactifs par le fluorophore R6G-AL

En parallèle de ces synthèses, nous avons abordé dans le 2^{ème} chapitre la production des anticorps anti-AFB1 et anti-PAT qui serviront à l'étape d'activation du système SPIT-FRI. Nous avons effectué une étude sur le marquage des anticorps anti-AFB1 par le quencher **BHQ-10** adaptable au fluorophore choisi. Cette étude n'a malheureusement pas abouti à un marquage réussi, elle nécessite une amélioration et une étude plus approfondie.

Finalement, dans le 3^{ème} chapitre, nous avons procédé à la fonctionnalisation d'une surface d'or par tous les réactifs multifonctionnels préalablement synthétisés. La stratégie

de fonctionnalisation comprenait tout d'abord l'étude de l'immobilisation des composés hétérobifonctionnels modèles **D4-R6AL** et **D5-P** sur la surface d'or choisie puis l'immobilisation des tripodes **T4-R6G-AL** et **T5-P**. Leurs caractérisations par différentes techniques (XPS, Voltamétrie cyclique, AFM et microscopie à épi-fluorescence) nous ont bien montré après plusieurs essais une fonctionnalisation prometteuse de tous ces réactifs.

Perspectives

Plusieurs perspectives sont envisageables à ces travaux. A partir du réactif **T4-R6G-AL** nous pouvons greffer l'analogue de mycotoxine **AFB2-alcyne** afin d'avoir une dérivatisation complète du tripode. Il est important de noter que cette étape peut s'effectuer en solution comme en surface, mais pour mieux caractériser le produit obtenu, il est préférable de l'effectuer en solution. Une optimisation de ce greffage est nécessaire puisque la présence du thiol libre peut engendrer une réaction secondaire conduisant à une thiolyne.

L'étape de greffage de l'analogue de **AFB2** va nous emmener à l'étape clé de la validation du système SPIT-FRI par des tests d'affinité entre anticorps-analogue de toxine et anticorps-mycotoxine en solution alimentaire. Idéalement, nous souhaitons que l'anticorps présente une bonne affinité pour le tripode et une meilleure pour l'analyte. Ceci va permettre de déplacer l'anticorps de la phase solide en présence de l'analyte cible en solution.

Des tests microbiologiques avec des solutions alimentaires contenant les mycotoxines à détecter sont aussi envisageables. Comme seconde étape, après avoir vérifié les différents paramètres du système SPIT-FRI, une future orientation du dispositif est son intégration dans un système microfluidique par transposition à un dosage en flux. Ceci permettrait des analyses directes dans les milieux complexes.

La synthèse fastidieuse du tripode nous laisse réfléchir quant aux modifications structurales de certaines fonctions et principalement la fonction oxyamine qui est particulièrement instable et une sensible. Il sera donc forcément possible de changer cette fonction par une autre fonction orthogonale avec le reste des fonctions : des cycloalcynes (cyclooctynes) qui permettraient une dérivatisation via une réaction de type SPAAC. Il est également possible d'utiliser des réactifs de ligation iEDDA comme des nitrones, des ylures d'azométhines générés par des imines, des iminiums ou des azirdines. Ce qui donnerait trois fonctions orthogonales entre elles avec une étape de déprotection en moins.

Partie expérimentale

Chemicals and reagents

Flash-column chromatography purifications were performed either on Geduran® Si 60 silica gel (40-63 or 63-200 or μm) from Merck Millipore. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminium sheets. The spots were visualized by illumination with a UV lamp ($\lambda = 254/365$ nm) and/or staining with KMnO_4 or bromocresol green solutions. Unless otherwise noted, all chemicals were used as received from commercial sources without further purification. Anhydrous DMF were purchased from Sigma Aldrich and stored over 4Å molecular sieves. CH_3CN , toluene, CH_2Cl_2 and Et_2O are dried over alumina cartridges using a solvent purification system MBRAUN MB SPS-800®. THF was distilled over Na/benzophenone. Filtrations were performed on Celite SDS 545 from Acros Organic. HPLC gradient-grade acetonitrile (CH_3CN) was obtained from VWR. Mobile layers for RP-HPLC were prepared with ultrapure water (18.2 M Ω .cm) provided by a PURELAB® flex 1 (Elga Veolia).

Compound **A**,²⁹⁸ **B**,^{299,300} **C**,³⁰¹ **D**,³⁰² **25**,³⁰³ and **SR101-CO₂H**,³⁰⁴ were prepared according to syntheses reported in the literature.

Instruments

^1H , ^{13}C NMR spectra were recorded with a Bruker DPX 300 (COBRA, UMR CNRS 6014). Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) using the residual solvent peak for calibration. Coupling constants (J) values are expressed in Hz. The following abbreviations were used in the spectral description: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), dd (doublet of doublet), ddd (doublet of doublet of doublet), dt (doublet of triplet), br (broad singlet), m (multiplet).

²⁹⁸ Foillard, S.; Rasmussen, M. O.; Razkin, J.; Boturny, D.; Dumy, P. 1-Ethoxyethylidene, a New Group for the Stepwise SPPS of Aminoxyacetic Acid Containing Peptides. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (3), 983–991.

²⁹⁹ Klein, E.; DeBonis, S.; Thiede, B.; Skoufias, D. A.; Kozielski, F.; Lebeau, L. New Chemical Tools for Investigating Human Mitotic Kinesin Eg5. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (19), 6474–6488.

³⁰⁰ Ma, L.; Tu, C.; Le, P.; Chitoor, S.; Lim, S. J.; Zahid, M. U.; Teng, K. W.; Ge, P.; Selvin, P. R.; Smith, A. M. Multidentate Polymer Coatings for Compact and Homogeneous Quantum Dots with Efficient Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138* (10), 3382–3394.

³⁰¹ Viault, G.; Dautrey, S.; Maindron, N.; Hardouin, J.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. The First “Ready-to-Use” Benzene-Based Heterotrifunctional Cross-Linker for Multiple Bioconjugation. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (16), 2693–2705.

