



HAL
open science

Auto-assemblage de nanoparticules métalliques et semi-conductrices dirigé par reconnaissance entre protéines artificielles

Maxence Fernandez

► **To cite this version:**

Maxence Fernandez. Auto-assemblage de nanoparticules métalliques et semi-conductrices dirigé par reconnaissance entre protéines artificielles. Matériaux. Université de Rennes, 2019. Français. NNT : 2019REN1S129 . tel-03123325

HAL Id: tel-03123325

<https://theses.hal.science/tel-03123325>

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.

THESE DE DOCTORAT DE CHIMIE

L'UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 596
Matière Molécules et Matériaux
Spécialité : Sciences des Matériaux

Par

Maxence FERNANDEZ

Auto-assemblage de nanoparticules métalliques et semi-conductrices dirigé par reconnaissance entre protéines artificielles

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 6 décembre 2019

Unité de recherche : Institut des Sciences Chimiques de Rennes (UMR CNRS 6226)

Rapporteurs avant soutenance :

Carole AIMÉ	Chargée de recherche CNRS, ENS, Paris
Thomas PONS	Chargé de recherche INSERM, ESPCI, Paris

Composition du Jury :

Carole AIMÉ	Chargée de recherche CNRS, ENS, Paris
Thomas PONS	Chargé de recherche INSERM, ESPCI, Paris
Erik DUJARDIN	Directeur de recherche CNRS, CEMES, Toulouse
Philippe MINARD	Professeur, Université Paris-Sud, Orsay
Directrice de thèse Valérie MARCHI	Directrice de recherche CNRS, ISCR, université de Rennes 1
Co-directrice de thèse Pascale EVEN- HERNANDEZ	Maître de conférences, ISCR, université de Rennes 1

Membre invité
Agathe URVOAS

Maître de conférences,
Université Paris-Sud, Orsay

Remerciements

À l'issue de la rédaction de ce manuscrit, je sais qu'une thèse n'est pas le fruit du travail mené dans la solitude. Assurément, il m'aurait été impossible de réaliser ce travail de recherche sans l'appui d'un grand nombre de personnes qui ont fait preuve de bienveillance et d'attention à l'égard de mes travaux et qui m'ont permis d'évoluer durant ces trois années.

Ce travail de thèse de doctorat a été réalisé dans l'équipe Matière Condensée et Systèmes Electroactifs de l'Institut des Sciences Chimiques de Rennes, à l'Université de Rennes 1. Je voudrais remercier son directeur, Marc Fourmigué, pour m'avoir accueilli au sein de l'institut. Je remercie également Dominique Lorcy, responsable de l'équipe MaCSE dans laquelle règne une convivialité et un dynamisme qui profite à chacun des doctorants de l'équipe. Enfin, je remercie la Région Bretagne et l'ANR (projet ARTEMIS ANR-14-CE08-0004) qui ont financé mon doctorat.

Je suis profondément sensible à l'honneur que m'ont fait l'ensemble des membres du jury en acceptant de rapporter mes travaux et de participer à ma soutenance dans ces conditions particulières. Je remercie Philippe Minard de s'être chargé de la présidence du jury et d'avoir instauré un esprit de convivialité malgré les difficultés logistiques imposées par les événements. Je suis également très reconnaissant envers les deux rapporteurs Thomas Pons et Carole Aimé pour avoir bien voulu lire et évaluer ce long manuscrit. Enfin, je remercie Erik Dujardin et Agathe Urvoas pour avoir suivi mes travaux avec intérêt. Merci à vous tous pour vos impressions, vos remarques, et vos questions dont la pertinence ont permis de soulever de nombreux points intéressants à la suite de mon exposé.

Je vais maintenant m'attacher à remercier celles et ceux qui ont permis la réussite de mes travaux et qui ont rendu ces trois années passionnantes. Parmi les chercheurs auprès desquels j'ai eu la chance d'évoluer et d'apprendre au cours de mon doctorat, je souhaiterais commencer par ma directrice de thèse, Valérie Marchi. Je tiens à te remercier pour ton suivi, tes nombreux conseils et la confiance que tu m'as accordée au cours des trois années. Je te suis particulièrement reconnaissant de ton attachement à me transmettre la rigueur et l'enthousiasme que tu consacres à ton domaine de recherche. Enfin, merci pour nos discussions durant lesquelles tu m'as fait part de ton expérience et de tes conseils pour l'après-thèse. Je remercie également ma co-directrice de thèse, Pascale Even-Hernandez. Tes qualités d'écoutes et de compréhension m'ont aidé tout au long de la thèse et tu as su

m'apporter les bons conseils aux moments clés. Tes conseils m'ont également permis d'aborder la rédaction de ce manuscrit avec plus de sérénité.

Merci également à l'ensemble des membres de l'équipe Modélisation et Ingénierie des Protéines à l'I2BC pour leur aide, leur soutien et la collaboration fructueuse que nous avons pu mener au cours de ces trois années. Je remercie particulièrement Philippe Minard, Agathe Urvoas et Marielle Valerio-Lepiniec qui m'ont chaleureusement accueilli dans leur laboratoire et qui m'ont permis, le temps de quelques jours, d'en apprendre plus sur le design et la production des protéines à motifs répétés. Je remercie aussi Erik Dujardin du CEMES pour ses conseils et ses explications qui m'ont grandement aidé tout au long de la thèse.

Mes remerciements vont également aux personnes avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui m'ont permis d'utiliser différentes techniques de caractérisation. Merci notamment à Agnès Burel, Vincent Dorcet, Valérie Demange et Ludivine Rault pour le temps passé au TEM sur les campus de Beaulieu ou de Villejean. Un grand merci à Bertrand Lefevre pour la gentillesse manifestée à mon égard lors de l'utilisation de l'ICP. Je remercie également Tahar Bouceba pour son aide et son expertise lors de l'étude par méthode SPR.

Je voudrais maintenant remercier l'ensemble des collègues de l'équipe MaCSE, dont plus d'uns ont manifesté à mon égard une grande humanité qui me fut précieuse au long de ces trois années de thèse. Plus particulièrement, je tiens à dire un grand merci à Nathalie, Yann, Antoine et Franck dont la bienveillance, l'humour et la générosité rendent si chaleureux ce couloir du bâtiment 10A. Je pense également aux autres chercheurs de l'ISCR que j'ai eu la chance de côtoyer durant ces trois années. Je salue notamment Soizic et Fabienne dont la gentillesse, le soutien et les conseils m'ont particulièrement touché.

Cette aventure s'est évidemment déroulée aux côtés des membres non permanents du laboratoire, thésards ou stagiaires et dont certains sont devenus de vrais amis. Merci à vous tous pour ces repas de midi, ces pauses thés et ces moments en dehors du laboratoire.

Enfin, mes derniers mots sont pour remercier l'ensemble de mes proches, dont la présence a toujours été un des moteurs de ma motivation. Une pensée particulière pour mes parents, dont la confiance et les encouragements n'ont jamais manqué. Les mots ne suffiront pas pour décrire toute l'aide que mes amis et ma famille m'ont apportée au cours de ces dernières années, et bien plus encore.

Merci

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
AuNC	nanocluster d'or
AuNP	nanoparticule d'or
BSA	albumine de sérum bovin
CTAB	bromure d'hexadecyltriméthylammonium
Cystag	<i>tag</i> poly-cystéine
DDT	1-dodécane-thiol
DLS	diffusion dynamique de la lumière
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
FRET	transfert d'énergie par résonance de type Förster
GNR	nanobâtonnet d'or
GSH	glutathion
HDA	hexadécylamine
Histag	<i>tag</i> poly-histidine
HOMO	orbitale la plus haute en énergie occupée par un électron
HRTEM	microscopie électronique en transmission de haute résolution
IgG	Immunoglobuline G
ITC	titration calorimétrique isotherme
LRR	
LSP	
LUMO	orbitale la plus basse en énergie non occupée par un électron
MEF	fluorescence exaltée par un métal
NHS	N-hydroxysuccinimide
NP	nanoparticule
ODPA	acide octadécylphosphonique
PEG	polyéthylène glycol
pH	potentiel hydrogène

pI	point isoélectrique
PLGA	acide poly (lactique-co-glycolique)
QD	quantum dots
QR	quantum rods
RU	unité de réponse
SAXS	diffusion des rayons X aux petits angles
SERS	spectroscopie Raman exaltée de surface
SPR	résonance de plasmon de surface
TDPA	acide 1-tetradécylphosphonique
TEM	microscopie électronique en transmission
TMAOH	hydroxyde de tétraméthylammonium
TMV	virus de la mosaïque du tabac
TOP	trioctylphosphine
TOPO	oxyde de trioctylphosphine
TPR	tétratricopeptide
UCA	ultracentrifugation analytique
UV	ultraviolet

Table des matières

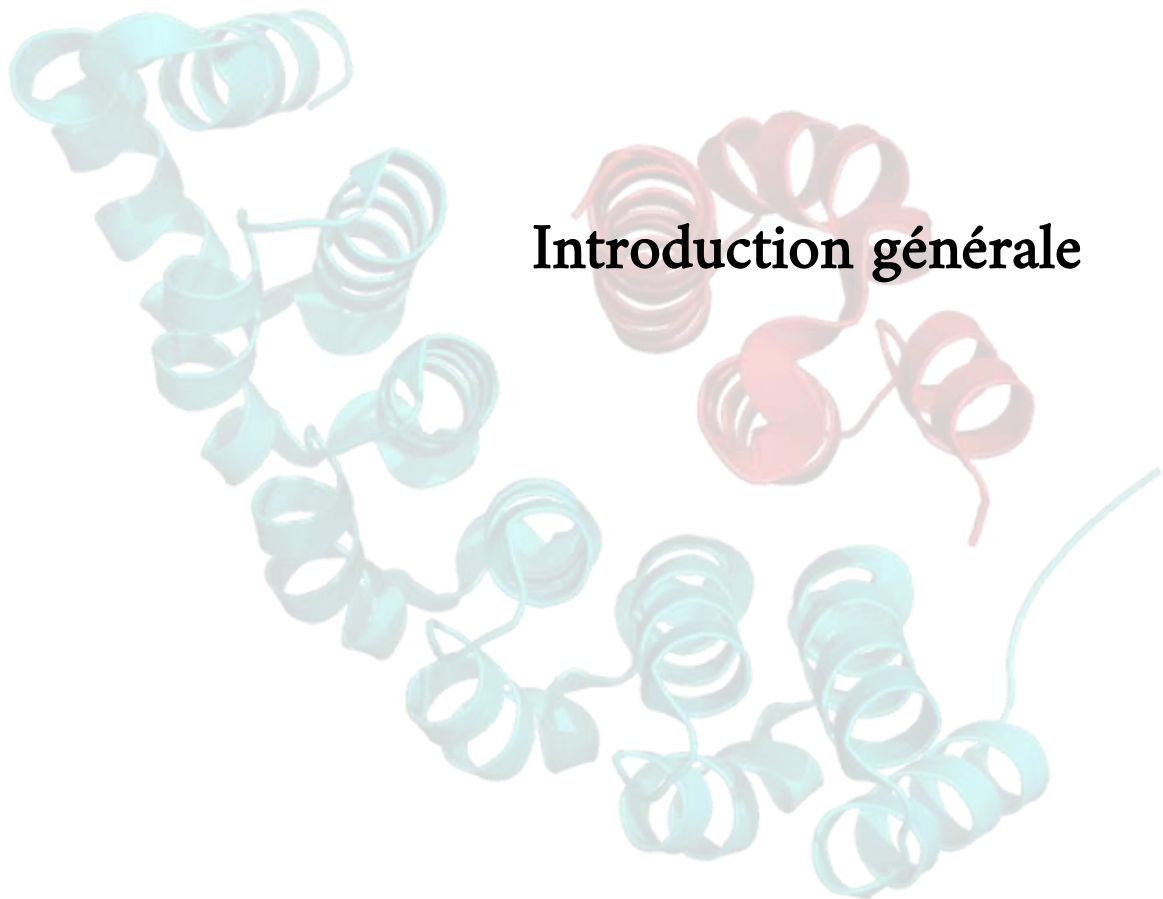
Introduction générale.....	15
Chapitre I. Nanoparticules et auto-assemblage pour des propriétés optiques contrôlées	21
<i>Introduction</i>	25
<i>Partie I. Des nanoparticules pour contrôler la lumière à l'échelle du nanomètre</i>	27
A. Nanoparticules semi-conductrices	27
B. Nanoparticules métalliques.....	32
<i>Partie II. Auto-assemblage des nanoparticules : l'apport du biomimétisme</i>	36
A. Auto-assemblage par évaporation de solvant.....	37
B. Auto-assemblage dirigé par des biomolécules	41
<i>Partie III. Des propriétés optiques nouvelles par le couplage de nanoparticules au sein d'un auto-assemblage</i>	49
A. Couplage de particules semi-conductrices.....	50
B. Couplages hybrides exciton—plasmon.....	55
C. Conclusion partielle	60
<i>Partie IV. Des protéines artificielles pour l'auto-assemblage de nanoparticules</i>	60
A. Exemples de protéines synthétiques.....	60
B. Les protéines α -Repeat	62
<i>Partie V. Objectifs de la thèse et choix du système</i>	68
<i>Références</i>	70
Chapitre II. Synthèse fonctionnalisation des nanoparticules	77
<i>Introduction</i>	81
<i>Partie I. La synthèse de nanoparticules monodisperses : considérations générales</i> ..	83
A. Introduction	83
B. La synthèse par précipitation	83

<i>Partie II. Synthèse de nanoparticules d'or</i>	86
A. Nanoparticules d'or sphériques.....	86
B. Nanobâtonnets d'or.....	89
C. Nanoclusters d'or.....	92
<i>Partie III. Synthèse de nanoparticules semi-conductrices fluorescentes</i>	95
A. Synthèse de quantum dots cœur—coquille CdSe/ZnS.....	95
B. Synthèse de quantum rods CdSe/CdS.....	100
C. Synthèse de quantum dots sans cadmium CuInS ₂ /ZnS.....	104
<i>Partie IV. Stabilisation et hydrophilisation de nanoparticules</i>	108
A. Introduction.....	108
B. Présentation des ligands utilisés.....	109
C. Stabilisation de nanoparticules métalliques.....	110
D. Hydrophilisation de nanoparticules semi-conductrices.....	114
E. Post-fonctionnalisation avec de la biotine.....	118
<i>Conclusion</i>	121
<i>Références</i>	123
Chapitre III. Greffage de protéines sur des nanoparticules	127
<i>Introduction</i>	131
<i>Partie I. Objectifs et présentation de la stratégie adoptée</i>	133
A. Description de la paire de protéines à haute affinité $\alpha 2/A3$	133
B. Affinité pour la surface des nanoparticules.....	136
C. Echange de ligands sur les nanoparticules.....	139
<i>Partie II. Mise en évidence de la bioconjugaison et caractérisation des NP fonctionnalisées</i>	141
A. Mise en évidence du greffage des protéines sur les nanoparticules.....	141
B. Propriétés optiques et morphologie des nanoparticules bioconjuguées.....	149
C. Taille et charge des nanoparticules bioconjuguées.....	154
D. Détermination de la stœchiométrie protéines par nanoparticule.....	157
<i>Partie III. Étude des interactions protéine—protéine après bioconjugaison</i>	161
A. Introduction.....	161

B. Résultats.....	163
C. Conclusion partielle	175
<i>Conclusion</i>	177
<i>Références</i>	178
Chapitre IV. Auto-assemblage de nanoparticules	181
<i>Introduction</i>	187
<i>Partie I. Principe et méthode de préparation des nanoparticules greffées avec les protéines</i>	189
A. Purification des nanoparticules bioconjuguées.....	190
B. Mise en évidence de la bioconjugaison.....	191
C. Mise en évidence de la stabilité des populations NP- α 2 et NP-A3.....	191
<i>Partie II. Auto-assemblage de nanoparticules semi-conductrices</i>	192
A. Auto-assemblages de QR.....	193
B. Auto-assemblage de QD	198
C. Conclusion.....	205
<i>Partie III. Auto-assemblages hybrides de nanoparticules métalliques et semi-conductrices</i>	206
A. Auto-assemblages hybrides sphères—nanobâtonnets.....	206
B. Auto-assemblage hybrides sphères—sphères de AuNP et de QD	218
C. Conclusion partielle sur la morphologie des assemblages	223
<i>Partie IV. Analyse structurale des auto-assemblages</i>	224
A. Détermination de l'interdistance moyenne QD—QD.....	224
B. Cas des auto-assemblages hybrides QD-AuNP.....	230
<i>Partie V. Influence de l'auto-assemblage sur les propriétés optiques</i>	231
A. Couplage d'exciton entre QD auto-assemblés.....	231
B. Fluorescence de QD couplés à des nanoparticules plasmoniques.....	232
<i>Partie VI. Cas particulier de dimères de QD</i>	236
A. Observations	236
B. Discussion.....	239
C. Conclusion sur la formation des dimères de QD.....	243

<i>Partie VII. Vers des auto-assemblages orthogonaux</i>	244
A. Une protéine α -Repeat bi-domaine	244
B. bGFP sur QD	245
C. Assemblage orthogonal hybride AuNP—QD.....	246
<i>Conclusion</i>	250
<i>Références</i>	252
Conclusion générale	255
Partie expérimentale	261
<i>Partie I. Synthèse des nanoparticules</i>	265
A. Synthèse de nanoparticules métalliques	265
B. Synthèse de nanoparticules semi-conductrices.....	267
<i>Partie II. Fonctionnalisation des nanoparticules</i>	271
A. Fonctionnalisation des AuNP.....	271
B. Fonctionnalisation des GNR.....	271
C. Fonctionnalisation – hydrophilisation de QD CdSe/ZnS et de QR CdSe/CdS	271
D. Fonctionnalisation des nanoparticules avec les protéines α -Repeat.....	272
E. Fonctionnalisation de QR avec de la biotine.....	272
<i>Partie III. Détermination de la stœchiométrie A3/AuNP</i>	273
<i>Partie IV. Mesures SPR d'interaction protéine-protéine sur appareil Biacore</i>	273
<i>Partie V. Mélange de nanoparticules pour les auto-assemblages</i>	274
A. Auto-assemblages massifs et limités de QR.....	274
B. Auto-assemblage de QD	275
C. Auto-assemblage de QD et AuNP	276
D. Auto-assemblage de GNR et QD	276
<i>Partie VI. Caractérisation</i>	277
A. Spectroscopie UV—visible.....	277
B. Spectroscopie de fluorescence.....	277
C. Électrophorèse sur gel d'agarose.....	277
D. Microscopie électronique en transmission.....	278

E. Diffusion dynamique de la lumière	278
F. Potentiel zêta	278
G. SAXS	278
<i>Partie VII. Méthodes de détermination des concentrations en nanoparticules.....</i>	<i>279</i>
A. Détermination de la concentration en AuNP	279
B. Détermination de la concentration GNR.....	279
C. Détermination de la concentration AuNC.....	280
D. Détermination de la concentration QD	280
E. Détermination de la concentration QR.....	281
F. Détermination de la concentration des QD CuInS ₂ /ZnS.....	282
<i>Partie VII. Composition des tampons.....</i>	<i>283</i>
A. Tampon NaP.....	283
B. Tampon borate.....	283
Annexes	285
<i>Annexe I. Introduction à la diffusion dynamique de la lumière appliquée aux particules</i>	<i>289</i>
<i>Annexe II. Méthode SPR : principe.....</i>	<i>291</i>
<i>Annexe III. Caractérisation des propriétés optiques des assemblages de nanoparticules</i>	<i>293</i>
A. Assemblages de GNR et de QD	293
B. Assemblages de AuNP et QD	294
<i>Annexe IV. Publication</i>	<i>295</i>



Introduction générale

L'organisation multi-échelle de la matière, de l'échelle moléculaire à l'échelle macroscopique, est un paramètre clé pour le développement de nouveaux matériaux fonctionnels. Depuis une vingtaine d'années, l'auto-assemblage de nanoparticules inorganiques s'est révélée être une voie prometteuse pour la création de systèmes structurés aux propriétés nouvelles. D'une part, les nanoparticules présentent des propriétés physico-chimiques qui diffèrent de celles d'un même matériau à l'échelle macroscopique. Ces propriétés uniques sont dues au confinement des champs électromagnétiques aux dimensions nanométriques. Ainsi, les nanoparticules semi-conductrices et métalliques se présentent comme des briques élémentaires attrayantes pour le développement de matériaux aux propriétés optiques collectives nouvelles. Le couplage des champs exaltés et confinés autour des nanoparticules métalliques avec la fluorescence modulable des nanoparticules semi-conductrices ouvrent de nouvelles voies pour des applications dans le domaine biomédical, l'optoélectronique, la photonique ou encore la production d'énergie.

Dans cette optique, l'auto-assemblage est un mécanisme qui a inspiré de nouvelles méthodes pour former des superstructures en combinant des nanoparticules de natures variées et aux propriétés très différentes. Plusieurs vecteurs d'auto-assemblage ont été mis au point, mais dans ce domaine les stratégies d'inspiration biologiques se sont révélées particulièrement performantes. Ainsi, les biomolécules (l'ADN, les protéines ou les peptides) ainsi que certaines nanostructures biologiques (virus notamment) permettent de diriger l'organisation de nanoparticules à différentes échelles. Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes intéressés à une nouvelle famille de protéines artificielles (les protéines α -Repeat) qui été développée par l'équipe de biologistes de P. Minard (I2BC, université Paris-Sud) et qui a permis de mettre au point des paires de protéines de fortes constantes d'affinité. En collaboration avec cette équipe et l'équipe de E. Dujardin (CEMES, Toulouse), il a été montré en 2016 que ces protéines peuvent être utilisées comme agents d'auto-assemblage de nanoparticules d'or (E. Dujardin *et al.*, ACS Nano 2016). Ces travaux montrent que ce système de codage basé sur des protéines artificielles peut être utilisé pour l'élaboration de matériaux complexes permettant de combiner les propriétés de nanoparticules de différentes natures et l'organisation sélective et structurées des protéines artificielles.

Ainsi, ces travaux de thèse ont pour objectif de mettre au point des nanomatériaux présentant des propriétés optiques nouvelles issues de l'auto-assemblage de nanoparticules métalliques et de nanoparticules semi-conductrices en utilisant ce codage par les acides aminés. Dans ce but, les protéines α -Repeat sont utilisées pour leur propriétés de reconnaissance spécifique et leur structure rigide permettant d'accéder à un haut niveau de contrôle de l'interdistance au sein des nanostructures. Pour y parvenir, une stratégie de fonctionnalisation sera suivie afin de greffer les protéines sur la surface des deux types de nanoparticules aux morphologies sphériques ou anisotropes. Les suspensions de nanoparticules fonctionnalisées par les protéines artificielles sont alors mélangées pour initier l'auto-assemblage de nanoparticules.

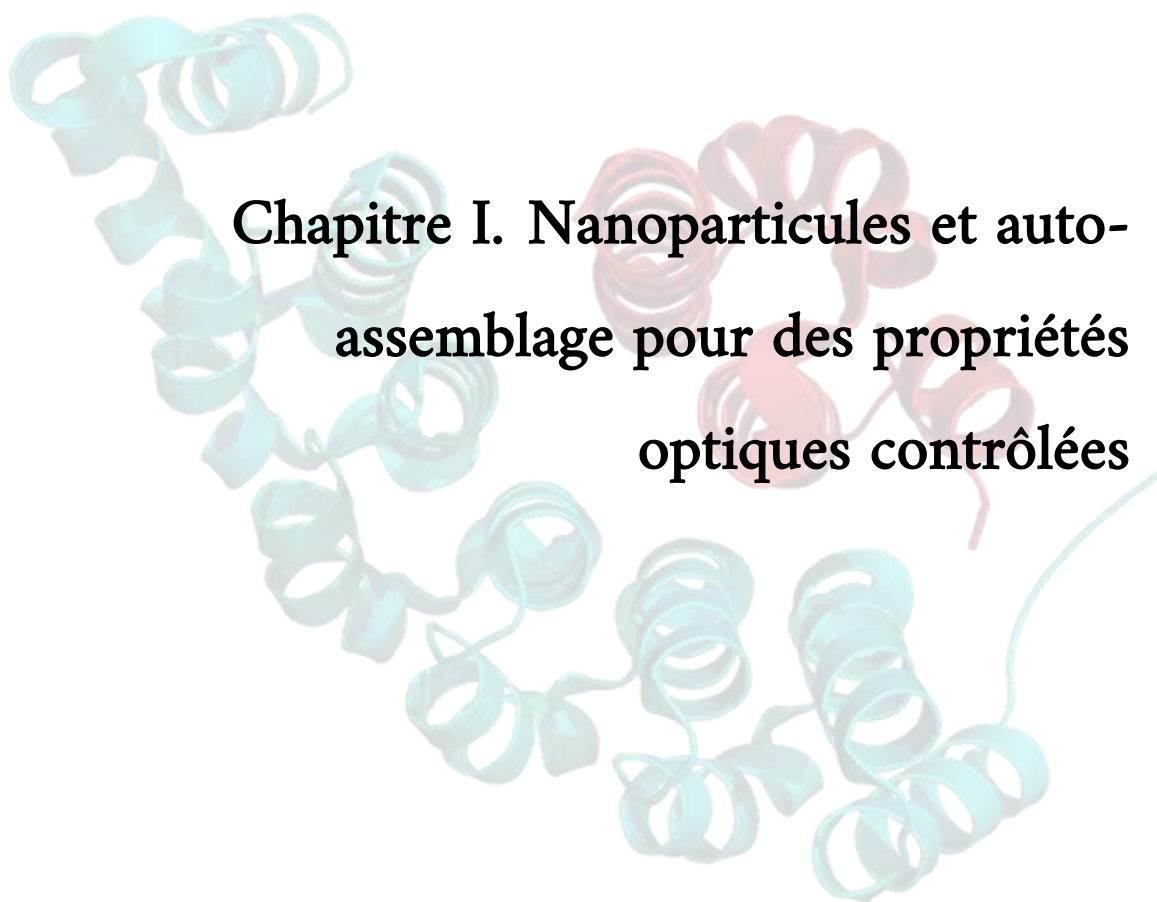
Ce manuscrit est organisé en 5 parties. Le premier chapitre, basé sur la littérature scientifique, permet tout d'abord d'introduire les propriétés optiques des nanoparticules semi-conductrices et des nanoparticules métalliques. Ensuite, après une présentation de la stratégie d'auto-assemblage de nanoparticules par évaporation de solvant, nous nous intéressons à l'auto-assemblage dirigé par des biomolécules (peptide, protéines naturelles, brins d'ADN) ou des nanostructures biologiques (virus). Après avoir passé en revue ces différentes stratégies d'auto-assemblage, nous aborderons les propriétés optiques nouvelles générées par l'auto-assemblage de ces deux types de nanoparticules. Finalement, après avoir présenté la famille des protéines artificielles α 2-Repeat, nous présentons en quoi elles constituent un médiateur d'auto-assemblage prometteur.

Le chapitre 2 expose la synthèse des nanoparticules semi-conductrices et métalliques. À l'aide de méthodes expérimentales tirées de la littérature et optimisées au laboratoire, nous montrons que nous sommes en mesure de synthétiser des objets aux morphologies et aux propriétés optiques contrôlées. De plus, ce chapitre est l'occasion de détailler la méthode de fonctionnalisation que nous adoptons dans le but de stabiliser les nanoparticules métalliques et d'obtenir des nanoparticules semi-conductrices stables dans l'eau.

Le chapitre 3 présente nos travaux concernant le greffage des protéines sur la surface inorganique des nanoparticules. Après avoir présenté en détail le couple de protéines α -Repeat utilisés, nous abordons la stratégie de greffage reposant sur des étiquettes d'affinité insérées dans la séquence des biomolécules. Nous poursuivons avec la mise en évidence de ce greffage ainsi que la caractérisation des propriétés colloïdales et optiques des

nanoparticules bioconjuguées. Finalement, nous montrons notre étude de l'activité de reconnaissance des protéines après leur greffage sur les nanoparticules.

Le chapitre 4 a pour sujet les résultats obtenus quant aux assemblages de nanoparticules semi-conductrices entre elles ou couplées avec des nanoparticules métalliques dans le but de contrôler la morphologie des nanostructures générées. Des méthodes de microscopie électronique et de diffusion des rayons X permettront de caractériser la structure des auto-assemblages. De plus, nous étudions l'influence de l'auto-assemblage sur les propriétés optiques des nanoparticules. Enfin, nous présentons nos premiers résultats sur l'utilisation d'une protéine bi-domaine pour le développement de nanostructures orthogonales.



**Chapitre I. Nanoparticules et auto-
assemblage pour des propriétés
optiques contrôlées**

Table des matières

Introduction.....	25
Partie I. Des nanoparticules pour contrôler la lumière à l'échelle du nanomètre	27
<i>A. Nanoparticules semi-conductrices.....</i>	<i>27</i>
A.1 Présentation générale	27
A.2 Propriétés optiques.....	28
A.3 Variation de la morphologie : cas des nanobâtonnets semi-conducteurs	31
<i>B. Nanoparticules métalliques</i>	<i>32</i>
B.1 Présentation générale	32
B.2 Propriétés optiques.....	33
B.2.i. Résonance plasmon.....	33
B.2.ii. Influence de la forme : cas des nanobâtonnets d'or.....	34
B.3 Cas particulier des nanoclusters d'or.....	35
Partie II. Auto-assemblage des nanoparticules : l'apport du biomimétisme	36
<i>A. Auto-assemblage par évaporation de solvant</i>	<i>37</i>
A.1 Structures 1D	37
A.2 Structures 2D	38
A.3 Structures 3D	39
A.4 Séchage de nanoparticules anisotropes	39
<i>B. Auto-assemblage dirigé par des biomolécules</i>	<i>41</i>
B.1 Les nanomatériaux à ADN.....	42
B.2 Les virus	44
B.3 Protéines et peptides.....	45
B.3.i. Peptides.....	45
B.3.ii. Protéines naturelles	46
B.4 Conclusion partielle	48
Partie III. Des propriétés optiques nouvelles par le couplage de nanoparticules au sein d'un auto-assemblage	49
<i>A. Couplage de particules semi-conductrices.....</i>	<i>50</i>

A.1	Transfert d'énergie par résonance de type Förster	50
A.2	Superradiance ou état d'émission cohérente dans un assemblage de QD	53
A.3	Effet laser	55
B.	<i>Couplages hybrides exciton—plasmon</i>	55
B.1	Extinction de fluorescence	56
B.2	Fluorescence exaltée par un métal	57
C.	<i>Conclusion partielle</i>	60
Partie IV.	Des protéines artificielles pour l'auto-assemblage de nanoparticules	60
A.	<i>Exemples de protéines synthétiques</i>	60
B.	<i>Les protéines α-Repeat</i>	62
B.1	Construction des protéines α -Repeat	63
B.2	Sélection de paires de protéines à haute affinité	64
B.3	Les protéines α -Repeat pour l'auto-assemblage de AuNP	66
Partie V.	Objectifs de la thèse et choix du système	68
Références	70

Introduction

À l'échelle du nanomètre, les nanoparticules semi-conductrices et nanoparticules métalliques possèdent des propriétés optiques uniques que l'on cherche ici à exploiter collectivement au sein d'un ensemble de dimension et de structure bien définies afin de générer de nouvelles propriétés optiques.

Les nanoparticules peuvent potentiellement absorber, transférer et guider la lumière à l'échelle nanométrique. Nous verrons d'abord comment les quantum dots (ou particules semi-conductrices) peuvent absorber la lumière pour former une paire électron-trou par séparation de charge (exciton) qui, en se recombinant, libèrent une intensité de fluorescence avec un excellent rendement quantique de fluorescence. Ces propriétés de fluorescence à l'échelle nanométrique sont modulables avec la nature chimique et la forme des nanoparticules semi-conductrices. De la même façon, le confinement des électrons au sein d'une particule métallique engendre des modes plasmon qui résultent en une forte absorption dans le visible dans le cas des nanoparticules d'or. La forme et la taille des nanoparticules d'or permettent aussi de moduler le nombre et l'énergie de ces modes plasmon.

Lorsque ces nanoparticules métalliques ou semi-conductrices interagissent entre elle à des distances comprises entre quelques nanomètres et quelques dizaines de nanomètres, ces propriétés optiques sont modulées par l'environnement des autres. Nous verrons par exemple comment le couplage entre nanoparticules métalliques ou entre nanoparticules semi conductrices affectent les propriétés optiques. Cette modulation des propriétés optiques trouve des applications dans des domaines variés comme les biotechnologies, la conversion d'énergie ou encore le transport et le stockage d'informations.

Pour coupler efficacement les nanoparticules entre elles, il est nécessaire de les organiser à une échelle mésoscopique sous forme de superstructures dans lesquelles l'interdistance jouera un rôle clef. Un enjeu important de cet axe de recherche est de concevoir des stratégies versatiles pour obtenir des superstructures de nanoparticules dans lesquelles l'interdistance est bien définie pour pouvoir la corrélérer avec la modulation des propriétés optiques.

Nous verrons en quoi les biomolécules telles que l'ADN ou les polypeptides peuvent être très pertinentes pour réaliser des auto-assemblages de nanoparticules de natures différentes.

De ce point de vue, les protéines artificielles sont une alternative très prometteuse. Nous présenterons la famille des protéines α -Repeat que nous allons chercher ici à exploiter pour fabriquer des assemblages de nanoparticules semi-conductrices ou des assemblages hybrides composés de nanoparticules d'or et de nanoparticules semi conductrices.

Partie I. Des nanoparticules pour contrôler la lumière à l'échelle du nanomètre

A. Nanoparticules semi-conductrices

A.1 Présentation générale

Les nanocristaux semi-conducteurs fluorescents (*quantum dots* en anglais, QD) font partie de la grande famille des nano-objets dont l'étude des propriétés connaît un développement spectaculaire depuis le début des années 1990. C'est à la fin des années 1970 que le physicien A. Ekimov synthétise des nanocristaux fluorescents de chlorure de cuivre ou de séléniure de cadmium au sein d'une matrice de verre fondu^[1] dont le comportement surprenant sera théorisé par A. Efros^[2], via le confinement de leurs électrons. Par la suite, les travaux de L. E. Brus ont permis la mise au point des premières synthèses colloïdales de QD de sulfure de cadmium^[3].

À partir de la fin des années 90, a été maîtrisée la synthèse de nanoparticules cristallines de tailles nanométriques composées de matériaux semi-conducteurs purs (Si) ou composés de l'association de deux éléments des colonnes II—IV (CdSe)^[4], III—V (GaAs)^[5] ou IV—VI (PbSe)^[6] du tableau périodique des éléments. Les propriétés de fluorescence exceptionnelles des QD ont été rapidement perçues comme très prometteuses dans de nombreuses applications telles que le marquage fluorescent en biologie^[7-9], les cellules photovoltaïques^[10,11] ou encore les diodes électroluminescentes^[12,13]. Ces nanoparticules (NP) semi-conductrices présentent des propriétés optiques remarquables, toutefois le faible nombre d'atomes qui les constituent leur confère une grande sensibilité aux réactions de surface qui peuvent affecter grandement leurs qualités exceptionnelles. Une solution à ce problème a été proposée en 1996 par P. Guyot-Sionnest : il s'agit de déposer sur le cœur une coquille semi-conductrice possédant un saut énergétique supérieur^[14]. L'idée est d'améliorer la passivation de la surface des nanocristaux à l'aide d'une structure cœur/coquille. De cette façon, le rendement quantique de fluorescence et la stabilité contre la photo-oxydation sont grandement améliorés en protégeant le cœur et en confinant les électrons dans ce dernier (Figure 1a). Depuis, plusieurs systèmes cœur/coquille ont été mis au point, classés selon les positions relatives des niveaux d'énergie et le *gap* des matériaux semi-conducteurs composant le cœur et la coquille (Figure 1b).

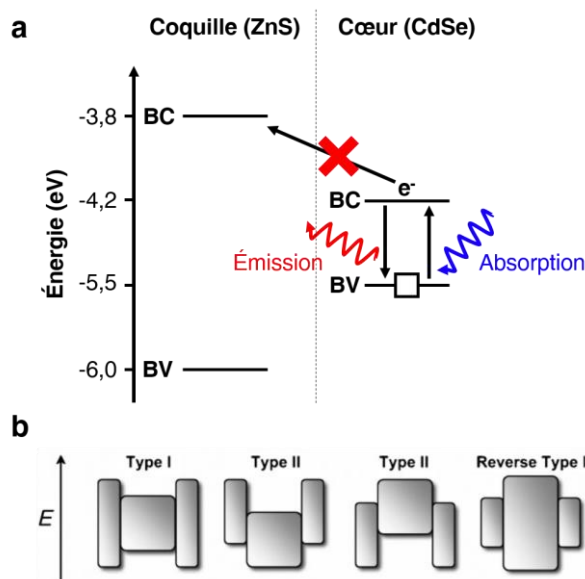


Figure 1. (a) Exemple de la structure cœur/coquille de CdSe/ZnS : absorption d'énergie par le cœur CdSe, création d'une paire électron—trou, transfert de l'électron interdit vers la coquille ZnS et désexcitation radiative (valeurs extraites de [15]). (b) Représentation schématique de l'alignement des niveaux d'énergie dans différents systèmes cœur/coquille pour la réalisation de QD. Le bord inférieur et supérieur des rectangles correspond aux limites de bande de valence et de la bande de conduction de la coquille et du cœur (extrait de [15]).

Aujourd'hui, l'ensemble du spectre visible, l'ultraviolet et l'infrarouge peuvent être couverts par la luminescence des QD^[15]. De plus, nous sommes parvenus à un degré de contrôle de la morphologie des nanocristaux suffisant pour obtenir des particules aussi bien sphériques qu'en forme de nanobâtonnets^[16,17], de rubans^[18] ou de nanoplaquettes^[19].

A.2 Propriétés optiques

La propriété physique majeure des matériaux semi-conducteurs, à l'état massif, est la capacité que possèdent les électrons, après absorption d'un photon, à passer de la bande de valence vers la bande de conduction. L'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ (avec h constante de Planck et ν la fréquence du photon considéré) dépend des bandes d'énergie caractéristiques du matériau. Ces bandes d'énergies sont constituées d'une multitude de niveaux d'énergie, correspondant aux différents états d'énergie accessibles aux électrons du matériau massif (Figure 2). Lorsque la taille du matériau diminue, ce nombre de niveaux d'énergie des électrons devient discret. Le couplage des différentes orbitales atomiques génère un ensemble de niveaux d'énergie électroniques discrets entre lesquels les électrons les plus mobiles peuvent éventuellement transiter lorsqu'ils sont soumis à une excitation lumineuse.

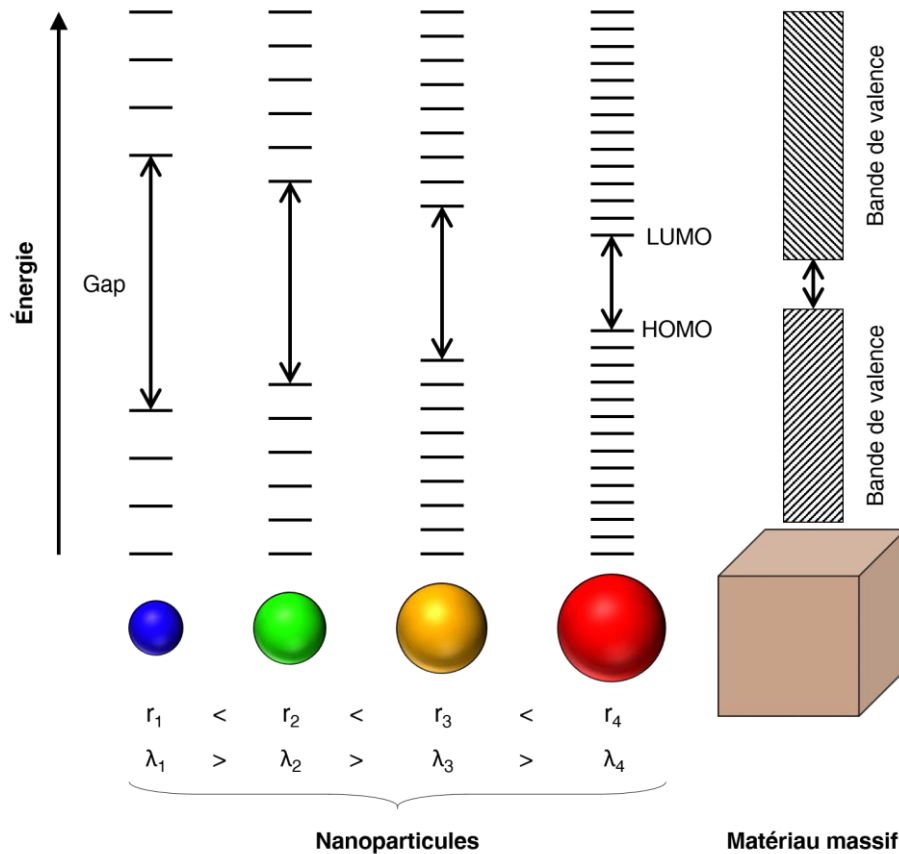


Figure 2. Effet du confinement quantique : relation entre les diamètres des NP semi-conductrices, la valeur énergétique de leur bande interdite (*gap*) et leur longueur d'onde d'émission. Inspiré de [20].

Lorsqu'un matériau semi-conducteur est amené à des tailles nanométriques, la réduction du nombre d'atomes composant les NP devient très importante. Ainsi, la différence d'énergie entre le niveau d'énergie le plus haut occupé par les électrons de la particule (HOMO) et le niveau d'énergie le plus bas non occupé (LUMO) devient dépendante de la taille de la particule elle-même. Par exemple, une particule présentant un diamètre de 3 nm contient typiquement, selon la nature du matériau en question, quelques centaines à quelques milliers d'atomes. Dans ce cas, le semi-conducteur est constitué de niveaux d'énergie discrets, comme autant d'orbitales moléculaires (Figure 2). La quantification des niveaux d'énergie du semi-conducteur est progressive lorsque le rayon de la nanoparticule diminue, et devient prépondérante lorsque le rayon devient inférieur à environ 10 nm. Pour les QD, ce confinement quantique donne lieu à des propriétés de fluorescence qui résultent de la désexcitation des électrons excités par absorption de la lumière. Après absorption d'un photon, est générée une séparation de charges électron—trou qui constitue une paire (exciton) caractérisé par son rayon de Bohr r_B qui permet de définir la distance moyenne entre l'électron et le trou.

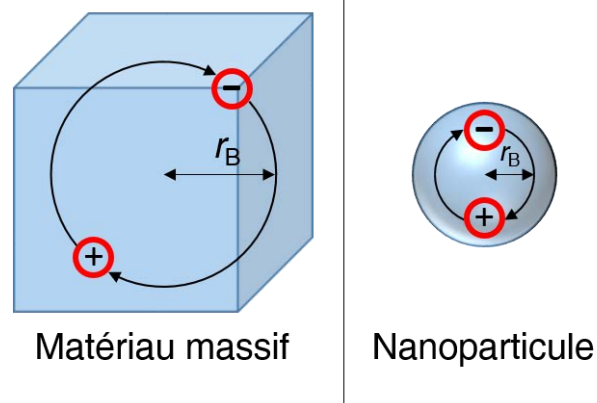


Figure 3. Représentation schématique du rayon de Bohr r_B pour un matériau massif ou une nanoparticule.

Comme illustré en Figure 3, le confinement des porteurs de charge au sein d'une nanoparticule rapproche la valeur du rayon de Bohr de l'exciton à la taille de la nanoparticule en question. Le confinement spatial des électrons et des trous au sein de la nanoparticule a pour effet d'augmenter l'énergie de transition excitonique. Ainsi, plus le rayon de la particule diminue, plus l'augmentation du *gap* est importante (variation en $1/r^2$). L'intérêt majeur des NP semi-conductrices provient de cette propriété exceptionnelle. Le *gap* des particules, qui correspond à l'énergie de la lumière émise par fluorescence, peut être ajusté en fonction de leur rayon. En conséquence, le retour de l'électron excité à son état fondamental émet un photon de longueur d'onde λ qui dépend de l'énergie de la bande interdite E_{NC} , de la vitesse de la lumière c et de la constante de Planck h .

$$\lambda = \frac{hc}{E_{NC}} \quad \text{Eq. 1}$$

Plus le rayon de la nanoparticule diminue et plus l'énergie de la bande interdite augmente avec un effet bathochrome sur la longueur d'onde d'émission (déplacement vers le bleu) (Figure 2). Au début des années 1980, une série de travaux publiés par différents groupes ont permis de vérifier expérimentalement la relation entre la taille des NP semi-conductrices et leur spectre d'absorption selon le confinement quantique^[1,3,21,22].

A.3 Variation de la morphologie : cas des nanobâtonnets semi-conducteurs

Parmi la variété de NP semi-conductrices anisotropes mises au point, les nanobâtonnets semi-conducteurs (en anglais *quantum rods*, QR) sont attractifs pour l'objectif de cette thèse. Ces particules possèdent une structure cœur/coquille avec des matériaux de type II–IV avec un cœur sphérique de CdSe et une coquille anisotrope de CdS en forme de bâtonnet. À la différence des QD, très souvent constitués d'une coquille de ZnS qui permet de confiner les électrons et les trous dans le cœur de CdSe, la coquille de CdS des QR permet la délocalisation des électrons dans cette coquille tandis que les trous restent confinés dans le cœur^[23,24].

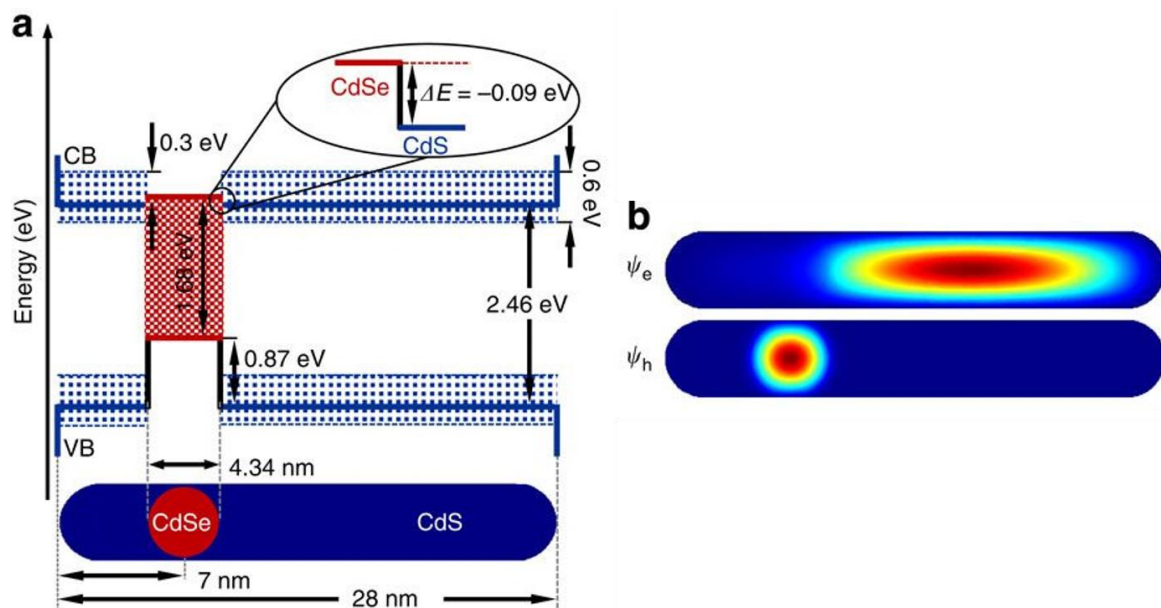


Figure 4. (a) Alignement des bandes de valence (VB) et des bandes de conduction (CB) du cœur de CdSe et de la coquille de CdS formant un QR. (b) Fonctions d'onde calculées pour les électrons (ψ_e) et les trous (ψ_h) localisés dans un QR CdSe/CdS. Extraites de [24].