³⁰² Susumu, K.; Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Pons, T.; Delehanty, J. B.; Mattoussi, H. Enhancing the Stability and Biological Functionalities of Quantum Dots via Compact Multifunctional Ligands. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (45), 13987–13996.

³⁰³ Herbst, E.; Shabat, D. FRET-Based Cyanine Probes for Monitoring Ligation Reactions and Their Applications to Mechanistic Studies and Catalyst Screening. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14* (15), 3715–3728.

³⁰⁴ Chevalier, A.; Renard, P.-Y.; Romieu, A. Azo-Sulforhodamine Dyes: A Novel Class of Broad Spectrum Dark Quenchers. *Org. Lett.* **2014**, *16* (15), 3946–3949.

Analytical RP-HPLC was performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument or Thermo Scientific Ultimate 3000 UHPLC system equipped with PDA and γ detector. Automated flash purifications on RP-C18 cartridges were performed with an Interchim puriFlash®4250 system.

HRMS were recorded either on a Thermo LTQ Orbitrap XL apparatus equipped with an ESI source or on a LCT Premier XE bench top orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer (Waters Micromass) equipped with an electrospray source and in the positive and negative modes (ESI+/-). ESI low resolution mass spectra were obtained either with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus.

UV-visible absorption spectra were obtained on a Varian Cary 60 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, light path 10 × 10 mm, chamber volume: 3.5 mL).

Fluorescence spectroscopic studies (emission/excitation spectra) were performed with Fluorolog Horiba with a semi micro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, light path: 10 x 4 mm, chamber volume: 1400 μ L, Chamber volume 3.5 mL for all other studies) for quantum yield determination.

The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:

$$\Phi_F(x) = (A_s/A_x) (F_x/F_s) (n_x/n_s)^2 \Phi_F(s)$$

where A is the absorbance (in the range of 0.01-0.1), F is the area under the emission curve, n is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts s and x represent standard and unknown, respectively. The following refractive index values were used: 1.479 for DMSO, and 1.337 for PBS.

Methods

RP-UHPLC systems

Several chromatographic systems were used for the analytical experiments and purification steps (by semi-preparative HPLC or automated flash purification system):

System A : RP-UHPLC (Hypersil Gold column, 1.9 μ m, 50 x 2.1 mm) with ACN (%C) and aqueous formic acid (FA 0,1%) as eluents. [5% ACN (5 min), followed by linear gradient from 5% to 55% (10 min), then 55% ACN (1min) and followed by 5% ACN (6.5 min)] at a flow rate of 0.6 mL/min.

Partie expérimentale

No	Time	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	Run				
2	0,000	0,600	0,0	5,0	0,0	5
3	10,000	0,600	0,0	55,0	0,0	5
4	11,000	0,600	0,0	55,0	0,0	5
5	11,500	0,600	0,0	5,0	0,0	5
6	18,000	0,600	0,0	5,0	0,0	5
7	New Row					
8	18,000	Stop Run				

System B : RP-UHPLC (Hypersil Gold column, 1.9 μm , 50 x 2.1 nm) with ACN and aqueous formic acid (FA 0,1%) as eluents. [5% ACN (1 min), followed by linear gradient from 5% to 100 % (5,5 min), then 100% ACN (60 s) and followed by 5% ACN (2 min)] at a flow rate of 0.6 mL/min.

No	Time	Flow [ml/min]	%B	%C	%D	Curve
1	0,000	Run				
2	0,000	0,600	0,0	5,0	0,0	5
3	0,100	0,600	0,0	5,0	0,0	5
4	5,500	0,600	0,0	100,0	0,0	5
5	6,000	0,600	0,0	100,0	0,0	5
6	6,100	0,600	0,0	5,0	0,0	5
7	8,000	0,600	0,0	5,0	0,0	5
8	New Row					
9	8,000	Stop Run				

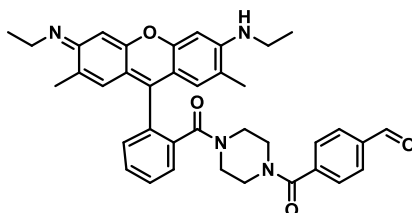
RP-HPLC

System C : RP-HPLC (Hypersil Gold column, 5 μm , 260 x 21.2 mm) with ACN and mQ water as eluents. [65% ACN (10 min), followed by linear gradient from 65% to 37 % (28 min), then 100% ACN (1 min) and followed by 65% ACN (13 min)] at a flow rate of 20 mL/min.

System D : RP-HPLC (Varian Kromasil C18 column, 10 μm , 250 x 21.2 mm) with ACN and mQ water as eluents. [95% ACN (5 min), followed by linear gradient from 95% to 40 % (21 min), and followed by 95% ACN (13 min)] at a flow rate of 18 mL/min.

System E : RP-HPLC (C18 column) with ACN and mQ water as eluents. [95% ACN (5 min), followed by linear gradient from 95% to 40 % (21 min), and followed by 95% ACN (13 min)] at a flow rate of 18 mL/min.

(Z)-4-(4-(2-(6-(ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl)benzoyl)pipe-
razine-1-carbonyl)benzaldehyde (R6G-AL)



To a solution of Rhodamine 6G derivative **29** (150 mg, 0.251 mmol, 1 equiv) in dry DMF (14 mL) was added a solution of 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-formylbenzoate **25** (95 mg, 0.377 mmol, 1.6 eq) dissolved in dry DMF (2 mL). Then, DIPEA (0.3 mL, 1.51 mmol, 6 equiv) was added dropwise through a syringe at 0°C. The resulting solution was stirred at rt under Argon atmosphere. After the reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1, v/v), the mixture was diluted with 20 mL of CH₂Cl₂, washed with H₂O (3 x 10 mL) and LiCl 5% (2 x 10 mL) and dried over anhydrous MgSO₄. Then, solvents were removed under vacuum and the crude mixture was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂-MeOH, 9:1, v/v) to give the **R6G-AL** as a pink/red solid (93 mg, 57%).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 1.38 (t, $^3J_{H-H} = 7.2$ Hz, 6H), 2.17 (s, 6H), 3.4 (m, 8H), 3.55 (q, $^3J_{H-H} = 7.2$ Hz, 4H), 6.94 (s, 2H), 7.03 (s, 2H), 7.49-7.55 (m, 3H), 7.68-7.80 (m, 3H), 7.98 (d, 2H, $^3J_{H-H} = 7.9$ Hz), 10.03 (s, 1H). "NH signal is not observed".

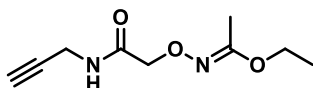
¹³C NMR {¹H} (75 MHz, CD₃OD): 14.1, 1617.5, 39.5 (4C), 94.9 (2C), 114.9 (2C), 126.8, 127.6 (2C), 128.8 (2C), 129, 130.8 (2C), 130.9 (2C), 131.3 (2C), 131.7 (2C), 132.5 (2C), 136.4, 138.9, 156.1 (2C), 157.9, 158.9, 169.8, 193.3.

HRMS (ESI+) in ACN, calculated for C₃₈H₃₉N₄O₄⁺ [M+H]⁺ = 615.74; found m/z 615.29.

UV/Vis (solvent, 25°C): $\lambda_{\text{abs Max}} = 512$ nm

Fluorescence (solvent, 25°C): $\lambda_{\text{em Max}} = 533$ nm; $\Phi_F = 97\%$

ethyl (E)-N-(2-oxo-2-(prop-2-yn-1-ylamino)ethoxy)acetimidate **31**



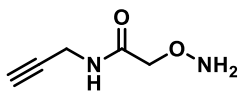
To a solution of intermediate **A** (822 mg, 3.2 mmol, 1.2 equiv) in dry CH₂Cl₂ (6 mL) was added propargylamine (170 µL, 2.65 mmol, 1 equiv). Then, DIPEA (1.4 mL, 8 mmol, 3 equiv.) was added dropwise. The reaction mixture was stirred under argon at rt overnight and it was concentrated and diluted with EtOAc (10 mL). The resulting organic phase was washed with 10% aq. citric acid (4 x 10mL), dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated in vacuo to afford compound **31** as white solid (500mg, yield 95%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 6.53 (s, 1H), 4.37 (s, 2H), 4.11 (dd, *J* = 5.5, 2.6 Hz, 2H), 3.99 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 2.23 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), 1.99 (s, 3H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR {¹H} (75 MHz, CDCl₃) δ 170.2, 72.8, 71.5, 62.8, 28.6, 14.3, 13.9.

HRMS (ESI+) calculated for C₉H₁₅N₂O₃⁺ [M+H]⁺ 199.0180; found 199.1080.

2-(aminooxy)-N-(prop-2-yn-1-yl)acetamide **32**

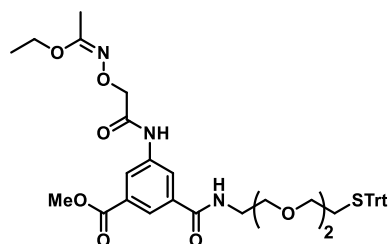


To a solution of **DG2-23** (70 mg, 1 equiv.) in CH₂Cl₂. Then, TFA (0.27 mL, 10 equiv.) was added. The reaction mixture was stirred at rt for 2h. The reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1, v/v). When the reaction has gone to completion, CH₂Cl₂ and 1M aq. HCl were added. The phases were separated and the aqueous mixture was washed with CH₂Cl₂ (3 x 5 mL). The water phase was brought to pH 14 with 2 M NaOH solution. To give after lyophilization and dilution in Et₂O the product as a colourless oil (yield 15 %).

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 4.15 (s, 1H), 4.07 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 2.62 (t, *J* = 2.6 Hz, 1H), "NH signals are not observed".

¹³C NMR {¹H} (75 MHz, MeOD) δ 171.33, 79.06, 73.97, 70.67, 27.54.

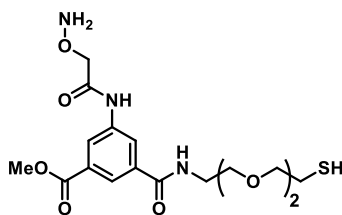
methyl(Z)-3-(2-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)acetamido)-5-((2-(2-(2-(tritylthio)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)benzoate **D4-P**



To a stirred solution of **16** (0.2 g, 0.6 mmol, 1 equiv.) in 10 mL dry CH₃CN under argon were added reagent **C** (0.241 g, 0.6 mmol, 1 equiv.) in 5 mL of dry CH₃CN dry, BOP reagent (0.261 g, 0.6 mmol, 1 equiv) and DIPEA (0.3 mL, 1.77 mmol, 3 equiv) dropwise. The resulting yellow transparent reaction mixture was stirred at rt for 4h. The reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9 : 1, v/v). Then, it was concentrated and diluted with EtOAc (25 mL). The organic layers were washed with 10% aq. Citric acid (3x 10 mL), sat. NaHCO₃ (3x 10 mL), brine (20 mL), dried (over anhydrous MgSO₄) and concentrated on vacuum. NaHCO₃ (3x 10 mL), brine (20 mL), dried (over anhydrous MgSO₄) and concentrated on vacuum. The crude mixture was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH 98: 2, v/v) to give the **D4-P** as a yellow oil (yield 65 %).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.42 (t, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.16 (t, 1H), 8.12 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.40 - 7.34 (m, 5H), 7.27 - 7.14 (m, 10H), 4.46 (s, 2H), 3.99 (q, *J* = 7.1 Hz, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.72 (s, 2H), 3.66 - 3.61 (m, 4H), 3.59 - 3.56 (m, 2H), 3.47 - 4.44 (m, 2H), 3.30 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.40 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