En effet, la différence en énergie entre la bande de conduction du CdSe (cœur) et celle du CdS (coquille) est suffisamment faible (0,09 eV) pour que les électrons puissent y être délocalisés sous l'action de l'agitation thermique (Figure 4a). Cette délocalisation des électrons s'effectue alors que les trous restent confinés dans le cœur car ils ne peuvent pas passer le *gap* de 0,87 eV entre les bandes de valence. Les QD CdSe/ZnS, de par leur structure cœur/coquille de type I, ne présentent pas cette séparation des porteurs de charge (Figure 1a). De ce fait, les QR présentent des propriétés nouvelles. Il est notamment possible d'effectuer la réduction de sels métalliques à une extrémité du QR^[25] ou encore d'effectuer la réduction d'une molécule organique d'un côté de la particule et une oxydation de l'autre

côté de celle-ci. En effet, la durée de vie de l'exciton est compatible avec les temps caractéristiques d'une réaction d'oxydo-réduction à la surface d'un nanobâtonnet^[26]. Outre les propriétés optiques originales, l'anisotropie de ces nanoparticules leur confère un riche polymorphisme à l'état condensé qui pourra être mis à profit pour réaliser des superstructures.

B. Nanoparticules métalliques

B.1 Présentation générale

De la même façon que pour les NP semi-conductrices, réduire les dimensions d'un matériau métallique à l'échelle du nanomètre génère des propriétés nouvelles très différentes du matériau massif. Ce phénomène touche plus particulièrement le confinement des électrons, dont la densité est significativement plus grande au sein d'un matériau métallique que dans un semi-conducteur^[27]. De ce fait, de nouvelles propriétés catalytiques et optiques émergent au sein de nanomatériaux composés de métaux nobles (Au, Ag, Cu)^[28-30]. Dans le cadre de ces travaux, nous nous intéressons particulièrement aux NP d'or (AuNP) qui sont souvent préférées aux NP d'argent pour leurs meilleures biocompatibilité et stabilité chimique, en particulier contre l'oxydation de surface et la dissolution en solution^[31]. Les AuNP se démarquent également par la valeur élevée de leur coefficient d'extinction molaire qui est 10^4 fois plus élevée que celle des colorants classiques^[32]. Ces particules se révèlent être particulièrement attractives pour plusieurs raisons : leur chimie de surface, leur conductivité, leur résonance de plasmon de surface, leur interaction avec la fluorescence d'autres entités et leurs propriétés d'oxydoréduction^[30]. De ce fait, les AuNP suscitent un grand intérêt en nanomédecine^[33], en catalyse^[34], en biodétection^[35,36], en bio-imagerie^[37], en photovoltaïque^[38], en électronique^[39] et pour l'optique non linéaire^[40,41]. De plus, les phénomènes radiatifs de fluorescence^[42] ou de diffusion Raman^[43] peuvent être exaltés de façon très importante sous l'influence de la résonance des plasmons de surface qui constitue la propriété optique majeure des AuNP.

B.2 Propriétés optiques

B.2.i. Résonance plasmon

Le terme « plasmon » décrit l'oscillation collective des électrons libres au sein d'un matériau métallique^[27,44]. Les plasmons peuvent être alors décrits, selon le modèle liquide de Fermi, comme un nuage d'électrons chargé négativement qui se déplace de manière cohérente dans un réseau constitué d'ions chargés positivement, de façon analogue à un plasma réel. Dans le cas d'une NP métallique dont la taille est suffisamment réduite, le champ électrique d'une lumière incidente peut pénétrer dans le métal et polariser les électrons de conduction (Figure 5). La taille des AuNP étant inférieure à la profondeur de peau de pénétration de l'or (qui est de 126 nm pour une excitation à 633 nm), l'ensemble des électrons conducteurs interagissent avec le champ électromagnétique incident. De ce fait, une AuNP absorbe une énergie qui induit l'oscillation collective des électrons, due à l'interaction de Coulomb, sur l'ensemble de la particule de façon directionnelle. Ce phénomène est dans ce cas appelé plasmon de surface localisé (en anglais *localized surface plasmons*, LSP).

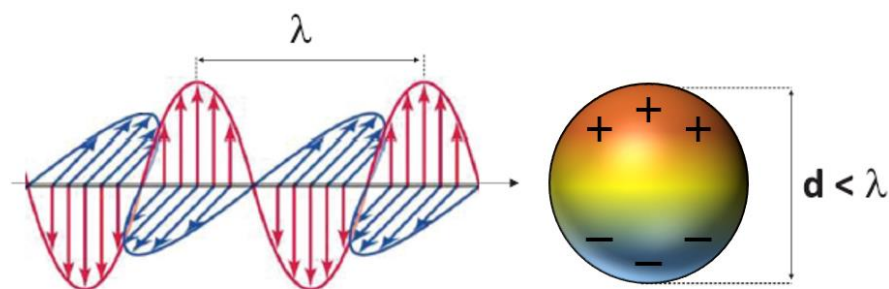


Figure 5. Excitation par la lumière des plasmons de surface d'une AuNP. Inspiré de [45].

La théorie de Mie permet de modéliser l'interaction entre une onde électromagnétique et une NP. Expérimentalement, la position (en longueur d'onde d'excitation) de la LSP peut être mesurée par spectroscopie d'absorption UV—visible. Le maximum du spectre obtenu est alors caractéristique de la LSP et correspond à une longueur d'onde précise. Dans le cas d'une NP d'or sphérique dans l'air, cette condition sera remplie pour une longueur d'onde d'excitation de 484 nm. Dans l'eau, elle le sera autour de 520 nm.

B.2.ii. Influence de la forme : cas des nanobâtonnets d'or

Au-delà des NP d'or sphériques, de nombreux travaux ont été menés pour parvenir au contrôle de la morphologie des nanocristaux métalliques. De nombreuses alternatives ont ainsi été développées, telles que les particules en forme des bâtonnets (en anglais *gold nanorods*, GNR)^[46], les NP creuses^[47], les nanocubes^[48], les nanoplaquettes^[49] ou les nanofils^[50].

Comme les AuNP, les GNR présentent des propriétés plasmoniques qui les rendent très attrayants pour des applications dans le domaine biomédical ou pour des spectroscopies exaltées^[46]. De plus, les GNR permettent de moduler leurs propriétés plasmoniques en fonction de leurs dimensions dans un domaine spectral plus large. Les GNR présentent deux modes de résonance plasmon, possédant chacun des conditions de résonance différentes. Le premier mode transverse (LSP_T), est associé à l'oscillation des électrons de conduction selon l'axe transversal du GNR qui résonne autour de 520 nm (Figure 6a). L'autre mode LSP longitudinal (LSP_L) correspond à l'oscillation selon l'axe long du bâtonnet. Ce dernier présente une position de résonance très dépendante du rapport d'aspect du GNR (défini comme le rapport de sa longueur divisée par sa largeur) (Figure 6a et b). Il est possible, selon la polarisation de la lumière incidente, d'activer sélectivement chacun des modes. Toutefois, en solution, l'ensemble des modes plasmons rencontrés sont activés et mesurés car l'orientation des GNR est aléatoire.

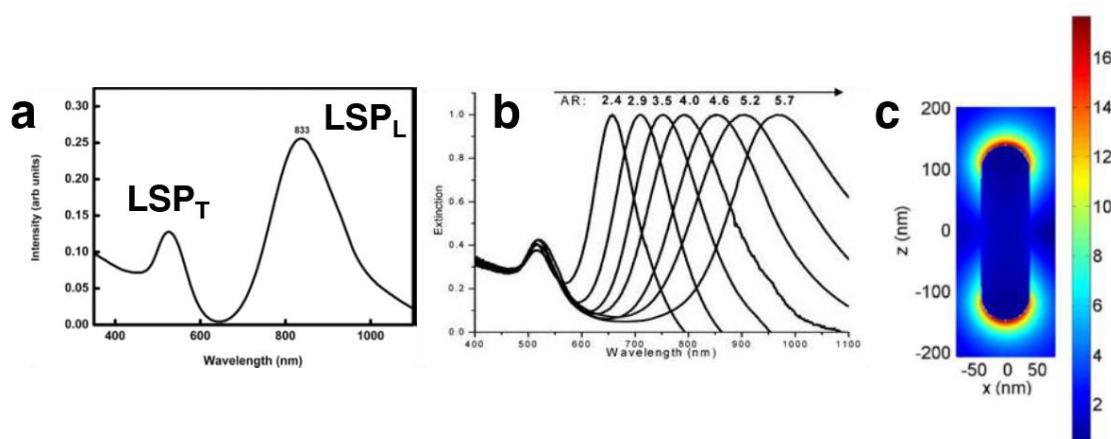


Figure 6. (a) Spectre d'absorption UV—visible de GNR présentant les deux modes plasmons. (b) La position de la LSP longitudinale accordable en fonction du rapport d'aspect (A.R.). (c) Simulation des champs exaltés autour d'un GNR par effet plasmon (extrait de [51]).

En champ proche, la résonance des modes plasmon des GNR produit des champs très exaltés dans le proche voisinage des particules (Figure 6c). Ce phénomène est mis à profit

pour les spectroscopies exaltées telles que la diffusion Raman exaltée de surface (SERS)^[52]. Ces propriétés ne concernent pas les particules de taille inférieure à 3 nm de diamètre, ces petites particules sont des *clusters* d'atomes avec des niveaux d'énergie discrets^[53] qui leur confèrent des propriétés de fluorescence mais pas de bande plasmon.

B.3 Cas particulier des nanoclusters d'or

En dessous de 3 nm, les NP d'or ne présentent plus de propriétés plasmoniques. Ces nano-objets, composés de quelques centaines d'atomes d'Au (voir Figure 7), présentent en revanche une émission de fluorescence couvrant un spectre allant du proche infrarouge jusqu'à la lumière visible^[54]. Ces nanoclusters d'or (AuNC) peuvent être synthétisés par réduction de sels d'or ou par *etching*. Dans le cadre des travaux présentés ici, nous nous intéressons aux AuNC synthétisés par réduction. Le mécanisme de la synthèse de AuNC stabilisé par le glutathion (GSH), qui possède un thiol, sera l'objet d'une sous-partie du Chapitre II.

Un grand nombre de AuNC très fluorescents ont pu être synthétisés ces 20 dernières années, présentant différentes tailles et des chimies de surface très variées. Leur émission de fluorescence peut être ajustée en changeant la taille des objets, les ligands de surface, l'état d'oxydation des atomes d'or et la taille de grain pour les plus gros objets^[55]. Nous nous limitons ici à décrire la fluorescence des AuNC-GSH stabilisé par le glutathion qui sont utilisés dans nos travaux.

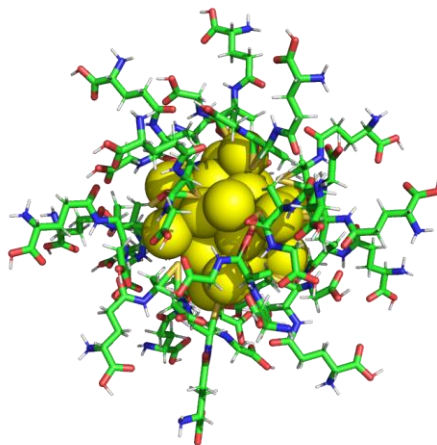


Figure 7. Représentation schématique d'un AuNC composé de 25 atomes d'Au et de 18 ligands glutathion. Structure calculée à l'aide du serveur web NanoModeler[56] et modélisée à l'aide du logiciel PyMol.

Ces nanoclusters d'or, préparés selon la méthode apportée par Xie *et al.*^[53] ont la particularité de présenter une structure cœur/coquille avec un cœur de Au⁰ et une coquille de complexes Au¹⁺—thiolate. Xie *et al.* montrent d'ailleurs que ces derniers présentent une émission de fluorescence induite (ou plutôt exaltée) par leur agrégation. Les auteurs proposent des mécanismes de transfert de charge du ligand vers le métal pour expliquer la fluorescence des agrégats. Des charges provenant de l'atome de soufre du ligand thiolate sont transférées à l'atome d'Au et déclenchent finalement un mécanisme de relaxation radiative^[57]. Selon les auteurs, la similarité entre les AuNC-GSH et les agrégats de complexes Au¹⁺—thiolate en matière de temps de vie de fluorescence et de spectre d'émission suggèrent que le mécanisme d'émission constaté avec les AuNC-GSH provient de l'agrégation de complexes Au¹⁺—thiolate à leur surface. Ces propriétés de fluorescence sont très remarquables, cependant il faut noter que le rendement quantique de fluorescence reste très inférieur à celui des QD. La stabilité de l'or par rapport aux semi-conducteurs pourrait être un atout dans les assemblages visés dans le cadre de cette thèse.

Partie II. Auto-assemblage des nanoparticules : l'apport du biomimétisme

Actuellement on peut distinguer deux axes forts de la recherche sur les NP : l'un cherche à créer des assemblages à 1, 2 ou 3 dimensions dans lesquels on cherche à identifier des propriétés collectives optiques. Le second exploite et manipule des particules uniques dans les nanostructures, ceci à des fins de miniaturisation pour l'électronique ou l'optique^[58]. Nous décrivons dans cette partie les méthodes utilisées pour assembler spontanément des

nanoparticules en structures organisées à 1, 2 et 3 dimensions. Dans ce domaine, le monde du vivant est le lieu de prédilection d'un phénomène appelé l'auto-assemblage. C'est un phénomène fondamental qui y génère de l'organisation structurale à toutes les échelles, depuis le repliement des protéines ou la formation de la membrane cellulaire^[59] jusqu'à l'organisation des modèles météorologiques^[60].

Il s'agit d'un processus par lequel des composants indépendants (des molécules ou des nanoparticules, par exemple) s'organisent spontanément en structures ordonnées caractérisées par une énergie libre minimale. Durant les deux dernières décennies, les acteurs de la science des matériaux se sont attachés à s'inspirer des exploits de la nature. Ainsi, l'auto-assemblage de NP permet de former des matériaux avec un très haut degré de précision et de complexité pour développer des fonctions nouvelles de reconnaissance, de transport, de catalyse ou encore de réponse à des stimuli^[59].

Dans cette partie, nous présenterons des procédés d'auto-assemblage qui ont été mis au point pour former des structures ordonnées à partir de NP semi-conductrices ou métalliques. Finalement, nous montrerons différentes approches utilisant des biomolécules, dont les propriétés d'organisation sans pareil permettent un contrôle fin de l'interdistance entre NP assemblées.

A. Auto-assemblage par évaporation de solvant

En 2008, Shevchenko et Talapin rapportaient que l'approche la plus populaire pour la formation de superstructures ordonnées de NP semi-conductrices consiste à disperser les particules dans un solvant approprié puis d'augmenter de façon progressive la concentration des particules par évaporation du solvant^[61]. Cette stratégie est intéressante car la nature des assemblages obtenus peut être modifiée en changeant la concentration en NP, le solvant, la température d'évaporation ou le substrat utilisé.

A.1 Structures 1D

Ainsi, des nanofils semi-conducteurs peuvent être formés à partir de nanocristaux isotropes présentant un grand moment dipolaire. En effet, il a été montré en 2007 que des QD de CdSe ou PbSe ont tendance, en solution, à former des chaînes^[62]. Au sein de ces chaînes, les NP peuvent fusionner à travers un mécanisme d'attachement orienté entre faces

crystallines équivalentes et qui permet de former des nanofils monocristallins^[63,64]. La force motrice à l'origine de la formation unidirectionnelle de ces nanofils a été identifiée comme étant l'anisotropie dans la structure cristalline ou dans la réactivité de surface de ces QD^[61]. Ces auto-assemblages 1D permettent d'obtenir de larges quantités de nanofils semi-conducteurs cristallins et dont les dimensions et la morphologie peuvent être contrôlées (Figure 8).

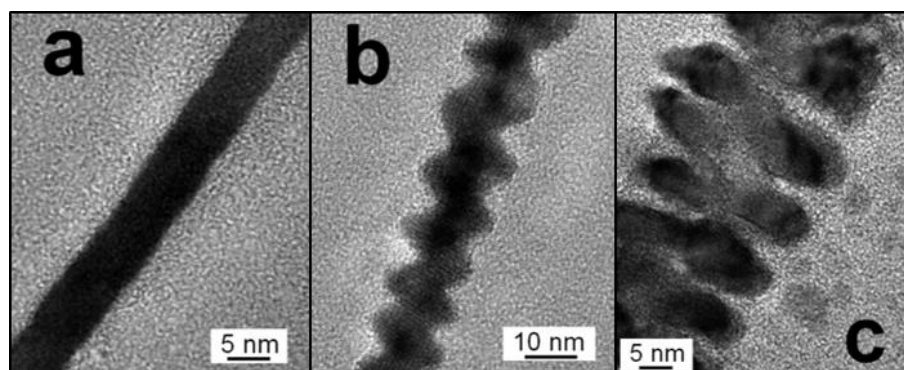


Figure 8. Images TEM de nanofils de PbSe avec une morphologie (a) droite, (b) en zigzag ou (c) à embranchements. Extrait de [65].

A.2 Structures 2D

L'auto-assemblage par évaporation de solvant a aussi permis la mise au point de structures 2D formées par des NP sphériques. Là aussi, la structure des assemblages formés peut être modifiée en changeant la concentration en NP, le solvant, la température et le substrat. L'évaporation de solvant est ici une stratégie particulièrement intéressante car il est possible d'obtenir des superstructures 2D sous forme de monocouche et de grande ampleur. L'interdistance entre les NP assemblées est déterminée par la longueur des ligands de surface utilisés et peut donc être ajustée en modifiant la nature des stabilisants. De nombreux travaux ont été réalisés dans ce sens avec des QD, dont notamment ceux de Talapin^[61] (Figure 9a et b). En ce qui concerne les nanoparticules métalliques, le groupe de Murphy a montré l'auto-assemblage de nanoparticules d'or de différentes morphologies par séchage de solutions aqueuses. En augmentant la température d'évaporation et en variant la tension interfaciale, ils ont pu obtenir des nano-anneaux de AuNP^[66] (Figure 9c).

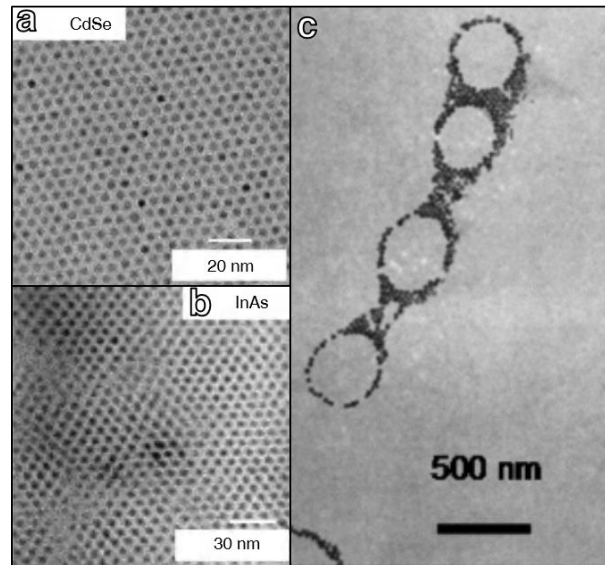


Figure 9. Nanostructures 2D formées par séchage de (a) QD CdSe et de (b) QD InAs (extraits de [61]). (c) Nano-anneaux de AuNP (extrait de [66]).

A.3 Structures 3D

La stratégie d'assemblage par séchage est aussi pertinente pour la formation de « super-réseaux » composés de NP ordonnées sur des étendues de plus ou moins grande ampleur. On parle alors de solides qui peuvent être cristallins ou non. La formation de solides amorphes résulte d'un ordre à courte distance et de NP orientées de façon aléatoire et peuvent être obtenus avec une polydispersité de taille importante et une évaporation très rapide^[67].

Pour la formation de super-réseaux de NP présentant une structure cristalline à longue portée, les conditions de croissance sont très importantes. Il a notamment été rapporté qu'une croissance lente favorise la cristallisation. À nouveau, cela revient à optimiser les paramètres tels que la température d'évaporation et la composition du milieu.

A.4 Séchage de nanoparticules anisotropes

L'auto-assemblage par évaporation de solvant est une méthode largement utilisée pour la formation de nanostructures périodiques à base de NP anisotropes, particulièrement de QR^[68]. L'auto-assemblage de nanobâtonnets est moins favorable du point de vue entropique que pour des NP sphériques, du fait que cet auto-assemblage nécessite d'organiser la position et l'orientation de chaque nanobâtonnet^[61]. Toutefois, il est établi qu'un ensemble de NP anisotropes (en forme de bâtonnet) peut prendre la forme d'au moins 4 phases

stables, à savoir celle d'un fluide isotrope, d'un cristal liquide nématique, d'un solide cristallin et d'une phase smectique (Figure 10).

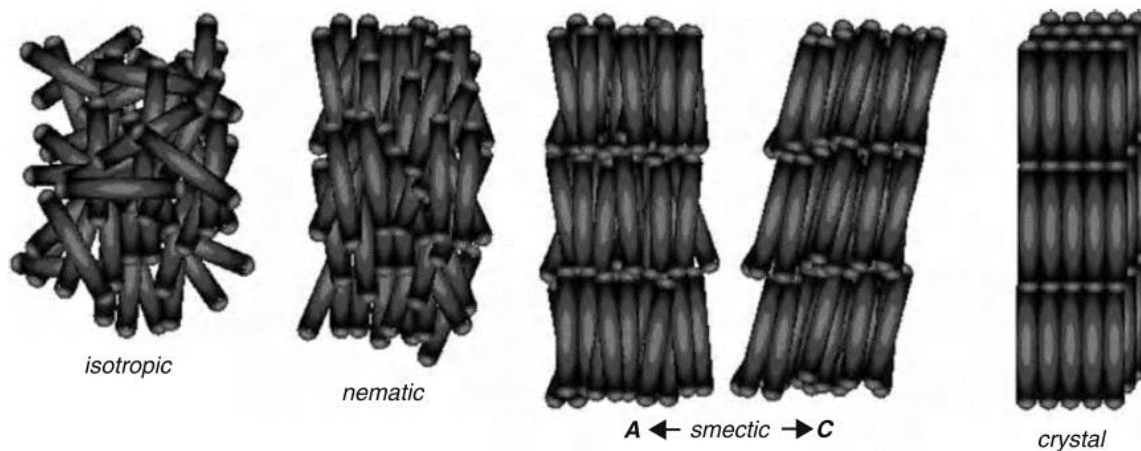


Figure 10. Représentation schématique des assemblages typiques de NP en forme de bâtonnets avec différents degrés d'organisation (extrait de [61]).

En 2004, les travaux de Weller *et al.* ont montré que le séchage rapide d'une suspension concentrée de QR CdSe monodisperses dans le toluène permet de former des solides organisés en phase nématique^[69] (Figure 11a). Les assemblages de QR sont modifiés en ajoutant du méthyl *tert*-butyl éther à la suspension de QR concentrée. Son séchage sous pression réduite permet aux QR de s'assembler en longues cartouches parallèles entre elles et formant des superstructures en phase smectique-A (Figure 11b).

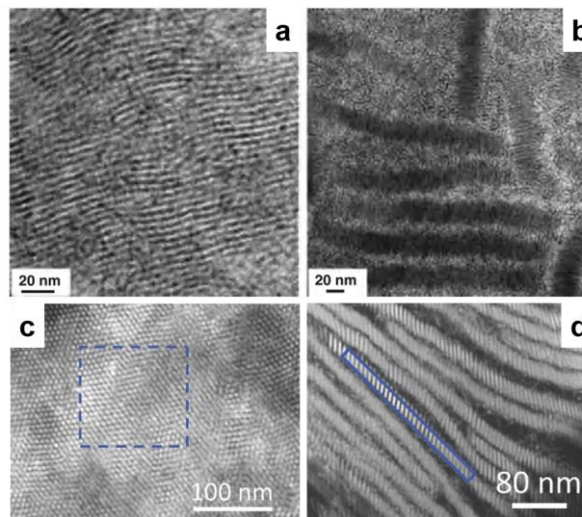


Figure 11. Assemblages de QR CdSe par évaporation d'une suspension en solvant organique s'organisant selon une phase (a) nématique et (b) smectique (extraits de [69]). (c et d) Auto-assemblage de QR par évaporation d'une solution aqueuse et s'organisant selon un arrangement smectique-B.

L'auto-assemblage de QR peut aussi être effectué par séchage de suspensions aqueuses. Par exemple, au laboratoire, il a été montré que des QR CdSe/CdS fonctionnalisés avec des ligands peptidiques peuvent, après séchage dans un environnement microstructuré, s'assembler en supercristaux au sein desquels les QR suivent un arrangement smectique-B^[70] (Figure 11c et d). Une approche similaire a été également utilisée pour l'auto-assemblage de GNR fonctionnalisés avec des ligands PEGylés^[71]. Ces NP anisotropes s'organisent, après évaporation, en phase smectique-B elles aussi. Cette approche pour l'auto-assemblage de NP anisotropes en solutions aqueuses est très performante mais elle aboutit sur des interdistances faibles et difficilement ajustables car elles sont limitées par la taille des ligands de surface utilisés.

B. Auto-assemblage dirigé par des biomolécules

L'approche consistant à utiliser des biomolécules comme médiateurs d'auto-assemblage de nanoparticules trouve sa force dans leurs les propriétés tout à fait exceptionnelles. En particulier, la sélectivité d'un assemblage de biomolécules et la versatilité des méthodes expérimentales permettant de manipuler leurs structures les rendent particulièrement attractives pour construire des superstructures complexes. En couplant des biomolécules aux NP on peut ainsi tenter de transférer ces propriétés exceptionnelles aux particules par un codage d'acides aminés ou d'ADN.

Dans cette partie nous souhaitons rendre compte de la puissance de l'approche biologique dans l'auto-assemblage de NP. Sans vouloir établir un compte-rendu exhaustif de la littérature à ce sujet, nous présentons l'auto-assemblage de NP métalliques ou semi-conductrices à l'aide d'ADN, de virus ou de protéines.

B.1 Les nanomatériaux à ADN

La recherche en nanotechnologie basée sur l'ADN a commencé par la construction de structures relativement souples ramifiées ou topologiques, pour aboutir à la fabrication de structures ADN avec des croisements plus rigides et de plus en plus complexes^[72]. Ces travaux ont été facilités par les nombreux outils développés pour la production rapide et à bas coût de brins d'ADN plus ou moins longs. Les interactions entre nucléotides (adénine—thymine et guanine—cytosine) offrent un système simple et robuste pour le design de nanostructures complexes.

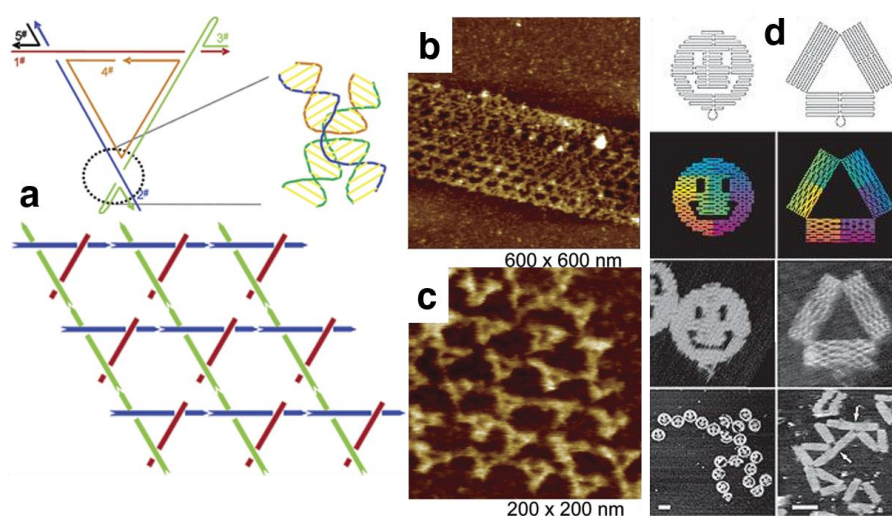


Figure 12. (a) Représentation schématique d'une structure de tensegrité de triangles d'ADN (b et c) observée par AFM (extraits de [73]). (d) Représentations schématiques de deux structures d'ADN en origami caractérisées par AFM (extraits de [74]).

Deux sauts qualitatifs ont été effectués en 2004 et 2006 respectivement par Seeman *et al.* et par Rothmund. Les premiers sont parvenus à former des cristaux d'ADN dont la rigidité et la périodicité sont assurées par leur aptitude à se réticuler et s'apparier de façon très spécifique. Ces structures diffractent les rayons X avec une haute résolution^[73,75] (Figure 13a—c). Rothmund a, quant à lui, été le premier à présenter les origamis d'ADN,

c'est-à-dire des structures 2D pouvant adopter des formes très diverses en jouant sur le repliement d'un seul brin d'ADN^[74] (Figure 13d).

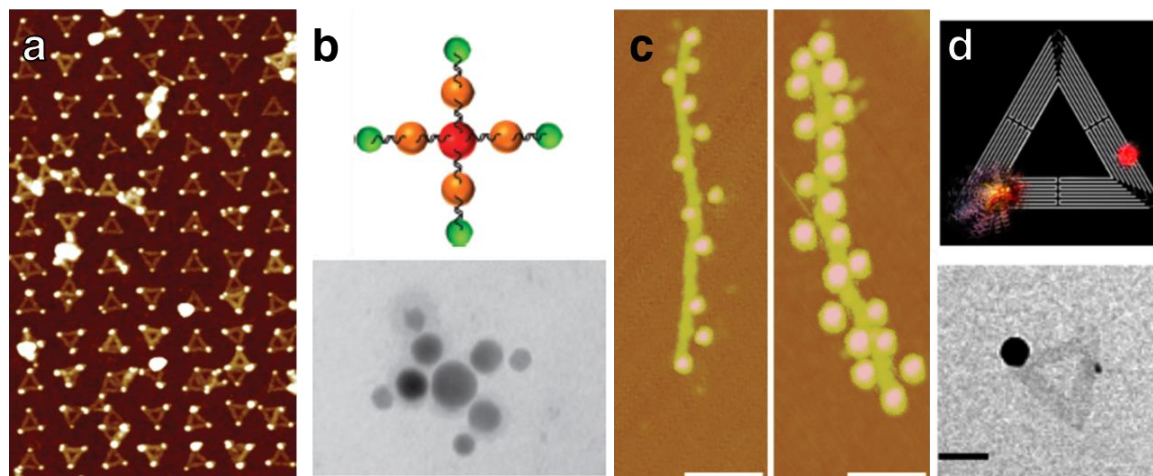


Figure 13. (a) Image AFM de AuNP auto-assemblées sur des origamis d'ADN triangulaires (extraite de [76]). (b) Représentation schématique et image TEM de QD de différents diamètres auto-assemblés par des brins d'ADN (extraites de [77]). (c) Image AFM de QD auto-assemblés sur des origamis d'ADN en forme de tubes (extraite de [78]). (d) Représentation schématique et image TEM d'une paire QD—AuNP auto-assemblée sur un origami d'ADN triangulaire (extraites de [79]).

Souhaitant bénéficier du caractère bien défini de ces nanostructures, de nombreux travaux ont été réalisés pour l'auto-assemblage de NP inorganiques induit par appariement de brins d'ADN. Les groupes de Mirkin et de Alivisatos ont su exploiter cette stratégie pour mettre au point l'auto-assemblage de AuNP ou de QD^[80,81] ou même l'auto-assemblage hybride entre ces deux types de NP^[82]. Des brins d'ADN auxquels sont ajoutés des groupements thiols sur leur extrémité 3' ou 5' ont été utilisés pour la fonctionnalisation de AuNP et des structures bien définies ont été mises au point à l'aide d'origamis (Figure 13a). La fonctionnalisation de QD est moins facile à cause de l'interaction moins forte entre leur surface et des brins d'ADN thiols^[72]. On retrouve toutefois les travaux spectaculaires de l'équipe de Kelley^[77] montrant l'auto-assemblage contrôlé de QD (Figure 13b) et aussi la mise à profit des origamis d'ADN pour l'auto-assemblage de QD par Hughes *et al.* (Figure 13c). Finalement, des QD et des AuNP peuvent être aussi auto-assemblés par des brins d'ADN. À ce titre, les travaux de Sun et Gang ont montré des super-réseaux 3D de QD et AuNP dont la caractérisation par diffusion des rayons X a mis en évidence une structure cristalline cubique centrée^[83]. Les origamis d'ADN (Figure 13d) permettent la mise au point de structures hybrides QD—AuNP^[79].

B.2 Les virus

Au cours des deux dernières décennies, les virus se sont révélés être des outils puissants pour les nanotechnologies. Du point de vue de l'évolution, les virus sont parvenus à protéger leur matériel génétique de l'environnement hostile qui les entoure en développant une coquille protéique auto-assemblée, appelée capsid, de forme et de géométrie variées^[84]. De plus, les virus bénéficient d'une excellente biocompatibilité et la nature protéique de leur capsid induit la présence de groupements chimiques disponibles. Cela permet aux nanomatériaux inorganiques d'être fixés à des endroits bien définis selon une disposition symétrique^[85]. Ces propriétés en font ainsi un support particulièrement intéressant pour la formation de nanomatériaux auto-assemblés.

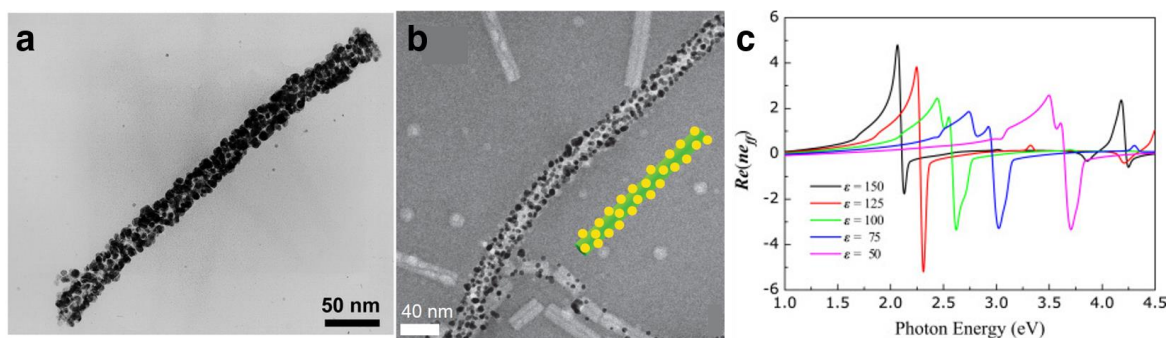


Figure 14. (a) Image TEM d'un TMV recouvert de AuNP (extraite de ^[86]). (b) Image TEM d'un TMV modifié avec un peptide favorisant la croissance de AuNP et formant ainsi une structure virus—AuNP chirale (extraite de ^[87]). Calcul théorique de l'indice de réfraction négatif d'un réseau cristallin composé de capsides virales et de AuNP (extrait de ^[88]).

Les travaux pionniers datent du début des années 2000 et ont montré la minéralisation des virus sphériques tels que le virus de la marbrure de niébé à travers les travaux remarquables de A. Szuchmacher Blum^[89] ou le virus de la mosaïque du tabac^[90] (TMV). On retrouve également les travaux de l'équipe de Mann qui ont montré la synthèse de NP d'Ag, Pt ou Au sur la partie interne ou externe du TMV^[86] (Figure 14a). Plus récemment, l'utilisation des virus est arrivée à un niveau de maîtrise suffisant pour les intégrer dans le guidage et l'amplification de radiations. Le développement des métamatériaux à base de virus en sont un bon exemple. L'ingénierie génétique permet de modifier la structure de ces virus afin que les matériaux obtenus présentent des propriétés optiques contrôlées telles que des indices de réfraction négatifs ou de la chiralité (Figure 14b et c).

B.3 Protéines et peptides

À une échelle plus réduite que les virus, la composition en acides aminés des protéines et des peptides fait que ces biomolécules se prêtent à une chimie très variée. Pour les protéines, ces biomolécules présentent des structures tridimensionnelles localement adoptées par au moins une partie de leur séquence peptidique et qui correspond à leur structure secondaire. Ces structures locales, hélices α et feuillets β , sont définies par les liaisons hydrogène à l'intérieur de la séquence. On parle ensuite de structure tertiaire des protéines pour définir la position relative dans l'espace des différents éléments de structures secondaires les uns par rapport aux autres. Les acides aminés, unité de base des protéines, contiennent des groupes fonctionnels sur leurs chaînes latérales (par exemple, $-\text{NH}_2$ dans la lysine et l'arginine, $-\text{COOH}$ dans les acides glutamique et aspartique, et $-\text{SH}$ dans la cystéine). Ces sites actifs sont souvent utilisés pour l'adsorption de protéines modifiées sur la surface des nanoparticules^[91].

De façon similaire à ce qui peut être réalisé avec les brins d'ADN, ces deux types de biomolécules peuvent être utilisés pour induire l'auto-assemblage de nanoparticules de deux façons. Un peptide, ou une protéine, peut être utilisé en tant que gabarit moléculaire qui permet de fixer plusieurs NP et ainsi de les assembler. Aussi, des protéines greffées sur des NP peuvent induire leur auto-assemblage à l'aide d'une reconnaissance moléculaire spécifique.

B.3.i. Peptides

Les peptides peuvent s'assembler en structures supramoléculaires nanométriques telles que des nanotubes, des rubans hélicoïdaux ou des assemblages réguliers de fibres^[92]. Cette propriété a été mise à profit par l'équipe de Rosi qui a utilisé un peptide amphiphile pouvant se replier en double hélice pour l'auto-assemblage de AuNP synthétisées *in situ* le long du peptide pour obtenir des nanostructures plasmoniques chirales^[93] (Figure 15a). Plus récemment, Pochan *et al.* ont utilisé la même approche avec des nanotubes peptidiques riches en résidus cystéine permettant de synthétiser et d'auto-assembler des AuNP^[94]. Aussi, les fibres de collagène ont été utilisées par Matsui *et al.* pour l'auto-assemblage de AuNP en des réseaux 3D à l'aide d'unités biotine intégrées dans les fibres pour fixer la streptavidine fixée sur les AuNP^[95]. Les structures biomimétiques obtenues forment un maillage de fibres

peptidiques qui rassemblent des AuNP de différentes tailles (jusqu'à 30 nm de diamètre) au sein d'un assemblage très dense (Figure 15b).

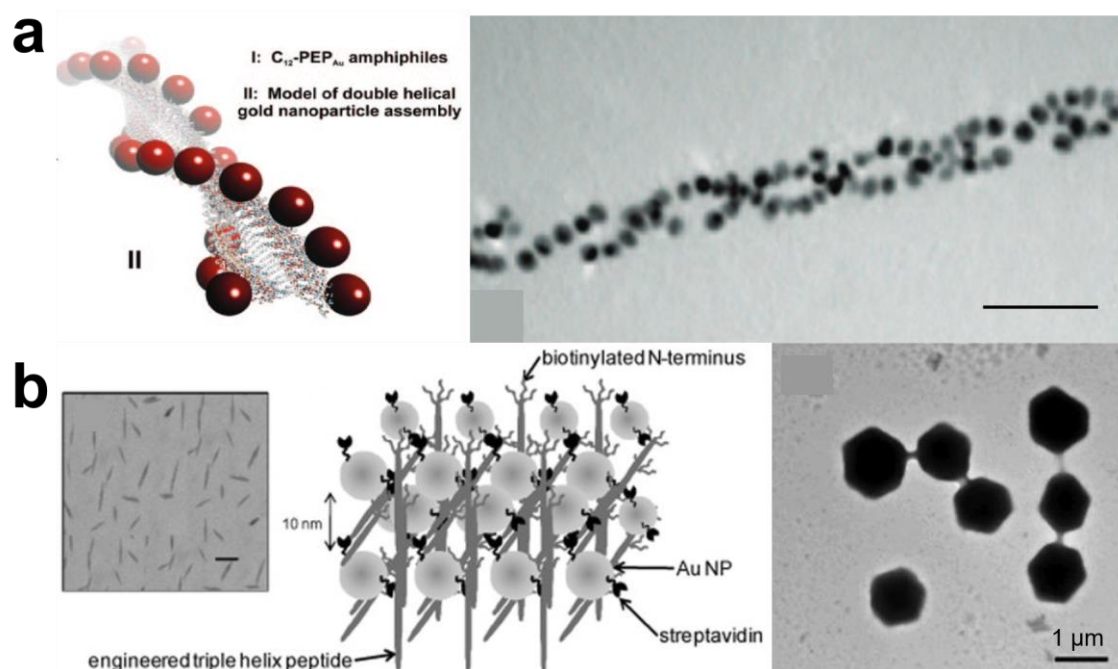


Figure 15. (a) Principe et image TEM de l'auto-assemblage de AuNP synthétisées et disposées le long d'une double hélice peptidique (extraits de [93]). (b) Auto-assemblage de AuNP au sein d'un maillage très dense de fibres d'un peptide biotinylé (extraits de [95]).

B.3.ii. Protéines naturelles

Certaines protéines naturelles présentent une affinité très forte pour une cible moléculaire qui peut être mise à profit pour l'auto-assemblage de NP. Un premier exemple très célèbre concerne la streptavidine et l'avidine qui détiennent une affinité très forte pour une petite molécule organique appelée biotine (Figure 16a). Pour leur utilisation en biologie moléculaire ou pour la mise au point de nanostructures inorganiques, la streptavidine est souvent préférée à l'avidine car elle possède une plus grande stabilité et une plus grande affinité pour la biotine avec une constante d'affinité de l'ordre de 10^{-14} mol/L^[96]. En 1999, Connolly et Fitzmaurice sont parvenus à l'auto-assemblage de AuNP biotinyllées reliées entre elles par des liaisons biotine—streptavidine—biotine (Figure 16b et c). En 2005, l'auto-assemblage de nanoparticules anisotropes (GNR) a été réalisé à l'aide du même couple de biomolécules par Gole et Murphy et ces travaux ont montré un assemblage qui s'opère préférentiellement entre pointes de GNR^[97]. Toutefois, le couplage de

nanoparticules par l'interaction streptavidine—biotine trouve sa limite dans le fait qu'il n'est pas réversible. La streptavidine reste toutefois très utilisée pour la fonctionnalisation de NP puisque des biomolécules telles que l'ADN peuvent être biotinylées pour faciliter leur greffage sur des nanoparticules fonctionnalisées avec de la streptavidine^[91,98].

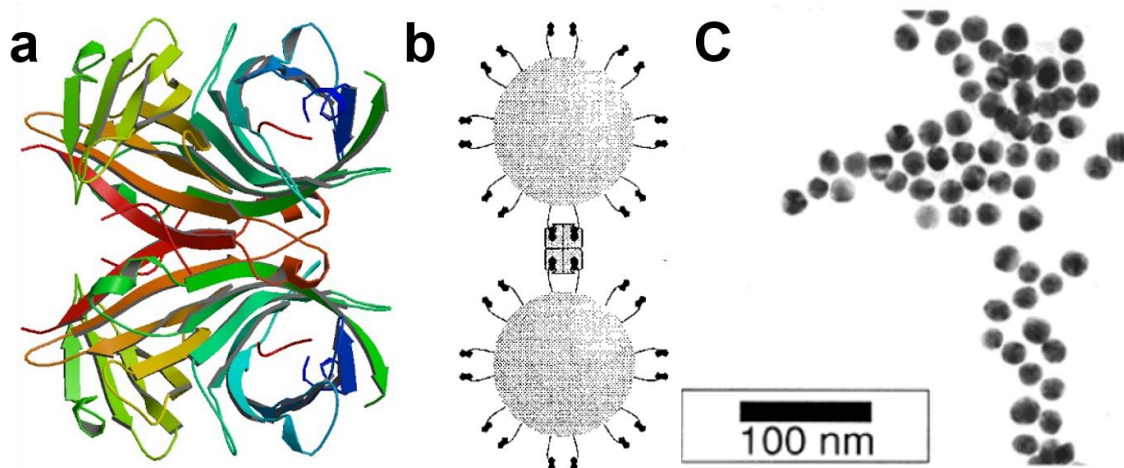


Figure 16. (a) Structure en rubans de la streptavidine tétramérique. (b) Représentation schématique et (c) image TEM de l'auto-assemblage de AuNP biotinylées reliées par une streptavidine tétramérique (extraits de [99]).

Le couple de protéines naturelles barnase/barstar peut lui aussi être envisagé comme une sorte de « glue moléculaire » universelle permettant d'assembler des nanoparticules. En effet, ces protéines naturelles peuvent former un complexe barnase—barstar très stable^[100]. En 2010, l'équipe de Deyev a montré la mise au point de nanostructures bifonctionnelles formées en auto-assemblant des QD et des nanoparticules magnétiques à l'aide de ce couple de protéines^[101]. Les assemblages ainsi formés ont montré des résultats satisfaisants pour la bio-imagerie. Comme l'ont montré Kataoka *et al.* dès 2001, ainsi que d'autres équipes^[102], une seule protéine peut suffire à induire l'auto-assemblage de nanoparticules inorganiques^[103]. Dans les travaux de Kataoka *et al.*, des AuNP fonctionnalisées avec un sucre (le lactopyranoside) permettent de détecter une lectine qui le fixe et qui induit leur auto-assemblage.

Finalement, les anticorps constituent une option très attrayante pour la mise au point de nanostructures auto-assemblées. La très grande affinité d'un anticorps avec son antigène rend ce modèle robuste et très similaire à l'action de la streptavidine pour la biotine. Par exemple, Davis et Mann ont développé un système d'auto-assemblage de AuNP et d'AgNP reposant sur la fonctionnalisation de ces nanoparticules avec des anticorps^[104]. Le mélange

de ces NP avec des antigènes « double face » induit leur assemblage (Figure 17a). Pour la biodétection de l'immunoglobuline G (IgG) de chèvre, Su *et al.* ont fonctionnalisé des GNR avec un anticorps anti-IgG qui entraîne l'agrégation des GNR au contact de l'IgG^[105] (Figure 17b).