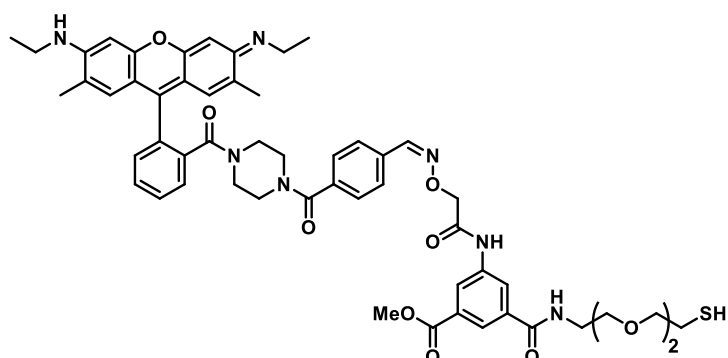
methyl3-(2-(aminooxy)acetamido)-5-((2-(2-(2-mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamo-
yl) benzoate **D4**



The full protected heterobifunctional reagent **D4-P** (0.04g, 0.055 mmol) was dissolved in 3 mL CH₂Cl₂. Then, TFA (42 μL, 10 equiv.) and Et₃SiH (TES) (53 μL, 6 equiv.) were added and the resulting mixture was stirred at rt for 2h. After the reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9:1, v/v), 7 mL of water were added. Thereafter, the aqueous layer was washed with CH₂Cl₂ and lyophilized to give **D4**. **D4** was used without further purification.

HRMS (ESI+) calculated for for $C_{17}H_{25}N_3O_7^+$ $[M+H]^+$ 416.1488; found 416.1491.

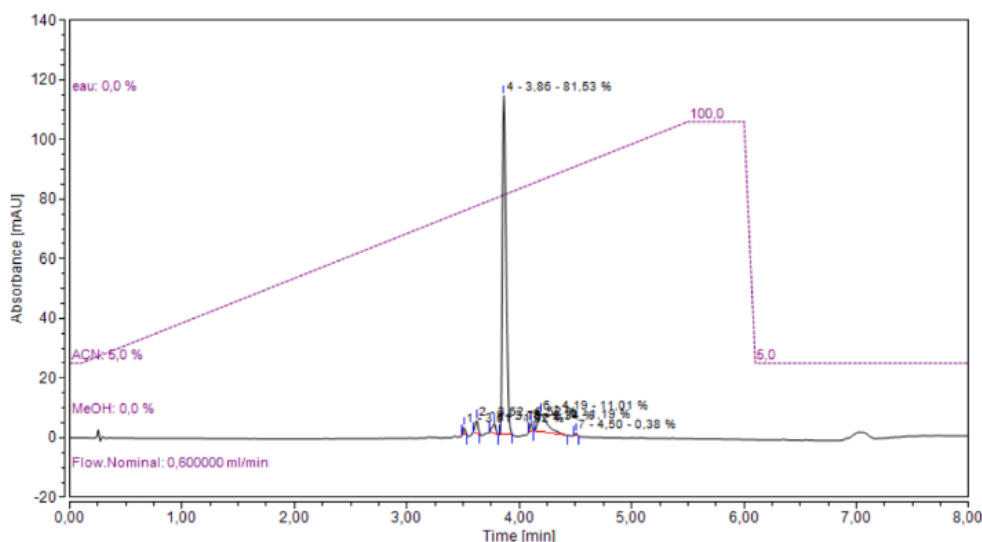
methyl 3-(2-((((Z)-4-(4-(2-((Z)-6-(ethylamino)-3-(ethylimino)-2,7-dimethyl-3H-xanthen-9-yl)benzoyl)piperazine-1-carbonyl)benzylidene)amino)oxy)acetamido)-5-((2-(2-(2mercaptoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)benzoate **D4-R6G**



Dipode **D4** (11 mg, 0.02 mmol, 1.4 equiv) was dissolved in 0.1 M aq. NaOAc buffer (pH 4.1, 3 mL). Fluorophore **R6G-AL** (0.015 mmol, 1 equiv) was added and the resulting mixture was stirred at rt for 2h. The reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 8.5 : 1.5, v/v) and RP-HPLC (system B). When the reaction has gone to completion, the crude mixture was lyophilized and dissolved in H₂O and CH₃CN. Thereafter, the product was purified by semi-preparative RP-HPLC (system C) and lyophilized to give **DG4-R6G** as a pink powder (7 mg, 50%).

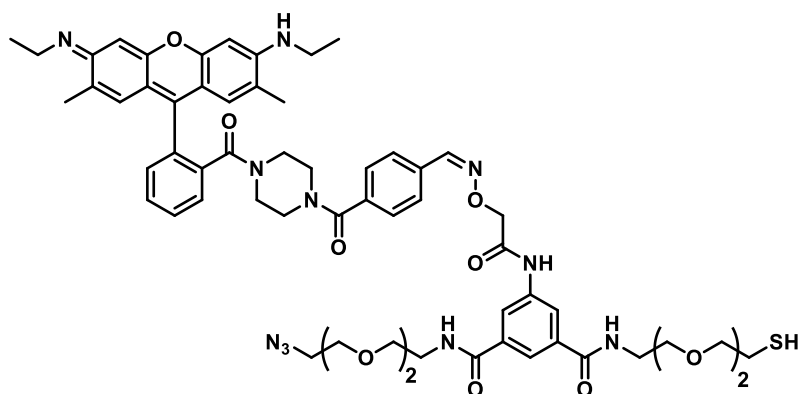
HRMS (ESI⁺) calculated for C₅₅H₆₂N₇O₁₀S⁺ [M+H]⁺ 1012.4277; found 1012.4279.

RP-HPLC (System B): tr= 3.86, Purity 82%.