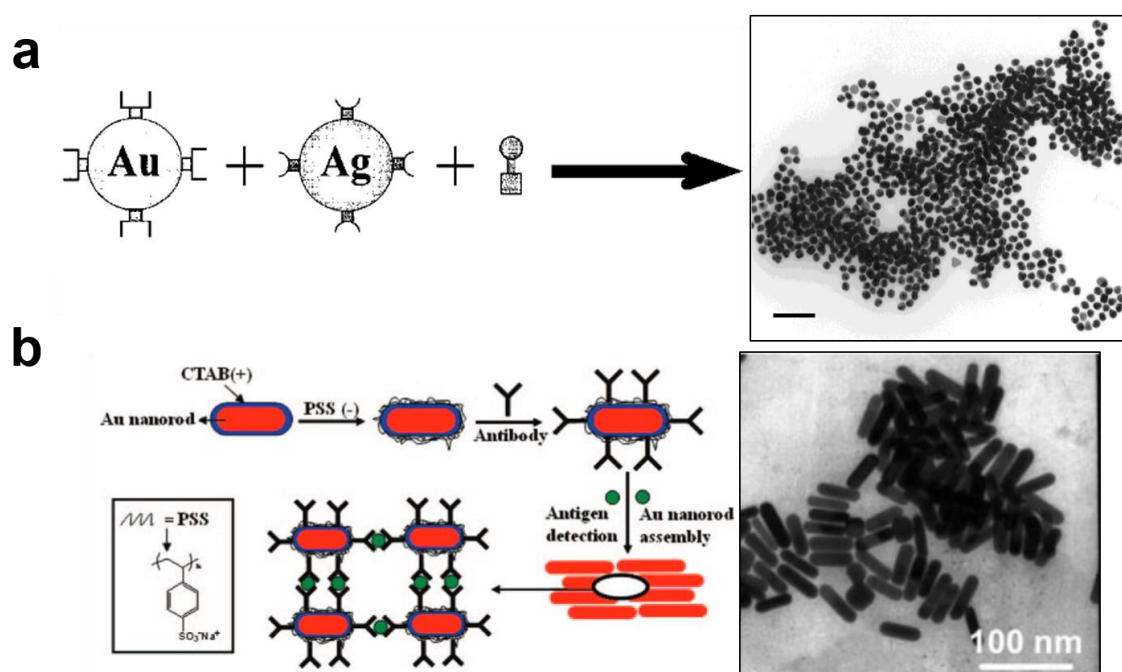


Figure 17. (a) Principe et image TEM de l'auto-assemblage de AuNP et AgNP induit par la reconnaissance entre des anticorps et un antigène « double face » (modifiés depuis [104]). (b) Principe et image TEM de l'auto-assemblage de GNR induit par la reconnaissance entre l'IgG et son anticorps (extraits de [105]).

B.4 Conclusion partielle

Les biomolécules proposent des voies prometteuses pour l'auto-assemblage contrôlé de NP, dont certains exemples ont été présentés ci-dessus. De nouveaux systèmes sont développés et permettent de dépasser les limites de la stratégie par évaporation de solvant. Toutefois, des limites peuvent être rencontrées avec les médiateurs d'auto-assemblages de petite taille (peptides, oligonucléotides) et avec les entités les plus grandes (protéines, brins d'ADN ou virus). Par exemple, l'organisation spatiale de NP par des peptides est difficile à réaliser car les peptides les plus courts ne présentent pas de structures 3D stables et les peptides les plus longs détiennent des structures 3D difficiles à prédire. Concernant les technologies ADN, celles-ci présentent les résultats qui sont très certainement les plus prometteurs grâce au haut degré de contrôle qu'elles permettent d'atteindre. Toutefois, on peut déplorer la chimie restreinte aux bases nucléiques que l'ADN propose par rapport aux protéines. Les acides nucléiques (ADN et ARN) sont tous construits sur un même squelette

ribose—phosphate polyanionique avec 4 bases azotées différentes. Bien que les technologies ADN en fassent une glue moléculaire très performante, l'ADN n'est pas un matériau fonctionnel. Il s'agit d'une très bonne structure qui peut être désignée à façon mais ses propriétés intrinsèques sont assez pauvres. Aussi, dans leur revue publiée en 2011, Yan *et al.* indiquent que les technologies ADN souffrent de leur prix et de leur taux d'erreur d'assemblage élevés^[72]. Malheureusement, alors que le coût du séquençage a diminué rapidement au fil du temps, le coût de la synthèse d'oligonucléotides n'a pas suivi la même évolution^[106,107]. Toutefois, le développement des nanostructures d'ADN (origamis, mailles 3D, etc.) a permis de combler le manque de rigidité des premières structures d'ADN et ces objets restent des outils prometteurs puissants et très sophistiqués pour le contrôle de l'auto-assemblage de NP inorganiques^[108].

En parallèle, les protéines présentent des excellentes propriétés pour la structuration des nanomatériaux. Elles permettent aussi de fournir une chimie complexe en association avec des molécules organiques mais également avec des matériaux inorganiques. En parallèle, des systèmes auto-assemblés sont développés à partir de protéines (enzymes, anticorps ou protéines plus traditionnelles) qui démontrent des propriétés de reconnaissance très fortes pour leur cible moléculaire (streptavidine/biotine, barnase/barstar). Toutefois, ces modèles présentent des limites : l'association 1:1 est difficile à dépasser et l'interdistance entre NP assemblées est déterminée par la taille du complexe moléculaire, cette dernière n'étant pas modifiable. Sur une échelle plus grande, les virus agissent comme des gabarits pour l'auto-assemblage de NP et l'interdistance obtenue est difficilement contrôlable. En réponse à ces limitations, de nouveaux systèmes protéiques sont développés à partir de protéines mises au point par ingénierie génétique. Ces protéines artificielles constituent de nouveaux modèles alternatifs pour l'auto-assemblage de NP qui sont présentés dans la Partie IV.

Partie III. Des propriétés optiques nouvelles par le couplage de nanoparticules au sein d'un auto-assemblage

L'interaction entre une onde lumineuse et un ensemble de particules optiquement actives ou une structure périodique peut donner naissance à des effets et des propriétés photophysiques exceptionnelles. À titre d'exemple, les propriétés optiques des NP métalliques plasmoniques sont radicalement modifiées lorsque des AuNP ne sont plus

indépendantes. Dans un ensemble, à une distance suffisamment proche, ces NP se voient et interagissent optiquement^[109]. Ceci est dû au couplage entre les oscillations des plasmons des particules qui interagissent. Ainsi, des systèmes nouveaux, consistant à coupler des NP plasmoniques, présentent une très forte sensibilité aux modifications dans la géométrie du couplage^[110]. De cette façon émerge l'idée de modifier et de contrôler les propriétés des matériaux en couplant chimiquement des NP individuelles pour les maintenir à une distance proche. De quelques nanomètres à quelques dizaines de nanomètres, les couplages plasmoniques et/ou excitoniques peuvent être efficaces dans une structure de géométrie contrôlée avec une structure périodique. Dans cette partie, nous illustrerons quelques-unes des propriétés optiques issues du couplage entre particules optiquement actives.

A. Couplage de particules semi-conductrices

Les QD, dont la fluorescence est facilement ajustable, sont très attractifs. pour le développement de superstructures qui ouvrent de nouvelles possibilités en nanophotonique^[111] et en photodétection^[112], notamment les LED et les cellules photovoltaïques^[113,114]. En effet, le développement de superstructures composées de NP semi-conductrices fluorescentes peut être la source de nouveaux phénomènes optiques.

A.1 Transfert d'énergie par résonance de type Förster

Le couplage entre deux luminophores proches en distance (colorants organiques, NP ou protéines fluorescentes) peut donner lieu à un processus transfert d'énergie par résonance de type Förster (en anglais *Förster Resonance Energy Transfer*, FRET). Ce transfert vient du couplage entre le dipôle de transition à l'état excité et l'état fondamental des luminophores. Ce mécanisme prend place entre un donneur de fluorescence et un accepteur d'énergie plus basse et peut se propager de proche en proche dans un ensemble de luminophores^[115]. Cette interaction non radiative s'effectue à certaines conditions. D'abord, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir le spectre d'absorption de l'accepteur. De plus, ce phénomène est en général plus efficace lorsque la distance entre donneur et accepteur est de l'ordre de 20 à 60 Å^[116] mais une interdistance de 1 à 10 nm reste suffisante^[117]. La distance optimale du FRET est caractérisée par R_0 (la distance Förster) qui est la distance à laquelle l'efficacité du transfert d'énergie est de 50 %^[115,117].

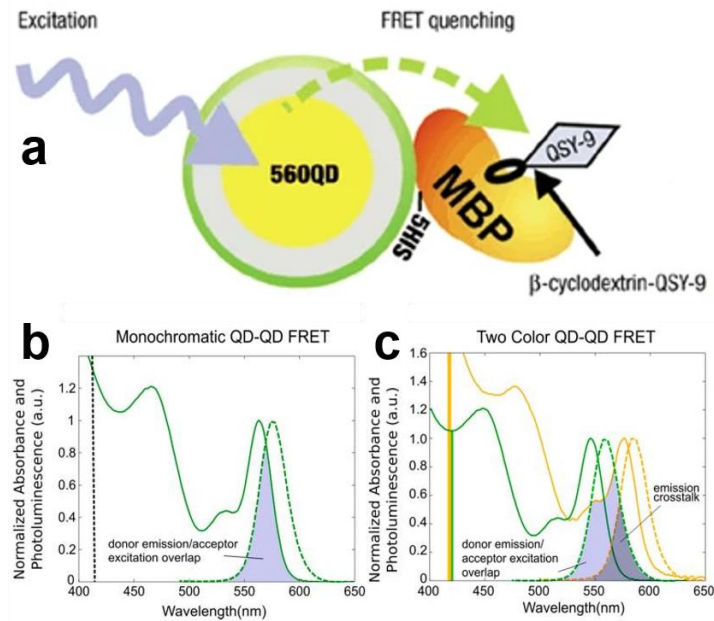


Figure 18. (a) Représentation schématique d'un biocapteur basé sur un FRET entre des QD émettant à 560 nm et le QSY-9 greffé sur une protéine (la MBP) extrait de [118]. Superposition des spectres d'émission et d'absorption (b) d'une population de QD CdSe/ZnS de 3,3 nm de diamètre pour du FRET monochromatique et (c) de deux populations de QD (2,9 nm et 3,7 nm)

Comme il a été montré en 2003 par l'équipe de Mattoussi, un FRET peut se produire entre des QD et une molécule accepteur d'énergie (se comportant comme tueuse de fluorescence car non luminescente), servant ainsi de modèle de biocapteur utilisant le FRET comme inducteur de signal et des QD comme donneurs d'énergie^[118] (Figure 18a). Toutefois, les nanocristaux semi-conducteurs peuvent être envisagés comme des donneurs et accepteurs d'énergie dans un même système. Une première configuration consiste en un *homotransfert* (ou homo-FRET) : il s'agit là d'un transfert d'énergie entre plusieurs copies d'une même entité, ici d'une même population de QD (voir Figure 18b). C'est un phénomène bien connu et bien étudié pour les fluorophores organiques^[119] et qui a notamment été démontré et exploité avec les QD par les équipes de Klimov, de Bawendi et de Talapin^[120-122]. Cet homo-FRET provient de la distribution de tailles de nanocristaux, qui existe même pour des populations monodisperses. Ce phénomène peut prendre place pour tous les types de nanocristaux tels que CdTe^[123,124], CdSe^[121], PbS^[120] ou InP^[125]. De ce fait, il existe un recouvrement entre le spectre d'émission des QD légèrement plus gros et le spectre d'absorption des QD légèrement plus petits. Ce phénomène est tellement efficace qu'une différence en énergie de 55 meV suffit à induire un transfert entre des QD CdSe donneurs et des QD CdSe accepteurs^[121]. En résulte l'extinction de la fluorescence des QD plus gros au profit de l'exaltation de la fluorescence des QD plus petits. À l'échelle

macroscopique, ce phénomène est caractérisé par un décalage vers le rouge et un amincissement du pic de fluorescence de l'échantillon de QD (Figure 19). Toutefois, l'homo-FRET souffre d'un manque de sensibilité : lors du transfert d'énergie, l'émission gagnée par les QD accepteurs est très largement excédée par leur excitation directe. Ceci limite ce système pour son utilisation dans les biocapteurs^[126].

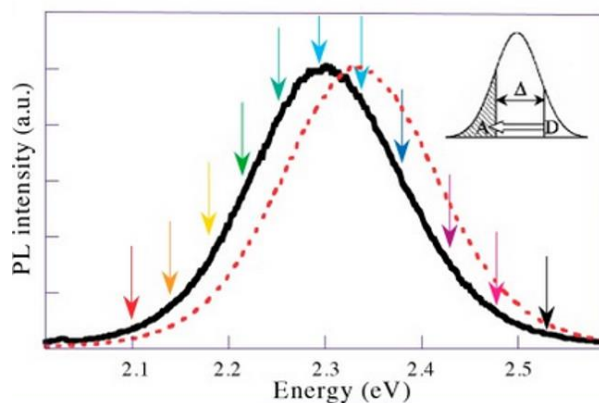


Figure 19. FRET prenant place au sein d'une population de QD monochromatique : les QD de plus haute énergie donnent de l'énergie aux QD de plus petites énergies au sein d'une population inhomogène. Le spectre d'émission des QD couplés (en pointillés rouges) est décalé vers le rouge (extrait de [121]).

Une autre configuration de FRET entre QD est celle de *l'hétérotransfert* (ou hétéro-FRET). Ici, du FRET est observé entre deux populations de différentes tailles. Ces QD présentent une différence de taille suffisante pour qu'une population (les plus petits QD) corresponde aux donneurs et l'autre population (les plus grands QD) aux accepteurs d'énergie. Quand le FRET se produit, l'émission des QD les plus petits s'efface au profit du signal de fluorescence des QD les plus grands (Figure 20).

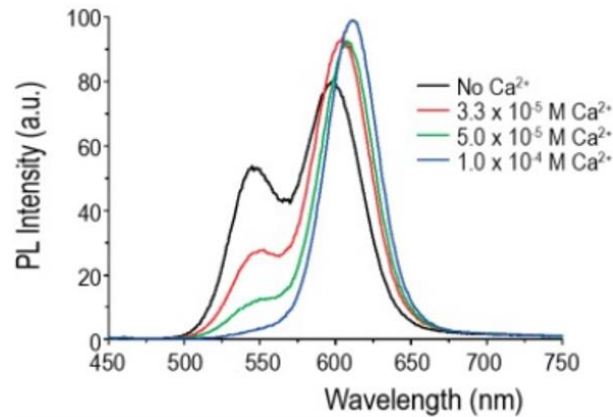


Figure 20. Hétéro-FRET : le spectre d'émission d'un mélange de QD verts et de QD rouges présente une diminution de l'émission des QD verts (donneurs) et une augmentation de l'émission des QD rouges (accepteurs) lors de leur agrégation par ajout d'ions Ca²⁺ (extrait de ^[123]).

La configuration de l'hétéro-FRET présente l'avantage de disposer de deux couleurs d'émission facilement différenciables et les changements en intensité de fluorescence sont plus prononcés. Cela donne lieu à des variations spectrales qui sont plus évidentes que celles de l'homo-FRET. Toutefois, comme pour la configuration de l'homo-FRET, il se pose le problème d'interférences en émission. En effet, l'excitation, typiquement dans l'UV, excite directement aussi bien les QD donneurs que les QD accepteurs. De plus, la section efficace d'absorption des QD accepteurs (de plus grands diamètres) est plus grande et donc génère un bruit de fond très important. Plusieurs solutions ont été développées, telles que l'emploi de QD CdSe/CdS « géants » sur lesquels plusieurs couches de CdS sont déposées afin de réduire l'homo-FRET^[127]. Il y a aussi la synthèse de QD dopés (par des ions Cu⁺ ou Mn²⁺) afin de modifier le temps de vie de l'émission des QD donneurs^[128].

A.2 Superradiance ou état d'émission cohérente dans un assemblage de QD

Formulé par Dicke en 1954, il s'agit d'une émission de rayons lumineux faite de manière cohérente par des atomes excités^[129] dans un ensemble. Contrairement au FRET qui ne fait intervenir que deux QD voisins, il s'agit d'un couplage collectif entre les dipôles transitoires des états excités des QD à longue distance qui génère un nouvel état radiant d'émission cohérente. La superradiance peut être mise en évidence pour des NP semi-conductrices (QD ou QR) lorsqu'elles sont considérées comme un système quantique couplé. À ces longues distances, les interactions dipolaires font que les QD ne se comportent pas comme

des objets individuels mais forment une seule entité collectivement. En 2007, Hommel *et al.* ont montré par spectroscopie de fluorescence qu'une monocouche de QD CdSe/ZnSe présente une signature spectrale spécifique. Ces échantillons montrent que les QD ont une réponse optique non plus individuelle mais collective issue de l'ensemble de QD^[130], la fluorescence est alors décalée vers le rouge et l'intensité de fluorescence est exaltée.

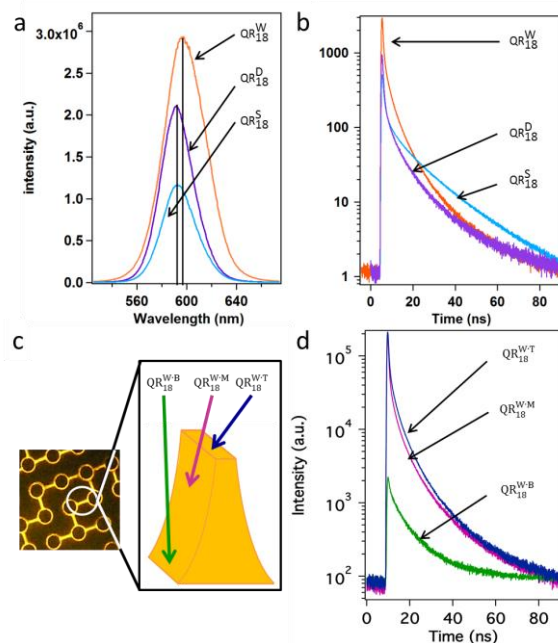


Figure 21. Observation de superradiance avec des QR de 18 nm de long. (a) Spectre d'émission de fluorescence de QD séchés dans un moule microstructuré (orange) comparé à ceux de QR en suspension (violet) et séchés (bleu). (b) Mesures de fluorescence résolue en temps sur les mêmes échantillons. (c) Propriétés optiques des assemblages de QR selon leur positionnement dans le moule. Travaux non publiés.

En collaboration avec l'IPR (université de Rennes1), E. Henry a montré pendant sa thèse que l'assemblage en 3D de QD élaboré avec une matrice constituée de membranes lipidiques et d'actines génère des propriétés de fluorescence particulière attribuées au phénomène de superradiance. La structure périodique du cristal 3D de QD modifie leur émission de fluorescence en la décalant vers des plus grandes longueurs d'onde et en augmentant son intensité^[131]. Dans ce cas, l'exaltation de la fluorescence des QD ne peut s'expliquer par un FRET car les interdistances sont bien supérieures à 10 nm. Au contraire, le phénomène de superradiance repose sur des interactions à longues distances qui sont en accord avec l'interdistance QD—QD mesurée dans ces travaux. De même, l'assemblage en structure smectique B de QR donne des propriétés optiques singulières mises en évidence lors du travail de thèse de T. Bizien (Figure 21). Dans ce dernier cas, une exaltation de fluorescence

est observée lorsque les nanobâtonnets sont ordonnés en 3D suivant un ordre smectique B avec une interdistance bien définie.

A.3 Effet laser

Les travaux sur le couplage de nanocristaux semi-conducteurs ont également ouvert la voie vers la fabrication de lasers à QD (appelés nanolasers)^[132]. Ces lasers sont intéressants grâce à leur seuil de fonctionnement particulièrement bas. Les QD actifs optiquement sont assemblés dans une phase condensée selon une structure périodique qui constitue le milieu amplificateur, de telle sorte que l'émission des QD devient stimulée. L'effet laser a été constaté lors de l'encapsulation de QD dans des sphères de silice par Stucky *et al.*^[133] (Figure 22a) et lors du confinement de QR CdSe/ZnS dans une microcavité cylindrique par Banin *et al.*^[134] (Figure 22b).

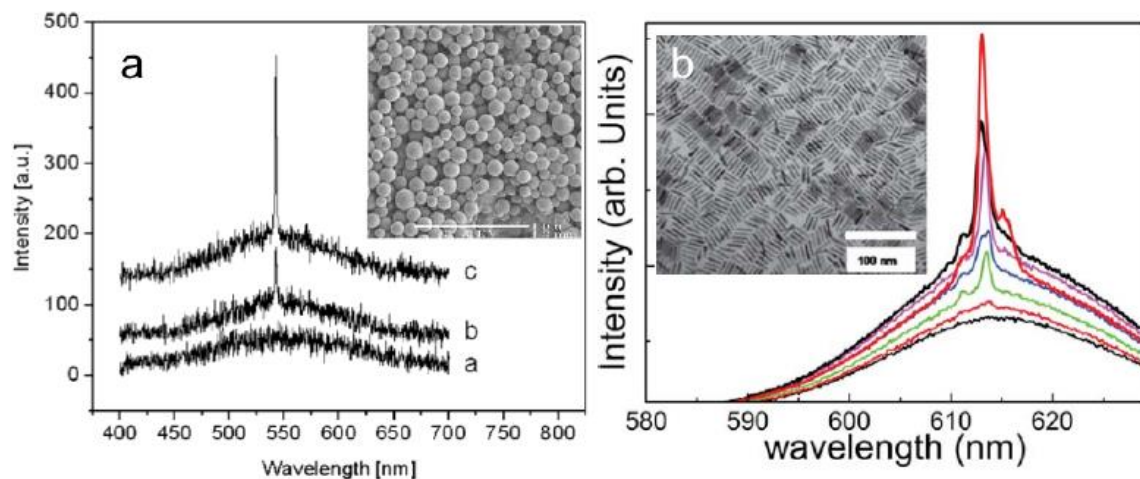


Figure 22 Effet laser constaté avec (a) des QD encapsulés dans des sphères de silice et (b) des QR CdSe/ZnS confinés dans une fibre optique (extraits de ^[133,134]).

B. Couplages hybrides exciton—plasmon

Nous décrivons ici d'autres interactions, qui résultent de complexes hybrides entre des NP semi-conductrices et des NP métalliques. D'un point de vue général, positionner un fluorophore à proximité d'une nanostructure métallique peut avoir deux effets sur son émission, à savoir une augmentation ou une diminution du rendement quantique de fluorescence^[42,135]. En effet, comme il a été rappelé dans la partie précédente, l'environnement proche des NP métalliques se caractérise par l'exaltation localisée et le

confinement des champs électromagnétiques. Cela peut alors augmenter de façon significative la fluorescence de fluorophores placés à proximité de ces NP. On parle alors de fluorescence exaltée par un métal (en anglais *metal-enhanced fluorescence*, MEF). Aussi, le rapprochement entre fluorophore et NP métallique peut conduire à l'extinction de l'énergie du fluorophore excité causé par un transfert non radiatif vers le métal.

D'abord démontrées avec des fluorophores organiques, ces interactions exclusives ont été, depuis le début des années 2000, mises à profit avec des NP métalliques et des QD. En effet, ces mécanismes sont très dépendants de la forme des NP métalliques, de l'orientation du fluorophore et de la distance entre la NP métallique et le fluorophore^[136-139]. Ces propriétés de couplage exciton—plasmon sont donc très prometteuses pour des applications dans le domaine biomédical ou en microscopie^[135].

B.1 Extinction de fluorescence

À l'échelle d'un chromophore moléculaire, Parak *et al.* se sont intéressés à l'évolution du rendement quantique de la fluorescence d'une cyanine attachée à des AuNP et maintenue à des distances fixes bien définies à l'aide d'espaceurs ADN rigides^[140] (Figure 23a). Cette étude révèle que le rendement quantique dépend de la distance entre les cyanines et les AuNP car elle modifie leur taux d'émission. Une étude comparable a été menée par l'équipe de Strouse : celle-ci met en évidence le transfert d'énergie entre fluorescéine et AuNP à des distances plus grandes que celles d'un FRET traditionnel mais qui est lui aussi dépendant de la distance entre émetteur et accepteur d'énergie^[141].

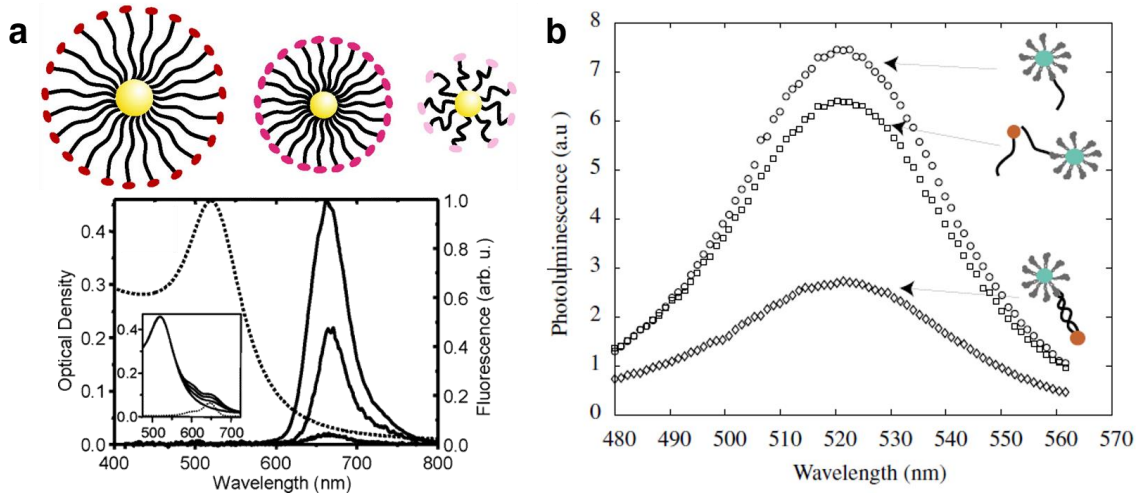


Figure 23. (a) Représentation schématique du couplage entre les AuNP et la cyanine réalisée avec des brins d'ADN de différentes longueurs qui induisent une extinction progressive de leur fluorescence à 666 nm (extrait de [140]). (b) Évolution de l'intensité de fluorescence de QD suivant leur couplage ou non à des AuNP par de l'ADN double brin (extrait de [142]).

Cette relation entre rendement quantique de l'émetteur et sa distance avec une NP métallique a aussi été démontrée pour des NP semi-conductrices^[42,142,143]. Par leurs travaux de 2004, Libchaber *et al.* ont mis en évidence un processus de type FRET entre QD et AuNP à travers un couplage par des brins d'ADN rigides (Figure 23b). L'étude théorique réalisée en 2006 par Naik *et al.* a montré que, dans des complexes QD—AuNP, le taux de dissipation d'énergie de l'exciton des QD dépend fortement de l'interdistance ainsi que de l'énergie et du moment dipolaire de l'exciton.

En 2006, Naik *et al.* sont aussi parvenus à étudier une extinction similaire en couplant ces deux types de particules à l'aide d'une paire anticorps/antigène ou grâce à la paire biotine/streptavidine. Ces travaux ont montré que l'extinction dépend notamment du nombre de AuNP attachées par QD. Finalement, les auteurs formulent l'hypothèse selon laquelle le même couplage pourrait permettre l'exaltation de la fluorescence des QD par les AuNP en faisant varier le nombre de AuNP par QD et la distance moyenne entre ces deux entités.

B.2 Fluorescence exaltée par un métal

Des NP métalliques peuvent exalter la fluorescence de QD placés dans leur environnement proche. En effet, le taux d'excitation d'un QD est proportionnel à l'intensité du champ électrique. Sous l'effet de l'exaltation du champ local par les NP plasmoniques, la fluorescence de QD se retrouve « dopée » car ces QD, au contact de ces points chauds (ou

hot spots en anglais) absorbent plus de lumière qu'en l'absence de NP métalliques^[135,144]. De plus, les NP métalliques peuvent modifier les taux de recombinaison radiative et non radiative des fluorophores auxquels elles sont couplées, et donc modifier leur rendement quantique et le temps de demi-vie des excitons.

Pour expliquer le phénomène de fluorescence exaltée par un métal, il faut considérer le taux d'excitation et le rendement quantique du fluorophore. Ces deux paramètres sont sensibles à la fréquence d'excitation mais également à la distance qui les sépare des NP métalliques et finalement à l'orientation du fluorophore par rapport à la NP métallique. L'intensité du champ électrique étant très augmentée à proximité de la surface des NP métalliques, le taux d'excitation d'un fluorophore sera maximal lorsque ce dernier sera placé à proximité d'une surface de NP métallique^[135].

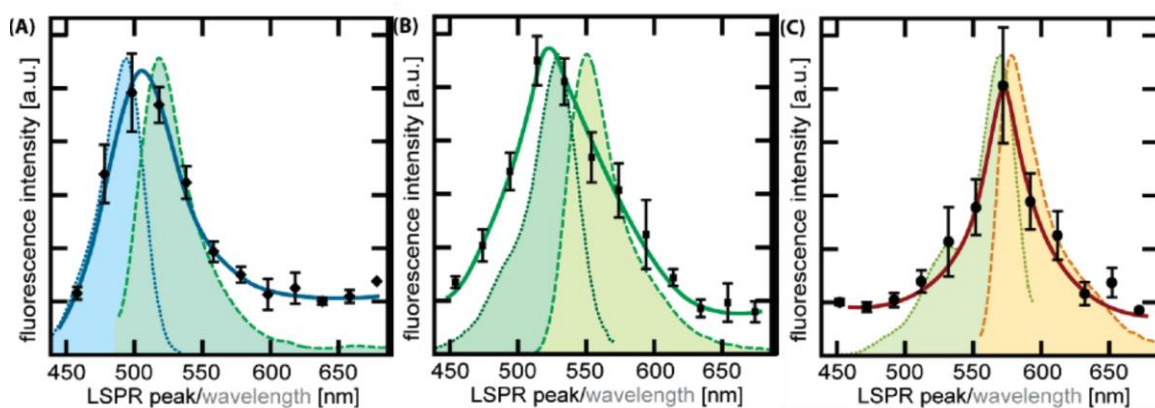


Figure 24. Évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la position de la bande plasmon de nanoprismes d'Ag fonctionnalisés avec (A) l'Alexa Fluor 488, (B) l'Alexa Fluor 532 et (C) le Rhodamine Red. Les spectres d'absorption et d'émission de chaque fluorophore organique sont également présentés. Extrait de [145].

En plus de la distance entre émetteur et accepteur, l'efficacité du MEF est aussi très dépendante du recouvrement spectral entre la position de la bande plasmon et la bande d'émission de fluorescence. En 2007, les travaux de l'équipe de Ginger ont montré que le facteur d'exaltation de la fluorescence de différents fluorophores organiques varie en fonction de la position de la bande plasmon de nanoprismes d'Ag^[145] (Figure 24). Ici, il est montré que le MEF est maximal lorsque la bande d'émission du fluorophore correspond à des énergies plus faibles (soit des longueurs d'onde plus grandes de 10 à 40 nm) que la bande plasmon des nanoprismes. Les auteurs concluent que, pour la mise au point d'un système de MEF, les effets de la distance NP—fluorophore peuvent être minimisés en ajustant les propriétés optiques des entités utilisées.

Dans leur publication de 2006, Naik *et al.* observent que le facteur d'exaltation de fluorescence dépend beaucoup de la nature du métal^[42]. Ils indiquent également que l'exaltation induite par des AuNP n'est possible que pour des émetteurs à faible rendement quantique (de l'ordre de 1 %). La résonance plasmon des NP d'argent étant particulièrement forte, ces particules seraient plus prometteuses pour des applications optiques et la détection basée sur le MEF.

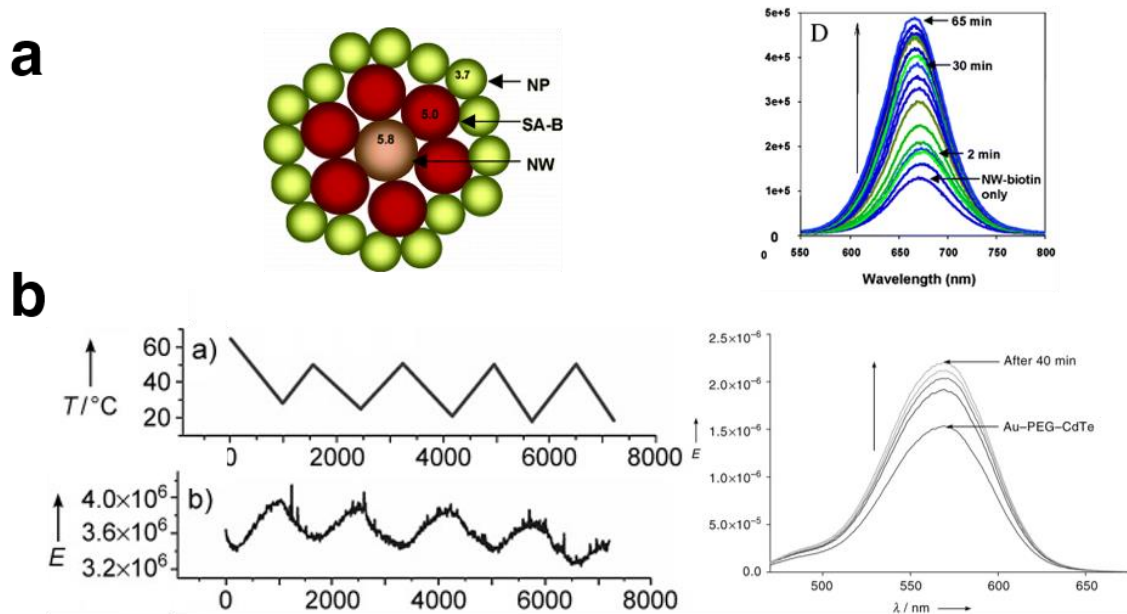


Figure 25. (a) Coupe transversale d'un modèle d'assemblage des AuNP autour d'un nanofil de CdTe et évolution de la fluorescence du complexe au cours de sa formation (extraits de ^[146]). (b) Évolution de la fluorescence E de QD CdTe couplé à des AuNP par un polymère thermosensible en fonction de la température du milieu (extraits de ^[147]).

Finalement, les travaux de l'équipe de Kotov sont particulièrement passionnants car ils illustrent le phénomène de MEF avec des systèmes colloïdaux. Ils sont parvenus à mettre en place le MEF en utilisant des nanofils de CdTe et des AuNP assemblés grâce au couple streptavidine—biotine^[146] (Figure 25a). Dans une autre étude, ils ont mis au point un « nanothermomètre » construit à partir de AuNP et de QD CdTe connectés par un polymère thermosensible^[147] (Figure 25b). Les fluctuations thermiques induisent un changement de conformation du polymère et donc de l'interdistance entre QD et AuNP. Ainsi il est possible de relier la modulation optique à la fluctuation de température. Le couplage exciton—plasmon est ici mis en évidence par l'exaltation de la fluorescence des QD causée par MEF. L'équipe de Bawendi a également publié des travaux montrant l'exaltation de la fluorescence de QD CdSe/ZnS au contact d'une surface d'or rugueuse^[148]. De telles structures peuvent permettre, à terme, de parvenir à contrôler l'exaltation de fluorescence de QD adjacents à

des nanostructures métalliques. Il s'agit là d'un objectif majeur pour réussir à appliquer le phénomène de MEF dans des dispositifs.

C. Conclusion partielle

Cette partie a été l'occasion de passer en revue les propriétés optiques uniques émergeant du couplage de particules semi-conductrices (couplages exciton—exciton) et du couplage hybride de NP semi-conductrices et métalliques (couplages plasmon—exciton). Dans tous les type de couplages mis en jeu, l'interdistance séparant les particules est le paramètre clé à maîtriser si l'on souhaite ajuster les couplages de NP^[149]. Parvenir à ce niveau de contrôle permettrait d'optimiser la réponse optique d'un système en définissant une interdistance sur mesure.

Partie IV. Des protéines artificielles pour l'auto-assemblage de nanoparticules

Dans la partie II nous avons vu l'intérêt des biomolécules pour auto-assembler des NP, par codage ADN notamment. Le codage par acides aminés est plus versatile pour varier la sélectivité et la structure des assemblages 3D.

A. Exemples de protéines synthétiques

Les superhélices (en anglais *coiled coils*) constituent un motif structurel des protéines dans lequel deux à sept hélices α sont enroulées les unes autour des autres^[150]. Ces structures permettent à des complexes protéiques de posséder une dynamique d'ouverture/fermeture comme c'est le cas avec les glissières à leucine^[151] (ou *leucine zipper*). Une première utilisation des interactions spécifiques des superhélices a été réalisée par Woolfson *et al.* qui ont conçu un système d'agrégation réversible de AuNP fonctionnalisées avec deux peptides à motifs de répétition *heptad*^[152]. L'introduction d'un peptide complémentaire induit alors la formation des superhélices et génère ainsi l'auto-assemblage de AuNP (Figure 26a). Le même peptide forme également un hétérocycle avec un dendrimère peptidique complémentaire qui, ajouté à une solution de AuNP, induit l'agrégation de particules d'or avec une interdistance bien définie^[153] (Figure 26b). Plus récemment, l'équipe de Shen a utilisé des protéines artificielles en superhélice qui peuvent former un hétérodimère pour l'auto-assemblage de AuNP^[154]. La caractérisation de ces

assemblages par diffusion de rayons X montre une interdistance bien définie et dont la valeur est en parfait accord avec les dimensions du dimère de protéines utilisé (Figure 26c).

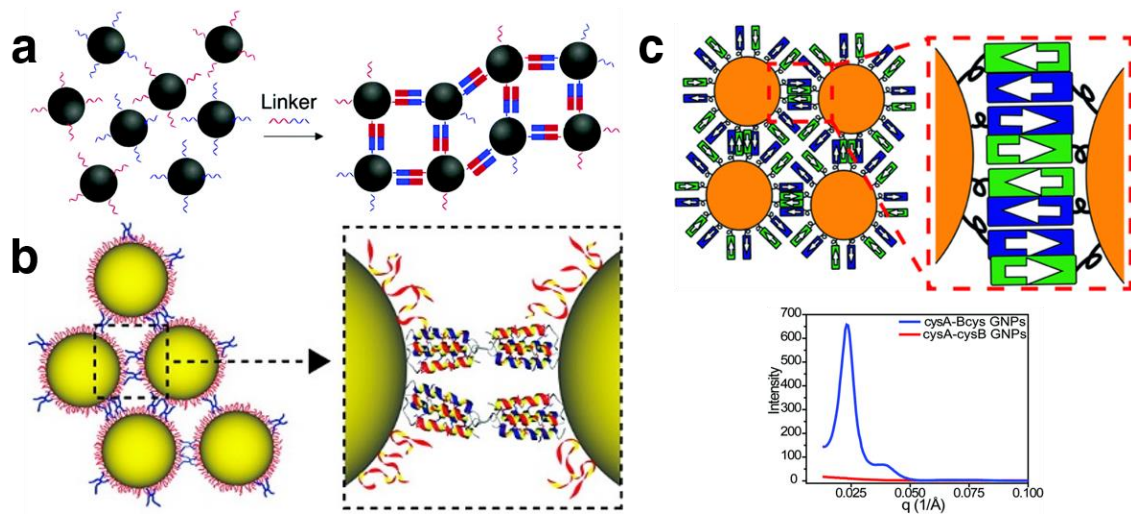


Figure 26. Représentations schématiques du principe d'auto-assemblage de AuNP par (a) des peptides superhélices à motifs répétés ou (b) par la formation d'un hétérodimère de peptides superhélices assemblés (extraits respectivement de [152,153]). (c) Représentation schématique du principe d'auto-assemblage de AuNP induit par l'association de protéines à superhélice et la mesure de l'interdistance par diffusion des rayons X aux petits angles (extraits de [154]).

En 2017, l'équipe de Saven a synthétisé des protéines dont la structure a été modélisée pour la coordination des ions Zn^{2+} . Le but était de les utiliser pour l'auto-assemblage de AuNP^[155]. La modélisation de ces protéines a été réalisée de façon à ce que la formation d'une superhélice soit permise lors de la complexation des ions Zn^{2+} par l'association des protéines (Figure 27a). Ainsi, la présence de ces ions induit l'auto-assemblage des NP (Figure 27b et c).

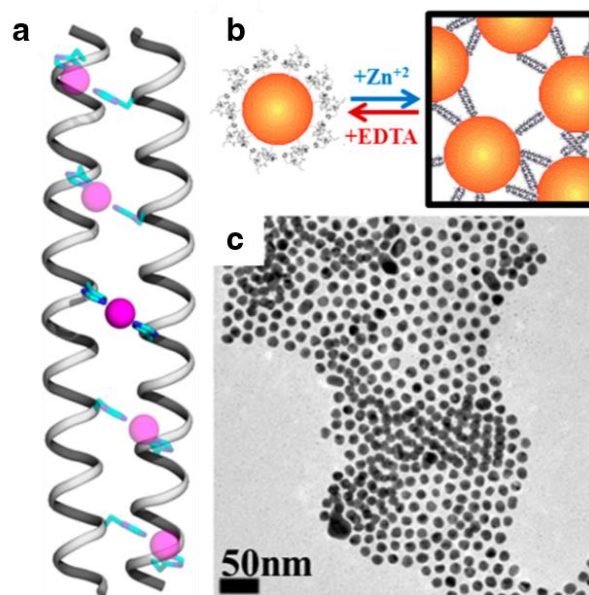


Figure 27. (a) Représentation schématique de la structure en superhélice formée par les deux protéines lors de la coordination des ions Zn^{2+} (sphères bleues). (b) Principe de l'auto-assemblage réversible des AuNP par la coordination des ions Zn^{2+} et (c) image TEM des assemblages obtenus (extraits de ^[155])

Ces travaux montrent l'intérêt que présentent les protéines artificielles pour l'auto-assemblage de NP. À l'aide du génie génétique, il est possible de mettre au point des protéines dont la structure leur permet de se combiner avec d'autres partenaires selon différents mécanismes.

B. Les protéines α -Repeat

Les protéines à motif répété constituent une classe de protéines artificielles qui contiennent une succession de petites unités structurales (appelées motifs de répétition) composées d'environ 20 à 40 acides aminés et qui s'empilent afin de former un domaine caractéristique. Ces protéines forment une classe importante qui, dans la nature, est souvent impliquée dans des interactions protéine—protéine. Elles sont particulièrement intéressantes pour le design de protéines car elles agissent comme une cible standard avec de larges surfaces disponibles pour des interactions^[156]. Ces surfaces possèdent la propriété exclusive de pouvoir être adaptées à la taille d'une cible d'interaction en ajustant le nombre de répétitions dans la protéine. En 2010, l'équipe du professeur P. Minard (I2BC, université Paris-Sud) a mis au point une librairie de protéines artificielles alpha-hélicoïdales (les protéines α -Repeat) basées sur le motif de répétition HEAT^[157]. À partir de cette famille de protéines, et en s'inspirant des processus évolutifs, cette équipe a développé une stratégie permettant de générer des protéines présentant une forte affinité pour une cible qui peut

être une surface inorganique, une molécule ou une autre protéine^[158]. Dans cette partie, nous présenterons comment ces protéines ont été développées et en quoi elles sont prometteuses en tant que médiateurs d'auto-assemblage de NP inorganiques.

B.1 Construction des protéines α -Repeat

Plusieurs motifs de répétition ont été identifiés au sein des protéines, à savoir la répétition tétratricopeptide^[159] (TPR), la répétition riche en leucine^[160] (LRR), la répétition ankyrine^[161] ou encore la répétition HEAT^[162]. Ce dernier motif tient son nom de quatre protéines dans lesquelles il a été identifié : la *huntingtine* (impliquée dans la maladie de Huntington), l'*elongation factor 3*, la protéine phosphatase 2A et la kinase de levure TOR1. Les fonctions biologiques des protéines dans lesquelles le motif HEAT a pu être retrouvé sont très diverses toutefois ce motif est très souvent impliqué dans des interactions protéine—protéine. La succession de motif HEAT confère une conformation particulière au domaine concerné qui est celle d'un enchaînement de paires d'hélices α qui forment une superhélice droite.

Pour la mise au point de la famille des protéines α -Repeat, le groupe de P. Minard a sélectionné le motif HEAT^[157] et a développé des protéines stables à haute température. Une protéine (MTH187), dont la fonction est à ce jour encore inconnue, a été sélectionnée à partir de *Methanobacterium thermoautotrophicum* dans le but de développer un motif α -Rep^[163]. Cette séquence contient les acides aminés les plus fréquemment observés qui assurent la structure du motif de répétition d'intérêt (Figure 28). On peut observer que la variabilité dans le motif de répétition obtenu n'est pas homogène. En effet, des positions sont hautement conservées et correspondent à des acides aminés situés sur les chaînes orientées entre les deux hélices α d'un même motif ou entre deux motifs successifs. Des positions pour lesquelles la nature de l'acide aminé est beaucoup plus variable (on parle de position hypervariable) sont retrouvées sur la face externe de la seconde hélice α de chaque unité de répétition. L'orientation des positions hypervariables est particulièrement intéressante car celles-ci sont situées sur une même face. En association avec la structure stable assurée par les positions hautement conservées, ces chaînes latérales variables créent une surface disponible dont la composition chimique changeante est propice à des interactions.

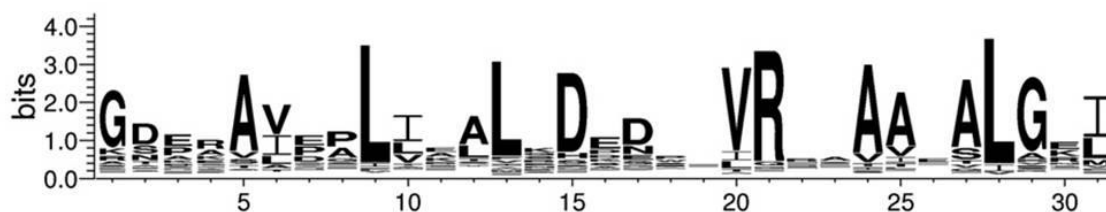


Figure 28. Conception du motif α -Rep. Les grosses lettres correspondent aux acides aminés hautement conservés dans le motif (Extrait de [157]).

Ainsi, une première librairie de protéine α -Repeat a été mise au point. Dans cette librairie, les protéines générées contiennent entre 1 et 10 motifs α -Rep. Leur caractérisation a montré qu'elles contiennent de nombreuses hélices α , comme attendu, et que ces protéines sont très difficiles à dénaturer^[157]. D'ailleurs, il a été observé que la stabilité d'une protéine augmente proportionnellement au nombre de motif α -Rep, ce qui suggère que chaque motif participe à la stabilité globale de la protéine. Parmi les protéines générées, celles contenant entre 1 et 6 motifs ont été purifiées. Des biomolécules monomériques ont ainsi été obtenues, à l'exception d'une protéine à 4 motifs de répétition. Cette protéine, appelée α Rep-N4 et surnommée A3, forme un homodimère dont la structure cristallographique a été caractérisée et dont les dimensions ont été mesurées par SAXS^[157]. Cette protéine a été utilisée comme cible pour la génération de protéines de haute affinité avec A3^[158].

B.2 Sélection de paires de protéines à haute affinité

La sélection et la caractérisation de paires de protéines α -Repeat ont été réalisées en 2013 par l'équipe de P. Minard^[158]. Pour ce faire, les séquences issues des librairies de protéines α -Repeat (avec lesquelles la sélection a été effectuée) ont été associées par recombinaison génétique à un phage vecteur, le bactériophage M13. Pour ce faire, la séquence codant la protéine α -Repeat a été fusionnée à l'extrémité C-terminale de la protéine pIII de la capsid du bactériophage (Figure 29a). Une première étape de sélection a ensuite été effectuée en exposant la librairie de phage à la cible prédéfinie et immobilisée au fond d'une plaque ELISA (Figure 29b, étape 1). Pendant cette phase d'exposition, les phages exprimant une protéine α -Repeat qui détient de l'affinité pour la cible sont fixés, tandis que ceux qui n'ont pas d'affinité sont évacués par lavage (Figure 29b, étape 2). Après élution des phages fixés à la cible, ceux-ci sont amplifiés par infection de bactéries *Escherichia coli* (Figure 29b, étape 3). Ces bactéries permettent de répliquer en grande quantité les phages par lesquels elles sont infectées, et qui sont ensuite collectés pour une seconde étape de sélection et d'amplification (Figure 29b, nouveau demi-cycle).

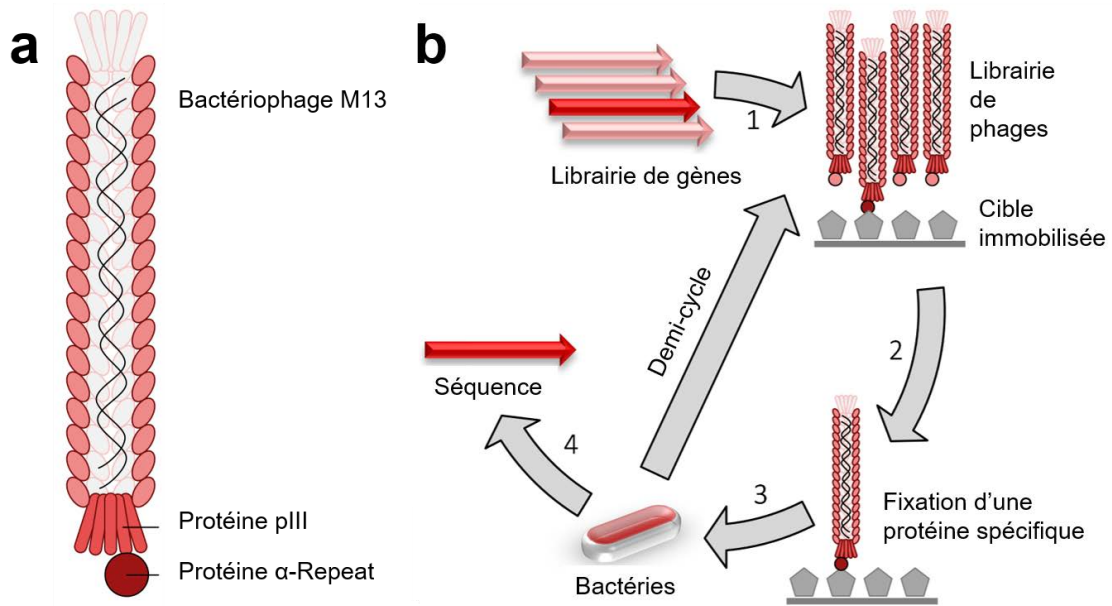


Figure 29. (a) Représentation schématique du bactériophage M13 exprimant une protéine de fusion pIII- α -Repeat. (b) Synoptique de la sélection et de l'amplification de protéines α -Repeat spécifiques pour une cible par le procédé de *phage display*.

L'enchaînement de cycles d'enrichissement et d'amplification permet de sélectionner des phages qui fixent la cible prédéfinie. De cette façon, il est possible de sélectionner des protéines α -Repeat qui peuvent reconnaître n'importe quelle protéine d'intérêt préalablement choisie. Plus spécifiquement, pour la génération d'un couple de protéine α -Repeat, il suffit d'utiliser une protéine α -Repeat comme cible. Les protéines ainsi sélectionnées à travers le procédé de *phage display* sont donc des protéines qui interagissaient de façon spécifique avec la protéine de départ. Ces deux partenaires bénéficient donc des propriétés avantageuses de protéines α -Repeat, à savoir leur haute stabilité et leur bonne solubilité. Dans le cadre des travaux publiés en 2013, une démonstration de ce principe est réalisée avec la protéine A3 comme protéine cible de départ. Après 3 cycles de sélection et d'amplification, deux protéines partenaires de A3 sont retenues. Nommées $\alpha 2$ et $\alpha 17$, ces deux protéines ont des séquences différentes (et notamment un nombre de motifs répétés différent) mais elles présentent toutes les deux une haute affinité pour A3^[158] (avec des constantes d'affinité de l'ordre du nanomolaire). Dans le cadre de nos travaux, la description détaillée du couple $\alpha 2$ /A3 sera effectuée au Chapitre III. Il est intéressant de noter que d'autres protéines α -Repeat ont été sélectionnées par un procédé de *phage display* similaire en utilisant une surface d'or (111) comme cible.

Les protéines ainsi sélectionnées ont été utilisées pour la morphosynthèse de nanoparticules d'or^[49] par l'équipe d'E. Dujardin en collaboration avec l'équipe de P. Minard.

B.3 Les protéines α -Repeat pour l'auto-assemblage de AuNP

En 2016, un projet multidisciplinaire financé par l'ANR (ARTEMIS) impliquant l'équipe de P. Minard (université Paris-Sud), l'équipe de E. Dujardin (CEMES, Toulouse) et l'équipe de V. Marchi (université de Rennes 1) a eu pour objectif d'utiliser les couples de protéines α -Repeat comme inducteurs de l'auto-assemblage de AuNP en se passant de brins d'ADN ou de peptides^[164].

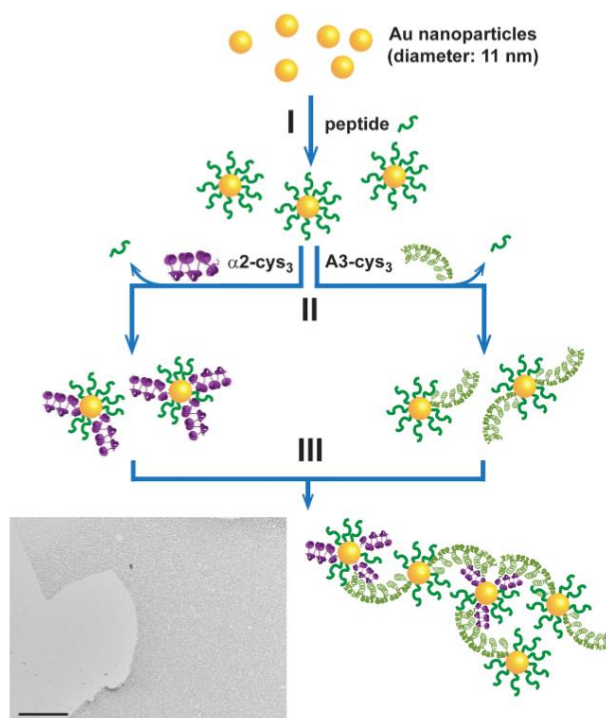


Figure 30. Synoptique de l'auto-assemblage de AuNP dirigé par l'appariement de protéines α -Repeat hautement spécifiques (extrait de ^[164]).

Dans le cadre de la thèse de G. K. Laxminarayana^[165], une modification de la séquence peptidique des protéines α -Repeat nouvellement mises au point a permis leur greffage sur des AuNP de 10 nm de diamètre à travers une stratégie d'échange de ligands afin de former deux populations de AuNP-protéine complémentaires (Figure 30, étape II). Le mélange de ces populations a ensuite rendu possible l'auto-assemblage massif des AuNP selon la reconnaissance entre les deux protéines partenaires utilisées (Figure 30, étape III). La taille

intrinsèque du couple de protéines utilisées induit un espacement de l'ordre de 5 nm entre chaque AuNP, qui est une distance intéressante pour obtenir une réponse plasmonique caractéristique de l'auto-assemblage des AuNP.

Partie V. Objectifs de la thèse et choix du système

Ce chapitre bibliographique a été l'occasion d'introduire les propriétés physico-chimiques et colloïdales des nanoparticules métalliques et des nanoparticules semi-conductrices. L'objectif de cette thèse est la mise au point de nanostructures hybrides entre ces deux types de nanoparticules en s'affranchissant des inducteurs d'auto-assemblage traditionnels (brins d'ADN, peptides, virus, etc.). Ici, des protéines choisies par le processus de sélection de paires de protéine α -Repeat complémentaires et de très haute affinité sont utilisées comme inducteur d'auto-assemblage. En effet, les résultats très prometteurs obtenus avec ces protéines pour l'auto-assemblage de AuNP montrent qu'il est possible d'assembler des nanoparticules de n'importe quelle nature. Dans ce sens, les propriétés optiques nouvelles issues du couplage de nanoparticules prouvent qu'il est intéressant de chercher à auto-assembler des NP semi-conductrices fluorescentes avec des AuNP plasmoniques. La mise au point de ces nanostructures est effectuée dans l'idée de générer des phénomènes d'extinction spécifique de la fluorescence ou de son exaltation par le métal. Dans ce but, les protéines α -Repeat sont perçues comme une alternative très prometteuse pour le contrôle de l'interdistance, qui est le paramètre clé définissant la nature des phénomènes optiques générés par le couplage des nanoparticules. Cette thèse a également pour objectif de contrôler la morphologie des superstructures nanométriques générées.

La synthèse de NP semi-conductrices fluorescentes et de NP métalliques plasmoniques aux propriétés morphologiques et optiques contrôlées constitue la première étape de ce travail décrite dans le Chapitre II de ce manuscrit. De plus, nous nous sommes attachés à fonctionnaliser ces NP en échangeant les ligands de synthèse initiaux par des ligands peptidiques dont la structure leur confère une grande stabilité colloïdale. La structure de ces ligands est le fruit de plusieurs travaux effectués au laboratoire qui ont montré que leur encrage robuste leur permet de se greffer aussi bien sur des surfaces métalliques que sur des surfaces semi-conductrices.

Grâce à la grande stabilité en milieu tamponné que confèrent ces ligands, nous allons explorer la fonctionnalisation de ces différents types de nanoparticules avec les protéines α -Repeat au cours du Chapitre III. Dans cette optique, nous étudierons ici l'influence du greffage des protéines sur les propriétés physico-chimiques des NP, à savoir leurs propriétés d'absorption, de fluorescence, de charge et de taille hydrodynamique. Ces travaux seront

l'occasion de vérifier si la stratégie adoptée pour le greffage des protéines fonctionne pour la surface des NP semi-conductrices. Aussi, en collaboration avec T. Bouceba (université Paris-VI), nous étudierons l'influence de la fixation des protéines à une surface inorganique sur leur activité de reconnaissance moléculaire par méthode de résonance de plasmon de surface.

Dans le quatrième chapitre de ce manuscrit, nous mettrons à profit les informations tirées de l'étude du greffage des protéines pour mettre au point deux types de superstructures. Nous réaliserons un premier type d'auto-assemblage à partir des nanoparticules semi-conductrices, que nous avons cherché à coupler. Dans cette partie, nous étudierons l'auto-assemblage de nanocristaux semi-conducteurs sphériques ou en forme de nanobâtonnets. Un autre type d'assemblage est ici présenté, qui consiste en la formation de superstructures hybrides semi-conducteur—métal, en cherchant à auto-assembler des nanoparticules fluorescentes avec des nanoparticules d'or plasmoniques. Pour ces deux types d'auto-assemblage, l'accent sera porté sur le contrôle de la morphologie des structures obtenues analysées en détail par microscopie électronique à transmission. Aussi, l'étude des propriétés optiques des auto-assemblages est réalisée en parallèle de leur étude structurale qui est faite en collaboration avec F. Artzner (université de Rennes 1) par diffusion des rayons X aux petits angles. Finalement, nous présenterons un dernier type d'assemblage hybride basé sur une structure protéique bi-domaine qui ouvre la voie vers la mise au point de nanostructures orthogonales.

Références

- [1] A. I. Ekimov, A. A. Onushchenko, *Soviet Physics Semiconductors-Ussr* **1982**, *16*, 775–778.
- [2] A. Efros, *Sovient Physics Semiconductors-USSR* **1982**, *16*, 772–775.
- [3] R. Rossetti, S. Nakahara, L. E. Brus, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 1086–1088.
- [4] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706–8715.
- [5] A. Zrenner, L. V. Butov, M. Hagn, G. Abstreiter, G. Böhm, G. Weimann, *Phys. Rev. Lett.* **1994**, *72*, 3382–3385.
- [6] I. Kang, F. W. Wise, *J. Opt. Soc. Am. B, JOSAB* **1997**, *14*, 1632–1646.
- [7] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos, *Science* **1998**, *281*, 2013–2016.
- [8] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez, *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 41–46.
- [9] W. C. W. Chan, S. Nie, *Science* **1998**, *281*, 2016–2018.
- [10] A. J. Nozik, M. C. Beard, J. M. Luther, M. Law, R. J. Ellingson, J. C. Johnson, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6873–6890.
- [11] P. V. Kamat, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 908–918.
- [12] X. Dai, Z. Zhang, Y. Jin, Y. Niu, H. Cao, X. Liang, L. Chen, J. Wang, X. Peng, *Nature* **2014**, *515*, 96–99.
- [13] Y. Yang, Y. Zheng, W. Cao, A. Titov, J. Hyvonen, J. R. Manders, J. Xue, P. H. Holloway, L. Qian, *Nature Photonics* **2015**, *9*, 259–266.
- [14] M. A. Hines, P. Guyot-Sionnest, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468–471.
- [15] P. Reiss, M. Protière, L. Li, *Small* **2009**, *5*, 154–168.
- [16] Z. A. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1389–1395.
- [17] L. Manna, E. C. Scher, L.-S. Li, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7136–7145.
- [18] C. Ma, Y. Ding, D. Moore, X. Wang, Z. L. Wang, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 708–709.
- [19] S. Ithurria, B. Dubertret, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16504–16505.
- [20] F. Chandezon, P. Reiss, *Nanocristaux Semi-Conducteurs Fluorescents*, Ed. Techniques Ingénieur, **2004**.
- [21] A. I. Ekimov, A. A. Onushchenko, *Jetp Lett* **1984**, *40*, 1136–1139.
- [22] L. E. Brus, *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 5566–5571.
- [23] Y. Luo, L.-W. Wang, *ACS Nano* **2010**, *4*, 91–98.
- [24] C. Grivas, C. Li, P. Andreakou, P. Wang, M. Ding, G. Brambilla, L. Manna, P. Lagoudakis, *Nature Communications* **2013**, *4*, 1–9.
- [25] L. Carbone, A. Jakab, Y. Khalavka, C. Sönnichsen, *Nano Lett.* **2009**, *9*, 3710–3714.
- [26] C. Hamon, C. Martini, P. Even-Hernandez, B. Boichard, H. Voisin, L. Largeau, C. Gosse, T. Coradin, C. Aimé, V. Marchi, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 16119–16122.
- [27] C. Kittel, *Introduction to Solid State Physics*, Wiley New York, **1976**.
- [28] X. Huang, S. Neretina, M. A. El-Sayed, *Advanced Materials* **2009**, *21*, 4880–4910.
- [29] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 8410–8426.
- [30] Y. Xia, W. Li, C. M. Copley, J. Chen, X. Xia, Q. Zhang, M. Yang, E. C. Cho, P. K. Brown, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 914–924.

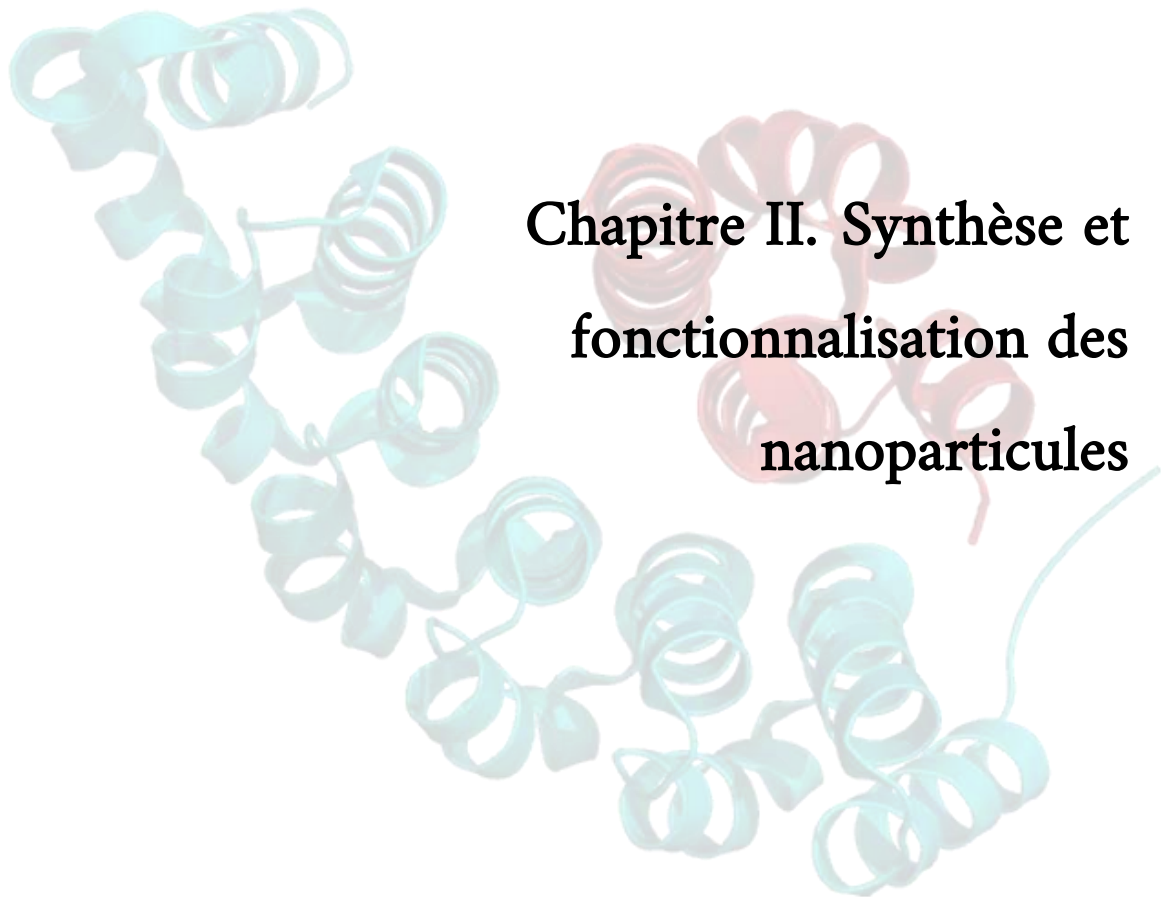
- [31] V. Amendola, M. Meneghetti, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 3805–3821.
- [32] H. Du, R.-C. A. Fuh, J. Li, L. A. Corkan, J. S. Lindsey, *Photochemistry and Photobiology* **1998**, *68*, 141–142.
- [33] R. Arvizo, R. Bhattacharya, P. Mukherjee, *Expert Opinion on Drug Delivery* **2010**, *7*, 753–763.
- [34] M.-C. Daniel, D. Astruc, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 293–346.
- [35] M. Nguyen, I. Kherbouche, M. Braik, A. Belkhir, L. Boubekeur-Lecaque, J. Aubard, C. Mangeney, N. Felidj, *ACS Omega* **2019**, *4*, 1144–1150.
- [36] K. Saha, S. S. Agasti, C. Kim, X. Li, V. M. Rotello, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2739–2779.
- [37] W. Li, X. Chen, *Nanomedicine* **2015**, *10*, 299–320.
- [38] C. Clavero, *Nature Photonics* **2014**, *8*, 95–103.
- [39] R. J. Barsotti, M. D. Vahey, R. Wartena, Y.-M. Chiang, J. Voldman, F. Stellacci, *Small* **2007**, *3*, 488–499.
- [40] V. Amendola, M. Meneghetti, *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 24501–24508.
- [41] M. Hentschel, B. Metzger, B. Knabe, K. Buse, H. Giessen, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2016**, *7*, 111–120.
- [42] A. O. Govorov, G. W. Bryant, W. Zhang, T. Skeini, J. Lee, N. A. Kotov, J. M. Slocik, R. R. Naik, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 984–994.
- [43] P. L. Stiles, J. A. Dieringer, N. C. Shah, R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2008**, *1*, 601–626.
- [44] S. A. Maier, *Plasmonics: Fundamentals and Applications*, Springer US, **2007**.
- [45] V. Amendola, R. Pilot, M. Frascioni, O. M. Maragò, M. A. Iati, *J. Phys.: Condens. Matter* **2017**, *29*, 203002.
- [46] H. Chen, L. Shao, Q. Li, J. Wang, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 2679–2724.
- [47] Y. Sun, B. T. Mayers, Y. Xia, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 481–485.
- [48] C.-Y. Chiu, P.-J. Chung, K.-U. Lao, C.-W. Liao, M. H. Huang, *J. Phys. Chem. C* **2012**, *116*, 23757–23763.
- [49] J. Prasad, S. Viollet, K. L. Gurunatha, A. Urvoas, A. C. Fournier, M. Valerio-Lepiniec, C. Marcelot, B. Baris, P. Minard, E. Dujardin, *Nanoscale* **2019**, *11*, 17485–17497.
- [50] S. Gong, W. Schwalb, Y. Wang, Y. Chen, Y. Tang, J. Si, B. Shirinzadeh, W. Cheng, *Nature Communications* **2014**, *5*, 1–8.
- [51] S. A. Maier, H. A. Atwater, *Journal of Applied Physics* **2005**, *98*, 011101.
- [52] S. Nie, S. R. Emory, *Science* **1997**, *275*, 1102–1106.
- [53] Z. Luo, X. Yuan, Y. Yu, Q. Zhang, D. T. Leong, J. Y. Lee, J. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16662–16670.
- [54] J. Zheng, C. Zhang, R. M. Dickson, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 077402.
- [55] J. Zheng, C. Zhou, M. Yu, J. Liu, *Nanoscale* **2012**, *4*, 4073–4083.
- [56] S. Franco-Ulloa, L. Riccardi, F. Rimembrana, M. Pini, M. De Vivo, *J. Chem. Theory Comput.* **2019**, *15*, 2022–2032.
- [57] S.-H. Cha, J.-U. Kim, K.-H. Kim, J.-C. Lee, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 6297–6303.
- [58] Z. Tang, N. A. Kotov, *Advanced Materials* **2005**, *17*, 951–962.
- [59] A. C. Mendes, E. T. Baran, R. L. Reis, H. S. Azevedo, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2013**, *5*, 582–612.
- [60] G. M. Whitesides, B. Grzybowski, *Science* **2002**, *295*, 2418–2421.

- [61] E. V. Shevchenko, D. V. Talapin, in *Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots: Synthesis, Assembly, Spectroscopy and Applications* (Ed.: A.L. Rogach), Springer Vienna, Vienna, **2008**, pp. 119–169.
- [62] M. Klokkenburg, A. J. Houtepen, R. Koole, J. W. J. de Folter, B. H. Ern e, E. van Faassen, D. Vanmaekelbergh, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2931–2936.
- [63] Z. Tang, N. A. Kotov, M. Giersig, *Science* **2002**, *297*, 237–240.
- [64] C. Pacholski, A. Kornowski, H. Weller, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 1188–1191.
- [65] D. V. Talapin, H. Yu, E. V. Shevchenko, A. Lobo, C. B. Murray, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 14049–14054.
- [66] T. K. Sau, C. J. Murphy, *Langmuir* **2005**, *21*, 2923–2929.
- [67] C. B. Murray, C. R. Kagan, M. G. Bawendi, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 545–610.
- [68] J. Hu, L. Li, W. Yang, L. Manna, L. Wang, A. P. Alivisatos, *Science* **2001**, *292*, 2060–2063.
- [69] D. V. Talapin, E. V. Shevchenko, C. B. Murray, A. Kornowski, S. F orster, H. Weller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12984–12988.
- [70] T. Bizien, P. Even-Hernandez, M. Postic, E. Mazari, S. Chevance, A. Bondon, C. Hamon, D. Troadec, L. Largeau, C. Dupuis, et al., *Small* **2014**, *10*, 3707–3716.
- [71] C. Hamon, M. Postic, E. Mazari, T. Bizien, C. Dupuis, P. Even-Hernandez, A. Jimenez, L. Courbin, C. Gosse, F. Artzner, et al., *ACS Nano* **2012**, *6*, 4137–4146.
- [72] A. V. Pinheiro, D. Han, W. M. Shih, H. Yan, *Nature Nanotechnology* **2011**, *6*, 763–772.
- [73] D. Liu, M. Wang, Z. Deng, R. Walulu, C. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 2324–2325.
- [74] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [75] J. Zheng, J. J. Birktoft, Y. Chen, T. Wang, R. Sha, P. E. Constantinou, S. L. Ginell, C. Mao, N. C. Seeman, *Nature* **2009**, *461*, 74–77.
- [76] A. M. Hung, C. M. Micheel, L. D. Bozano, L. W. Osterbur, G. M. Wallraff, J. N. Cha, *Nature Nanotechnology* **2010**, *5*, 121–126.
- [77] G. Tikhomirov, S. Hoogland, P. E. Lee, A. Fischer, E. H. Sargent, S. O. Kelley, *Nature Nanotechnology* **2011**, *6*, 485–490.
- [78] H. Bui, C. Onodera, C. Kidwell, Y. Tan, E. Graugnard, W. Kuang, J. Lee, W. B. Knowlton, B. Yurke, W. L. Hughes, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 3367–3372.
- [79] A. Samanta, Y. Zhou, S. Zou, H. Yan, Y. Liu, *Nano Lett.* **2014**, *14*, 5052–5057.
- [80] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607–609.
- [81] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611.
- [82] A. Fu, C. M. Micheel, J. Cha, H. Chang, H. Yang, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10832–10833.
- [83] D. Sun, O. Gang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5252–5254.
- [84] D. S. Petrescu, A. S. Blum, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2018**, *10*, e1508.
- [85] C. C. DuFort, B. Dragnea, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2010**, *61*, 323–344.
- [86] E. Dujardin, C. Peet, G. Stubbs, J. N. Culver, S. Mann, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 413–417.

- [87] M. Kobayashi, S. Tomita, K. Sawada, K. Shiba, H. Yanagi, I. Yamashita, Y. Uraoka, *Opt. Express, OE* **2012**, *20*, 24856–24863.
- [88] V. Yannopapas, *Solid State Communications* **2015**, *204*, 51–55.
- [89] T. Douglas, M. Young, *Advanced Materials* **1999**, *11*, 679–681.
- [90] C. E. Fowler, W. Shenton, G. Stubbs, S. Mann, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 1266–1269.
- [91] F. Li, J. Lu, X. Kong, T. Hyeon, D. Ling, *Advanced Materials* **2017**, *29*, 1605897.
- [92] S. Zhang, D. M. Marini, W. Hwang, S. Santoso, *Current Opinion in Chemical Biology* **2002**, *6*, 865–871.
- [93] C.-L. Chen, P. Zhang, N. L. Rosi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13555–13557.
- [94] Y. Tian, H. V. Zhang, K. L. Kiick, J. G. Saven, D. J. Pochan, *Chem. Mater.* **2018**, *30*, 8510–8520.
- [95] P. Kaur, Y. Maeda, A. C. Mutter, T. Matsunaga, Y. Xu, H. Matsui, *Angewandte Chemie International Edition* **2010**, *49*, 8375–8378.
- [96] N. Michael Green, in *Methods in Enzymology* (Eds.: M. Wilchek, E.A. Bayer), Academic Press, **1990**, pp. 51–67.
- [97] A. Gole, C. J. Murphy, *Langmuir* **2005**, *21*, 10756–10762.
- [98] S.-J. Park, A. A. Lazarides, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2909–2912.
- [99] S. Connolly, D. Fitzmaurice, *Advanced Materials* **1999**, *11*, 1202–1205.
- [100] R. W. Hartley, *Trends in Biochemical Sciences* **1989**, *14*, 450–454.
- [101] M. P. Nikitin, T. A. Zdobnova, S. V. Lukash, O. A. Stremovskiy, S. M. Deyev, *PNAS* **2010**, *107*, 5827–5832.
- [102] T. A. Pham, A. Schreiber, E. V. S. (née Rosseeva), S. Schiller, H. Cölfen, *Beilstein J. Nanotechnol.* **2016**, *7*, 351–363.
- [103] H. Otsuka, Y. Akiyama, Y. Nagasaki, K. Kataoka, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 8226–8230.
- [104] W. Shenton, S. A. Davis, S. Mann, *Advanced Materials* **1999**, *11*, 449–452.
- [105] C. Wang, Y. Chen, T. Wang, Z. Ma, Z. Su, *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 5809–5811.
- [106] R. A. Hughes, A. D. Ellington, *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2017**, *9*, a023812.
- [107] S. Kosuri, G. M. Church, *Nature methods* **2014**, *11*, 499.
- [108] M. R. Jones, N. C. Seeman, C. A. Mirkin, *Science* **2015**, *347*, 1260901.
- [109] C. P. Shaw, D. G. Fernig, R. Lévy, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 12181–12187.
- [110] N. A. Kotov, P. S. Weiss, *ACS Nano* **2014**, *8*, 3101–3103.
- [111] J. H. Fendler, *Chem. Mater.* **1996**, *8*, 1616–1624.
- [112] K. Ariga, Y. Yamauchi, G. Rydzek, Q. Ji, Y. Yonamine, K. C.-W. Wu, J. P. Hill, *Chem. Lett.* **2013**, *43*, 36–68.
- [113] S. Wintzheimer, T. Granath, M. Oppmann, T. Kister, T. Thai, T. Kraus, N. Vogel, K. Mandel, *ACS Nano* **2018**, *12*, 5093–5120.
- [114] B. H. Kim, M. J. Hackett, J. Park, T. Hyeon, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 59–71.
- [115] T. Förster, *Annalen der Physik* **1948**, *437*, 55–75.
- [116] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer Science & Business Media, **2013**.

- [117] B. W. van der Meer, D. M. van der Meer, S. S. Vogel, *FRET—Förster Resonance Energy Transfer*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim, Germany, **2013**.
- [118] I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, J. M. Mauro, *Nature Materials* **2003**, *2*, 630–638.
- [119] R. Luchowski, E. G. Matveeva, I. Gryczynski, E. A. Terpetschnig, L. Patsenker, G. Laczko, J. Borejdo, Z. Gryczynski, *Curr Pharm Biotechnol* **2008**, *9*, 411–420.
- [120] R. Bose, J. F. McMillan, J. Gao, K. M. Rickey, C. J. Chen, D. V. Talapin, C. B. Murray, C. W. Wong, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2006–2011.
- [121] S. A. Crooker, J. A. Hollingsworth, S. Tretiak, V. I. Klimov, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 186802.
- [122] C. R. Kagan, C. B. Murray, M. Nirmal, M. G. Bawendi, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 1517–1520.
- [123] S. Mayilo, J. Hilhorst, A. S. Susha, C. Höhl, T. Franzl, T. A. Klar, A. L. Rogach, J. Feldmann, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 14589–14594.
- [124] Z. Tang, B. Ozturk, Y. Wang, N. A. Kotov, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 6927–6931.
- [125] U. T. D. Thuy, P. T. Thuy, N. Q. Liem, L. Li, P. Reiss, *Appl. Phys. Lett.* **2010**, *96*, 073102.
- [126] K. F. Chou, A. M. Dennis, *Sensors (Basel)* **2015**, *15*, 13288–13325.
- [127] J. Kundu, Y. Ghosh, A. M. Dennis, H. Htoon, J. A. Hollingsworth, *Nano Lett.* **2012**, *12*, 3031–3037.
- [128] S. Sarkar, A. R. Maity, N. S. Karan, N. Pradhan, *J. Phys. Chem. C* **2013**, *117*, 21988–21994.
- [129] R. H. Dicke, *Phys. Rev.* **1954**, *93*, 99–110.
- [130] M. Scheibner, T. Schmidt, L. Worschech, A. Forchel, G. Bacher, T. Passow, D. Hommel, *Nature Physics* **2007**, *3*, 106–110.
- [131] E. Henry, A. Dif, M. Schmutz, L. Legoff, F. Amblard, V. Marchi-Artzner, F. Artzner, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5443–5448.
- [132] S. Noda, *Science* **2006**, *314*, 260–261.
- [133] J. N. Cha, M. H. Bartl, M. S. Wong, A. Popitsch, T. J. Deming, G. D. Stucky, *Nano Lett.* **2003**, *3*, 907–911.
- [134] M. Kazes, D. Y. Lewis, Y. Ebenstein, T. Mokari, U. Banin, *Advanced Materials* **2002**, *14*, 317–321.
- [135] C. D. Geddes, *Metal-Enhanced Fluorescence*, John Wiley & Sons, **2010**.
- [136] P. Bharadwaj, L. Novotny, *Opt. Express, OE* **2007**, *15*, 14266–14274.
- [137] J. Gersten, A. Nitzan, *J. Chem. Phys.* **1981**, *75*, 1139–1152.
- [138] P. C. Das, A. Puri, *Phys. Rev. B* **2002**, *65*, 155416.
- [139] R. Carminati, J.-J. Greffet, C. Henkel, J. M. Vigoureux, *Optics Communications* **2006**, *261*, 368–375.
- [140] E. Dulkeith, M. Ringler, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Muñoz Javier, W. J. Parak, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 585–589.
- [141] C. S. Yun, A. Javier, T. Jennings, M. Fisher, S. Hira, S. Peterson, B. Hopkins, N. O. Reich, G. F. Strouse, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3115–3119.
- [142] Z. Gueroui, A. Libchaber, *Phys. Rev. Lett.* **2004**, *93*, 166108.
- [143] J. M. SLOCIK, A. O. GOVOROV, R. R. NAIK, *Supramolecular Chemistry* **2006**, *18*, 415–421.
- [144] P. P. Pompa, L. Martiradonna, A. D. Torre, F. D. Sala, L. Manna, M. D. Vittorio, F. Calabi, R. Cingolani, R. Rinaldi, *Nature Nanotechnology* **2006**, *1*, 126–130.

- [145] Y. Chen, K. Munechika, D. S. Ginger, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 690–696.
- [146] J. Lee, A. O. Govorov, J. Dulka, N. A. Kotov, *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2323–2330.
- [147] J. Lee, A. O. Govorov, N. A. Kotov, *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 7605–7608.
- [148] K. T. Shimizu, W. K. Woo, B. R. Fisher, H. J. Eisler, M. G. Bawendi, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 117401.
- [149] D. V. Talapin, C. B. Murray, *Science* **2005**, *310*, 86–89.
- [150] J. Liu, Q. Zheng, Y. Deng, C.-S. Cheng, N. R. Kallenbach, M. Lu, *PNAS* **2006**, *103*, 15457–15462.
- [151] L. Gonzalez, D. N. Woolfson, T. Alber, *Nature Structural Biology* **1996**, *3*, 1011–1018.
- [152] M. G. Ryadnov, B. Ceyhan, C. M. Niemeyer, D. N. Woolfson, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 9388–9394.
- [153] D. Aili, K. Enander, L. Baltzer, B. Liedberg, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 2473–2478.
- [154] A. Siehr, B. Xu, R. A. Siegel, W. Shen, *Soft Matter* **2019**, *15*, 7122–7126.
- [155] M. J. Eibling, C. M. MacDermaid, Z. Qian, C. J. Lanci, S.-J. Park, J. G. Saven, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 17811–17823.
- [156] P. Amstutz, H. K. Binz, P. Parizek, M. T. Stumpp, A. Kohl, M. G. Grütter, P. Forrer, A. Plückthun, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 24715–24722.
- [157] A. Urvoas, A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, M. Graille, D. Durand, D. C. Desravines, H. van Tilbeurgh, M. Desmadril, P. Minard, *Journal of Molecular Biology* **2010**, *404*, 307–327.
- [158] A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, A. Urvoas, A. Chevrel, M. Graille, Z. Fourati-Kammoun, M. Desmadril, H. van Tilbeurgh, P. Minard, *PLOS ONE* **2013**, *8*, e71512.
- [159] L. D. D'Andrea, L. Regan, *Trends in biochemical sciences* **2003**, *28*, 655–662.
- [160] P. Enkhbayar, M. Kamiya, M. Osaki, T. Matsumoto, N. Matsushima, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2004**, *54*, 394–403.
- [161] S. E. Lux, K. M. John, V. Bennett, *Nature* **1990**, *344*, 36.
- [162] M. A. Andrade, P. Bork, *Nature Genetics* **1995**, *11*, 115–116.
- [163] O. Julien, I. Gignac, A. Hutton, A. Yee, C. H. Arrowsmith, S. M. Gagné, *J Biomol NMR* **2006**, *35*, 149–154.
- [164] K. L. Gurunatha, A. C. Fournier, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, V. Marchi, P. Minard, E. Dujardin, *ACS Nano* **2016**, *10*, 3176–3185.
- [165] G. Kargal Laxminarayana, *Approches Colloïdale et Bio-Inspirée En Nanoplasmonique*, thesis, Toulouse **3**, **2012**.



**Chapitre II. Synthèse et
fonctionnalisation des
nanoparticules**

Table des matières

Introduction.....	81
Partie I. La synthèse de nanoparticules monodisperses : considérations générales	83
<i>A. Introduction.....</i>	<i>83</i>
<i>B. La synthèse par précipitation</i>	<i>83</i>
B.1. Principe général.....	83
B.2. Nucléation	84
B.3. Croissance.....	85
B.4. Mûrissement et terminaison.....	85
Partie II. Synthèse de nanoparticules d'or.....	86
<i>A. Nanoparticules d'or sphériques</i>	<i>86</i>
A.1. Principe de la synthèse	86
A.2. Propriétés optiques.....	87
A.3. Propriétés morphologiques	88
<i>B. Nanobâtonnets d'or.....</i>	<i>89</i>
B.1. Principe de la synthèse	89
B.1.i. Synthèse « one pot ».....	89
B.1.ii. Synthèse par germination et croissance	90
B.2. Propriétés optiques.....	91
B.3. Propriétés morphologiques	91
<i>C. Nanoclusters d'or.....</i>	<i>92</i>
C.1. Présentation de la synthèse	92
C.2. Propriétés optiques.....	94
C.3. Propriétés morphologiques	95
Partie III. Synthèse de nanoparticules semi-conductrices fluorescentes	95
<i>A. Synthèse de quantum dots cœur-coquille CdSe/ZnS.....</i>	<i>95</i>
A.1. Introduction	95
A.2. Synthèse des cœurs CdSe	96

A.3.	Synthèse de la coquille de ZnS.....	98
A.4.	Mesure du diamètre	99
<i>B.</i>	<i>Synthèse de quantum rods CdSe/CdS.....</i>	<i>100</i>
B.1.	Introduction et principe de la synthèse.....	100
B.2.	Caractérisation optique des QR CdSe/CdS	102
B.2.i.	Cœurs CdSe	102
B.2.ii.	Dépôt de la coquille de CdS anisotrope.....	103
B.3.	Détermination de la taille.....	104
<i>C.</i>	<i>Synthèse de quantum dots sans cadmium CuInS₂/ZnS.....</i>	<i>104</i>
C.1.	Introduction	104
C.2.	Synthèse des cœurs CuInS ₂	106
C.3.	Passivation avec une coquille de ZnS	106
C.4.	Morphologie des QD CuInS ₂ /ZnS.....	107
Partie IV.	Stabilisation et hydrophilisation de nanoparticules	108
<i>A.</i>	<i>Introduction</i>	<i>108</i>
<i>B.</i>	<i>Présentation des ligands utilisés.....</i>	<i>109</i>
<i>C.</i>	<i>Stabilisation de nanoparticules métalliques</i>	<i>110</i>
C.1.	Nanoparticules d'or	110
C.2.	Nanobâtonnets d'or	112
<i>D.</i>	<i>Hydrophilisation de nanoparticules semi-conductrices</i>	<i>114</i>
D.1.	Introduction	114
D.2.	Méthode.....	114
D.3.	Cas des QD CuInS ₂ /ZnS	115
D.4.	Propriétés optiques et stabilité des QD et QR hydrophiles.....	116
<i>E.</i>	<i>Post-fonctionnalisation avec de la biotine</i>	<i>118</i>
Conclusion.....		121
Références.....		123

Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté les outils conceptuels nécessaires pour aborder les nanoparticules, les protéines et les différentes propriétés physiques qui ont fait l'objet des études présentées dans ce manuscrit. Nous nous sommes également intéressés aux problématiques liées au domaine de l'auto-assemblage de nanoparticules.

Ce chapitre aura pour objectif de présenter les voies de synthèses qui ont été suivies pour l'élaboration de nanoparticules métalliques et semi-conductrices. À l'aide de méthodes adaptées pour la caractérisation des propriétés optiques, nous montrerons que ces nanoparticules présentent des propriétés optiques définies. Cependant, avant de rentrer dans les détails des mécanismes de synthèse et de leurs conditions, une première partie permettra de poser les bases théoriques mises en jeu dans le domaine de la synthèse chimique de nanoparticules en phase liquide.

Finalement, il s'agira de discuter des travaux de fonctionnalisation que nous avons menés sur les nanoparticules métalliques et semi-conductrices. L'utilisation de ligand thiols nous permet en effet de stabiliser les nanoparticules d'or et de rendre les nanoparticules semi-conductrices hydrophiles tout en maintenant leurs propriétés optiques exclusives. Nous aurons également l'occasion de présenter des travaux impliquant l'utilisation de ces nanoparticules fonctionnalisées pour des futures applications en nanoplasmonique.

Partie I. La synthèse de nanoparticules monodisperses : considérations générales

A. Introduction

Dans cette partie, nous nous intéressons à la synthèse de nanoparticules métalliques composée d'or et de nanoparticules semi-conductrices. Ces nanoparticules ont différentes tailles, morphologies et compositions. Pour les nanoparticules d'or : des sphères, des nanobâtonnets et des nanoclusters ; pour les nanoparticules semi-conductrices : des sphères, des nanobâtonnets et des sphères sans cadmium. La synthèse de ces nanocristaux aux propriétés optiques variées est réalisée via une approche dite « *bottom up* », ou constructive, qui consiste en l'association d'atomes en germes, qui à leur tour se regroupent pour finalement former des nanoparticules. Pour l'élaboration de nanoparticules, la chimie en phase liquide permet de couvrir un vaste répertoire de synthèses : précipitations, procédés sol-gel, microémulsions, méthodes hydrothermales/solvothermales, synthèses sur matrice ou encore les synthèses biomimétiques^[1]. Parmi ces nombreuses possibilités, notre choix s'est porté sur l'utilisation des méthodes de précipitation pour parvenir à former des nanoparticules aux propriétés optiques bien définies.

B. La synthèse par précipitation

B.1. Principe général

La synthèse de nanoparticules par co-précipitation présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre et permet un contrôle efficace de la taille et de la composition des nanoparticules synthétisées^[2]. Son principe repose sur la réalisation simultanée de l'ensemble des étapes nécessaires à la formation d'une nanoparticule : nucléation d'agrégats d'atomes, croissance puis processus de mûrissement. La compréhension et la maîtrise de chacune de ces étapes sont nécessaires au contrôle de la taille des nanoparticules synthétisées. Cette méthode de synthèse se caractérise par la formation de produits de précipitation peu solubles, induite très souvent par une réaction chimique entre des précurseurs inorganiques. La faible solubilité de ces produits de réaction permet d'atteindre facilement des conditions de sursaturation, ce qui a pour effet de donner lieu au processus de nucléation. Cette étape conduit, dans ces conditions, à la génération d'un grand nombre de nanoparticules de petites tailles. La co-précipitation a également comme particularité

d'aboutir à des phénomènes de mûrissement qui affecteront grandement la taille finale, la morphologie et les propriétés des nanoparticules.

B.2. Nucléation

Ainsi, l'étape de nucléation est déterminante pour la taille et la morphologie des nanoparticules synthétisées. La nucléation commence dès lors que la précipitation est initiée et consiste en la formation d'agrégats d'atomes monocristallins de tailles très réduites. Sa dynamique peut être résumée à travers l'expression de R_N , constante homogène de nucléation, qui caractérise le nombre de germes formés par unité de temps t et par unité de volume V en conditions stationnaires^[3].

$$R_N = \left(\frac{dN}{dt} \right) \frac{1}{V} \quad \text{Eq. 1}$$

Cette constante dépend notamment du rayon critique d'équilibre R^* qui caractérise la taille nécessaire à un germe pour continuer à croître et en dessous de laquelle il est dissout. Cette taille dépend différents paramètres, tels que la température du milieu, le degré de sursaturation et de la tension de surface à l'interface solide—liquide. Le choix des précurseurs inorganiques est alors très important. Finalement pour permettre une nucléation très rapide, il est favorable de se placer à un très haut degré de sursaturation et à une température élevée. Ainsi, il est possible d'obtenir un très grand nombre de germes, ou *nuclei*, de très petites tailles et monodisperses. Les paramètres caractérisant la phase de nucléation ont été passés en revue par V. La Mer^[4] et sont représentés dans le diagramme suivant (Figure 1).

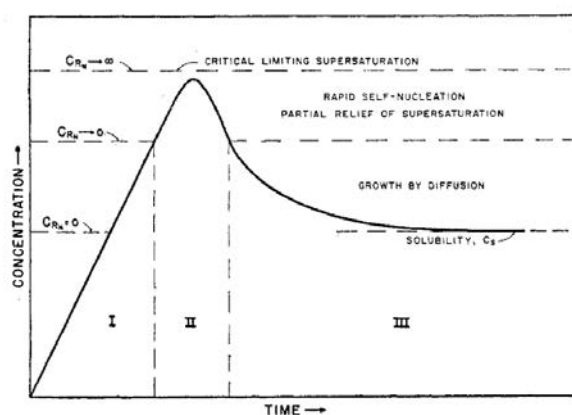


Figure 1. Représentation schématique de l'évolution de la concentration en monomères avant et après nucléation en fonction du temps (extrait de [4]).

B.3. Croissance

Il a été démontré que la croissance des germes nouvellement formés est, dans une très grande majorité des cas, limitée par la diffusion des espèces en solution plutôt que par la réaction elle-même^[5,6]. De ce fait, le taux de croissance des germes en nanoparticules est essentiellement dirigé par la température du milieu et les gradients de concentrations qui y prennent place. La modélisation de cette étape de la synthèse par co-précipitation a été établie en 1987 grâce aux travaux de T. Sugimoto^[7] qui ont permis de montrer qu'interviennent la tension interfaciale, la température et à nouveau le degré de sursaturation de la solution dans le mécanisme de la croissance des germes. Contrairement à la nucléation, il est nécessaire que l'étape de croissance soit relativement lente. En effet, la formation d'un cristal parfait consiste, pour les atomes, à explorer différents sites d'encrage pour trouver la bonne configuration.

B.4. Mûrissement et terminaison

Dans le cas de la synthèse par précipitation, le devenir des particules terminant leur phase de croissance est désormais dicté par un phénomène appelé le mûrissement d'Ostwald^[8]. Comme représenté dans la Figure 2, ce phénomène lent consiste en la dissolution des plus petites particules au profit de la déposition de leurs atomes sur la surface des particules les plus grandes. Bien que ce mécanisme de mûrissement particulier soit encore sujet à de nombreuses études, il est désormais établi que cette dissolution est due à une énergie de surface plus importante dans le cas des petites nanoparticules, favorisant ainsi leur solubilité apparente^[9].

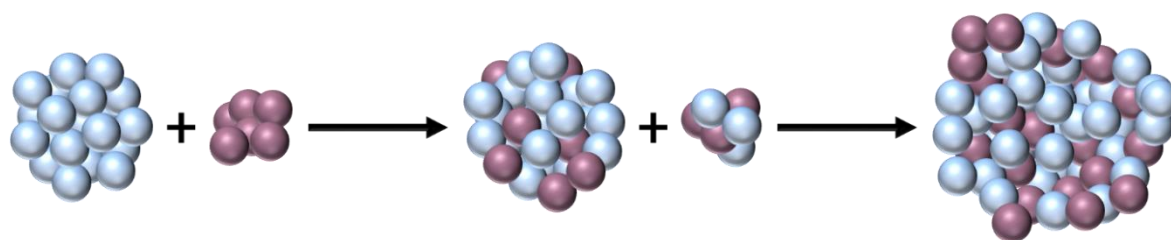


Figure 2. Représentation schématique du mûrissement d'Ostwald.