UV/Vis (solvent, 25°C): λ_{abs} Max = 512 nm

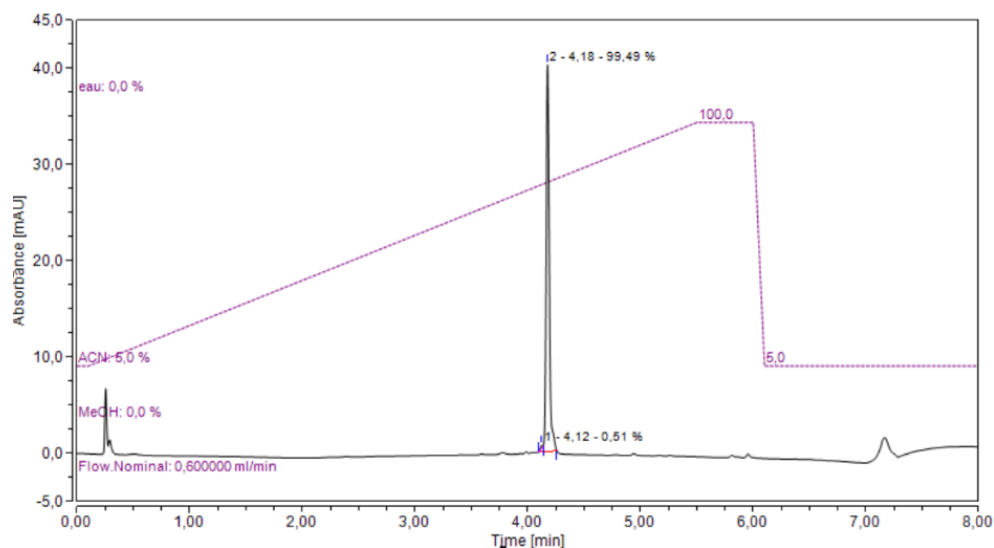
Fluorescence (solvent, 25°C): λ_{em} Max = 533 nm; Φ_F = 96%

T4-R6G

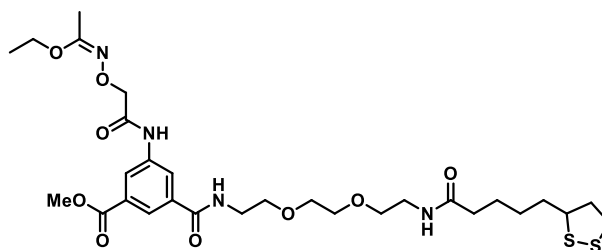
Benzenic tripod **T4** (0.01 mg, 0.018 mmol, 1.25 equiv) was dissolved in 3 mL of 0.1 M aq. NaOAc buffer (pH 4.1). Fluorophore **R6G-AL** (0.009 mmol, 1 equiv) was added and the resulting mixture was stirred at rt for 2h. The reaction was checked for completion by TLC ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 9: 1, v/v) and RP-HPLC (system B). When the reaction has gone to completion, the crude mixture was lyophilized and dissolved in H_2O and CH_3CN . Thereafter, the product was purified by semi-preperative RP-HPLC (system C) and lyophilized to give **T4-R6G** as a pink powder (7.6 mg, 48%).

HRMS (ESI-) calculated for $\text{C}_{61}\text{H}_{73}\text{N}_{11}\text{O}_{11}\text{S}^-$ $[\text{M}]^-$ 1154.5127; found 1154.5133.

RP-HPLC (System B): t_r = 4.18, Purity > 99%.



methyl(Z)-3-((2-(2-(2-(5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)-5-(2-(((1-ethoxyethylidene)amino)oxy)acetamido)benzoate **D5**



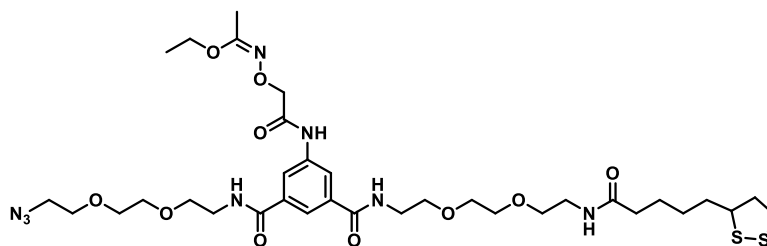
To a stirred solution of **16** (159 mg, 0,74 mmol, 1 equiv) in 20 mL dry DMF were added reagent **D** (158 mg, 0,74 mmol, 1 equiv.), BOP reagent (207 mg, 0,74 mmol, 1 equiv) and DIPEA (0,25 mL, 1,41 mmol, 3 equiv) dropwise. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 4h. After the reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9 :1, v/v). It was concentrated and diluted with CH₂Cl₂ (20 mL). The organic layers were washed with 10% aq. citric acid (3x 10 mL), sat. aq. NaHCO₃ (3x 10 mL), brine (20 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated under vacuum. The crude mixture was purified by flash-column chromatography (silica gel, EtOAc/EtOH 92: 8, v/v) to give the **D5-P** as yellow oil (139 mg, yield 45%).

¹H NMR (300 MHz, MeOD) δ 8.44 (dd, J = 2.1, 1.5 Hz, 1H), 8.3 (t, 1H), 8.22 (t, J = 1.6 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.99 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.71 – 3.51 (m, 12H), 3.35 (t, 1H), 3.19-3.01 (m, 1H), 2.48-2.48 (m, 1H), 2.17 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.05 (s, 3H), 1.91-1.8 (dt, 2H), 1.66-1.53 (m, 4H), 1.45 – 1.34 (m, 2H), 1.27 (t, J = 7.1 Hz, 6H).

¹³C NMR {¹H} (75 MHz, MeOD) δ 176, 171.6, 168.9, 167.4, 165.5, 139.9, 137, 132.45, 125, 124.8, 124.7, 73.9, 71.3, 70.6, 70.5, 63.6, 57.5, 52.9, 41.2, 41, 40.3, 39.3, 36.8, 35.7, 29.8, 26.69, 20.8, 14.63, 13.98.