À la fin d'une synthèse par co-précipitation, l'agrégation des nanoparticules nouvellement formées est un phénomène quasi inévitable en absence de ligands à la surface des objets qui permettent de réduire l'énergie interfaciale. Pour permettre alors la stabilité des nanoparticules, il est nécessaire de diminuer les interactions attractives entre nanoparticules.

À cette fin, il est possible de mettre à profit la répulsion stérique induite par le greffage de molécules telles que des surfactants ou des polymères, ou encore de favoriser de la répulsion électrostatique en recouvrant les nanoparticules d'espèces chargées par chimisorption^[10] ou même par une approche mixte dite électrostérique^[11].

Partie II. Synthèse de nanoparticules d'or

A. Nanoparticules d'or sphériques

A.1. Principe de la synthèse

Dans le domaine de la synthèse de nanoparticules d'or sphériques, les travaux précurseurs de M. Faraday ont été fondateurs. En effet, ceux-ci rendent compte pour la première fois, en 1857, de la synthèse de ces nanoparticules par la réduction de l'acide chloraurique par du phosphore ou des composés organiques^[12]. Comme présenté en Figure 3, les nanoparticules d'or issues d'une des synthèses de cette époque présentent la couleur rubis, caractéristique de ces colloïdes.



Figure 3. Un échantillon de nanoparticules d'or synthétisées par M. Faraday en 1856, conservé au faraday Museum, Londres (depuis www.rigb.org).

La synthèse de colloïdes d'or a été ensuite rationalisée par J. Turkevitch^[13] via la réduction de l'acide chloraurique par de l'acide citrique en milieu aqueux porté à ébullition. Il est intéressant de noter que, dans cette méthode, l'acide citrique joue à la fois le rôle d'agent réducteur et celui d'agent stabilisant. Dans cette méthode, le mécanisme commence par la réduction des ions Au^{3+} en ions Au^+ par le citrate de sodium (Figure 4a). Cette réduction est favorisée thermodynamiquement par la différence positive entre les potentiels d'oxydoréduction des ions Au^{3+} ($E^0 = 1,52 \text{ V}$) et du citrate de sodium ($E^0 = 0,18 \text{ V}$)^[14,15]. Finalement une réaction de dismutation des ions Au^+ dans l'eau génère les atomes d'au (Figure 4b)^[16].

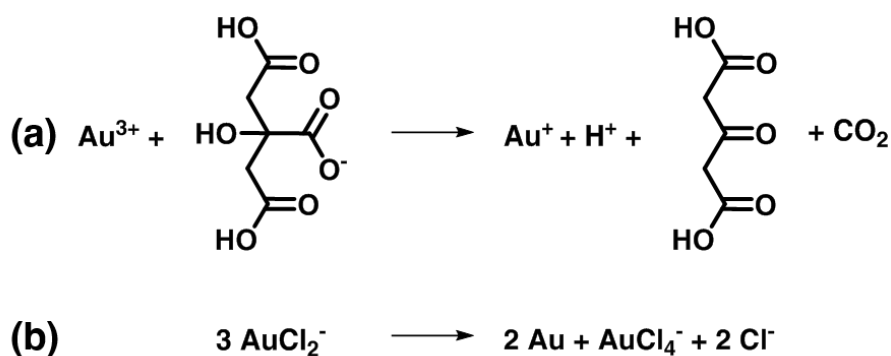


Figure 4. Schéma réactionnel de la réduction des sels d'or par le citrate de sodium.

Ce principe a permis par la suite à G. Frens, en 1973, de contrôler la taille des nanoparticules d'or synthétisées en modulant le rapport molaire entre sels d'or et acide citrique^[17]. En suivant cette stratégie, il est possible de contrôler la taille des particules de 5 à 150 nm de diamètre. Il est toutefois à noter que d'une part les plus grosses particules montrent une instabilité certaine ainsi que de larges distributions de taille^[18,19] et que d'autre part ces nanoparticules sont instables vis-à-vis des sels en solution.

A.2. Propriétés optiques

Les nanoparticules d'or sphériques sont obtenues selon la méthode de G. Frens^[17] pour 15 minutes de temps de réaction et une injection de 1 mL de citrate de sodium. La caractérisation des propriétés d'absorption de ces colloïdes dans l'eau permet de mettre en lumière la présence d'une importante bande d'absorption centrée sur 520 nm (voir Figure 5). Appelée communément bande plasmon, elle témoigne de la présence des plasmons localisés de surface (dont le principe a été expliqué au Chapitre I) qui trouvent leur condition de résonance pour des rayonnements lumineux autour de cette longueur d'onde. Les objets synthétisés étant sphériques, ceux-ci ne présentent qu'une seule dimension caractéristique et donnent ainsi lieu à une seule condition de résonance des plasmons de surface. De plus, la position de cette bande d'absorption est liée au diamètre des particules^[20]. À ces propriétés d'absorption particulières s'ajoute un phénomène de diffusion qui induit une augmentation de l'absorbance mesurée à des longueurs d'onde inférieures à 450 nm. En effet, ces nanoparticules étant d'une taille inférieure aux valeurs de ces longueurs d'onde, on assiste à la déviation de ces rayons lumineux par les particules.

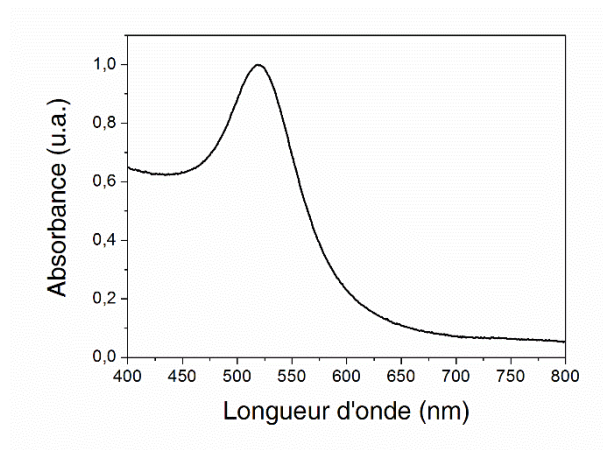


Figure 5. Spectre d'absorption UV—visible de nanoparticules d'or sphériques et stabilisées par l'acide citrique dans l'eau.

A.3. Propriétés morphologiques

Les AuNP synthétisées, comme les autres nanoparticules décrites dans ce chapitre, sont systématiquement caractérisées par microscopie électronique en transmission (TEM) dont l'utilisation en autonomie a été permise par l'encadrement de A. Burel (MRic, Biosit UMS 3480). Cette observation par microscopie électronique (Figure 6a) révèle des nanoparticules quasi sphériques. Sur la base de ces observations, la distribution statistique des diamètres des nanoparticules (Figure 6b) donne un diamètre moyen de $19,8 \pm 2,5$ nm. De plus, de nombreux points de contact entre nanoparticules témoignent d'une certaine instabilité colloïdale. Pour la détermination des concentrations molaires des suspensions de AuNP synthétisées, la méthode suivie est détaillée dans la partie expérimentale.

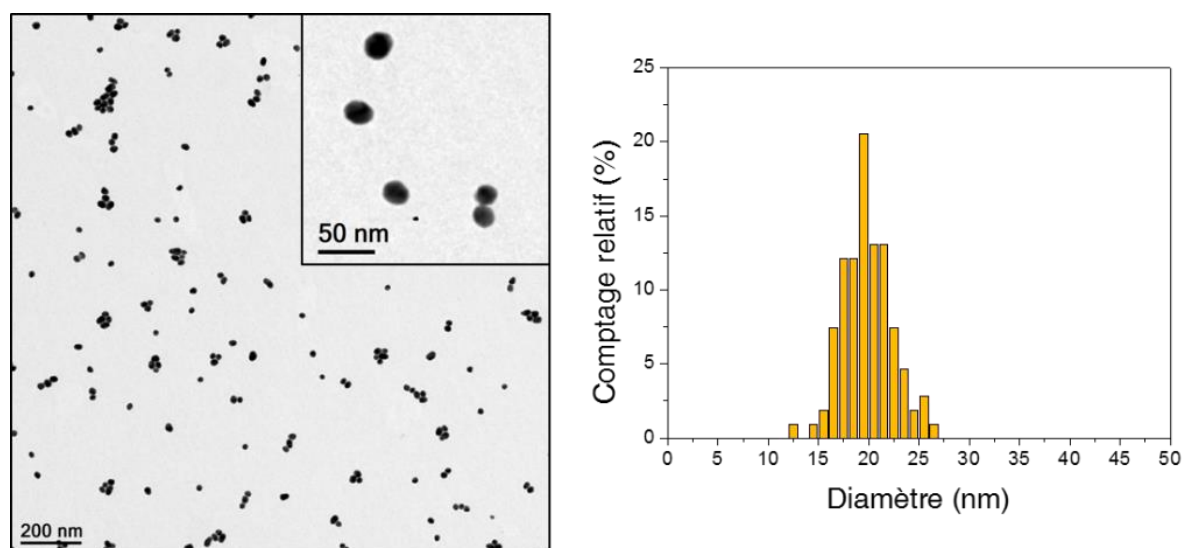


Figure 6. (a) Image TEM de nanoparticules d'or obtenues selon la méthode de G. Frens. (b) Distribution statistique du diamètre des nanoparticules observées ($n_{\text{comptées}} = 107$).

B. Nanobâtonnets d'or

B.1. Principe de la synthèse

Parmi les synthèses de nanoparticules d'or anisotropes, la synthèse de nanobâtonnets est la mieux établie. La taille, la forme ou encore la monodispersité des particules formées sont désormais contrôlées avec un degré de précision satisfaisant. Pour parvenir à la formation de nanobâtonnets, l'idée est de réaliser une étape de croissance de nanoparticules d'or en présence d'un surfactant cationique qui servira d'agent inducteur d'anisotropie^[21]. Comme schématisé en Figure 7, ce pouvoir est expliqué par une adsorption préférentielle du bromure d'hexadecyltriméthylammonium (CTAB) sur les faces cristallographiques $[100]$ plutôt que sur les faces $[111]$ de germes d'or (Figure 7a). Par la suite, durant la croissance des objets peut s'effectuer dans la direction de faces $[111]$ plus accessibles et forme ainsi des objets de forme cylindrique allongée^[22].

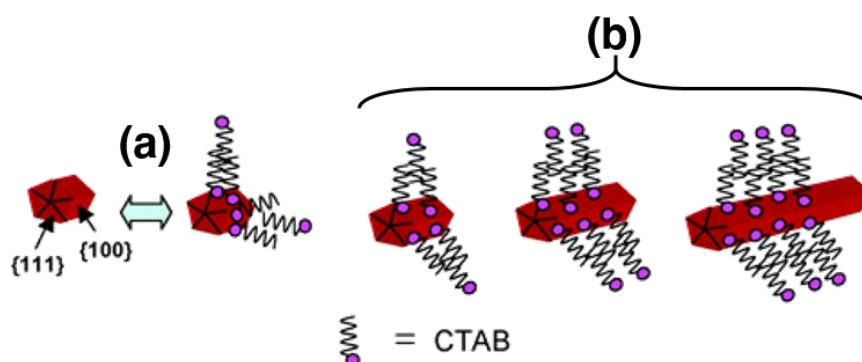


Figure 7. Mécanisme de la croissance des nanobâtonnets d'or en présence de CTAB (adapté depuis ^[22]).

Pour favoriser davantage l'anisotropie des objets, la croissance est réalisée en présence de sels d'argent AgNO_3 dont le rôle clé est toutefois discuté depuis longtemps^[23,24]. Dans le cadre de nos travaux, nous avons suivi deux méthodes de synthèse de nanobâtonnets d'or.

B.1.i. Synthèse « one pot »

Une première méthode, développée par C. Murphy^[25] en 2001 puis par Jana^[26] en 2005 est dite « *one pot* » car la phase de nucléation et la phase de croissance anisotrope sont réalisées dans la même solution et en même temps. Elle permet d'obtenir en seulement 20 minutes de réaction une suspension en nanobâtonnets ($\text{GNR}_{\text{Janna}}$) très concentrés et aux dimensions relativement petites, mais également des sphères d'or assez nombreuses. Des stratégies de purification par centrifugation permettent d'améliorer la pureté en nanobâtonnets^[27-29].

B.1.ii. Synthèse par germination et croissance

Une autre synthèse, dite par germination et croissance, a été développée par Murray *et al.*^[30]. Elle reprend le principe d'une première méthode mise au point par le groupe de El-Sayed^[23] qui a permis de séparer les phases de germination et de croissance. Comme montré en Figure 8, l'idée ici est, dans un premier temps, de former de très nombreux germes sphériques d'une taille très réduite^a par la réduction de sels d' Au^{3+} par le tétrahydruoborate de sodium (NaBH_4) qui est un réducteur utilisable en solution aqueuse.

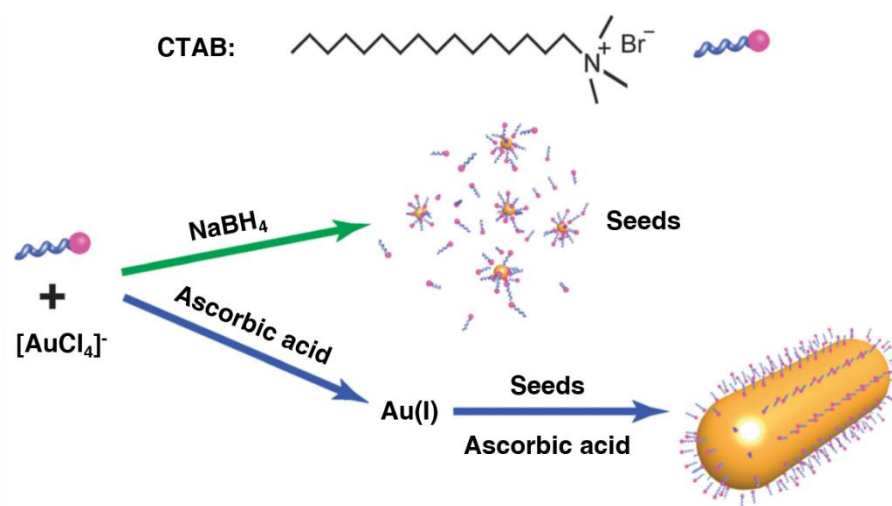


Figure 8. Synoptique de la synthèse de GNR par la méthode de germination et croissance modifiée par Murray *et al.* (extrait de [22]).

La seconde étape consiste ensuite à injecter ces germes dans une solution aqueuse d'acide chloraurique, dite de croissance, dans laquelle les bâtonnets ($\text{GNR}_{\text{Murray}}$) seront formés. Cette seconde solution comporte un mélange de tensio-actif cationique (le CTAB) et anionique (l'oléate de sodium) et de l'acide ascorbique. Une grande quantité d'ions Au^{1+} y est présente grâce au pouvoir réducteur de l'oléate de sodium^b et de l'acide ascorbique^c. Cette méthode a pour avantage de minimiser très largement la formation de sphères. De plus, à travers le contrôle minutieux de la fraîcheur de la solution de NaBH_4 , de l'âge de germes ou encore de la température, elle permet d'obtenir des nanobâtonnets présentant des rapports d'aspect et des diamètres variés avec des distributions en tailles très réduites.

^a Des sphères d'or d'un diamètre de 3-4 nm typiquement.

^b Dû à la liaison double $\text{C}=\text{C}$ présente dans la structure de cet acide gras mono-insaturé.

^c Capable d'effectuer deux oxydations à un électron consécutives.^[31]

B.2. Propriétés optiques

Comme dans le cas des nanoparticules d'or sphériques, la caractérisation des propriétés optiques par spectroscopie d'absorption UV–Vis des nanobâtonnets synthétisés démontre leurs propriétés plasmoniques. En effet, pour les deux méthodes de synthèses utilisées, deux bandes d'absorption sont observables. Celles-ci sont centrées sur des longueurs d'onde à 537 nm et 695 nm dans le cas des $\text{GNR}_{\text{Murray}}$, et à 518 nm et 723 nm dans le cas des GNR_{Jana} (Figure 9).

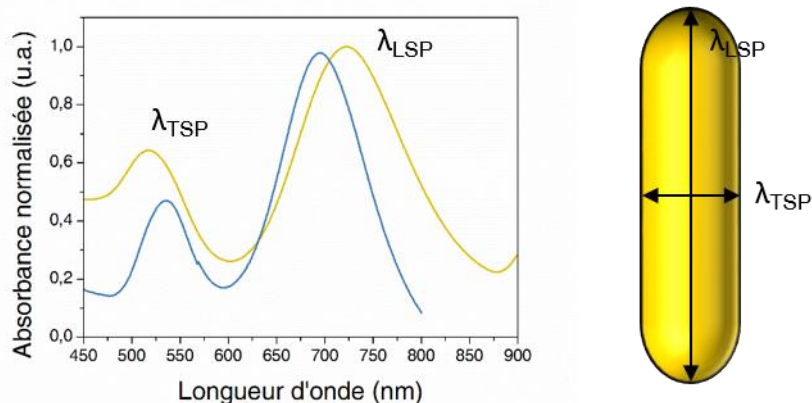


Figure 9. Spectre d'absorption UV-visible de GNR_{Jana} (courbe bleue) ou de $\text{GNR}_{\text{Murray}}$ (courbe jaune) dans l'eau et représentation schématique des deux modes plasmons des GNR.

Comme expliqué dans le chapitre précédent, ces deux bandes d'absorption correspondent aux conditions de résonance du mode longitudinal (λ_{LSP}) et du mode transverse (λ_{TSP}) des plasmons localisés de surface des nanobâtonnets. Ces particules étant en solution, l'orientation d'un bâtonnet par rapport à l'autre se fait de façon aléatoire, ce qui a pour conséquence de rendre la mesure isotrope. De ce fait, les conditions de résonance de chacun des modes plasmons peuvent être rencontrées et sont donc visibles dans le spectre d'absorption. La faible différence dans la position des bandes plasmons longitudinales et transverses témoigne de rapports d'aspect semblables entre GNR_{Jana} et $\text{GNR}_{\text{Murray}}$.

B.3. Propriétés morphologiques

L'observation de clichés TEM des nanobâtonnets obtenus selon les deux méthodes employées montre des objets aux dimensions différentes (Figure 10). Les distributions statistiques des longueurs et des largeurs observées sont de $18 \pm 2,5$ nm et $6,0 \pm 1,0$ nm pour les GNR_{Jana} et de $61 \pm 5,3$ nm et $20 \pm 2,6$ nm pour les $\text{GNR}_{\text{Murray}}$. Ces objets

présentent ainsi tous les deux un rapport d'aspect d'environ 3. Cette égalité explique le positionnement semblable des bandes plasmon transverses et longitudinales montrées ci-dessus. Pour la détermination des concentrations molaires des suspensions de GNR synthétisés, la méthode suivie est détaillée dans la partie expérimentale.

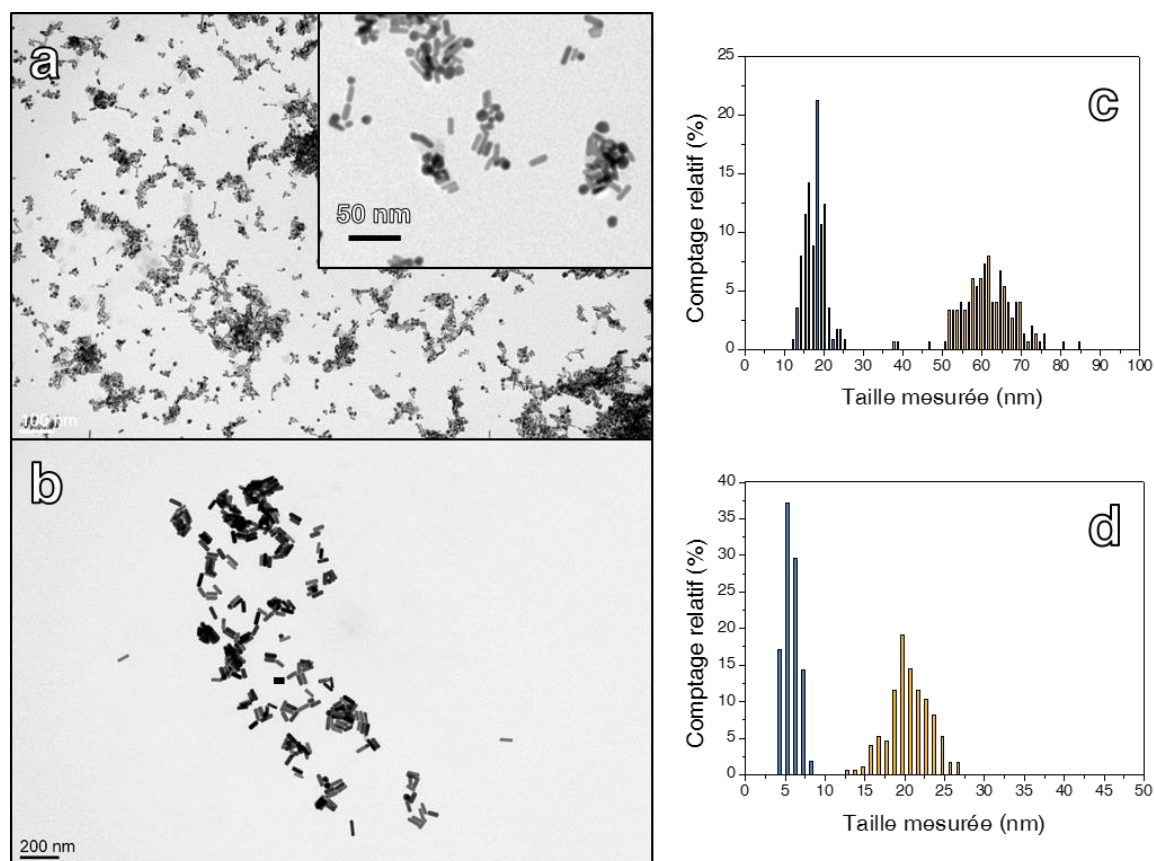


Figure 10. Images TEM (a) des GNR_{Janna} ou (b) des GNR_{Murray}. (c) Distribution statistique de la longueur des GNR_{Janna} (bleu) et des GNR_{Murray} (jaune). (d) Distribution statistique des diamètres des GNR_{Janna} (bleu) et des GNR_{Murray} (jaune).

C. Nanoclusters d'or

C.1. Présentation de la synthèse

Les principales caractéristiques des nanoclusters d'or (AuNCs) ont été présentées au Chapitre 1. Quant à leur synthèse, la littérature offre de très nombreuses études et de multiples revues couvrant les différentes approches développées durant les deux dernières décennies^[32-34]. On dénombre deux voies de synthèse : la synthèse par réduction de sels d'or et la synthèse par *etching*. Dans le cadre de ces travaux, des AuNCs ont été préparés selon la première approche car elle permet de produire des AuNCs hydrophiles et stables

en présence de sels, les rendant ainsi candidats potentiels pour le greffage des protéines α -Repeat.

La préparation de suspensions de nanoclusters d'or stables et présentant une fluorescence satisfaisante est une tâche délicate. En effet, le premier obstacle auquel se confronte la formation de ces nanoparticules est tout simplement leur taille : très petits, les AuNCs auront tendance naturellement à s'agréger comme lors d'une synthèse de nanoparticules d'or par réduction d'ions auriques. De ce fait, un ligand doit être sélectionné avec raison et introduit dans les bonnes proportions afin de remplir le rôle d'agent stabilisant. Le choix de ce ligand est d'autant plus crucial compte tenu de son rôle important dans la définition de la taille^[35] et des propriétés d'émission de fluorescence du cluster d'or^[36]. De cette façon, les travaux sur les clusters d'or ont abouti à des objets stabilisés, par exemple par des dendrimères de poly(amidoamine)^[37], des polymères tels que le poly(NIPAM-AA-HEA)^a, des oligonucléotides^b, des protéines^[38] ou encore des thiols^[39,40].

Des nanoclusters d'or stables et présentant une fluorescence satisfaisante ont été obtenus selon une méthode de synthèse développée par J. Xie *et al.* dans laquelle le glutathion (dont la structure est décrite en Figure 11) est utilisé en tant qu'agent réducteur et stabilisant^[41]. En Figure 11 sont également présentées les trois étapes du mécanisme aboutissant à la formation de AuNCs fluorescents. Dans un premier temps, la réduction des ions Au^{3+} en Au^{1+} est effectuée à température ambiante par le groupement thiol du glutathion et est immédiatement suivie par la coordination de ces ions Au^{1+} . Ces derniers peuvent se complexer avec le groupement thiol déprotoné du glutathion (formation de complexes Au^{1+} -thiolate) ou avec d'autres groupements tels que le groupe carboxyle de ce même ligand (complexes Au^{1+} -X). La seconde étape du mécanisme consiste en une réduction sélective des complexes Au^{1+} -X formant ainsi des atomes Au^0 . Cette réduction sélective est cinétiquement favorisée par haute température et par un potentiel redox plus positif dans le cas des complexes Au^{1+} -X que dans les complexes Au^{1+} -thiolate. Les atomes de Au^0 sont très vite isolés par les complexes Au^{1+} -thiolate à cause de la forte affinité entre les atomes Au^0 et les ions Au^{1+} , ce qui résulte en de nouveaux intermédiaires Au^0 - Au^{1+} -thiolate. Finalement, la dernière étape du mécanisme est l'agrégation lente de ces

^a Le poly (N-isopropylacrylamide-acrylic acid-2-hydroxyethylacrylate).

^b Un oligonucléotide est un court segment d'ADN ou ARN.

intermédiaires entre eux, par la collision des atomes Au^0 et leur fusion en un cœur métallique recouvert d'une couche compacte de complexes Au^{1+} –thiolate.

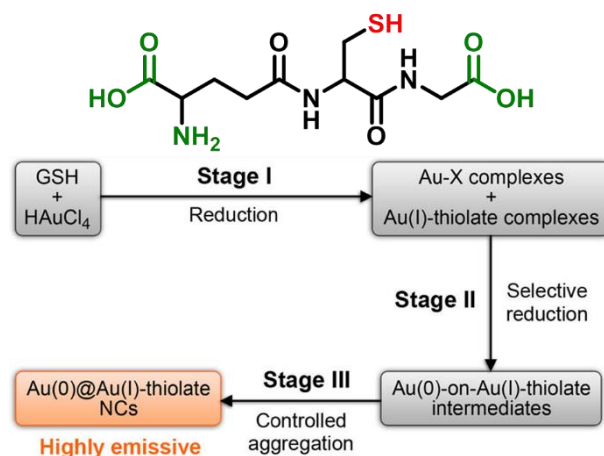


Figure 11. Structure du glutathion et synoptique de la synthèse de AuNC en trois étapes par Xie *et al.* (extrait de [41]).

C.2. Propriétés optiques

Les AuNCs ainsi synthétisés présentent les propriétés de fluorescence recherchées. En effet, en Figure 12 est présenté le spectre de luminescence de ces nanoparticules (courbe orange) dans lequel une bande de fluorescence est observable. Elle est centrée sur 605 nm et possède une largeur à mi-hauteur (de 112 nm) comparable à la littérature^[41]. Ces propriétés de fluorescence témoignent donc de la préparation réussie de nanostructures cœur–coquille au sein desquels les complexes Au^{1+} –thiolate présents autour du cœur métallique sont en mesure d'émettre de la lumière^[41,42].

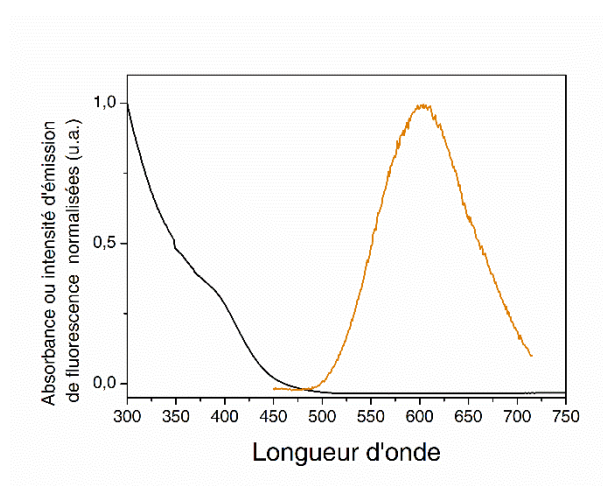


Figure 12. Spectres d'émission de fluorescence (courbe orange) et d'absorption UV–visible (courbe noire) de AuNC dans l'eau.

Quant aux propriétés d'absorption des AuNCs synthétisés, le spectre d'absorption UV–visible présenté en Figure 12 (courbe noire) est très différent de celui des nanoparticules d'or précédemment présentées dans les parties A et B de ce chapitre. En effet, celui-ci ne présente pas de bande plasmons, ce qui est un élément supplémentaire confirmant la préparation réussie de AuNCs qui sont des entités non plasmoniques. En revanche, ce spectre d'absorption présente une absorption croissante à partir de 500 nm jusqu'aux longueurs d'onde les plus faibles et un épaulement vers 400 nm que l'on retrouve également pour des complexes Au^{1+} –thiolate isolés^[41].

C.3. Propriétés morphologiques

Pour la caractérisation de la morphologie des AuNCs synthétisés, des observations en microscopie électronique en transmission de haute résolution (HRTEM) ont été réalisées en collaboration avec V. Demange, V. Dorcet et L. Rault (UMR 6226 ISCR / UMS 2001 ScanMAT). Ces images sont présentées en Figure 13a et b montrent que les clusters synthétisés sont des quasi-sphères. Leur diamètre moyen est mesuré (Figure 13c) et a une valeur de 1,9 nm. Pour la détermination des concentrations molaires des suspensions de AuNC synthétisés, la méthode suivie est détaillée dans la partie expérimentale.

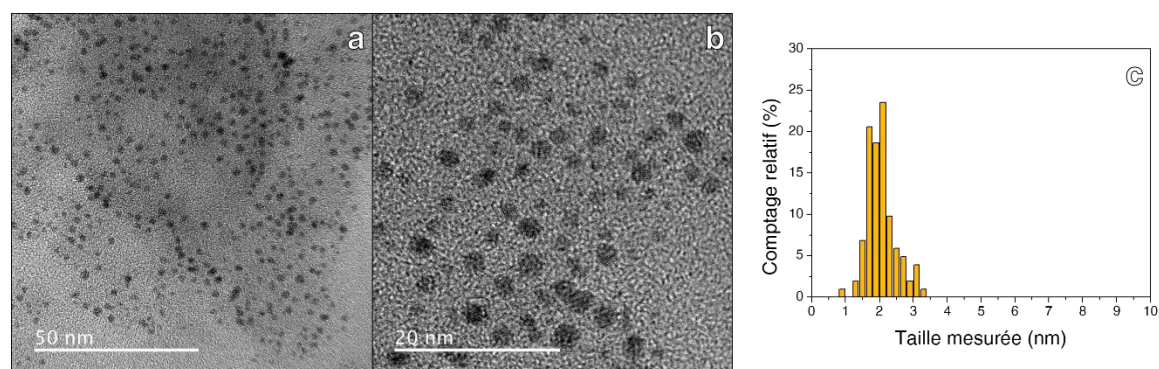


Figure 13. (a et b) Images HRTEM des AuNC et (c) la distribution statistique de leurs diamètres.

Partie III. Synthèse de nanoparticules semi-conductrices fluorescentes

A. Synthèse de *quantum dots* cœur–coquille CdSe/ZnS

A.1. Introduction

Les méthodes de synthèse de nanoparticules semi-conductrices ont été très largement optimisées au cours de ces 30 dernières années. Initialement, ces nanoparticules étaient

produites en matrice vitreuse puis incorporées dans des filtres optiques. Après une longue suite de travaux, auxquels ont contribué les équipes de M.G. Bawendi (MIT)^[43,44], de L.E. Brus (Bell Labs)^[45], de A.P. Alivisatos (University of California)^[46], ou encore de P. Guyot-Sionnest (University of Chicago), une nouvelle voie de synthèse en phase liquide a pu être développée. Celle-ci permet désormais de bien contrôler la croissance des nanocristaux et donc d'obtenir des objets avec des tailles bien définies. Dans le cadre des travaux présentés dans cette partie, la synthèse utilisée au laboratoire est la décomposition à haute température de précurseurs organométalliques développée dans les publications mentionnées ci-dessus. Cette synthèse a pu faire l'objet d'optimisation au laboratoire lors des thèses antérieures de A. Dif^[47], V. Roullier^[48] et B. Boichard^[49].

Pour des QD CdSe/ZnS, leur synthèse s'effectue en deux étapes : dans un premier temps, des cœurs de séléniure de cadmium CdSe sont préparés puis purifiés. Intervient ensuite une étape de croissance par hétéro-épitaxie^a d'une coquille de ZnS sur cœurs CdSe avec un contrôle de son épaisseur.

A.2. Synthèse des cœurs CdSe

Les cœurs de CdSe sont préparés en deux temps. Traditionnellement, le précurseur de cadmium utilisé dans la synthèse de QD en phase liquide est le diméthylcadmium (CH_3CdCH_3). Très volatil et très toxique, ce précurseur a été remplacé par un composé plus pratique à manipuler qui est l'oxyde de cadmium (CdO)^[50]. Tout d'abord, le précurseur de Cd^{2+} très réactif est formé en introduisant le CdO dans le montage présenté en Figure 14, en présence d'une alkylphosphine, l'oxyde de trioctylphosphine (TOPO) et d'une alkylamine : l'hexadécylamine (HDA). Le TOPO et la HDA vont avoir un double rôle, à savoir celui de solvants chélatant à haut point d'ébullition et celui de former des micelles recouvrant et protégeant la surface des QD en croissance. Le milieu réactionnel contient également de l'acide 1-tétradécylphosphonique (TDPA) qui sert de ligand pour complexer le Cd^{2+} produit par la décomposition du CdO à haute température (320 °C). Cette réaction génère une molécule d' H_2O pour chaque atome de Cd chélaté : elle s'opère sous atmosphère inerte (argon) sans quoi cette décomposition n'est pas possible. La disparition de la couleur rouge brique de l'oxyde de cadmium confirme la formation du

^a L'hétéro-épitaxie consiste en la croissance d'une couche mince par dépôt d'atomes sur la surface d'un cristal préexistant. La couche mince et le substrat sont de natures différentes.

complexe cadmium—phosphonates (cadmium ditetradécylphosphonate). Une fois cette première étape de synthèse effectuée, la température du milieu réactionnel est ajustée à 270 °C.

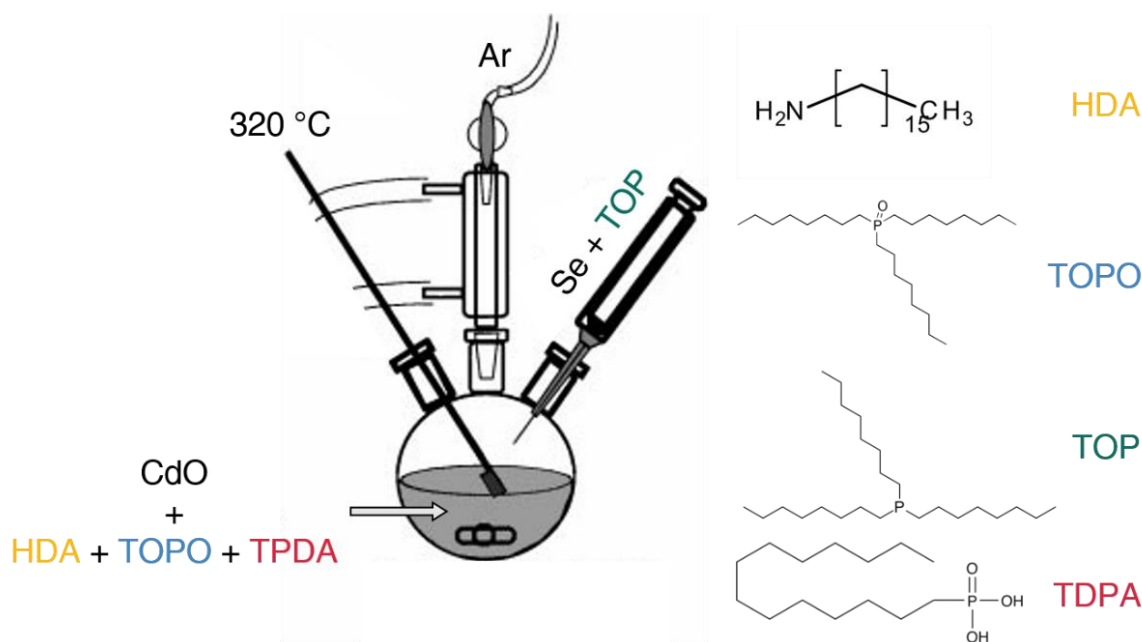


Figure 14. Montage et réactifs utilisés pour la synthèse des cœurs de CdSe (Adapté depuis ^[51]).

En parallèle, une solution de sélénium est préparée en solubilisant de la poudre de Se dans de la trioctylphosphine (TOP) à température ambiante. Dix équivalents Cd^{2+} en sélénium sont solubilisés pour améliorer le rendement quantique des QD^[52]. Cette solution est préparée sous argon afin d'éviter l'oxydation de la TOP en TOPO et du Se en SeO_2 .

La sursaturation en précurseurs et le début de la phase de nucléation des nanocristaux sont déclenchés par l'injection de ce mélange Se + TOP dans le milieu réactionnel à 270 °C. Cette température est choisie car elle est idéale pour la synthèse de nanocristaux monodisperses. En effet, une injection rapide permet la nucléation instantanée des germes de CdSe mais également une baisse de la température (aux alentours de 200 °C). Le chauffage du milieu permet alors de remonter la température à 230 °C, condition à laquelle la croissance des germes peut alors se dérouler. On a donc la séparation des étapes de nucléation et de croissance, ce qui permet d'assurer la monodispersité des nanoparticules semi-conductrices produites.

Le suivi de la longueur d'onde d'émission des germes de CdSe peut être réalisé par spectroscopie de fluorescence et permet alors d'arrêter la réaction quand la longueur d'onde voulue est atteinte (Figure 15b). En parallèle, les spectres d'absorption des germes de CdSe montrent le pic excitonique du CdSe (Figure 15a). Il s'agit du pic correspondant à la

longueur d'onde d'émission de la première transition énergétique (E_{1s}) entre bande de valence et bande de conduction du semi-conducteur. Ce pic se déplace progressivement selon la taille des nanocristaux à cause du phénomène de confinement quantique. L'arrêt de la croissance des germes nécessite d'être réalisé brutalement afin d'éviter tout phénomène de maturation d'Ostwald qui aurait pour effet d'élargir la distribution des diamètres des particules. À cet effet, une trempe thermique est effectuée pour abaisser la température du milieu à une valeur inférieure à 200 °C, température à laquelle les germes de CdSe ne peuvent plus croître. Après la synthèse des cœurs, des lavages permettent d'éliminer à la fois les ligands organiques et le sélénium en excès.

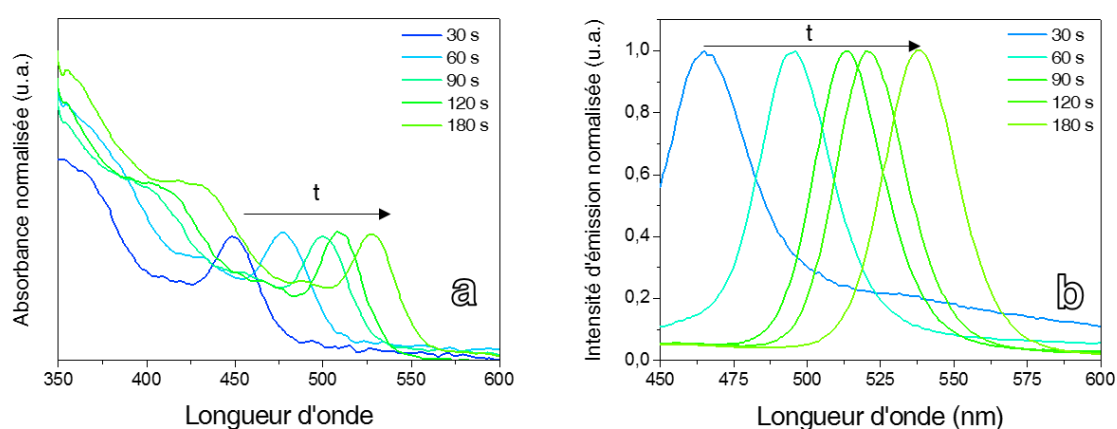


Figure 15. Évolution (a) du spectre d'absorption UV—visible et (b) du spectre d'émission des cœurs de CdSe entre 0 et 180 s ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm).

A.3. Synthèse de la coquille de ZnS

La seconde étape de la synthèse des QD cœur—coquille CdSe/ZnS consiste à nucléer une fine couche de ZnS sur des cœurs purifiés. Cette coquille de ZnS a pour rôle de renforcer le rendement quantique des cœurs en préservant des électrons excités d'une désexcitation non radiative en surface^[43]. Ce phénomène permet ainsi de gagner un facteur compris entre 2 et 3 sur l'intensité d'émission obtenue.

Le dépôt par épitaxie de cette seconde couche semi-conductrice est mené dans le même mélange de solvant, à savoir TOPO et HDA, en présence de cœurs CdSe et sous atmosphère inerte. La température du milieu réactionnel est portée à 150 °C puis les précurseurs de zinc et de soufre dans le TOP sont injectés lentement et à débit constant. La formation de la couche de ZnS provoque à la fois l'augmentation quasi immédiate de la fluorescence de

la solution mais également le décalage du maximum d'émission λ_{em} vers des longueurs d'onde plus grandes. Il est alors possible de suivre ce dépôt par spectroscopie de fluorescence et de l'arrêter lorsqu'une épaisseur optimale est observée. La Figure 16 montre ainsi l'évolution croissante de l'intensité de fluorescence ainsi qu'un décalage du maximum d'émission de l'ordre de 2 nm. Cette croissance est observable pour une durée de réaction allant jusqu'à 100 min, mais un temps trop long entraîne sa diminution. En effet, il existe une épaisseur critique à partir de laquelle les défauts cristallins tendent à diminuer de nouveau l'intensité de fluorescence. La formation de la couche de ZnS doit être un processus lent afin d'éviter la génération de défauts cristallins conduisant à l'augmentation des processus de recombinaison non radiatifs^[53].

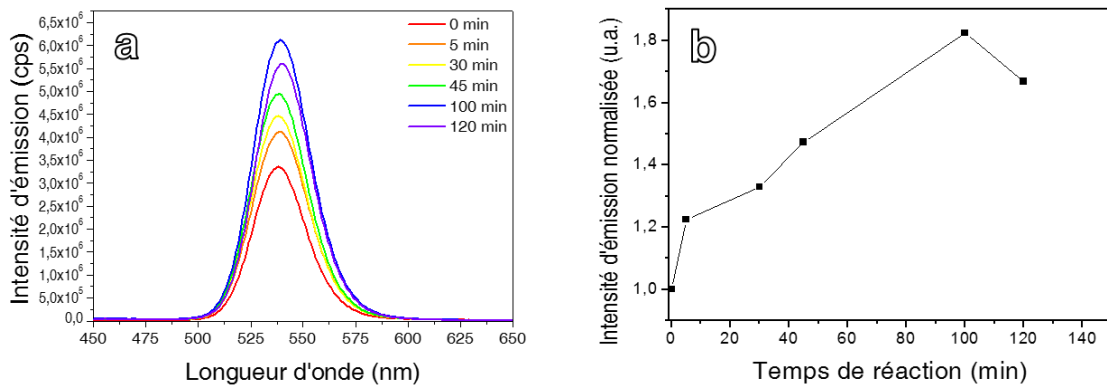


Figure 16. (a) Évolution du spectre d'émission des QD CdSe/ZnS et (b) évolution de l'intensité d'émission normalisée en fonction du temps de réaction ($\lambda_{exc} = 350$ nm).

A.4. Mesure du diamètre

Les QD synthétisés sont caractérisés par TEM. Des nanocristaux présentant une λ_{EM} de 538 nm sont alors observés par TEM (Figure 17a). Les particules synthétisées se présentent sous la forme de quasi-sphères et l'analyse statistique de leur diamètre montre une distribution centrée sur $3,1 \pm 0,6$ nm (Figure 17b).

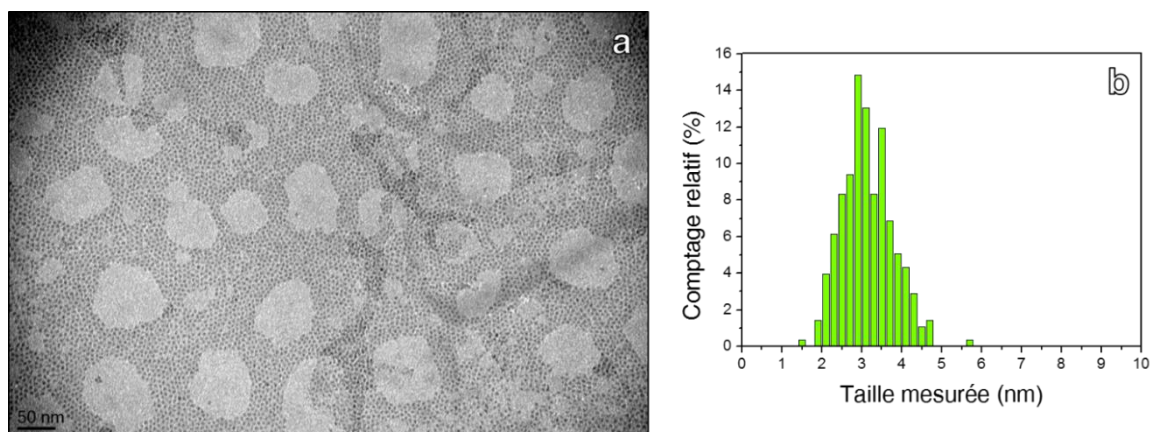


Figure 17. (A) Image TEM des QD avec $\lambda_{em} = 538$ nm et (b) la distribution statistique de leur diamètre ($n_{comptees} = 276$).

B. Synthèse de *quantum rods* CdSe/CdS

B.1. Introduction et principe de la synthèse

Des nanobâtonnets semi-conducteurs aux propriétés optiques uniques (décrites au Chapitre 1) peuvent être obtenus par une voie de synthèse similaire à celle des QD. Développée à la suite des travaux menés pour obtenir des QD aux tailles bien contrôlées, les QR sont également formés lors d'une synthèse en deux temps : formation d'un cœur de CdSe puis croissance anisotrope d'une coquille de CdS. Cette synthèse plus récente est le fruit de nombreux travaux, dont ceux de L. Manna, qui ont eu lieu de 2000 à 2007^[54-59]. Elle se différencie de la synthèse des QD précédemment décrite par la composition du milieu réactionnel et la température à laquelle ce dernier est porté. Ces deux paramètres permettent ainsi l'anisotropie des objets.

Tout d'abord, la température à laquelle les cœurs de CdSe sont formés est plus élevée : 380 °C contre 320 °C dans le cas des QD. En se formant, ces cœurs peuvent se former selon deux types de structures cristallines : forme wurzite et forme zinc blende (dont les structures sont montrées en Figure 18). Or, l'intérêt de cette différence de température est de favoriser une structure cristalline de type wurzite^[60]. En complément à ce phénomène, la présence d'un acide phosphonique à chaîne longue, l'acide octadécylphosphonique (ODPA), permet également de favoriser la formation du CdSe sous forme wurzite.

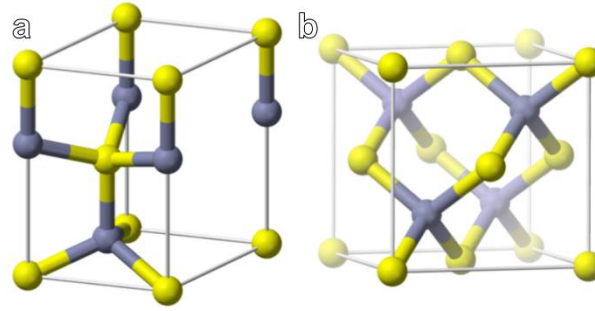


Figure 18. Structure des mailles (a) wurzite et (b) zinc blende du CdSe.

Une fois ces cœurs préparés, la croissance de la coquille de CdS par épitaxie est réalisée en injectant une solution de TOP + S en tant que précurseur de soufre dans un milieu réactionnel à chaud et contenant du CdO. La structure cristalline de type wurzite des cristaux de CdSe présente l'intérêt d'avoir trois faces cristallines plus ou moins réactives (Figure 19a). Le point essentiel de cette structure est la présence d'une face (001) composée uniquement d'atomes de cadmium comme montré en Figure 19b.

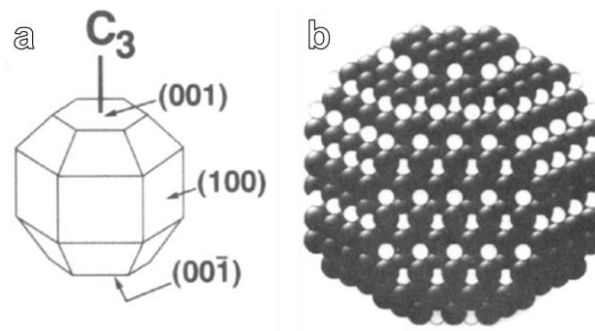


Figure 19. (a) Schéma d'une nanoparticule de CdSe de type wurzite montrant ses principaux plans cristallins. (b) Représentation schématique de la même particule montrant les couches d'empilement des atomes de Cd en noir et des atomes de Se en blanc.

En comparaison aux autres faces, celle-ci est plus réactive et sera donc le point de départ de la croissance anisotrope du cristal de CdS à la surface des cœurs de CdSe. La Figure 20 permet de résumer ce mécanisme.

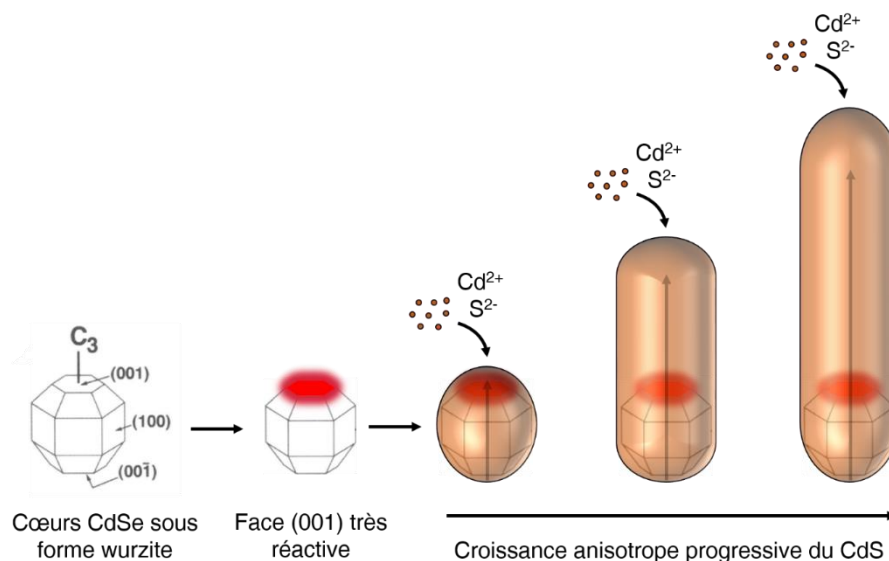


Figure 20. Schéma du mécanisme de croissance anisotrope du CdS sur les cœurs de CdSe pour la synthèse de QR.

Pour moduler la morphologie (longueur et largeur) des QR, la cinétique de la réaction peut être modulée par les concentrations initiales en réactifs. Ainsi, les quantités relatives en précurseurs de cadmium et de soufre par rapport à la quantité de cœurs CdSe peuvent être modifiés. La longueur d'onde d'émission des objets peut, elle, être changée en utilisant des cœurs de CdSe de différentes tailles.

B.2. Caractérisation optique des QR CdSe/CdS

B.2.i. Cœurs CdSe

La mesure des spectres d'émission et d'absorption des cœurs CdSe est importante car elle permet de vérifier la qualité des germes avant de les utiliser pour la croissance anisotrope du CdS et donc la formation des QR. La Figure 21 montre que la bande d'émission de fluorescence de ces cœurs est fine, avec une largeur à mi-hauteur de 25 nm qui témoigne d'une grande monodispersité en taille. Le spectre d'absorption UV-Visible, quant à lui, présente le pic excitonique du CdSe qui permet notamment d'évaluer un diamètre moyen à l'aide de l'approximation fournie par Peng *et al.*^[61]. Pour les cœurs caractérisés dans la Figure 21, le pic excitonique centré sur 503 nm donne un diamètre moyen de 2,4 nm. Deux autres pics d'absorption sont également observables, situés à 405 et 460 nm.

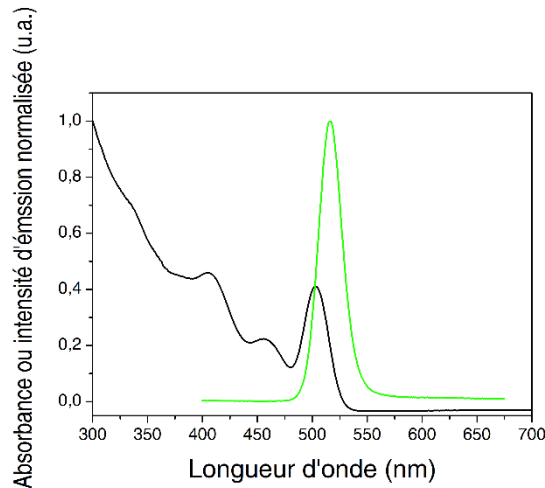


Figure 21. Spectres normalisés d'émission de fluorescence (courbe verte) et d'absorption UV—visible (courbe noire) de cœurs CdSe dans le toluène ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$).

B.2.ii. Dépôt de la coquille de CdS anisotrope

Comme pour le dépôt de la coquille de ZnS dans le cas des QD, les spectroscopies d'émission de fluorescence et d'absorption UV-Visible nous permettent aussi de suivre l'augmentation de l'épaisseur de CdS déposé sur les germes de CdSe (Figure 22).

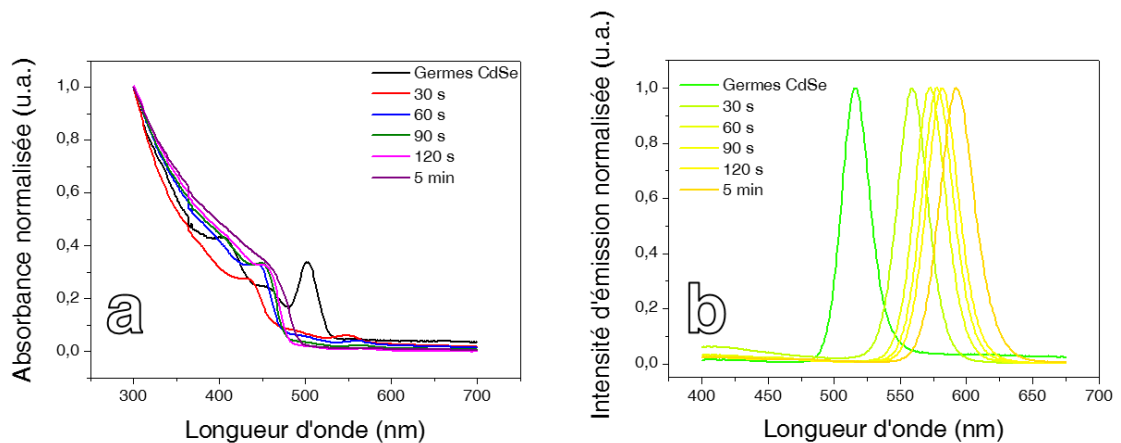


Figure 22. (A) Évolution du spectre d'absorption UV—visible normalisée des QR CdSe/CdS et (b) évolution de leur spectre d'émission normalisée en fonction du temps de réaction ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$).

Le spectre d'absorption des cœurs montre que le premier pic excitonique (à 503 nm) se déplace et s'éteint dès les premières secondes après l'injection de la solution de soufre. Simultanément, on peut observer un pic à 550 nm qui correspond à la formation du cristal de CdS. Ce pic s'éteint au cours de la réaction. Deux pics sont aussi bien visibles au début de la réaction, à 435 et 490 nm. Ils correspondent à des interactions entre CdSe et CdS^[59,60].

B.3. Détermination de la taille

La caractérisation par microscopie électronique en transmission permet de vérifier la qualité de chaque lot de QR synthétisé. Comme illustré en Figure 23, un lot de QR synthétisé avec un temps de réaction de 8 minutes mène bien à la formation de nanobâtonnets. Le logiciel ImageJ permet d'estimer un diamètre moyen de $6,0 \pm 1$ nm et une longueur moyenne de 110 ± 16 nm. En outre, ces observations TEM nous montrent la présence de quelques germes de CdSe entourés de trois bras de CdS. Ces objets, appelés tripodes, rendent compte de la présence de quelques germes de CdSe cristallisés sous forme tétraédrique zinc blende. Cette structure cristalline présente quatre faces [111] qui permettent la croissance par épitaxie du CdS. La synthèse de tétrapodes, tripodes ou bipodes de CdS est d'ailleurs l'objet de nombreux travaux de recherche^[62,63].

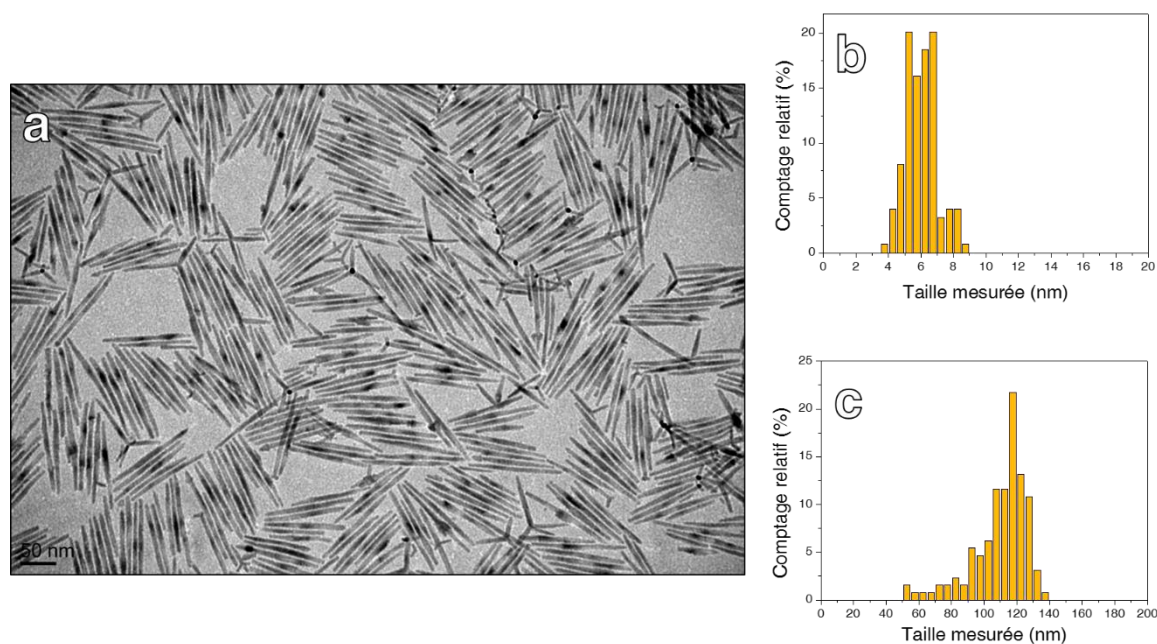


Figure 23. (A) Image TEM d'un lot de QR synthétisés avec un temps de réaction de 8 minutes et distribution statistique de (b) leur diamètre et (c) leur longueur.

Pour la détermination des concentrations molaires des suspensions de QR synthétisés, la méthode suivie est détaillée dans la partie expérimentale.

C. Synthèse de *quantum dots* sans cadmium $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$

C.1. Introduction

Comme nous l'avons expliqué au Chapitre I, les QD ont été très vite perçus comme très prometteurs pour des applications biologiques : en biophotonique, en nanomédecine, pour

l'imagerie ou encore pour de la biodétection. Toutefois, ces nanoparticules semi-conductrices étant très majoritairement composées de cadmium associé à d'autres éléments, la toxicité de ces objets est devenue une limite à leur utilisation. D'un côté, des études ont montré qu'en milieu biologique ces QD peuvent être dégradés et ainsi répandre des ions Cd^{2+} très toxiques^[64-66]. D'autres études, quant à elles, pointent du doigt la mauvaise qualité des QD utilisés, notamment en terme de stabilité, comme étant responsable des effets délétères observés^[67,68]. En réponse à ces deux conclusions discordantes, deux solutions ont été développées pour palier le problème de toxicité des QD à base de cadmium.

Tout d'abord, un travail sur la chimie de surface des objets peut être effectué. Il vise alors à améliorer leur stabilité. Par exemple, une stratégie d'encapsulation des particules par une couche de polymère très stable, tel que le polyacrylate de sodium ou un polyméthacrylate modifié, fait partie des possibilités développées dans cette optique^[69-71].

Un autre axe de recherche plus exigeant, lui, consiste à mettre au point de nouveaux QD dont la composition s'affranchit du cadmium. Il s'agit d'un défi technologique conséquent et qui s'oppose aux propriétés optiques excellentes des QD traditionnels : leurs bandes d'émission sont fines et leurs rendements quantiques sont bien souvent élevés. Allant dans ce sens, de nombreux travaux ont alors fait émerger de nouvelles nanoparticules semi-conductrices composées, par exemple, de phosphore d'indium (InP)^[72,73], de disulfure de cuivre et d'indium (CuInS_2)^[74], de disulfure d'argent et d'indium (AgInS_2)^[75] ou encore de sulfure d'argent (Ag_2S)^[76]. Dans le cadre de nos travaux, notre choix s'est porté sur la synthèse en milieu liquide de nouveaux QD CuInS_2 . Ces QD sans cadmium ont déjà été utilisés pour des études d'imagerie optique *in vitro*^[77] et *in vivo*^[78] et leur rendement quantique peut être aussi largement amélioré à l'aide du dépôt d'une couche de ZnS ^[79]. La présence de cette coquille étant un prérequis indispensable au greffage des protéines α -Repeat.

La synthèse des QD $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ est réalisée dans des conditions similaires à celles des QD CdSe/ZnS , à savoir sous atmosphère inerte et à haute température. Des travaux publiés par l'équipe de P. Reiss (CEA, Grenoble) en 2009 décrivent la synthèse en milieu liquide de ces nanocristaux^[80]. Elle a pour originalité et avantage d'utiliser le 1-dodécane-thiol (DDT) à la fois en tant que précurseur de soufre mais aussi en tant que ligand pour la stabilisation des particules. D'autre part, les précurseurs d'indium et de cuivre sont respectivement l'acétate d'indium ($\text{In}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_3$) et l'iodure de cuivre (CuI) qui sont solubilisés dans de l'octadécène. Une modification apportée par V. Klimov^[81] en 2011 va

même plus loin en utilisant le DDT comme précurseur de soufre, ligand et solvant et permet d'obtenir des QD $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ avec des maxima d'émission entre 550 nm et 815 nm.

C.2. Synthèse des cœurs CuInS_2

Ainsi, en suivant les méthodes de Klimov et de P. Reiss, la synthèse de cœurs CuInS_2 a pour première étape la décomposition des précurseurs de cuivre et d'indium dans le DDT à 100 °C et sous argon. Le mélange est ensuite porté à 230 °C, température à laquelle la nucléation puis la croissance des nanoparticules est déclenchée par la décomposition du DTT. La solution passe alors d'une couleur incolore à verte, jaune puis rouge et finalement noire. Comme pour la synthèse des QD CdSe/ZnS , il est possible de suivre l'augmentation de la taille des nanoparticules en suivant l'évolution de leur maximum d'émission. Finalement, quand la taille et la longueur d'onde d'émission souhaitées sont atteintes, une trempe thermique permet d'arrêter la réaction. Avec un temps de réaction de 15 minutes, des cœurs de CuInS_2 fluorescents dans le rouge à $\lambda_{\text{em}} = 684$ nm (Figure 24) sont obtenus. Leur bande d'émission présente une largeur à mi-hauteur de 103 nm, ce qui est une valeur haute reflétant la polydispersité de la suspension. D'autre part, le spectre d'absorption UV—visible ne permet pas d'observer un pic excitonique bien visible.

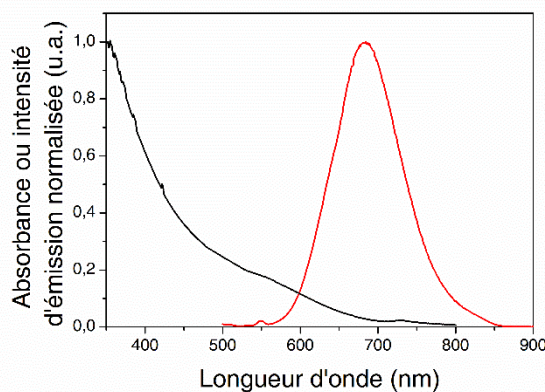


Figure 24. Spectre d'absorption UV—visible (courbe noire) et spectre d'émission (courbe rouge) des cœurs CuInS_2 ($\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm).

C.3. Passivation avec une coquille de ZnS

Le dépôt d'une coquille de ZnS sur les cœurs fraîchement préparés est ensuite réalisé. Une solution de stéarate de zinc dissout dans de l'octadécène est utilisée comme solution de Zn. Elle est donc injectée dans le mélange DDT + cœurs CuInS_2 . Les cœurs n'ont subi aucune étape de lavage, le DDT servant à nouveau de précurseur de soufre. Pour permettre

la croissance du ZnS, le mélange CuInS_2 + DDT + zinc stéarate est chauffé à 220 °C pendant une durée comprise entre 20 minutes et 1 heure. La formation de la coquille de sulfure de zinc est suivie par spectroscopie de fluorescence (Figure 25). Alors que le spectre d'absorption ne présente aucune évolution majeure, l'intensité d'émission de fluorescence des nanoparticules cœur-coquille en formation est multipliée par un facteur d'environ 7 après 15 minutes de réaction. Cette augmentation s'accompagne également d'un décalage de la bande d'émission vers le bleu. Les auteurs qui ont développé cette synthèse expliquent ce décalage par une attaque probable des cœurs, due aux conditions dans lesquelles la croissance est effectuée. Cette réduction de la taille du cœur de CuInS_2 augmente alors le confinement quantique au sein des nanocristaux et l'émission est portée vers des plus hautes énergies.

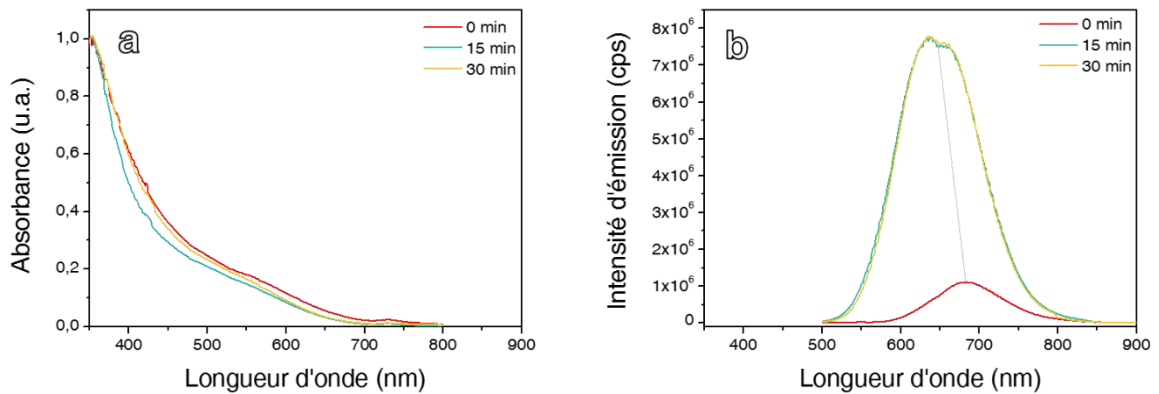


Figure 25. (a) Évolution du spectre d'absorption UV-visible et (b) évolution du spectre d'émission de fluorescence des QD $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ pendant le dépôt de la coquille de ZnS ($\lambda_{\text{exc}} = 400$ nm).

C.4. Morphologie des QD $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$

Les QD sans cadmium ainsi obtenus présentent une morphologie peu homogène lors de leur caractérisation par TEM (Figure 26a). La littérature montre des nanocristaux tétraédriques comme présentés dans l'encart de la Figure 26a, ce qui est observé pour quelques particules seulement. Ces QD ne semblent pas très monodisperses non plus puisque la mesure de leur taille (Figure 26b) donne un diamètre moyen de $3,2 \pm 0,9$ nm. Cette taille moyenne est cependant en accord avec la littérature^[81] (2,7 nm pour 20 minutes de réaction et sans coquille de ZnS). Pour la détermination des concentrations molaires des

suspensions de QD CuInS₂/ZnS synthétisés, la méthode suivie est détaillée dans la partie expérimentale.

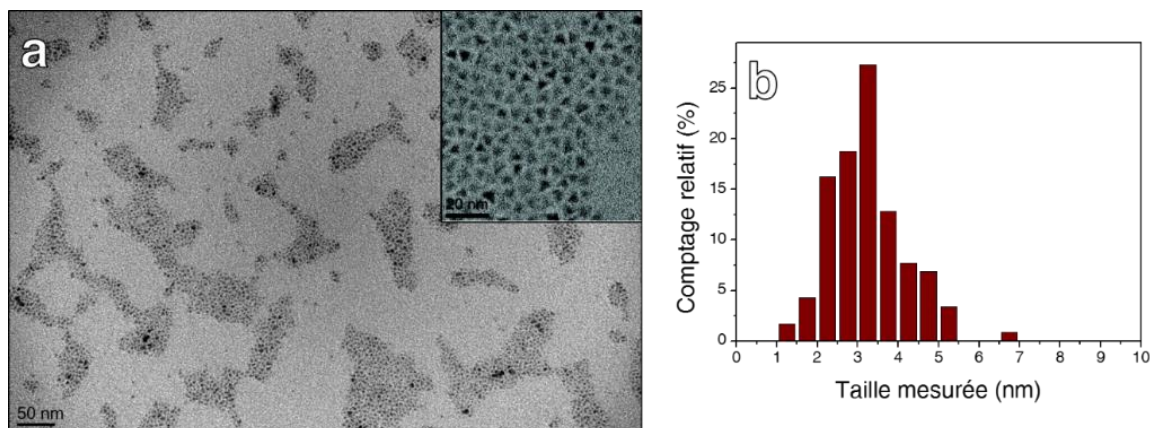


Figure 26. (a) Image TEM des QD CuInS₂/ZnS avec $\lambda_{em} = 648$ nm et (b) la distribution statistique de leur diamètre ($n_{comptées} = 179$). Encart de (a) extrait de [80].

Partie IV. Stabilisation et hydrophilisation de nanoparticules

A. Introduction

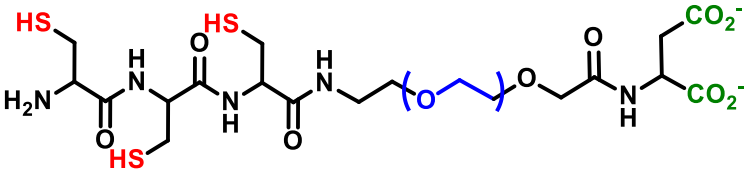
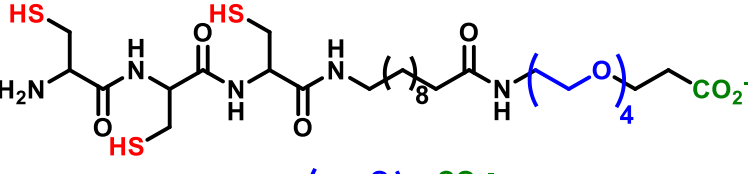
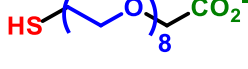
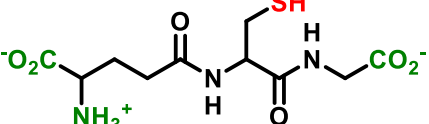
Cette partie traite du contrôle de la chimie de surface des nanoparticules synthétisées. Ces travaux ont pour objectif de modifier l'état de surface de ces particules en changeant les ligands à leur surface afin de les rendre hydrophiles et stables contre l'aggrégation. L'objectif est d'apporter aux nanoparticules des propriétés idéales en matière de stabilité afin de pouvoir greffer les protéines α -Repeat sur leur surface.

La stratégie de fonctionnalisation que nous avons suivie s'appuie sur deux constats. D'une part, les nanoparticules métalliques (sphères et nanobâtonnets d'or) sont stabilisées par des ligands via des interactions électrostatiques. Ces ligands (citrate et CTAB) se révèlent alors insuffisants lorsque l'on place les nanoparticules en milieu tamponné. D'autre part, nous disposons de nanoparticules semi-conductrices qui sont synthétisées en milieu organique et qui sont donc, en l'état, inutilisables dans l'eau. Des ligands thiols PEGylés, synthétisés et décorés à façon, ont été ainsi testés pour obtenir à la fois des nanoparticules d'or stables en présence de sels, et pour rendre les nanoparticules semi-conductrices hydrophiles. D'autres ligands, de structures plus simples, seront également étudiés pour comparaison. Nous commencerons par présenter les ligands utilisés puis nous discuterons des résultats de fonctionnalisation obtenus pour ces deux types de nanoparticules.

B. Présentation des ligands utilisés

Une partie des ligands utilisés dans ces travaux présentent un squelette peptidique (voir Tableau 1). Ces molécules, appelées C3E6D et C5PEG4, peuvent être préparés à façon par un fournisseur extérieur. La structure de ces ligands peptidiques est le fruit de plusieurs travaux de l'équipe^[82-85]. Ils ont été mis au point pour posséder une grande affinité pour la surface des nanoparticules métalliques et semi-conductrices et pour générer de la répulsion électrostatique et stérique afin de leur apporter une grande stabilité. D'une part, une fonction d'accroche, composée de trois cystéines (on parle alors de motif tricystéine), sert d'encre multidentate ayant une forte affinité avec les atomes d'or ou les atomes de soufre et de zinc de la surface des nanoparticules métalliques ou de semi-conductrices grâce aux trois fonctions thiols apportées par ce motif. L'utilisation de l'acide lipoïque, ligand dithiol, pour la fonctionnalisation de QD est décrite dans la littérature depuis 2008 par l'équipe de H. Mattoussi^[86] (US Naval Research Laboratory). La structure de ces peptides présente également des unités polyéthylène glycol (PEG) qui permettent une bonne solubilité dans l'eau, apportent une grande flexibilité au ligand et induisent de la répulsion stérique pour prévenir l'agrégation. Finalement, un groupement ionisable, acide carboxylique, permet de moduler la charge des nanoparticules. Elle participe aussi à la stabilité colloïdale par la présence du carboxylate à pH neutre.

Tableau 1. Noms et structures des ligands utilisés pour la stabilisation et l'hydrophilisation de NP.

Nom	Structure
C3E6D	
C5PEG4	
SG-PEG ₈ -COOH	
Glutathion (GSH)	

Deux ligands supplémentaires, de structures moins élaborées, ont été également étudiés pour leur influence sur la stabilité colloïdale des nanoparticules et sur les propriétés de fluorescence des QD. Il s'agit, d'une part, d'un ligand mono-thiol qui, comme le C3E6D et le C5PEG4, comporte des unités PEG et un groupement ionisable COOH. Ce ligand SH-PEG₈-COOH présente des propriétés semblables aux ligands peptidiques à la différence qu'il est monodentate. D'autre part, le glutathion (GSH) sera également étudié. Il s'agit d'un tripeptide de séquence acide glutamique – cystéine – glycine et qui est présent dans le métabolisme des cellules animales et végétales. Exempt d'unités PEG, ce ligand possède toutefois un site d'encrage thiol et des groupements chargés acides carboxyliques et amines et devrait donc présenter une certaine affinité pour les nanoparticules métalliques et semi-conductrices.

C. Stabilisation de nanoparticules métalliques

C.1. Nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or d'environ 20 nm synthétisées au laboratoire sont stabilisées par le citrate. Comme il a pu être observé en Figure 6, ces nanoparticules présentent de nombreux points de contact témoignant de leur instabilité partielle. De plus, la stabilisation par répulsion électrostatique apportée par le citrate ne permet pas de transférer ces nanoparticules dans des milieux tamponnés, comme typiquement le tampon phosphate salin

(NaP) qui sera utilisé lors de leur biofonctionnalisation avec des protéines α -Repeat. De plus, l'utilisation de ce tampon ne peut être évitée puisqu'il a été montré qu'un greffage direct des protéines α -Repeat, c'est-à-dire sans passer par une étape de stabilisation des AuNP, conduit à leur agrégation^[87].

Ainsi, les AuNP peuvent être incubées avec un ligand thiol directement après leur synthèse. Un grand nombre d'équivalents, 9000, sont utilisés afin de favoriser le greffage du peptide sur les particules. Dans certains cas, un léger changement de couleur de la solution colloïdale peut être immédiatement observé lors de l'injection du peptide. Après un temps d'incubation court (de 2 h à une nuit), une étape de purification par filtration centrifuge permet de retirer l'excès de ligands n'ayant pas réagi avec les particules. Cette étape est aussi l'occasion de concentrer les nanoparticules et d'obtenir des suspensions de AuNP habituellement concentrées à une centaine de nM. Ensuite, l'état de surface et la stabilité des AuNP sont caractérisés par spectroscopie d'absorption UV—visible (Figure 27).

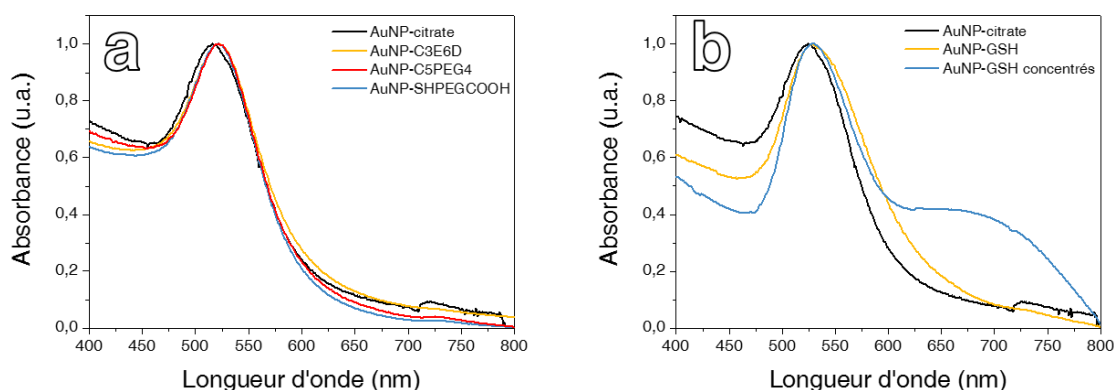


Figure 27. Spectres d'absorption UV—visible des AuNP fonctionnalisées avec (a) des ligands thiols PEGylés et (b) avec le glutathion.

Pour les ligands C3E6D, C5PEG4 et SH-PEG₈-COOH, un décalage de la bande plasmon des AuNP d'environ 6 nm peut être observé après l'étape de lavage (Figure 27a). Cette bande plasmon reste par ailleurs symétrique et n'est pas élargie. Ces observations permettent donc d'en déduire la fonctionnalisation effective des nanoparticules d'or avec les deux ligands peptidiques et avec le monothiol. Ils apportent en plus une stabilité colloïdale satisfaisante.

Dans le cas de l'essai de stabilisation des AuNP par le glutathion, la bande plasmon ne semble pas subir de décalage vers des plus petites ou des plus grandes longueurs d'onde (Figure 27b). De plus, le spectre d'absorption des particules AuNP-GSH après filtration

centrifuge révèle l'apparition d'un second pic qui témoigne de la faible stabilité de ces nanoparticules (Figure 27b, courbe bleue). Ceci peut s'expliquer par l'absence d'unité PEG dans la structure du glutathion.

C.2. Nanobâtonnets d'or

De la même façon que pour les nanoparticules d'or sphériques, la nécessité de fonctionnaliser les nanobâtonnets d'or provient de leur incompatibilité avec une utilisation en milieu tamponné. En effet, après synthèse, le ligand présent à leur surface est le CTAB et celui-ci ne permet pas de stabiliser les objets en présence de sels. Ce ligand pose également problème à cause de la cytotoxicité induite par les molécules de CTAB libres présentes dans les suspensions de GNR^[88]. De plus, à forte concentration, le CTAB cristallise à température ambiante.

La fonctionnalisation des nanobâtonnets d'or est rendue plus compliquée que celle de nanoparticules d'or sphériques par la liaison forte entre leur surface et le CTAB. Contrairement à la monocouche de citrate à la surface des AuNP qui peut être facilement remplacée, le CTAB forme une double couche autour des GNR (Figure 28) qui va gêner la fixation de ligands thiols. Après la synthèse de ces particules, des centrifugations sont réalisées et sont suivies par la redispersion des GNR dans une solution aqueuse de CTAB à 0,5 mM. En plus d'abaisser la concentration globale en CTAB, ces lavages permettent de se placer à une concentration inférieure à la concentration micellaire critique (CMC) de ce surfactant et de potentiellement désorber, en partie, le CTAB de la surface des GNR. Ces deux conditions rendent alors plus facile la fonctionnalisation des nanobâtonnets d'or.

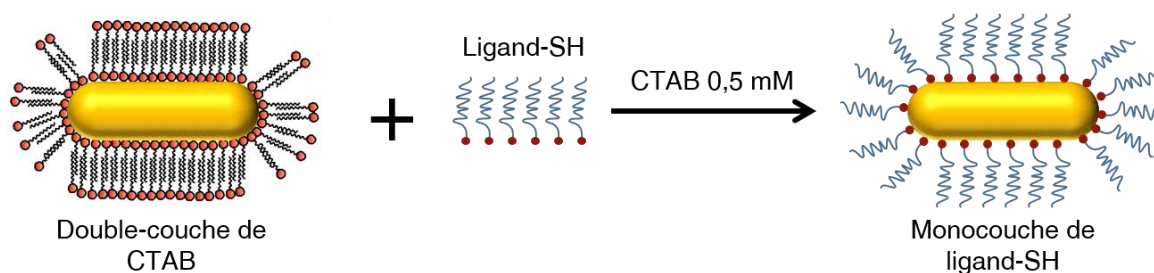


Figure 28. Synoptique de la fonctionnalisation de GNR-CTAB par un ligand thiol.

La fonctionnalisation des nanobâtonnets d'or a été l'occasion d'une collaboration avec Lauren Moreau, stagiaire de Master (université de Rennes 1). Pendant ces travaux, les performances du C3E6D et du glutathion ont été étudiées pour la fonctionnalisation de

GNR. Pour parvenir à l'échange de ligands entre ligand thiol et CTAB, nous nous plaçons dans les conditions mentionnées plus haut (0,5 mM en CTAB) et les bâtonnets sont incubés avec un grand nombre d'équivalents (50 000) en C3E6D ou GSH. Ce nombre d'équivalents a été déduit par le suivi de la position de la bande plasmon longitudinale (λ_{LSP}) des GNR, 24 heures après injection d'un nombre variable d'équivalents de GSH ($\Delta\lambda_{LSP}$, Figure 29).

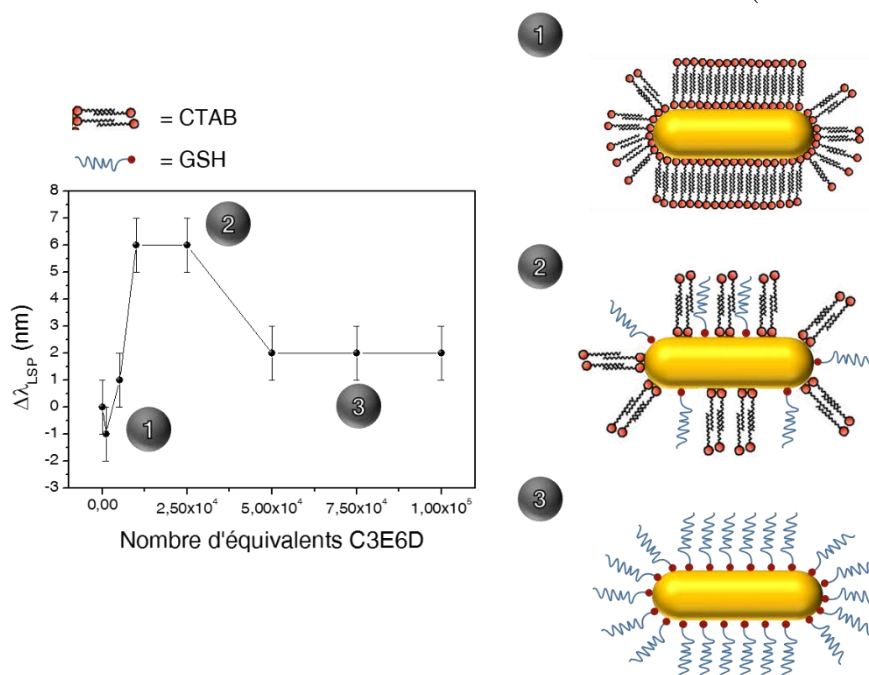


Figure 29. Évolution de la position de la LSP ($\Delta\lambda_{LSP}$) d'un lot de GNR 24 heures après leur incubation avec un nombre d'équivalents GSH variable.

La chimie de surface des objets évolue en fonction de ce nombre d'équivalents et induit alors un changement dans les conditions de résonance du plasmon de surface. Comme schématisé dans la Figure 29, on observe alors une évolution de la λ_{LSP} qui peut être synthétisée en trois grandes étapes. Tout d'abord, un nombre réduit d'équivalents ne permet pas un échange de ligands significatif et la λ_{LSP} évolue peu (Figure 29, étape 1). Ensuite, une étape intermédiaire consiste en un état de surface mixte entre CTAB et GSH (Figure 29, étape 2). Finalement, à partir de 50 000 équivalents ajoutés, la λ_{LSP} stagne après qu'une majorité du CTAB se soit désorbée au profit d'une monocouche de GSH (Figure 29, étape 3). Cette information obtenue avec le GSH, ligand monothiol, a été étendue à l'utilisation du C3E6D dont le nombre d'équivalents nécessaires devrait être logiquement inférieur car il s'agit ici d'un ligand tricystéine.

De cette façon, la fonctionnalisation des GNR a pu être réalisée à l'aide du glutathion et du C3E6D en les incubant avec 50 000 équivalents molaires de ligands. La mesure du spectre d'absorption UV—visible (Figure 30) de ces GNR fonctionnalisés montre un

décalage de la λ_{LSP} vers le rouge de 2-3 nm pour les GNR-GSH et de 6 nm pour les GNR-C3E6D qui témoigne d'un changement dans la chimie de surface des objets. De plus, les spectres des GNR-GSH et des GNR-C3E6D ont été mesurés dans du tampon NaP et l'allure symétrique des bandes plasmon de ces objets prouve leur stabilité.

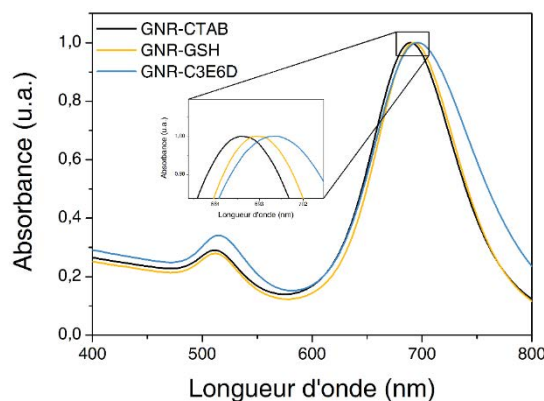


Figure 30. Spectres d'absorption UV—visible de GNR-CTAB dans l'eau et de GNR fonctionnalisés avec C3E6D ou GSH dans du tampon NaP.

D. Hydrophilisation de nanoparticules semi-conductrices

D.1. Introduction

Comme expliqué dans la Partie III de ce chapitre, les QD CdSe/ZnS et QR CdSe/CdS sont synthétisés en milieu organique et sont, en fin de synthèse, stabilisés par TOP, TOPO et HDA. Ces ligands confèrent une grande stabilité aux nanoparticules, mais ne leur permettent pas pour autant d'être utilisés en milieu aqueux. Dans le but de pouvoir, par la suite, greffer les protéines artificielles d'intérêt, nous avons besoin « d'hydrophiliser » ces nanoparticules semi-conductrices tout en leur assurant d'être stables en milieu tamponné. Pour ce faire, une stratégie d'échange de ligands par transfert de phase est envisagée : l'idée est alors de remplacer les ligands hydrophobes phosphines et amines par les ligands thiols hydrophiles présentés plus haut. Ce procédé a été validé par de nombreux travaux réalisés au laboratoire [82–85].

D.2. Méthode

Comme présenté en Figure 31, le procédé d'échange de ligands démarre d'une suspension organique de QD ou QR sur laquelle ont été réalisées plusieurs étapes de lavage afin de se débarrasser de l'excès de ligands hydrophobes. Contrairement au cas des nanoparticules

métalliques, qui peuvent être mises en contact directement avec un grand excès de ligand thiol dans l'eau, la fonctionnalisation de QD et QR passe par une étape à deux phases avec la phase organique contenant les nanoparticules et la phase aqueuse contenant un excès de ligands thiols. Un agent de transfert de phase, l'hydroxyde de tétraméthylammonium (TMAOH) est ajouté, son rôle est de rendre les fonctions thiols des ligands très réactives en les déprotonant et de placer les QD ou QR hydrophobes à l'interface solvant organique/eau^[82,89,90]. Après une forte agitation, qui permet de mettre en contact les deux phases, le transfert des particules de la phase organique vers la phase aqueuse peut être facilement observé grâce à la nouvelle coloration et la fluorescence de cette dernière (et la décoloration de la phase organique).

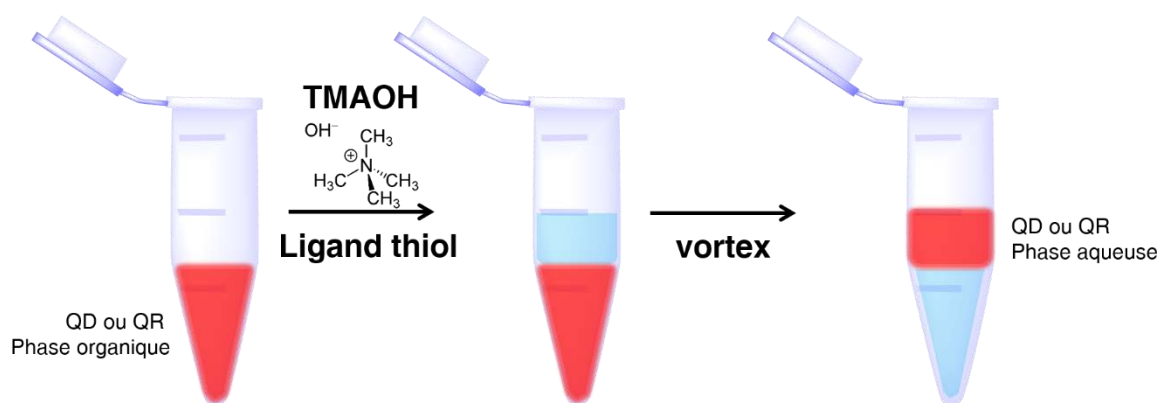


Figure 31. Synoptique de l'échange de ligands par transfert de phase de QD ou QR.

Lorsque le transfert de phase n'est pas total, cette technique présente l'avantage de pouvoir être ajustée immédiatement par ajout de ligand ou de TMAOH. Un pipetage manuel permet ensuite de séparer la suspension aqueuse de la phase organique et les traces de solvant résiduelles sont éliminées par évaporation. Finalement, l'excès de ligand thiol est éliminé en passant la suspension de QD ou QR sur une colonne de chromatographie d'exclusion stérique (NAP-5 ou NAP-10, GE Healthcare) qui permet également de changer le tampon de la suspension de nanoparticules par du tampon NaP qui est compatible avec les protéines.

D.3. Cas des QD $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$

Des essais de fonctionnalisation ont également été menés sur les QD $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ dont la synthèse a été décrite page 104. Malgré la variation de la concentration des QD, de la nature du ligand thiol utilisé ou du pH de la solution de ligands, il n'a pas été possible de passer ces nanocristaux dans l'eau. Après synthèse, ces nanoparticules sont stabilisées par le

DDT qui est également un ligand thiol. Le fait que la nature des ligands hydrophobes soit la même que celle des ligands hydrophiles contribue peut-être à rendre cet échange de ligands complexe.

D.4. Propriétés optiques et stabilité des QD et QR hydrophiles

La mesure des spectres d'absorption UV—visible et d'émission de fluorescence des QD CdSe/ZnS et QR hydrophiles est un moyen de caractériser leur fonctionnalisation par des ligands thiols. Tout d'abord, les propriétés d'absorption de ces deux types de particules ne semblent pas être véritablement influencées par leur passage dans l'eau (Figure 32a et c). Les pics excitoniques ne sont pas élargis et la position de leur maximum n'est pas décalée. La mesure des spectres d'émission de fluorescence de ces objets est quant à elle plus riche en informations (Figure 32b et d).