HRMS (ESI+) calculated for C₂₉H₄₅N₄O₉S₂⁺ [M+H]⁺ 657.2608; found 657.2628.

ethyl(Z)-N-(2-((3-((2-(2-(2-(5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamido)ethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)-5-((2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethyl)carbamoyl)phenyl)amino)-2-oxoethoxy) acé-
timidate D5

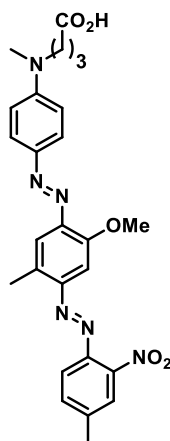


To a stirred solution of reagent **D** (214 mg, 0.46 mmol, 1 equiv) in dry DMF (10 mL) were added benzoic acid **18** (156 mg, 0.46 mmol, 1 equiv) diluted in dry DMF (5 mL), BOP reagent (205 mg, 0.46 mmol, 1 equiv) diluted in dry DMF (2 mL) and DIPEA (0,24 mL, 1.33 mmol, 3 equiv). The resulting reaction mixture was stirred at rt for 5 h. The reaction was checked for completion by TLC (CH₂Cl₂/MeOH 9 :1, v/v) before it was concentrated in vacuo and diluted with CH₂Cl₂ (15 mL). The organic layer was washed with 10% aq. Citric acid (3x 10 mL), sat. aq. NaHCO₃ (3x 10 mL), brine (20 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and concentrated on vacuum. The crude mixture was purified by flash-column chromatography (silica gel, CH₂Cl₂/MeOH 9:1 v/v) to give the **T5-P** (222 mg, yield 60%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.47 (s, 1H), 8.14-8.12 (m, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.98 (s, 1H), 4.41 (s, 2H), 3.97-3.9 (q, *J* = 7 Hz, 2H), 3.64 – 3.59 (m, 12H), 3.53-3.44 (m, 2H), 3.38- 3.29 (m, 4H), 3.14- 3.01 (m, 2H), 2.42-2.31 (m, 1H), 2.09 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2 (s, 3H), 1.87-1.76 (m, 1H), 1.63-1.55 (m, 4H), 1.4- 1.31 (m, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H).

¹³C NMR {¹H} (75 MHz, CDCl₃) δ 138, 135.7, 135.6, 121.3, 121.2, 121, 72.9, 70.5, 70.37, 70.22, 70.18(2C), 70, 69.9 (2C), 69.7, 69.5, 62.9, 56.4, 40.2, 40(2C), 40.05, 39.1, 38.4, 36.8, 36.2, 34.6, 28.9, 25.3, 14.2, 14.1.

HRMS (ESI⁺) calculated for C₃₄H₅₄N₈O₁₀S₂ [M+Na]⁺ 821.3320; found 821.3302.

BHQ-1

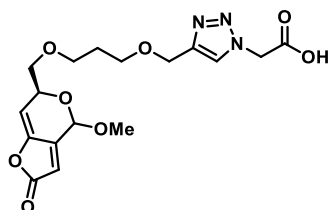
A stirred solution of fast corinth V (0.8 g, 1.93 mmol, 1.2 equiv.) at rt in 12 mL of NaOAc buffer (pH 4) and ACN (1 :1) was prepared and filtrated then added to **21** (0.31 g, 1.6 mmol, 1 equiv.) that was previously diluted in 4.5 mL of ACN at T= 0°C. The reaction mixture was then stirred at rt for 2h until precipitation occurred. The formed solid was recovered through filtration and washed thrice with a solution of water/ACN (1:1). The product was then lyophilized to give a dark powder (0.36 g, 45%).

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 12.20 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.77 (dd, J = 12.7, 8.7 Hz, 3H), 7.66 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.87 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.52 – 3.45 (t, 1H), 3.38 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 2.62 (s, 3H), 2.48 (s, 1H), 2.31 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 1.86 – 1.73 (m, 2H).

¹³C NMR {¹H} (75 MHz, DMSO) δ 174.2, 154.3, 151.8, 150.0, 146.3, 144.6, 143.5, 142.5, 142.2, 133.8, 132.2, 125.4, 124.2, 119.9, 118.4, 111.3, 99.0, 55.8, 50.8, 38.1, 30.6, 21.7, 20.6, 16.2.

HRMS (ESI-) calculated for C₂₆H₂₇N₆O₅⁻ [M]⁻ 503.2033; found 503.2043.

2-(4-((3-(((6S)-4-methoxy-2-oxo-2,6-dihydro-4H-furo[3,2-c]pyran-6-yl)methoxy)propoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetic acid **44**



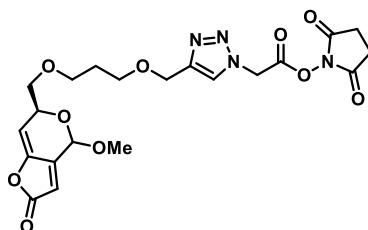
To a stirred solution of **40** (0.1 g, 0.34 mmol) was dissolved in THF (3 mL) were added 2-azidoacetic acid **43** (0.043 g, 0.425 mmol, 1.25 equiv) was added with H₂O (3 mL). Thereafter, CuSO₄ · H₂O (0.01 g, 0.1 equiv.) and ascorbic acid (0.032 g, 0.5 equiv.) were successively added. The reaction was stirred at rt 15min. After the reaction was checked for completion by TLC (cyclohexane/EtOAc 6:4, v/v), 1 M aq. HCl (10mL) was added and the organic phase was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). The product was isolated after removal of volatiles under reduce pressure and RP-HPLC purification to yield **44** as yellow oil (87mg, 65%).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) 7.73 (s, 1H), 5.96 (s, 1H), 5.87 (s, 1H), 5.66 (s, 1H), 5.18 (s, 2H), 4.68 (t, 1H), 4.63 (s, 2H), 3.61 (m, 5H), 3.52 (s, 3H), 3.48 (s, 1H), 1.85 (dd, J= 12.3, 6.2 Hz, 2H)

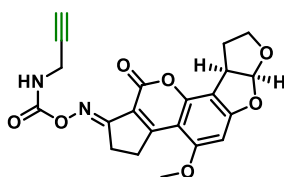
¹³C NMR {¹H} (75 MHz, CDCl₃) δ 169.00, 168.36, 148.59, 147.06, 145.17, 124.74, 111.72, 109.00, 94.33, 72.31, 68.68, 67.77, 67.54, 63.89, 56.28, 51.12, 29.78.

HRMS (ESI-) calculated for C₁₇H₂₀N₃O₈·[M]⁻ 394.1256; found 394.1250.

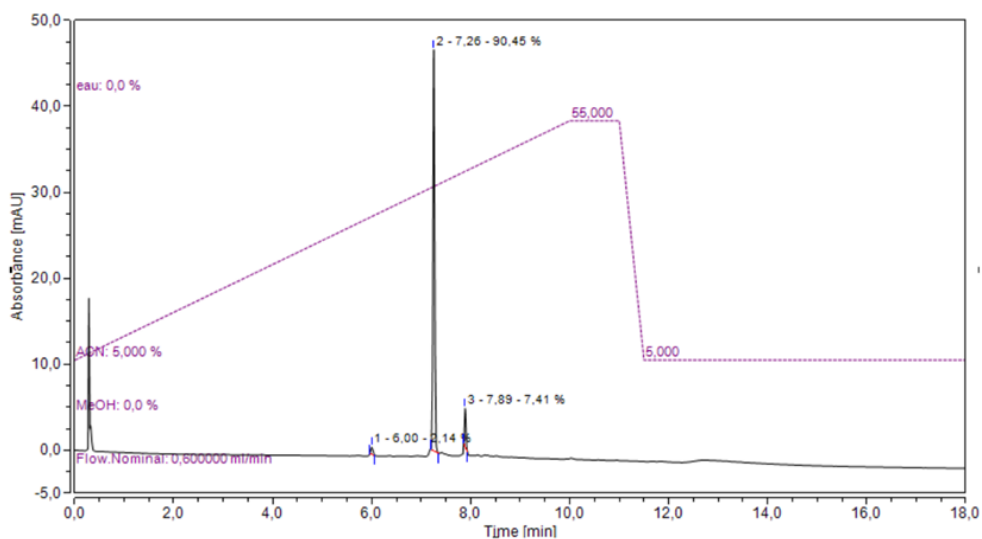
2,5-dioxopyrrolidin-1-yl-2-(4-((3-(((6S)-4-methoxy-2-oxo-2,6-dihydro-4H-furo[3,2-c]pyran-6-yl)methoxy)propoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)acetate **45**



To a solution of **44** (0.031g, 0.08 mmol, 1 equiv.) in 3 mL of dry DMF, DCC (0.01g, 0.08 mmol, 1 equiv.) and NHS (0.09g, 0.08 mmol, 1 equiv.) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, then was filtrated on a Celite pad and concentrated under vacuum. The crude was diluted with 10 mL CH₂Cl₂ then the organic layer was washed with 5% NaHCO₃ (3x 5 mL), brine (5 mL), dried (over anhydrous MgSO₄) and concentrated under vacuum. The crude was then used without any purification in the next step.

AFB2-Alcyne

To a solution of commercial **AFB2** (0.01g, 0.032 mmol, 1 equiv.) in 7.6 mL of H₂O/MeOH/Pyridine (1:4:1). **32** (0.03 mg, 0.23 mmol, 7.3 equiv.) and 300 μ L of HCl (1M) were added. The reaction mixture was stirred 8h at 60°C. The reaction was checked by RP-UHPLC (system A) : conversion of 79%. Thereafter, the product was concentrated and was purified by semi-preparative RP-HPLC (system D) and lyophilized to give brown powder (7 mg, 77%). Purity 90%.



Matériels et méthodes

Substrate:

Gold coated glass plates which were purchased from Arrandee. Borosilicate glass substrates were coated with 2.5 nm of chromium layer and 250 nm of gold layer. Substrates are available in 11x11 mm slides.

Surface functionalization

Gold coated glass plates were cleaned with piranha solution (concentrated sulfuric acid H_2SO_4 and hydrogen peroxide H_2O_2 30% (5:1)) to remove all the organic residues (step 1), followed by washing either with ethanol or with the solvent used for immersion (step 2). These plates were then immersed into a solution containing thiol derivatives (2 to 5 mM) at room temperature (step 3). The immersion time was varied from 2h to 24h depending on the nature and concentration of adsorbate. Then, the plates were subsequently washed with ethanol in order to remove any residual traces of ungrafted molecules (step 4). The substrates were then dried (step 5) using nitrogen flux and were stored under an inert atmosphere at 4°C.

The best results were obtained with low concentrations and long incubation times. Polar solvents (ethanol, methanol, water, acetonitrile) were used to prepare the latter solution since they solubilize thiol derivatives as well as they limit the side reactions induced by the nucleophilicity of the thiol.

Characterization techniques

▪ Atomic Force Microscopy (AFM)

AFM imaging was carried out in collaboration with Dr Sandrine Morin at PBS laboratory (Polymères, Biopolymères, Surfaces) in Evreux. It was performed with AFM PICO-SPM (Molecular Imaging). Atomic Force Microscope operated in contact mode in air using classical pyramidal tip with theoretical constant spring of $C = 0,38 \text{ N/m}$ and scan rate between 0,5 and 1 Hz. The images were obtained with a resolution of 512x512. The images were then processed by SPIP (Scanning Probe Image Processor) software to obtain the average roughness data (R_a : Roughness Average or also noted S_a) as well as the difference between the average of the highest five points and the average of the lowest five points (noted R_z or S_z) on surfaces of $10 \times 10 \mu\text{m}^2$. The samples were studied before and after chemical modifications.