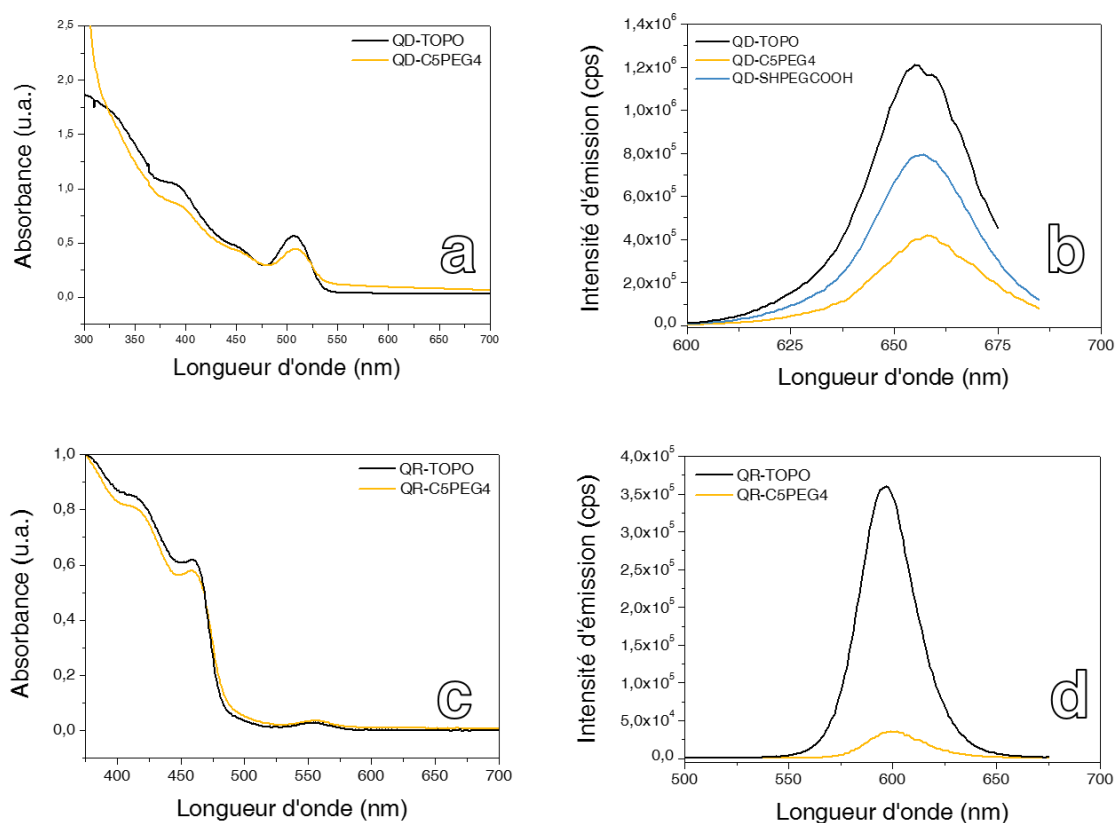


Figure 32. (a, c) Spectres d'absorption UV—visible et (b, d) spectres d'émission de fluorescence de QD et de QR hydrophiles respectivement ($\lambda_{\text{exc}} = 350 \text{ nm}$).

En effet, la fonctionnalisation des QD et des QR a deux effets sur leurs propriétés d'émission de fluorescence. La première consiste en un décalage de leur maximum d'émission vers le rouge : de 655 nm pour des QD-TOPO dans le toluène (Figure 32b,

courbe noire) à 658 nm pour des QD-C5PEG4 dans l'eau (Figure 32b, courbe jaune), et de 596 nm pour des QR-TOPO dans le toluène (Figure 32d, courbe noire) à 600 nm pour des QR-C5PEG4 dans l'eau (Figure 32d, courbe jaune). Ce décalage vers le rouge est attribué à l'extension de la fonction d'onde de l'exciton jusqu'aux ligands à l'extérieur de la particule. Cette extension diminue l'énergie du confinement de l'exciton ce qui augmente donc la longueur d'onde d'émission^[91]. En plus de ce décalage, l'émission de fluorescence des QD et des QR se voit être amoindrie lors de leur « hydrophilisation ». Par exemple, la fonctionnalisation avec le peptide C5PEG4 induit une diminution de l'intensité d'émission de 65% sur les QD (Figure 32b) et de 90% sur les QR (Figure 32d). Cette baisse en intensité d'émission est expliquée par une diminution du rendement quantique par la création de nouveaux pièges à porteurs de charge^[92] et par un possible rognage progressif de la coquille de ZnS par les ligands thiols^[93].

Il est également intéressant d'observer l'influence du ligand de fonctionnalisation sur la baisse de l'intensité de fluorescence. Si l'on compare un ligand tricystéine (C5PEG4) et monothiol (SH-PEG₈-COOH) pour la fonctionnalisation de QD, les nanoparticules perdent respectivement 65 % ou 34 % de leur intensité de fluorescence. Cette différence peut être expliquée par une densité de ligands moins importante dans le cas d'un ligand multidenté et par la possible activité d'*etching* des ligands qui est exaltée par la présence des trois groupements thiols des ligands C3E6D et C5PEG4^[93].

Afin de profiter au maximum de la fluorescence intense des QD, il peut ainsi paraître avantageux d'utiliser un ligand monothiol tel que le SH-PEG₈-COOH. Toutefois, la stabilité des objets fonctionnalisés par un tel ligand semble nettement moins bonne que celle d'objets stabilisés par les ligands tricystéines (C3E6D ou C5PEG4). Comme le révèle la Figure 33a, un lot de QD-C5PEG4 est encore bien suspendu dans l'eau après 10 jours à température ambiante. En revanche, un lot de QD-SH-PEG₈-COOH montre un agrégat épais dans le fond du microtube 10 jours après sa préparation (Figure 33b). Cette instabilité peut s'expliquer par la possible désorption du ligand monothiol. En effet, la liaison thiol-ZnS n'est pas aussi stable que la liaison thiol-Au : ces ligands sont liés au ZnS par une liaison dynamique qui les fait s'adsorber puis se désorber indéfiniment. Le lavage de l'excès de ligands monothiol place les particules dans un environnement sans ligand libre, ce qui peut conduire à la désorption d'une grande partie de ces ligands de la surface des particules. L'observation de ces QD par microscopie électronique révèle la formation d'agrégats de tailles variables (Figure 33c).

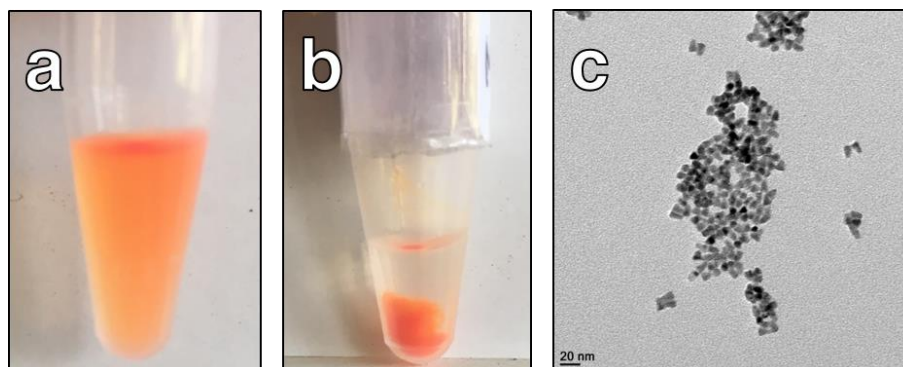


Figure 33. Photographies numériques à la lumière du jour de (a) QD-C5PEG4 et de (b) QD-SH-PEG₈-COOH 10 jours après leur fonctionnalisation. (c) image TEM de QD-SH-PEG₈-COOH 10 jours après leur fonctionnalisation.

E. Post-fonctionnalisation avec de la biotine

Comme énoncé dans le Chapitre I, la biotine est une molécule organique très utilisée en biochimie du fait de sa très forte affinité pour la streptavidine avec une constante d'affinité de l'ordre de 10^{-14} mol/L^[94]. Depuis maintenant plusieurs années, l'utilisation du couple biotine—streptavidine a été rapportée dans des travaux d'auto-assemblage de nanoparticules^[95,96]. Ici, le greffage de biotine sur des QR CdSe/CdS a été réalisé dans le cadre de deux travaux résumés en Figure 34. Tout d'abord, une collaboration avec l'équipe de E. Dujardin (CEMES, Toulouse) a pour objectif d'étudier le couplage optique entre ces QR et des nanoplaquettes d'or : l'interaction spécifique entre des QR biotinylés et des nanoplaquettes streptavidinées permet ainsi de réaliser des assemblages hybrides pour de la nanoplasmonique. D'autre part, des travaux concernant la formation d'assemblage de QR pour la génération de propriétés de superradiance sont l'occasion d'étudier l'influence de leur interdistance sur les propriétés optiques des assemblages. L'utilisation du couple biotine—streptavidine est alors un moyen de moduler l'interdistance entre particules.

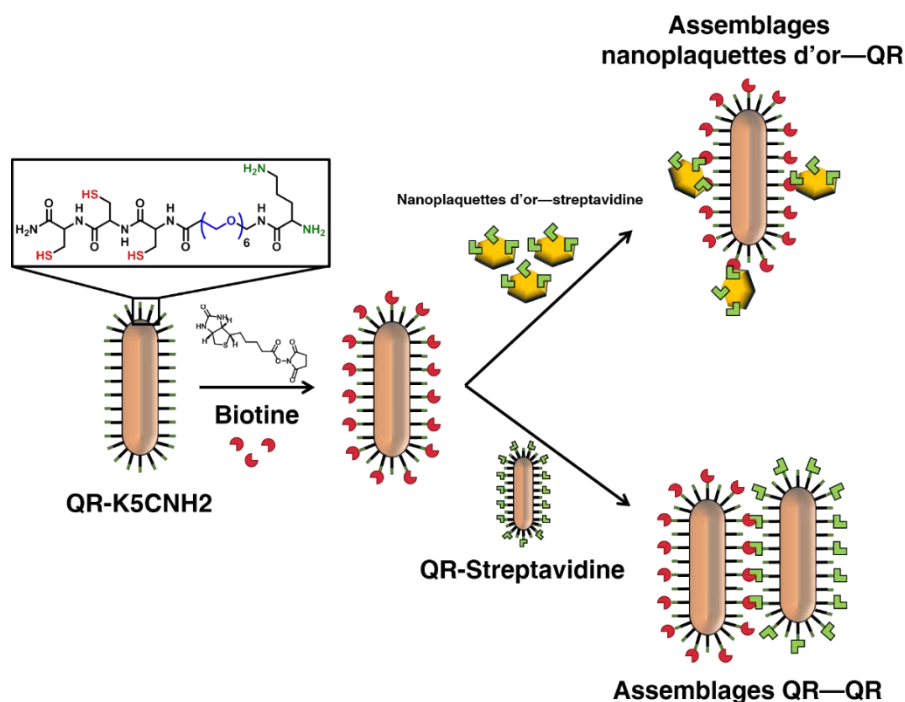


Figure 34. Synoptique de la formation d'assemblages nanoplaquettes d'or—QR ou d'assemblages QR—QR par de l'interaction entre streptavidine et biotine.

Pour la post-fonctionnalisation de QR avec de la biotine, l'idée est de mettre à profit une fonction réactive mise à disposition par un ligand peptidique utilisée lors de l'hydrophilisation des QR. Ce ligand K5CNH₂, dont la structure est présentée en Figure 34, dispose d'une amine terminale qui permet alors de réaliser un couplage peptique entre cette amine et l'acide carboxylique porté par la biotine. Pour réaliser ce couplage, des QR-K5CNH₂ sont réalisés selon la méthode présentée dans la sous-partie D de ce chapitre et en utilisant une solution aqueuse de ligand C3E6D (ligand chargé positivement à pH 7) à 98% et de K5CNH₂ à 2% (rapports molaires). Après lavage de l'excès de ligands, les QR sont mis en contact avec une solution de biotine-NHS (structure en Figure 34) qui va former une liaison amide entre le K5CNH₂ et la biotine par condensation des groupements amines et acides carboxyliques. 2% de K5CNH₂ se sont révélés être une proportion idéale car il a pu être constaté qu'une proportion trop importante de ce peptide (de 5 % à 20 %) conduit à une solubilisation impossible des QR dans l'eau ou à l'agrégation des QR après le greffage de la biotine.

Dans l'idée de vérifier le greffage de la biotine sur les nanobâtonnets semi-conducteurs, des billes streptavidinées (Pierce Streptavidin Agarose, ThermoFisher Scientific) sont mises en contact avec des QR-biotine obtenus selon la méthode décrite ci-dessus. Ce mélange billes + QR est ensuite lavé intensivement afin d'éliminer les QR non biotinylés. Comme

montré en Figure 35, l'observation par microscopie optique et en fluorescence de suspensions de billes streptavidinées incubées avec de l'eau, des QR-K5CNH2 ou avec des QR-biotine permet de mettre en évidence le greffage effectif de la biotine sur les QR CdSe/CdS. En effet, les images montrent que seules les billes incubées avec les QR-biotine sont fluorescentes (Figure 35f). Ce résultat permet donc de valider la post-fonctionnalisation des QR avec de la biotine et montre que ces QR sont prêts à être utilisés pour des interactions streptavidine—biotine.

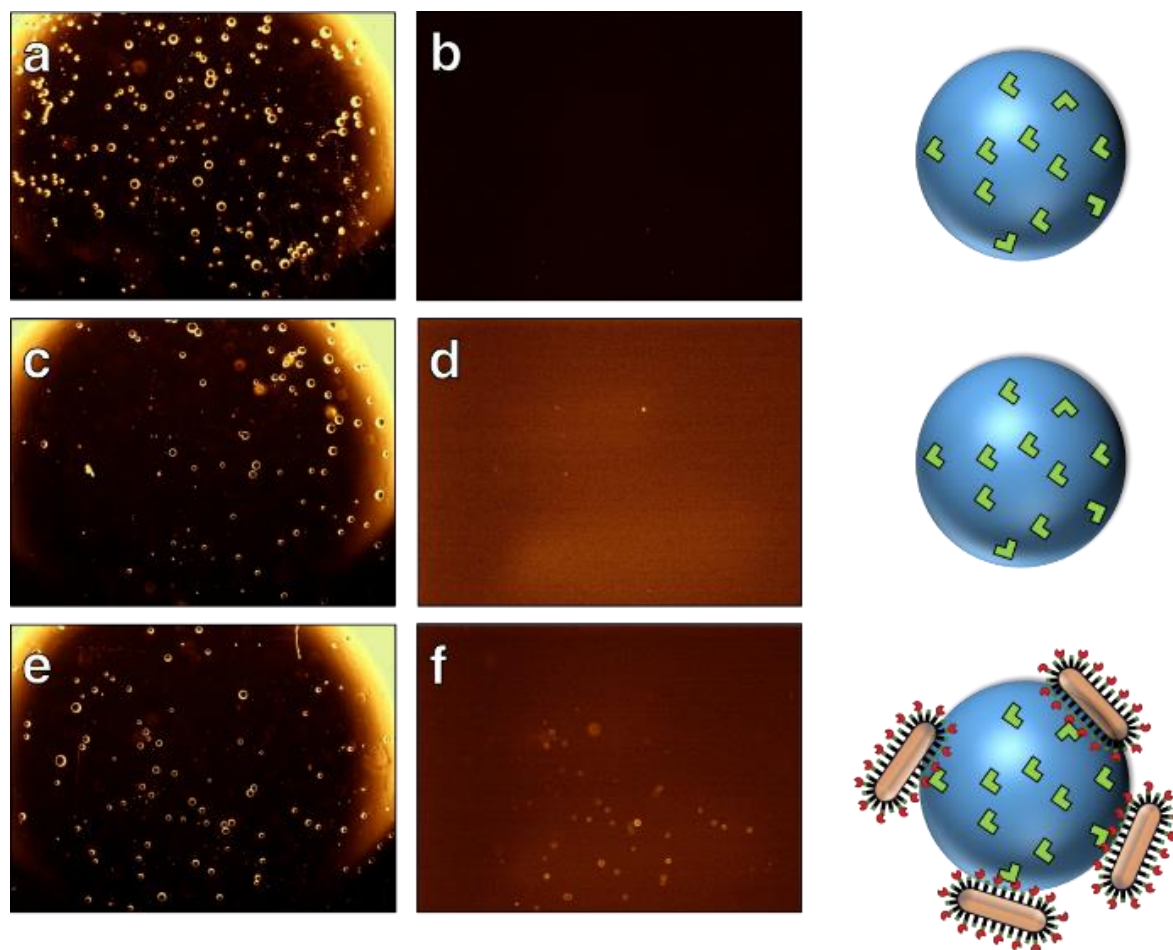


Figure 35. Photographies de vues (a, c et e) en microscopie optique et (b, d et f) en microscopie de fluorescence de billes streptavidinées incubées avec (de haut en bas) de l'eau, de QR-peptide ou des QR-biotinylés.

Conclusion

Ce chapitre nous a permis de rendre compte des synthèses colloïdales entreprises. Des nanoparticules d'or d'un diamètre allant de 10 à 20 nm et deux types de nanobâtonnets d'or ont pu être produits en tant que nanoparticules aux propriétés plasmoniques bien définies. Toujours dans la catégorie des nanoparticules métalliques, des nanoclusters d'or d'une taille d'environ 2 nm ont été obtenus. Leur fluorescence rouge nous a permis de considérer ces objets comme des candidats intéressants pour les travaux d'auto-assemblage dont cette thèse est l'objet.

En parallèle, des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents ont été synthétisés. Des QD cœur/coquille CdSe/ZnS ou CuInS₂/ZnS et des QR CdSe/CdS ont alors été sujets à la caractérisation de leurs propriétés d'absorption et de fluorescence. À l'exception des QD CuInS₂/ZnS, nous avons été en mesure de définir la longueur d'onde d'émission de ces nanocristaux à travers le contrôle de leurs dimensions. Toutefois, par souci de rendements quantiques assez faibles dans le rouge et par gain de temps, la suite de ce manuscrit présentera parfois des résultats obtenus avec des QD rouges de fabrication commerciale (QDot 655 ITK, Thermofisher Scientific).

Ce chapitre nous a aussi permis d'aborder la problématique de la fonctionnalisation de ces deux types de nanoparticules. Que ce soit pour la stabilisation des nanoparticules et des nanobâtonnets d'or ou pour rendre les QD et QR hydrophiles, l'utilisation de ligands thiols (glutathion, C3E6D, C5PEG4, SH-PEG₈-COOH) s'est révélée être efficace. L'analyse de l'évolution de la bande plasmon des particules d'or permet de témoigner de l'échange de ligands mais également de la stabilité des objets. Hormis pour les QD CuInS₂/ZnS, les ligands PEGylés (SH-PEG₈-COOH, C3E6D, C5PEG4) ont montré toute leur efficacité pour passer les nanocristaux semi-conducteurs dans l'eau. Des QD CdSe/ZnS présentant une fluorescence particulièrement intense ont pu être obtenus avec le ligand monothiol SH-PEG₈-COOH. Toutefois, il a été observé que l'emploi de ligands possédant un motif tricystéine leur confère une plus grande stabilité.

Finalement, des travaux de post-fonctionnalisation nous ont permis de montrer que les nanoparticules semi-conductrices hydrophiles sont un support de départ idéal pour de multiples applications. À leur surface, la structure des ligands peptiques peut être mise à

profit pour le greffage de biotine sur des QR. Ces objets fonctionnalisés et présentant une surface disponible très grande pourront être utilisés ultérieurement pour former des assemblages QR—QR ou QR—nanoplaquettes d'or.

Références

- [1] B. L. Cushing, V. L. Kolesnichenko, C. J. O'Connor, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3893–3946.
- [2] A. V. Rane, K. Kanny, V. K. Abitha, S. Thomas, in *Synthesis of Inorganic Nanomaterials* (Eds.: S. Mohan Bhagyaraj, O.S. Oluwafemi, N. Kalarikkal, S. Thomas), Woodhead Publishing, **2018**, pp. 121–139.
- [3] H. Furedi-Milhofer, *Pure Appl. Chem.* **1981**, *53*, 2041–2055.
- [4] V. K. L. Mer, *Ind. Eng. Chem.* **1952**, *44*, 1270–1277.
- [5] I. M. Lifshitz, V. V. Slyozov, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **1961**, *19*, 35–50.
- [6] C. Wagner, *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* **1961**, *65*, 581–591.
- [7] T. Sugimoto, *Advances in Colloid and Interface Science* **1987**, *28*, 65–108.
- [8] P. W. Voorhees, *J Stat Phys* **1985**, *38*, 231–252.
- [9] A. D. McNaught, A. Wilkinson, in *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd Ed. (the “Gold Book”)*, **1997**.
- [10] A. R. Studart, E. Amstad, L. J. Gauckler, *Langmuir* **2007**, *23*, 1081–1090.
- [11] G. Fritz, V. Schädler, N. Willenbacher, N. J. Wagner, *Langmuir* **2002**, *18*, 6381–6390.
- [12] Faraday Michael, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **1857**, *147*, 145–181.
- [13] J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier, *Discuss. Faraday Soc.* **1951**, *11*, 55–75.
- [14] D. V. Goia, E. Matijević, *New J. Chem.* **1998**, *22*, 1203–1215.
- [15] A. Van Hoonacker, P. Englebienne, *Current Nanoscience* **2006**, *2*, 359–371.
- [16] C. H. Gammons, Y. Yu, A. E. Williams-Jones, *Geochimica et Cosmochimica Acta* **1997**, *61*, 1971–1983.
- [17] G. Frens, *Nature Physical Science* **1973**, *241*, 20–22.
- [18] N. G. Bastús, J. Comenge, V. Puentes, *Langmuir* **2011**, *27*, 11098–11105.
- [19] H. Xia, Y. Xiahou, P. Zhang, W. Ding, D. Wang, *Langmuir* **2016**, *32*, 5870–5880.
- [20] S. Link, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 4212–4217.
- [21] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *Advanced Materials* **2001**, *13*, 1389–1393.
- [22] C. J. Murphy, T. K. Sau, A. M. Gole, C. J. Orendorff, J. Gao, L. Gou, S. E. Hunyadi, T. Li, *J. Phys. Chem. B* **2005**, *109*, 13857–13870.
- [23] B. Nikoobakht, M. A. El-Sayed, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1957–1962.
- [24] C. J. Johnson, E. Dujardin, S. A. Davis, C. J. Murphy, S. Mann, *J. Mater. Chem.* **2002**, *12*, 1765–1770.
- [25] N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy, *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4065–4067.
- [26] N. R. Jana, *Small* **2005**, *1*, 875–882.
- [27] F. Scaletti, C. S. Kim, L. Messori, V. M. Rotello, *MethodsX* **2014**, *1*, 118–123.
- [28] V. Sharma, K. Park, M. Srinivasarao, *PNAS* **2009**, *106*, 4981–4985.
- [29] C. Hamon, Préparation et Auto-Assemblage de Nanobâtonnets Fonctionnalisés Pour La Photo Oxydo-Réduction Catalytique, thesis, Rennes 1, **2013**.
- [30] X. Ye, C. Zheng, J. Chen, Y. Gao, C. B. Murray, *Nano Letters* **2013**, *13*, 765–771.
- [31] J. Du, J. J. Cullen, G. R. Buettner, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2012**, *1826*, 443–457.

- [32] Y. Zheng, L. Lai, W. Liu, H. Jiang, X. Wang, *Advances in Colloid and Interface Science* **2017**, *242*, 1–16.
- [33] L. Shang, S. Dong, G. U. Nienhaus, *Nano Today* **2011**, *6*, 401–418.
- [34] M. Cui, Y. Zhao, Q. Song, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *57*, 73–82.
- [35] R. Jin, *Nanoscale* **2010**, *2*, 343–362.
- [36] Z. Wu, R. Jin, *Nano Lett.* **2010**, *10*, 2568–2573.
- [37] J. Zheng, R. M. Dickson, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13982–13983.
- [38] J. Xie, Y. Zheng, J. Y. Ying, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 888–889.
- [39] Z. Wang, W. Cai, J. Sui, *ChemPhysChem* **2009**, *10*, 2012–2015.
- [40] M. Zhu, E. Lanni, N. Garg, M. E. Bier, R. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 1138–1139.
- [41] Z. Luo, X. Yuan, Y. Yu, Q. Zhang, D. T. Leong, J. Y. Lee, J. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16662–16670.
- [42] Y. Hong, J. W. Y. Lam, B. Z. Tang, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5361–5388.
- [43] C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706–8715.
- [44] B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi, **n.d.**, 13.
- [45] A. R. Kortan, R. Hull, R. L. Opila, M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, P. J. Carroll, L. E. Brus, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1327–1332.
- [46] X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7019–7029.
- [47] A. Dif, Auto-assemblages de quantum dots fonctionnalisés avec des membranes lipidiques ou des protéines, Thèse doctorat, Université de Rennes 1, **2007**.
- [48] V. Roullier, Micelles de nanocristaux fluorescentes et magnétiques comme sondes pour la bio-imagerie, Thèse doctorat, Université de Rennes 1, **2009**.
- [49] B. Boichard, Synthèse et Mise En Forme de Matériaux Nanostructurés Pour La Photosensibilisation de Réactions d'oxydoréduction, thesis, Rennes 1, **2015**.
- [50] Z. A. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 183–184.
- [51] C. B. Murray, C. R. Kagan, M. G. Bawendi, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **2000**, *30*, 545–610.
- [52] L. Qu, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2049–2055.
- [53] S. Chattopadhyay, P. Sen, J. T. Andrews, P. K. Sen, *J. Phys.: Conf. Ser.* **2012**, *365*, 012037.
- [54] L. Manna, E. C. Scher, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12700–12706.
- [55] L. Manna, E. C. Scher, L.-S. Li, A. P. Alivisatos, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 7136–7145.
- [56] D. V. Talapin, I. Mekis, S. Götzinger, A. Kornowski, O. Benson, H. Weller, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 18826–18831.
- [57] D. V. Talapin, E. V. Shevchenko, C. B. Murray, A. Kornowski, S. Förster, H. Weller, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 12984–12988.
- [58] Z. A. Peng, X. Peng, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1389–1395.
- [59] L. Carbone, C. Nobile, M. De Giorgi, F. D. Sala, G. Morello, P. Pompa, M. Hytch, E. Snoeck, A. Fiore, I. R. Franchini, et al., *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2942–2950.
- [60] J. J. Shiang, A. V. Kadavanich, R. K. Grubbs, A. P. Alivisatos, *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 17417–17422.

- [61] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854–2860.
- [62] K.-T. Yong, Y. Sahoo, M. T. Swihart, P. N. Prasad, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 2447–2458.
- [63] Q. Han, J. Zhao, L. Wu, J. Zhu, X. Wang, *Particuology* **2015**, *19*, 45–52.
- [64] J. Godt, F. Scheidig, C. Grosse-Siestrup, V. Esche, P. Brandenburg, A. Reich, D. A. Groneberg, *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* **2006**, *1*, 22.
- [65] I. Corazzari, A. Gilardino, S. Dalmazzo, B. Fubini, D. Lovisolò, *Toxicology in Vitro* **2013**, *27*, 752–759.
- [66] K. G. Li, J. T. Chen, S. S. Bai, X. Wen, S. Y. Song, Q. Yu, J. Li, Y. Q. Wang, *Toxicology in Vitro* **2009**, *23*, 1007–1013.
- [67] K. M. Tsoi, Q. Dai, B. A. Alman, W. C. W. Chan, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 662–671.
- [68] K.-T. Yong, W.-C. Law, R. Hu, L. Ye, L. Liu, M. T. Swihart, P. N. Prasad, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1236–1250.
- [69] L. Liu, K.-T. Yong, I. Roy, W.-C. Law, L. Ye, J. Liu, J. Liu, R. Kumar, X. Zhang, P. N. Prasad, *Theranostics* **2012**, *2*, 705–713.
- [70] C. M. Johnson, K. M. Pate, Y. Shen, A. Viswanath, R. Tan, B. C. Benicewicz, M. A. Moss, A. B. Greytak, *Journal of Colloid and Interface Science* **2015**, *458*, 310–314.
- [71] S. J. Tan, N. R. Jana, S. Gao, P. K. Patra, J. Y. Ying, *Chem. Mater.* **2010**, *22*, 2239–2247.
- [72] H. Uchida, T. Ogata, H. Yoneyama, *Chemical Physics Letters* **1990**, *173*, 103–106.
- [73] D. Battaglia, X. Peng, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 1027–1030.
- [74] Y. Jiang, Y. Wu, X. Mo, W. Yu, Y. Xie, Y. Qian, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2964–2965.
- [75] X. Kang, L. Huang, Y. Yang, D. Pan, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 7933–7940.
- [76] G. Hong, J. T. Robinson, Y. Zhang, S. Diao, A. L. Antaris, Q. Wang, H. Dai, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, *51*, 9818–9821.
- [77] S. Liu, F. Shi, X. Zhao, L. Chen, X. Su, *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *47*, 379–384.
- [78] D. Deng, Y. Chen, J. Cao, J. Tian, Z. Qian, S. Achilefu, Y. Gu, *Chem. Mater.* **2012**, *24*, 3029–3037.
- [79] C.-W. Chen, D.-Y. Wu, Y.-C. Chan, C. C. Lin, P.-H. Chung, M. Hsiao, R.-S. Liu, *J. Phys. Chem. C* **2015**, *119*, 2852–2860.
- [80] L. Li, T. J. Daou, I. Texier, T. T. Kim Chi, N. Q. Liem, P. Reiss, *Chem. Mater.* **2009**, *21*, 2422–2429.
- [81] L. Li, A. Pandey, D. J. Werder, B. P. Khanal, J. M. Pietryga, V. I. Klimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1176–1179.
- [82] A. Dif, F. Boulmedais, M. Pinot, V. Roullier, M. Baudy-Floc’h, F. M. Coquelle, S. Clarke, P. Neveu, F. Vignaux, R. L. Borgne, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14738–14746.
- [83] A. Dif, E. Henry, F. Artzner, M. Baudy-Floc’h, M. Schmutz, M. Dahan, V. Marchi-Artzner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8289–8296.
- [84] T. Bizien, J.-C. Ameline, K. G. Yager, V. Marchi, F. Artzner, *Langmuir* **2015**, *31*, 12148–12154.
- [85] T. Bizien, P. Even-Hernandez, M. Postic, E. Mazari, S. Chevance, A. Bondon, C. Hamon, D. Troadec, L. Largeau, C. Dupuis, et al., *Small* **2014**, *10*, 3707–3716.
- [86] B. C. Mei, K. Susumu, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Nature Protocols* **2009**, *4*, 412–423.
- [87] K. L. Gurunatha, A. C. Fournier, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, V. Marchi, P. Minard, E. Dujardin, *ACS Nano* **2016**, *10*, 3176–3185.

- [88] A. M. Alkilany, P. K. Nagaria, C. R. Hexel, T. J. Shaw, C. J. Murphy, M. D. Wyatt, *Small* **2009**, *5*, 701–708.
- [89] F. Pinaud, D. King, H.-P. Moore, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6115–6123.
- [90] J. Yang, T. C. Deivaraj, H.-P. Too, J. Y. Lee, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2181–2185.
- [91] C.-T. Y. W.-C. Chou, C. T. Yuan, D. S. Chuu, W. H. Chang, H. S. Lin, R. C. Ruaan, *Journal of Medical and Biological Engineering* **2006**, *26*, 131–135.
- [92] S. Jeong, M. Achermann, J. Nanda, S. Ivanov, V. I. Klimov, J. A. Hollingsworth, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10126–10127.
- [93] Y. Zhang, A. Clapp, *Sensors* **2011**, *11*, 11036–11055.
- [94] N. M. Green, in *Advances in Protein Chemistry* (Eds.: C.B. Anfinsen, J.T. Edsall, F.M. Richards), Academic Press, **1975**, pp. 85–133.
- [95] K. K. Caswell, J. N. Wilson, U. H. F. Bunz, C. J. Murphy, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13914–13915.
- [96] J. Lee, A. O. Govorov, N. A. Kotov, *Nano Lett.* **2005**, *5*, 2063–2069.



**Chapitre III. Greffage de protéines sur
des nanoparticules**

Table des matières

Introduction.....	131
Partie I. Objectifs et présentation de la stratégie adoptée.....	133
<i>A. Description de la paire de protéines à haute affinité $\alpha 2/A3$.....</i>	<i>133</i>
<i>B. Affinité pour la surface des nanoparticules.....</i>	<i>136</i>
B.1 Le tag poly-histidine.....	137
B.2 Le tag poly-cystéine.....	138
B.3 Conclusion.....	139
<i>C. Echange de ligands sur les nanoparticules.....</i>	<i>139</i>
Partie II. Mise en évidence de la bioconjugaison et caractérisation des NP fonctionnalisées.....	141
<i>A. Mise en évidence du greffage des protéines sur les nanoparticules.....</i>	<i>141</i>
A.1 Principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose.....	141
A.2 Mise en évidence qualitative du complexe nanoparticule/protéine par électrophorèse.....	143
A.3 Quantum rods.....	146
A.4 Nanoclusters d'or.....	147
A.5 Conclusion.....	148
<i>B. Propriétés optiques et morphologie des nanoparticules bioconjuguées.....</i>	<i>149</i>
B.1 Nanoparticules semi-conductrices.....	149
B.2 Nanoparticules métalliques.....	152
B.2.i AuNP et GNR.....	152
<i>C. Taille et charge des nanoparticules bioconjuguées.....</i>	<i>154</i>
C.1 Evolution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules.....	154
C.2 Evolution de la charge.....	156
<i>D. Détermination de la stoechiométrie protéines par nanoparticule.....</i>	<i>157</i>
D.1 Principe du dosage des protéines greffées sur les nanoparticules d'or.....	157
D.2 Résultats.....	159
D.3 Discussion.....	161

Partie III. Étude des interactions protéine—protéine après bioconjugaison	161
<i>A. Introduction</i>	<i>161</i>
<i>B. Résultats.....</i>	<i>163</i>
B.1 Affinité entre les protéines A3 et α 2 libres	165
B.1.i. Mesure d'affinité.....	165
B.1.ii. Cinétique de l'interaction entre protéines libres	165
B.2 Nanoparticules bioconjuguées	169
B.2.i. Conservation de l'affinité	169
B.2.ii. Analyses cinétiques – effet de la stœchiométrie sur l'interaction	171
<i>C. Conclusion partielle.....</i>	<i>175</i>
Conclusion.....	177
Références.....	178

Introduction

Après avoir présenté la synthèse et la fonctionnalisation des nanoparticules utilisées dans le cadre de ces travaux de thèse, ce nouveau chapitre aura pour objet de présenter l'étude du greffage des protéines α -Repeat sur les nanoparticules semi-conductrices et métalliques.

Les protéines utilisées seront décrites dans une première partie qui sera aussi l'occasion de présenter comment ces biomolécules pourront être greffées à la surface des nanoparticules. Les détails expérimentaux de cette stratégie de bioconjugaison seront également développés.

Afin d'évaluer la validité de la stratégie de bioconjugaison adoptée, le greffage sera ensuite mis en évidence. La caractérisation des propriétés physiques des nanoparticules (taille, charge, fluorescence et absorption) à l'aide de techniques adaptées permettra alors d'évaluer leur stabilité et de contrôler, dans une certaine mesure, le nombre de protéines par nanoparticule. Après la présentation de ces travaux de caractérisation, la détermination précise de cette stoechiométrie sera détaillée pour un couple protéine—particule.

Ce chapitre sera conclu par l'étude des interactions entre les protéines artificielles greffées à la surface des nanoparticules qui, avant ces travaux, n'avait encore jamais été réalisée. Démontrer ainsi la conservation des propriétés de reconnaissance entre $\alpha 2$ et A3 à la surface des nanoparticules permettra de valider leur utilisation pour la formation de nanostructures auto-assemblées.

Partie I. Objectifs et présentation de la stratégie adoptée

Comme il a été vu au chapitre I, les protéines α -Repeat ont déjà été utilisées pour induire l'auto-assemblage de nanoparticules d'or^[1]. Ces résultats prometteurs ont été obtenus en parvenant au greffage de deux de ces protéines sur la surface de nanoparticules d'or. Dans le cadre de cette thèse, il s'agit de mettre au point le greffage de ces protéines sur la surface de particules semi-conductrices, telles que des QD de type CdSe/ZnS ou des QR CdSe/CdS. Ces particules, de nature et de structure cristallographique différentes, ne possèdent pas la même réactivité chimique de surface. De plus, le greffage de biomolécules sur les nanoparticules suscite de nombreuses questions, notamment la stabilité colloïdale et chimique des nanoparticules, l'évolution de leurs paramètres physico-chimiques (taille, charge, propriétés optiques) et la préservation de l'activité biologique des protéines. Tous ces points sont des éléments cruciaux à contrôler après la bioconjugaison^a. Enfin, parvenir à contrôler le nombre de protéines greffées par particule constitue un défi pour maîtriser la morphologie et la géométrie des assemblages de nanoparticules (linéaires ou ramifiés). Cette première partie a ainsi pour premier objectif de présenter le couple de protéines α -Repeat $\alpha 2/A3$ qui sera utilisé dans la majeure partie des travaux présentés dans ce manuscrit. Dans un second temps, la stratégie de greffage basée sur l'utilisation d'étiquettes d'affinité (*tags*) sera décrite.

A. Description de la paire de protéines à haute affinité $\alpha 2/A3$

L'obtention de la paire de protéines artificielles complémentaires $\alpha 2/A3$ est le fruit d'un long travail très abouti réalisé par l'équipe de P. Minard (I2BC, CEA, CNRS, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay)^[2,3]. Ces paires de protéines α -Repeat complémentaires et de haute affinité sont sélectionnées à travers un procédé de *phage display* au sein d'une librairie de mutants pour leur affinité hautement spécifique pour une protéine cible préalablement choisie. En utilisant une protéine α -Repeat appelée A3 (une protéine composée de 4 répétitions HEAT^[4] voir Figure 1a) comme cible, nous avons choisi de travailler avec une protéine très spécifique pour A3, facile à produire en grande quantité et

^a Ici, la bioconjugaison consiste en la formation d'une liaison entre une protéine et une nanoparticule. En général, la bioconjugaison est définie comme une stratégie qui consiste à former une liaison covalente entre deux molécules, dont au moins une biomolécule.

disponible parmi celles isolées par les biologistes. La protéine $\alpha 2$ présentant l'affinité pour A3 la plus forte, possède seulement 2 unités de répétition HEAT (Figure 1b) et forme avec A3 un complexe $\alpha 2 \cdot A3$ dont la structure cristallographique est représentée en Figure 1c. Les détails de ce couple de protéines sont référencés sur la page 4JW2 de la PDB^[5] (*Protein Data Bank*, disponible sur www.rcsb.org). On observe que les interactions entre les deux protéines s'effectuent au niveau leur face concave. C'est cette face qui d'ailleurs porte les positions hypervariables en acides aminés. Il s'agit des positions dans la séquence des protéines α -Repeat dont la nature de l'acide aminé présente une grande variabilité d'un mutant à l'autre et qui déterminent la conformation de la protéine et sa spécificité pour sa cible.

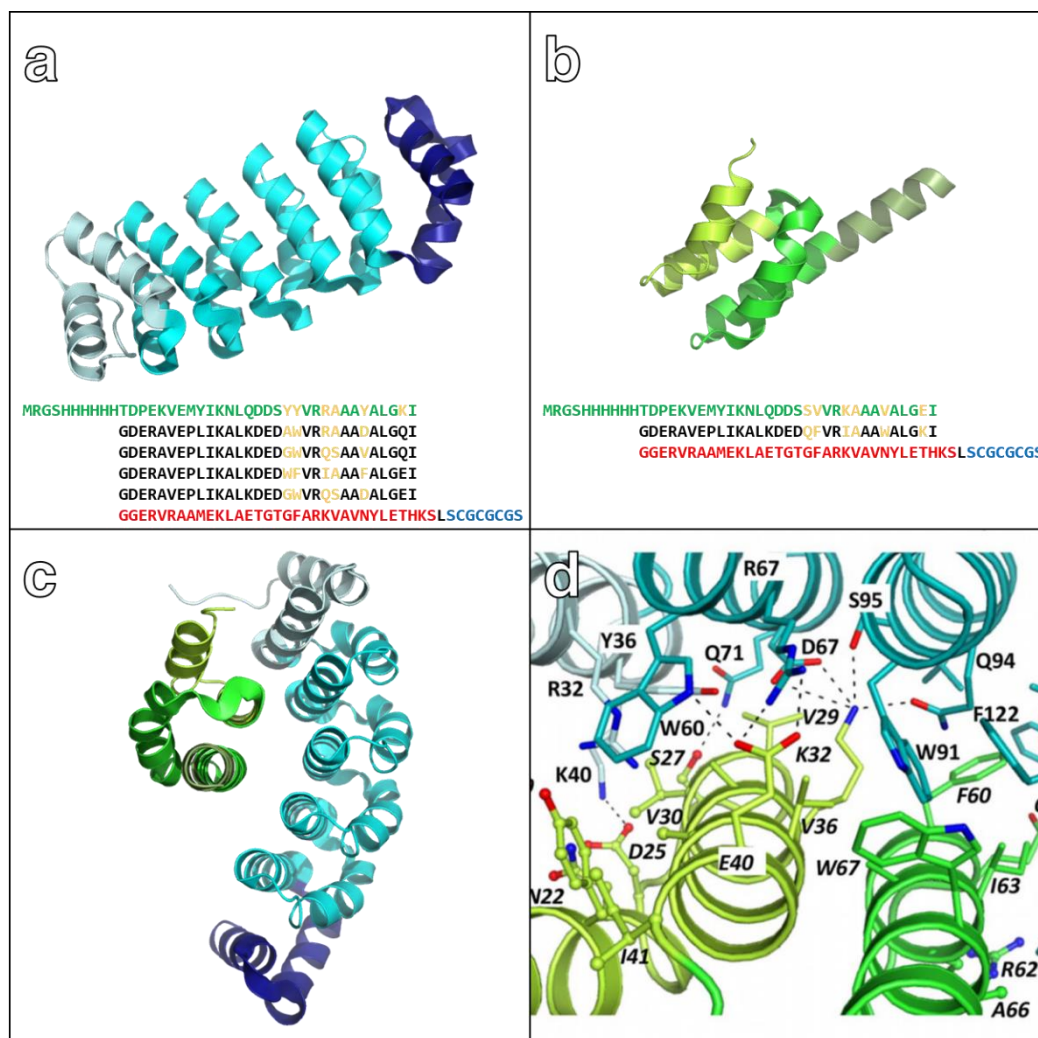


Figure 1. Représentation ruban et séquences en acides aminés de (a) A3 et (b) $\alpha 2$. (c) Représentation ruban du complexe $\alpha 2 \cdot A3$ et (D) représentation de l'interface entre $\alpha 2$ et A3 (extraite de [3]). Les parties rouges et vertes de la séquence des protéines représentent respectivement les extrémités C-terminale et N-terminale tandis que les positions hypervariables sont en jaune.

La structure cristallographique de ce complexe a été déterminée à partir de cristaux obtenus par diffusion de vapeur en goutte assise qui ont été caractérisés par diffraction des rayons X^[3]. La reconnaissance entre les deux protéines est assurée par 19 acides aminés de la séquence A3 et 22 acides aminés de la séquence de $\alpha 2$. Deux tiers de ces derniers sont localisés dans l'extrémité N-terminale de $\alpha 2$. Après la formation de ce complexe, un changement important dans la conformation de l'extrémité C-terminale de $\alpha 2$ est observé^[6]. De plus, cette affinité est dirigée principalement par des interactions hydrophobes. Comme présenté en Figure 1d, cette interface présente de nombreux acides aminés à chaînes latérales hydrophobes (tryptophane, valine, phénylalanine, méthionine et tyrosine). Ces interactions hydrophobes laissent également place à 4 liaisons hydrogène et 3 ponts salins^a mais ceux-ci ont un rôle mineur dans la stabilité du complexe $\alpha 2 \cdot A3$ ^[3]. Ce complexe est relativement « petit » puisque A3 et $\alpha 2$ ont des poids moléculaires respectifs de 22,6 kDa et de 12,3 kDa. La constante d'affinité du complexe évaluée par titration calorimétrique isotherme est de $4,2 \pm 3,8 \text{ nM}^{[1,7]}$, ce qui en fait un couple de protéines à haute affinité.

Un point important à soulever est la capacité de A3 à former des dimères avec elle-même^[2] ($A3 \cdot A3$). Ces dimères se forment en solution et la résolution de leur structure cristallographique par diffraction des rayons X montrent qu'il se forme par interaction entre l'extrémité N-terminale d'une protéine et l'extrémité C-terminale d'une seconde protéine (Figure 2). Les détails de ce couple de protéines sont référencés sur la page 3LTM de la PDB. La constante d'affinité du complexe $A3 \cdot A3$ mesurée par ultracentrifugation analytique (UCA) est de $37 \pm 6 \text{ nM}^{[7]}$.

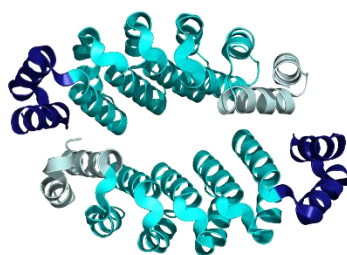


Figure 2. Représentation ruban du complexe $A3 \cdot A3$.

^a En biochimie, un pont salin consiste en la combinaison de deux interactions non covalents : liaison hydrogène et liaison ionique. Un exemple typique est le pont salin formé entre le carboxylate COO^- de l'acide glutamique E et l'ammonium NH_3^+ de la lysine K.

Le Tableau 1 regroupe les informations nécessaires à la manipulation de $\alpha 2$ et A3. On y retrouve ainsi leur point isoélectrique (pI), leur coefficient d'absorption molaire à 280 nm (ϵ_{280}), leur taille cristallographique et les constantes d'affinité (K_D) des complexes $\alpha 2 \cdot A3$ et $A3 \cdot A3$.

Tableau 1. Récapitulatif des données expérimentales sur les protéines $\alpha 2$ et A3.

Protéine	$\alpha 2$	A3	complexe $\alpha 2 \cdot A3$	complexe $A3 \cdot A3$
Poids moléculaire (kDa)	12,3	22,6	33,0	44,8
Point isoélectrique théorique (pI)	7,05	5,43		
ϵ_{280} (cystéines réduites)	8480 M ⁻¹ .cm ⁻¹	29450 M ⁻¹ .cm ⁻¹		
Taille cristallographique (nm)			8,8 x 8,8 x 7,8	
Mesure manuelle sur modèle cristallographique (nm)	2,8 x 2,4 x 4,3 ^a	3 x 3 x 6 ^b	6,1 x 5,3 x 3,1 ^c	5,0 x 2,2 x 1,7 ^d
K_D (nM)			4,2 ± 3,8 ^e	37 ± 6,0 ^f

^{a-d} Mesurées à partir des Figures 1a, 1b, 1c et de la Figure 2 respectivement ; ^d mesurée par ITC^[1,7] ; ^f mesurée par UCA^[7]

B. Affinité pour la surface des nanoparticules

Comme expliqué au chapitre I, fixer ou greffer des protéines sur une surface peut être réalisé efficacement via un greffage de type covalent. Cette méthode bien établie nécessite de greffer des fonctions acides carboxyliques de façon non covalente sur la surface de ZnS ou CdS, en deux étapes suivies d'une purification au minimum. De plus et surtout, son caractère non spécifique induit un manque de contrôle dans la bioconjugaison en termes de stœchiométrie et d'orientation. Lors d'un couplage peptidique, réalisé par exemple avec le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et le N-hydroxysuccinimide (NHS) en tant qu'agents d'activation des acides carboxyliques, les très nombreux

groupements amines portés par la protéine sont capables de se coupler avec les COOH activés. Ce caractère incontrôlable peut induire de l'hétérogénéité dans l'orientation de la biomolécule fixée sur les nanoparticules. Plusieurs liaisons peptidiques pour une seule protéine sont envisageables, ce qui peut détruire la conformation tridimensionnelle de la protéine et donc altérer ses propriétés de reconnaissance. Cette méthode de bioconjugaison peut même aller jusqu'à la formation d'oligomères de nanoparticule—protéine qui peut résulter en la précipitation des objets^[8]. Afin de contrôler le plus précisément possible le greffage des protéines sur la surfaces des nanoparticules semi-conductrices et métalliques, des *tags* (ou étiquettes) d'affinité pour l'échange des ligands PEGylés par les protéines ont donc été introduits dans la séquence des protéines. Il s'agit de courtes séquences d'acides aminés ajoutées par recombinaison génétique à la structure d'une protéine. Ici, nous avons utilisé le *tag* poly-histidine et le *tag* poly-cystéine qui ont déjà été identifiés et validés au laboratoire comme de très bons ligands des surfaces ZnS et CdS^[9-11].