▪ Epifluorescence microscopy

Analyses were carried out on a « Zeiss Axio Observer A1 » multi-function inverted microscope with a short arc high-pressure mercury vapour lamp and a femtowatt

photo-receiver « model 2151 » from the manufacturer New Focus. A digital camera and "DeltaPix Insight" software are integrated for 3D panoramic views.

▪ **X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)**

XPS analysis were carried out in collaboration with Dr Philippe Decorse at the ITODYS laboratory (Interfaces, Traitements, Organisation et DYnamique des Systèmes) in Paris-Diderot (Paris VII). A K-Alpha+ spectrometer from ThermoFisher Scientific was used for XPS analysis. An Al K α monochromatized radiation ($h\nu = 1486,6$ eV) was employed as X-ray source. The data processing (curve fitting) was performed using the Avatage Software provided by ThermoFisher Scientific.

▪ **ATR-FTIR spectroscopy**

Surfaces were characterized by using Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Tensor 27 from Bruker-Daltonic) equipped with ATR crystal in ZnSe and DTG detector at room temperature. Spectra were collected via OPUS 6.5 software and 20 scans averaged over the region 4000-650 cm^{-1} , at 4 cm^{-1} resolution. The main digital treatments are automatic baseline correction and spectral subtraction to eliminate the absorption bands of carbonated and liquid water (3100-3300 cm^{-1}) and CO₂ (2300 cm^{-1}) present in the crystal enclosure.

▪ **Cyclic voltammetry**

Cyclic voltammetry experiments were run with Versastat potentiostat. The electrochemical characterizations of the obtained compounds were made by cyclic voltammetry method using MeCN millimolar ferrocene solution with 0.1 M Bu₄NPF₆ as an electrolyte additive. The experiments were performed using gold electrode as working electrode ($d = 1$ mm), Ag/AgCl as reference electrode and a Platinum wire as counter electrode. The working electrode potentials were measured versus a platinum wire (3 scans with a scan rate of 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$).

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires développées par différentes espèces de champignons. Elles sont présentes dans l'environnement et peuvent entrer dans la chaîne alimentaire, et provoquer des intoxications graves. De ce fait, des doses tolérables pour chaque mycotoxine ont été fixées par l'Organisation Mondiale de Santé. Une quantité infime de ces toxines peut contaminer l'ensemble de la chaîne alimentaire, il est donc nécessaire de mettre au point des méthodes de détection fines et sensibles des toxines résiduelles. Il existe des techniques de laboratoire longues et coûteuses pour détecter la présence de ces composés mais ces techniques ne sont pas à la portée des petits producteurs et difficilement exportable hors des laboratoires de recherche. Afin de mieux satisfaire les besoins du marché agroalimentaire, ce projet de thèse a eu pour but de développer un immunocapteur microfluidique pour la détection des mycotoxines (Aflatoxine B1 et Patuline) basé sur le phénomène de transfert d'énergie par résonance de fluorescence (FRET). Ce dispositif « OFF-ON » repose sur la Méthode SPIT-FRI. L'outil se compose d'un réactif hétérotrifonctionnel « tripode » portant trois fonctions orthogonales entre elles (oxyamine, azoture et thiol). Cette molécule est localisée sur une surface d'or par sa fonction thiol par la méthode SAM. Les deux autres fonctions oxyamine et azoture ont servi respectivement pour le greffage d'un fluorophore jouant le rôle d'un donneur d'énergie et un analogue de mycotoxine. Ce dernier permet d'accrocher un anticorps spécifique anti-analyte marqué par un quencher (Accepteur d'énergie) adéquat au fluorophore. De ce fait, le phénomène de FRET entre ces deux partenaires s'opère. En présence de l'analyte introduit en flux, la forte affinité entre l'analyte par l'anticorps marqué permet une biorecognition entre eux, ce qui a pour conséquence le déplacement de celui-ci. L'éloignement de l'anticorps et de son quencher permet le rétablissement du signal de fluorescence. D'où, une biorecognition de l'analyte par l'anticorps marqué a lieu, ce qui a pour conséquence le déplacement de celui-ci. L'éloignement de l'anticorps et de son quencher permet le rétablissement du signal de fluorescence « ON ».

Mots clés : Mycotoxines, immunocapteur, microfluidique, FRET, SPIT-FRI, tripode, fluorophore, quencher, anticorps, affinité.

Mycotoxins are substances naturally produced by microscopic fungal species. Contamination of human food by such mycotoxins can lead to serious health problems. That's why, the World Health Organization recommended to control the mycotoxin concentration in food. Mycotoxins are detected by various conventional analytical methods. Even if these techniques are efficient, they are frequently expensive and time consuming. The purpose of our present work is to develop a novel immunofluorescence-based device to detect mycotoxins (Aflatoxin B1 and Patulin as proofs of concept). We aim to have a simple and accessible biosensor based as a competitive immunoassay for continuous flow detection involving a fluorescence resonance energy transfer (FRET). The procedure is based on SPIT-FRI method which can be used in different environments. Thus, my PhD work focused on the synthesis of heterotrifunctional crosslinkers « tripods », containing three different orthogonal groups (aminoxy, azido and thiol). This crosslinker is attached on a gold surface through the thiol functional group by self assembly monolayer adsorption (SAM). The aminoxy and azido functional groups are respectively used to graft a fluorophore as a donor energy D and a mycotoxin analog which structurally close to the target (respectively Aflatoxin B2 or Patulin). The latter will be recognized by a specific antibodies equipped with the appropriate quencher (Acceptor) to enhance the FRET efficiency. Once the antibody bounds to the toxin analogue, the fluorescence is turned « OFF » through Fluorescence Resonance Emission Transfer (FRET). The detection of toxins on flow is based on a competition immunoassay between the toxin and its analogue. The strong affinity of immobilized antibodies with toxins in food samples leads an interaction between them and will displace the antibody/quencher from the solid phase, and thus turn the fluorescence « ON ».

Keywords : Mycotoxins, Immunoassay, flow, biosensor, FRET, SPIT-FRI, tripod, fluorophore, quencher, antibody, affinity