B.1 Le *tag* poly-histidine

L'étiquette poly-histidine est constituée de 6 histidines (un « Histag ») et a, historiquement, été développé pour la purification des protéines. Ce *tag* a été développé par D. Stüber en 1988 pour l'ingénierie des protéines recombinantes afin de mettre à profit les propriétés chélatantes de l'histidine grâce au doublet libre donneur d'électrons des atomes d'azote^[12]. Celle-ci présente en effet une forte affinité pour les cations divalents Ni²⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ et dans une moindre mesure Fe³⁺ par liaison de coordination et permet de purifier à grande échelle les protéines à l'aide d'une chromatographie d'affinité. De cette façon, l'utilisation de protéines fusionnées avec un Histag ont pu être greffées sur des nanoparticules à l'aide d'agents chélatant tels que l'acide aspartique (qui fixe le Ni²⁺ pour exalter la fixation des protéines étiquetées Histag) ou encore par la chélation des ions Zn²⁺ directement disponibles à la surface de QD CdSe/ZnS^[13-15] comme schématisé en Figure 3. La constante d'équilibre de la fixation de protéines Histag sur des QD CdSe/ZnS est par ailleurs de l'ordre du nanomolaire^[16].

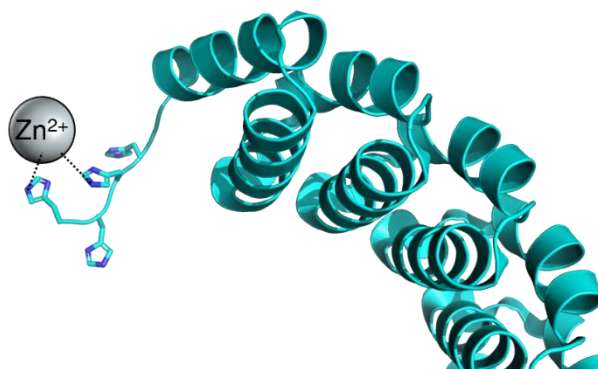


Figure 3. Greffage d'une protéine A3 sur un QD CdSe/ZnS : représentation schématique de la chélation d'un ion Zn^{2+} par le Histag de A3.

Un Histag HHHHHH a été ajouté par recombinaison à l'extrémité N-terminale de $\alpha 2$ et A3 et est observable dans leur séquence en Figure 1a et Figure 1b. Ce *tag* doit ainsi fournir aux deux protéines une affinité pour la surface des nanoparticules semi-conductrices (QD CdSe/ZnS et QR CdSe/CdS) car ces deux types d'objets sont recouverts par soit une couche de sulfure de zinc ZnS ou soit une couche de sulfure de cadmium CdS.

B.2 Le *tag* poly-cystéine

Une autre stratégie employée pour mettre au point des ligands et des biomolécules présentant une haute affinité pour la surface cristalline des QD est celle du tag poly-cystéine. Cette stratégie repose sur l'affinité du groupement thiol de la cystéine pour les surfaces de ZnS à travers une liaison de coordination établie avec l'ion Zn^{2+} ^[17]. Cette stratégie trouve son origine dans les travaux publiés en 2002 par Belcher *et al.* qui ont utilisé un peptide de reconnaissance. Ce dernier contenait une séquence d'affinité composée de 2 cystéines qui a permis l'assemblage et l'organisation de QD ZnS et de virus bactériophages^[18]. Par la suite, en 2004, les travaux de Pinaud *et al.* ont montré l'utilisation de peptides construits avec un motif d'affinité constitué d'une répétition de cystéines pour la fonctionnalisation et la bio-activation de QD CdSe/ZnS^[19]. Au laboratoire, en 2008, les travaux de A. Dif ont montré l'utilisation de peptides poly-cystéine pour le ciblage et le marquage de membranes de vésicules lipidiques^[10].

Dans la continuité de ces travaux, l'insertion à l'extrémité C-terminale d'un *tag* poly-cystéine CGCGCGS (Cystag, voir Figure 1) a été utilisée sur $\alpha 2$ et A3 en tant que second point d'accroche pour la surface de QD CdSe/ZnS et les QR CdSe/CdS pour renforcer le greffage sur ces nanoparticules semi-conductrices. D'autre part, cette approche a déjà été utilisée pour le greffage des protéines α -Repeat sur des nanoparticules d'or via la

chemisorption du soufre de la cystéine sur la surface d'or ($\text{protéine-SH} + \text{Au} \rightarrow \text{protéine-S-Au} + \text{e}^- + \text{H}^+$).

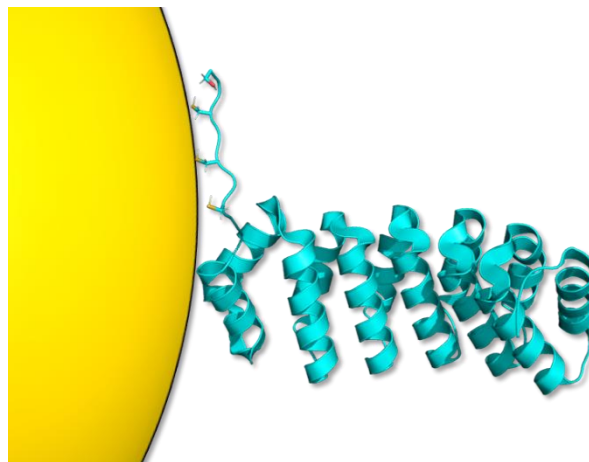


Figure 4. Représentation schématique du greffage d'une protéine A3 sur une nanoparticule par liaison de coordination entre Cd^{2+} , Zn^{2+} ou Au et les fonctions thiols du Cystag.

Comme montré en Figure 4, la présence du Cystag à l'extrémité C-terminale de A3 ne modifie pas sa structure et permet son greffage sur des QD et AuNP. Cette stratégie a pu faire ses preuves lors des travaux sur l'auto-assemblage de AuNP et a démontré que l'affinité au sein du couple $\alpha 2$ –A3 n'est pas altérée par la présence de ce *tag* poly-cystéine^[1].

B.3 Conclusion

Dans le but de réaliser des auto-assemblages de nanoparticules semi-conductrices et métalliques les séquences en acides aminés des protéines α -Repeat $\alpha 2$ et A3 ont été modifiées pour introduire des *tags* spécifiques à la surface des QD et des QR qui peuvent aussi fonctionner pour les nanoparticules d'or. La présence d'un Histag est nécessaire à la purification des protéines mais aussi afin de renforcer l'affinité pour les QD CdSe/ZnS et les QR CdSe/CdS, un Cystag composé de trois cystéines (CGCGCG) a été introduit. Nous disposons donc de protéines α -Repeat $\alpha 2$ et A3 toutes possédant un Histag et éventuellement les mêmes protéines avec un Cystag en plus du Histag pour effectuer les greffages sur les nanoparticules.

C. Echange de ligands sur les nanoparticules

Afin de greffer les protéines Histag et éventuellement Histag/Cystag, une stratégie d'échanges de ligands a été utilisée avec succès. Le greffage direct des protéines à partir des AuNP stabilisées par le citrate ne fonctionne pas. L'élimination des protéines en excès est

impossible sans induire la précipitation des AuNP après le greffage des protéines^[1]. Comme montré en Figure 5, nous avons donc choisi de stabiliser dans un premier temps les nanoparticules avec des ligands polycystéine PEGylés puis de remplacer une partie des ligands thiol PEGylés (dont l'utilisation a été expliquée au Chapitre II) par $\alpha 2$ ou A3. Ainsi la stabilité des nanoparticules est préservée en présence de sels et à des concentrations élevées en particules. Cette stratégie en deux étapes s'est avérée nécessaire pour tous les types de nanoparticules.

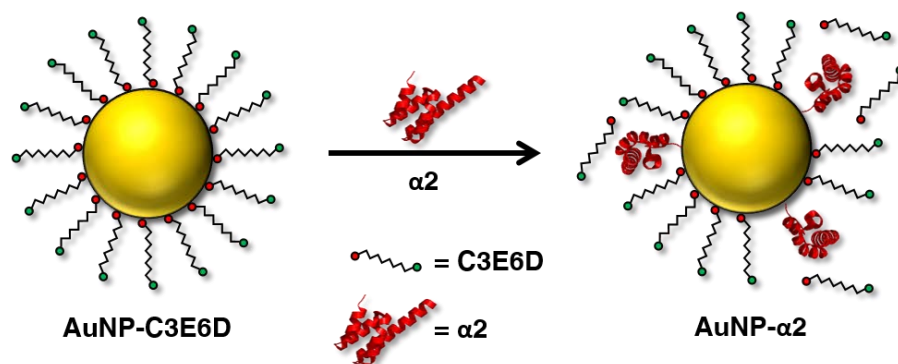


Figure 5. Synoptique du greffage de $\alpha 2$ sur une nanoparticule d'or.

Cette méthode de greffage est basée sur l'affinité du Cystag portés par les protéines α -Repeat pour la surface cristalline des nanoparticules. De ce fait, pour maximiser l'efficacité de ce processus, il est nécessaire d'effectuer au préalable une étape de traitement servant à réduire les éventuels ponts disulfures présents sur les protéines. En effet, lors du stockage des protéines, leur oxydation induit la formation de liaisons S—S, pont disulfure, dont l'affinité pour les nanoparticules semi-conductrices est connue pour être moins fortes. Les travaux de l'équipe de Mattoussi concernant l'acide lipoïque ont démontré qu'il était nécessaire de réduire ce ligand disulfure pour greffer les quantum dots^[20,21]. Ce problème ne concerne pas les AuNP pour qui les disulfures et les thiols présentent une affinité très proche. Ainsi, les protéines α -Repeat sont incubées en milieu réducteur dans une solution aqueuse de dithiothréitol (DTT) à 100 mM. Il s'agit d'un agent réducteur fort ($E = -0,33$ V à pH = 7) très utilisé en biochimie pour la réduction des ponts disulfures. Le DTT est en effet capable de former un cycle avec un pont disulfure interne. Son mécanisme d'action en deux étapes est représenté en Figure 6. La présence d'un groupement thiolate S^- (Figure 6a) permet la rupture du pont disulfure inter-protéine et aboutit à la formation d'un intermédiaire DTT-protéine (Figure 6b). Cet intermédiaire est instable car la seconde fonction thiol du DTT favorise la fermeture du cycle à 6 atomes laissant ainsi un pont

disulfure protéine—protéine réduit (Figure 6c). Après l'incubation des protéines dans la solution de DTT pendant quelques heures, les molécules de DTT oxydées et réduites sont éliminées à l'aide d'une colonne de chromatographie d'exclusion stérique équilibrée avec du tampon NaP à pH 7,4.

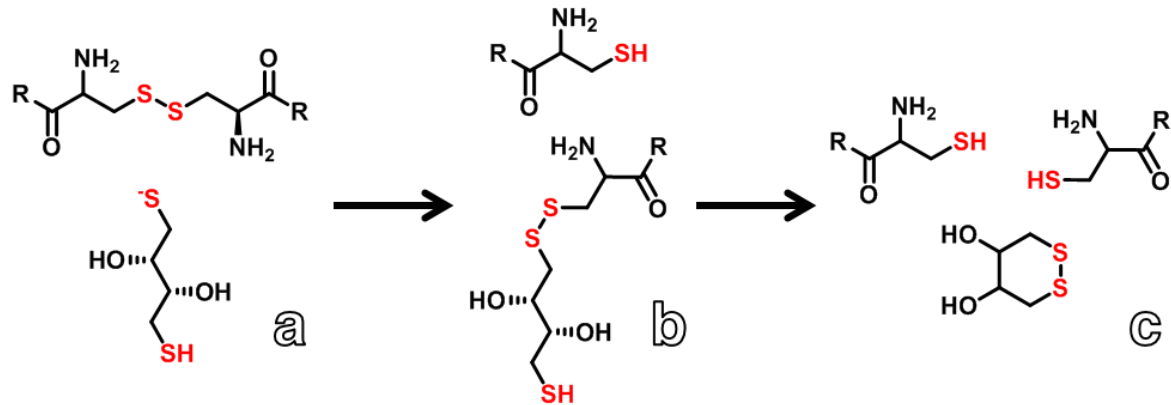


Figure 6. Réduction d'un pont disulfure par le dithiotréitol.

Finalement, la concentration en protéine de chaque fraction utilisée est déterminée par spectroscopie d'absorption UV—visible, et plus particulièrement en mesurant son absorbance à 280 nm^[22]. Le coefficient d'extinction molaire de α_2 ou A_3 est calculé en considérant la réduction complète de leurs résidus cystéines (Tableau 1). La connaissance de la concentration en protéines de chaque fraction traitée au DTT est une donnée importante pour connaître le rapport de concentration entre NP et protéines lors de l'étape d'incubation.

Partie II. Mise en évidence de la bioconjugaison et caractérisation des NP fonctionnalisées

A. Mise en évidence du greffage des protéines sur les nanoparticules

A.1 Principe de l'électrophorèse sur gel d'agarose

D'un point de vue général, les techniques séparatives telles que la chromatographie, le fractionnement d'écoulement de champ, l'électrophorèse ou la centrifugation sont largement utilisées pour la caractérisation des nanomatériaux bioconjugués^[23–26]. Initialement développées pour la caractérisation de macromolécules biologiques telles que l'ADN^[27], l'ARN^[28] ou les protéines^[29], les méthodes d'électrophorèse sur gel ont depuis pu démontrer leur grande utilité pour la caractérisation de nanoparticules bioconjuguées avec

des brins d'ADN^[30-32] ou des protéines^[13,33]. Plus particulièrement, les méthodes électrophorétiques sont utilisées en routine pour démontrer la formation de complexes entre biomolécules et nanoparticules par observation de différences de mobilités entre nanoparticules bioconjuguées et nanoparticules initiales. En outre, l'électrophorèse peut être employée pour purifier des nanoparticules bioconjuguées présentant une stœchiométrie particulière avec la biomolécule d'intérêt^[34]. Ces méthodes sont faciles à mettre en œuvre, sont peu coûteuses et sont effectuées très rapidement (la durée expérimentale d'une électrophorèse de routine étant de l'ordre d'une heure).

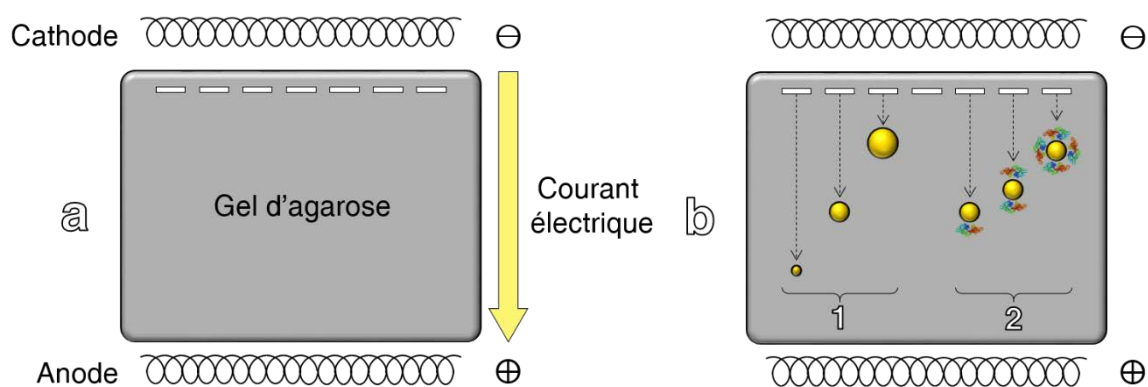


Figure 7. (a) Représentation schématique du montage d'une électrophorèse sur gel d'agarose et (b) principe de la différence de migration électrophorétique pour (1) des nanoparticules de diamètres différents ou (2) des nanoparticules bioconjuguées présentant différentes stœchiométries biomolécules/nanoparticule.

L'électrophorèse est basée sur la migration de particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. Dans le cas de l'électrophorèse sur gel d'agarose, les nanoparticules chargées sont contraintes à migrer sous champs électrique dans un gel d'agarose immergé dans une solution tampon sous l'impulsion du courant électrique. L'énergie motrice de ce déplacement est la tension appliquée à des électrodes placées de part et d'autre du gel d'agarose (Figure 7a). La vitesse de mobilité avec laquelle les nanoparticules traversent les gels d'agarose dépend de leurs caractéristiques physico-chimiques tels que leur taille et leur charge. Ainsi, dans le cas de nanoparticules présentant une charge globale négative supposée constante, l'électrophorèse de nanoparticules de différents diamètres donne lieu, après migration, à des distances de migrations vers l'anode d'autant plus grandes que la taille de la nanoparticule est petite (Figure 7b, 1). Selon le même principe, une nanoparticule bioconjuguée avec un nombre différent de protéines a une distance de migration d'autant plus grande que le nombre de protéines par particule est faible (Figure 7b, 2). En effet, le greffage d'un nombre croissant de biomolécules sur la surface d'une nanoparticule

augmente son rayon hydrodynamique^[13,32,35]. La charge surfacique peut être aussi un paramètre déterminant pour discriminer des nanoparticules de tailles semblables. Plus la particule est chargée, plus elle migre rapidement vers l'électrode de signe opposé.

A.2 Mise en évidence qualitative du complexe nanoparticule/protéine par électrophorèse

L'électrophorèse sur gel d'agarose est employée pour la mise en évidence de la bioconjugaison entre les nanoparticules et les protéines α -Repeat dans le cas des QD, des AuNP, des QR et des AuNCs. Des fractions de chacun de ces types de nanoparticules ont été incubées pendant une nuit en présence de quantités variables de protéines ($\alpha 2$ ou A3). Après incubation, les fractions de nanoparticules sont soumises à la migration électrophorétique. Pour ce faire, du glycérol est ajouté à chacune des fractions afin d'augmenter sensiblement la densité du mélange et d'assurer un bon remplissage des puits de chargement des échantillons. Le gel d'agarose est immergé dans du tampon borate à pH 9 qui permet de se placer à un pH plus basique de le pI des protéines (Tableau 1) et d'avoir des nanoparticules fonctionnalisées chargées négativement. Finalement, l'électrophorèse est démarrée après injection des échantillons. Les conditions de migration des nanoparticules bioconjuguées ont été optimisées. Pour parvenir à des résultats satisfaisants, c'est-à-dire pour obtenir des bandes de migration bien visibles, le gel de migration utilisé est composé à 0,5 % d'agarose (rapport masse/volume) et l'électrophorèse est menée pendant 20 à 40 minutes à une tension fixe de 3,6 V/cm (distance entre les électrodes). Les échantillons, quant à eux, présentent une concentration molaire en nanoparticules (semi-conductrices ou métalliques) de l'ordre de 10–30 nM.

La vérification de la fonctionnalisation des nanoparticules sphériques QD et AuNP par les protéines $\alpha 2$ et A3 est réalisée en incubant des QD-C3E6D et des AuNP-C3E6D avec des quantités croissantes de protéines. De plus, l'affinité pour la surface des QD est évaluée pour des protéines avec ou sans Cystag. Pour des QD d'un diamètre de 9 nm (QD rouges) ou de 2,5 nm (QD verts) et pour des AuNP d'un diamètre de 8 nm, l'influence de la quantité de protéines sur la migration électrophorétique des nanoparticules est montrée à travers la migration de ces nanoparticules au sein des gels d'agarose montrés dans la Figure 8 et dans la Figure 9.

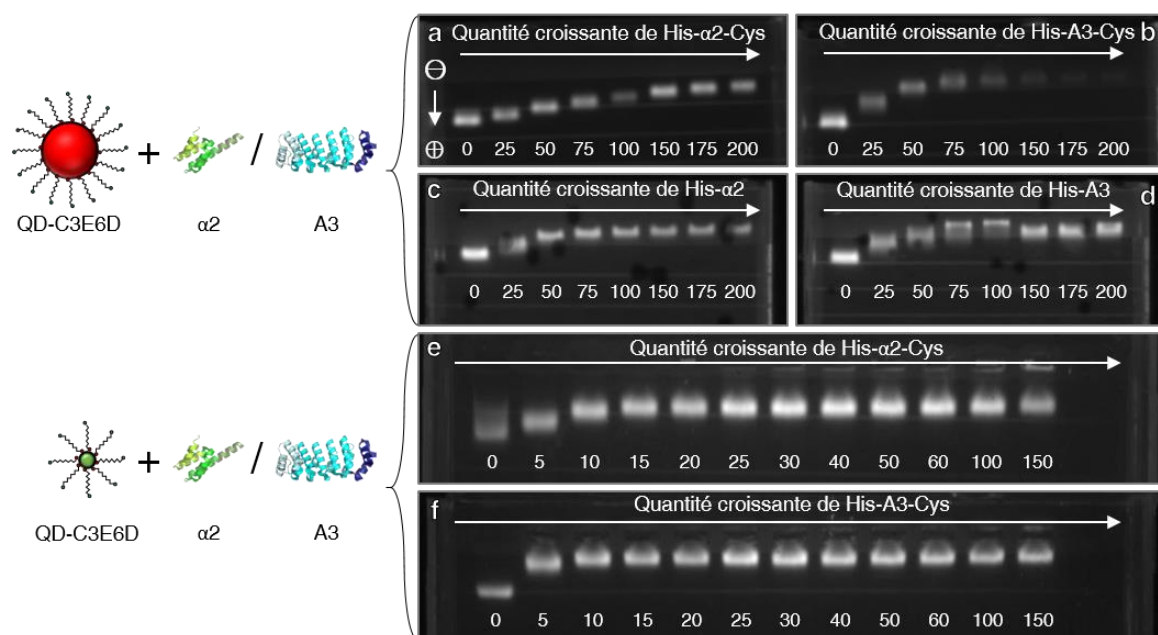


Figure 8. Photographies de fluorescence de migrations électrophorétiques sur gel d'agarose de QD de 9 nm de diamètre fonctionnalisés par du C3E6D et incubés 12 h avec des quantités croissantes de (a) His- α 2-Cys, (b) His-A3-Cys, (c) His- α 2 et (d) His-A3. Migrations électrophorétiques de QD de 2,5 nm de diamètre incubés 12 h avec des quantités croissantes de (e) His- α 2-Cys, (f) His-A3-Cys. Les valeurs représentent le nombre d'équivalents de QD en protéines et $\lambda_{exc} = 350$ nm.

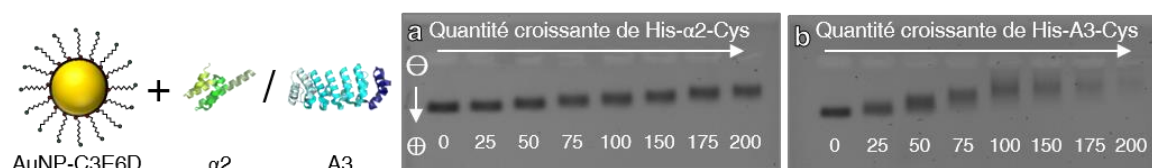


Figure 9. Photographies en lumière visible de migrations électrophorétiques sur gel d'agarose de AuNP de 10 nm de diamètre incubés 12 h avec des quantités croissantes de (a) His- α 2-Cys et (b) His-A3-Cys. Les valeurs représentent le nombre d'équivalents de AuNP en protéines.

Tout d'abord, la migration des nanoparticules vers l'anode montre que les quantum dots hydrophiles présentent une charge globale négative (bande observée sur chaque gel pour 0 équivalent). Ensuite, il apparaît que la distance de migration des nanoparticules devient plus courte après leur incubation avec les protéines. Ce phénomène survient également lors de l'utilisation des protéines α 2 et A3 sans Cystag (Figure 8, gels c et d). En sachant que la distance de migration des nanoparticules dépend de leur charge et de leur taille, ce comportement est en accord avec le greffage de protéines. De plus, la réduction progressive de la distance de migration de QD ou AuNP incubés avec des quantités croissantes de α 2 ou A3 peut être lié au greffage d'un nombre grandissant de protéines α -Repeat sur la surface des nanoparticules. La stœchiométrie protéines/nanoparticule augmente et induit ainsi une

augmentation de la taille et une réduction de la charge des nano-objets, ce qui réduit la distance de migration des QD et des AuNP bioconjugués. Il est important de remarquer que passée une certaine quantité de protéine, la distance de migration n'évolue plus. Ce plateau peut correspondre à la saturation de la surface des nanoparticules par les protéines. En conclusion, pour les QD comme pour les AuNP, les résultats des électrophorèses sur gel d'agarose prouvent le greffage des protéines α -Repeat sur la surface des nanoparticules et confirment la production de QD et AuNP bioconjugués. Par ailleurs, l'étude de la bioconjugaison par électrophorèse sur gel d'agarose révèle des différences entre $\alpha 2$ et A3. Tout d'abord, la comparaison du comportement électrophorétique des nanoparticules fonctionnalisées avec $\alpha 2$ ou A3 révèle des distances de migration plus courtes pour des nanoparticules incubées avec A3 (Figure 8, gels b, d et f ; Figure 9 gel b). Cette différence s'explique par la taille plus petite de $\alpha 2$ comparée à A3^[1,2]. Pour la même raison, la saturation de la surface des QD et des AuNP est atteinte pour des quantités de $\alpha 2$ inférieures à celles de A3.

Tableau 2. Dimensions des nanoparticules utilisées et données de saturation de surface déduites par électrophorèse sur gel d'agarose. A^{NP} désigne la surface de la NP considérée comme un cube. N^{sat} correspond au nombre maximal de protéines greffées sur la surface des NP, extrait des gels d'électrophorèse lorsque le plateau est atteint. $A_{\alpha 2}$ et A_{A3} sont les surfaces correspondantes à une protéine $\alpha 2$ ou A3 ($A = A^{NP} / N^{sat}$).

Nanoparticule	A^{NP} (nm ²)	N^{sat} ($\alpha 2$)	N^{sat} (A3)	$A_{\alpha 2}$ (nm ²)	A_{A3} (nm ²)
QD 9 nm	475	$\geq 200 \pm 13$	100 ± 13	$\geq 2,4 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,6$
QD 2,5 nm	38	15 ± 3	10 ± 3	$2,5 \pm 0,4$	$3,8 \pm 0,9$
AuNP 8 nm	384	$\geq 200 \pm 13$	75 ± 13	$\geq 1,9 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,7$

Comme montré dans le Tableau 2, le nombre de protéines greffées sur la surface des NP nécessaire pour atteindre la saturation est relié de façon linéaire à la surface des NP (A^{NP}). Les protéines utilisées ici peuvent être considérées comme deux entités géométriques de $2,8 \times 2,4 \times 4,3$ nm³ pour $\alpha 2$ et de $3 \times 3 \times 6$ nm³ pour A3 (Tableau 1). Comme attendu selon la taille respective de chaque protéine, la surface moyenne occupée par $\alpha 2$ ($A_{\alpha 2}$) est plus réduite que celle occupée par A3 (A_{A3}). La surface moyenne occupée par une protéine A3 greffée calculée ici est cependant significativement plus petite que la surface que l'on déduit de ses dimensions et qui vaut au moins 9 nm². A_{A3} est alors difficilement compatible avec le greffage d'une monocouche, même compacte, de protéines A3. Cette observation

suggère la formation d'une double couche de A3, ce qui n'est pas inattendu puisqu'il est établi que cette protéine forme des dimères A3•A3. Toutefois ce phénomène n'empêche pas l'appariement $\alpha 2 \cdot A3$ puisque ce complexe est bien plus stable.

A.3 Quantum rods

La même procédure expérimentale est réalisée à partir de QR (de 50 nm sur 5 nm) fonctionnalisés avec le peptide tricystéine C5PEG4. Ce peptide possède une longue chaîne alkyle espaceur qui optimise le greffage sur la surface des bâtonnets^[11]. Après avoir incubé ces nanobâtonnets semi-conducteurs avec $\alpha 2$ ou A3 pendant une nuit, leur migration sur gel d'agarose est évaluée après 30 minutes de migration. Pour les QR avant bioconjugaison (Figure 10, puits pour 0 équivalents pour les gels a et b), l'électrophorèse aboutit sur une bande bien définie qui rend compte de la bonne stabilité colloïdale de ces nanoparticules hydrophiles et de leur charge globale négative, ce qui est en accord avec des résultats déjà obtenus au laboratoire^[11]. Quant aux QR incubés avec les protéines α -Repeat, la migration sur gel d'agarose tend à former des traînées (Figure 10). Ces traînées sont d'autant plus longues que la quantité de protéine $\alpha 2$ ou A3 est importante. Ce phénomène s'accompagne toutefois d'une diminution progressive de la distance de migration des nanoparticules incubées avec les quantités de protéine les plus grandes. Pour les mêmes raisons que celles énoncées dans le cas des QD et des AuNP, cette diminution progressive est en accord avec le greffage des protéines α -Repeat sur la surface des QR.

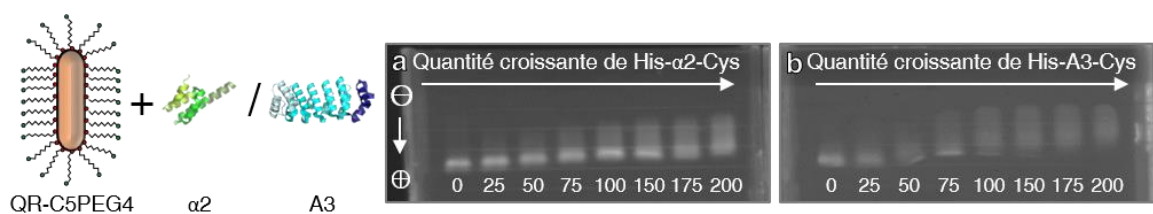


Figure 10. Photographies de fluorescence de migrations électrophorétiques de QR de 50 x 5 nm incubés 12 h avec des quantités croissantes de (a) His- $\alpha 2$ -Cys et (b) His-A3-Cys. Les valeurs représentent le nombre d'équivalents de QR en protéines.

Concernant la formation des traînées, celle-ci peut être due à l'agrégation partielle des QR lors de l'échange de ligands^[36]. Ceux-ci forment ainsi des agrégats de tailles variables et observables sous forme de traînées. D'autre part, la présence de ces traînées peut également attester de la formation de QR bioconjuguées dont les stœchiométries

protéines/QR sont très variables. Ainsi, chaque stœchiométrie correspond à une distance intermédiaire au sein de la traînée.

A.4 Nanoclusters d'or

Pour l'étude de la fonctionnalisation de nanoclusters d'or stabilisés par le GSH avec les protéines $\alpha 2$ et A3, l'électrophorèse sur gel d'agarose est utilisée comme décrit dans la littérature. L'étude de la bioconjugaison de AuNC d'un diamètre d'environ 2 nm avec des PEG a été décrite pour la streptavidine ou l'avidine selon Chang *et al.*^[37]. De façon semblable à ce qui a été réalisé pour les QD, les AuNP et les QR, ces nanoparticules d'or fluorescentes sont incubées avec des quantités croissantes de protéines.

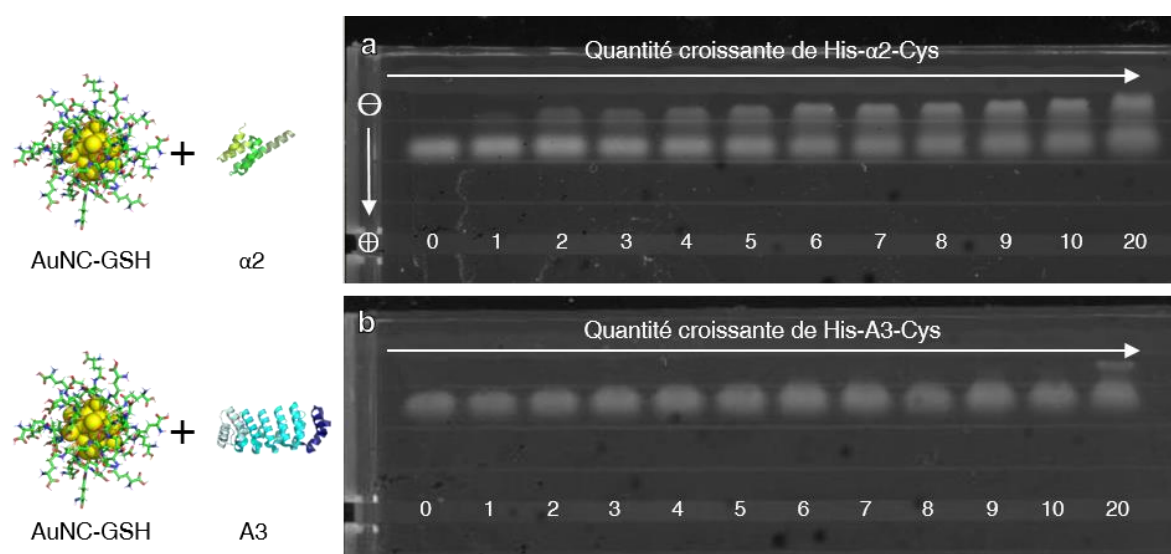


Figure 11. Photographies de fluorescence de migrations électrophorétiques de AuNC incubés 12 h avec des quantités croissantes de (a) His- $\alpha 2$ -Cys et (b) His-A3-Cys. Les valeurs représentent le nombre d'équivalents molaires de AuNC en protéines.

Après 20 minutes sous champ électrique, les nanoclusters d'or incubés avec $\alpha 2$ présentent une distance de migration progressivement ralentie entre 0 et 20 équivalents molaires de $\alpha 2$ (Figure 11, gel a) mais dans des proportions moins importantes que ce qui a pu être rapporté plus haut pour les autres types de nanoparticules car les tailles sont plus petites. Toutefois, en présence de $\alpha 2$, les AuNCs laissent apparaître une seconde bande distincte qui migre moins. Cette bande peut être attribuée au complexe issu de la bioconjugaison des AuNCs par $\alpha 2$. L'augmentation de la taille et la possible évolution de la charge des AuNCs conduisent ainsi à une nouvelle bande au sein du gel d'agarose. Dans le cas de la bioconjugaison des AuNCs avec la protéine A3 (Figure 11, gel b), la migration électrophorétique des incubations avec les protéines n'aboutit pas à la formation d'une

nouvelle bande avant 9 équivalents de protéines utilisés. En effet, pour 9 et 10 équivalents, la bande correspondant aux AuNCs-GSH s'étire un peu jusqu'à former une bande distincte pour 20 équivalents de A3 ajoutés. On observe donc un greffage visiblement plus facile pour $\alpha 2$ que pour A3. Contrairement aux AuNP, les AuNC présentent une différence de migration en présence de protéines assez faible, qui peut s'expliquer par leur ligand. Ici, les AuNC sont ici stabilisées par le GSH qui possède une charge négative et deux charges négatives à pH 7,4. Il est possible que le greffage de protéines induise une variation de charge moins importante que dans le cas de AuNP stabilisées par le C3E6D qui porte deux charges négatives à pH 7,4.

A.5 Conclusion

La migration électrophorétique sur gel d'agarose des différentes nanoparticules semi-conductrices et métalliques a permis d'étudier leur bioconjugaison de façon détaillée avec chacune des protéines du couple de protéines α -Repeat $\alpha 2$ et A3. D'un point de vue général, une augmentation de la taille et la possible variation de la charge globale des nanoparticules habillées par les protéines influe sur leur migration au sein du gel d'agarose lorsqu'elles sont soumises au champ électrique. Ceci mettant ainsi en évidence le greffage des protéines sur la surface des particules, cette étude indique que la stratégie de fonctionnalisation avec des *tags* d'affinité présents dans la séquence en acides aminés des protéines est adaptée aux types de particules étudiées.

Pour les nanoparticules semi-conductrices, QR et QD, l'observation des gels d'agarose après migration révèle la conservation des propriétés de fluorescence des particules après leur fonctionnalisation. Toutefois, cette technique n'apporte pas d'information quantitative sur les propriétés optiques des nanoparticules. L'objet de la sous-partie suivante est de comprendre l'influence du greffage des protéines α -Repeat sur les propriétés d'émission et d'absorption des nanoparticules semi-conductrices et métalliques à l'aide des techniques de caractérisation appropriées.

B. Propriétés optiques et morphologie des nanoparticules bioconjuguées

B.1 Nanoparticules semi-conductrices

La caractérisation de nanoparticules semi-conductrices bioconjuguées avec des protéines est souvent réalisée par spectroscopie d'émission de fluorescence. En effet, l'évolution du rendement quantique de ces particules permet de confirmer et voire même, dans certains cas, de quantifier la formation des nanoparticules bioconjuguées lors de leur interaction avec un peptide ou une protéine. Certaines configurations démontrent que l'interaction entre QD et protéines mènent à l'augmentation de leur luminescence. Par exemple, Mattoussi *et al.* ont démontré une exaltation de la fluorescence des QD par complexation avec la protéine de liaison au maltose modifiée portant un Histag^[15,16,38,39]. L'hypothèse émise pour expliquer l'augmentation de l'intensité de fluorescence de QD est la possible passivation de leur surface par le greffage des protéines. Mais c'est surtout la diminution de l'intensité de fluorescence qui est fréquemment observée lors du greffage de biomolécules sur la surface de nanoparticules semi-conductrices. Les biomolécules constituent un réservoir de pièges pour la recombinaison non radiative des excitons. Par exemple, la fonctionnalisation de QD avec des molécules contenant des amines primaires, secondaires ou quaternaires qui peuvent jouer le rôle de collecteurs de trous h^+ ^[40]. De plus, la fixation de certaines protéines, telles que l'albumine de sérum bovin (BSA) peut engendrer un décalage du maximum d'émission de fluorescence et du pic excitonique des QD vers le bleu^[41]. Les mécanismes qui sont à l'origine de ces phénomènes sont complexes et dépendent fortement des ligands utilisés.

Dans le cas de la bioconjugaison de QD CdSe/ZnS et de QR CdSe/CdS avec une des protéines du couple $\alpha 2/A3$, l'étude des propriétés optiques de ces nanoparticules fluorescentes est réalisée à travers le suivi de leurs spectres d'émission de fluorescence et d'absorption UV—visible. Les QD ou QR hydrophiles, fonctionnalisés avec C3E6D et C5PEG4 respectivement, sont incubés avec un grand excès (100 équivalents) de $\alpha 2$ ou A3 Histag et Cystag dans du tampon NaP à pH 7,4. Après une nuit d'incubation, les propriétés d'émission et d'absorption des nanoparticules sont mesurées. Les résultats indiquent que la bioconjugaison de ces deux types de nanoparticules semi-conductrices diminue leur intensité de fluorescence sans modifier leurs propriétés d'absorption de façon significative. Comme montré dans les Figure 12a et b, tandis que l'incubation des QR et des QD avec les protéines ne semble pas changer la longueur d'onde de leur maximum d'émission de

fluorescence, celle-ci induit tout de même une perte en intensité d'émission de 26 % et 38 % dans le cas des QR et 15 % et 19 % dans le cas des QD incubés avec $\alpha 2$ et A3 respectivement. Quant à leur spectre d'absorption UV—visible, leur mise en contact avec $\alpha 2$ ou A3 ne modifie pas la position des différents pics tels que le pic excitonique (Figure 12c et d). Il est toutefois intéressant de noter que les nanoparticules incubées avec la protéine A3 présentent un spectre d'absorption sensiblement aplati en comparaison avec les spectres des particules sans protéines ou des particules couplées avec $\alpha 2$.

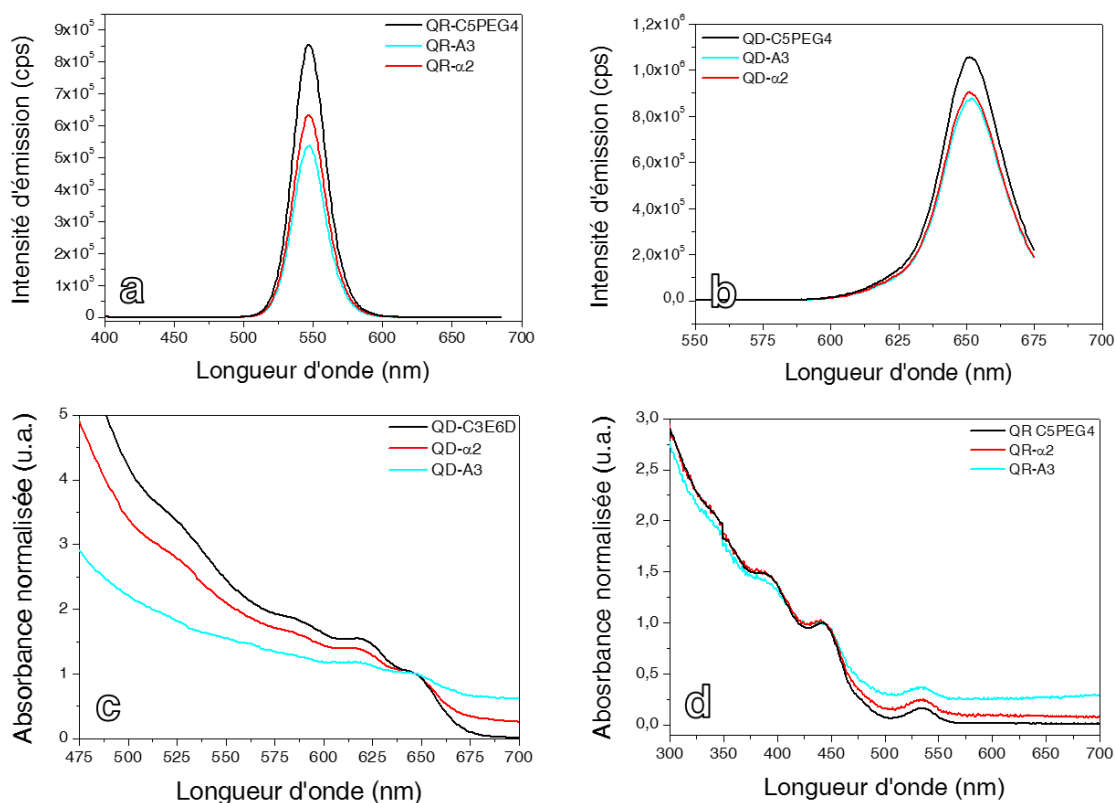


Figure 12. Spectres d'émission de fluorescence de QR (a) et de QD (b) et spectres d'absorption UV—visible de QR (c) et de QD (d) bioconjugués avec $\alpha 2$ et A3 à pH = 7,4 ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm).

Dans le but de comprendre la diminution de l'intensité d'émission de fluorescence observée lors de l'incubation des QD et QR avec les protéines α -Repeat, ces nanoparticules bioconjuguées ont été observées par TEM afin de vérifier si une agrégation ou une dégradation des nanoparticules pouvait induire une diminution de la fluorescence (Figure 13). Ces observations mettent en lumière une certaine instabilité, particulièrement dans le cas de QR (Figure 13c et Figure 13d). Quelques particules semblent être déstabilisées dans le cas des QD incubées avec A3 (Figure 13a) tandis qu'aucun agrégat n'est observé quand il s'agit des QD- $\alpha 2$ (Figure 13b).

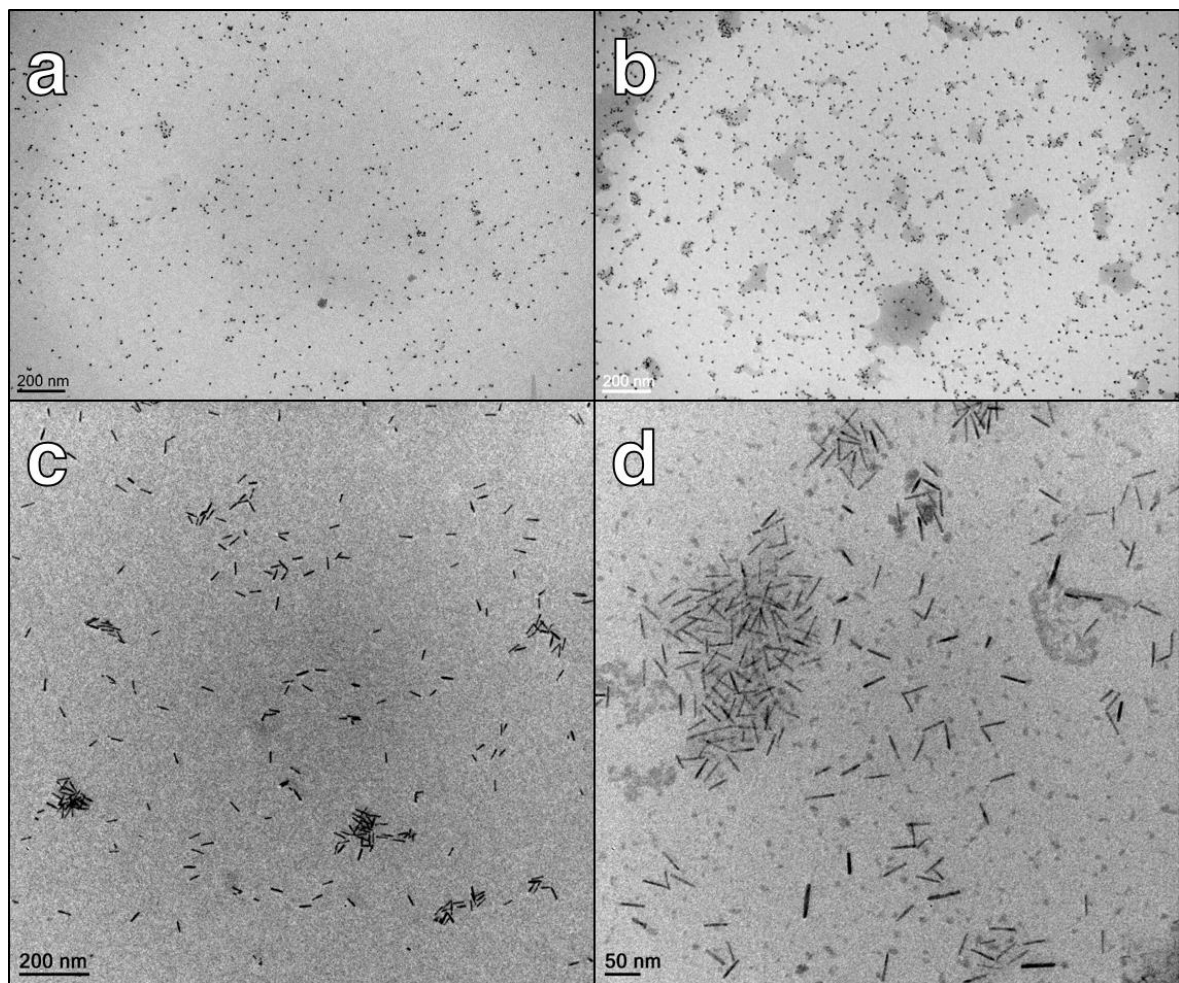


Figure 13. Images TEM de (a) QD-A3, (b) QD- α 2, (c) QR-A3 et (d) QR- α 2 à pH 7,4.

Ainsi, la diminution de 15 % à 38 % de l'intensité de fluorescence causée par la bioconjugaison des protéines α -Repeat sur les nanoparticules semi-conductrices peut s'expliquer par la diminution de la passivation des particules. D'autre part, la probabilité des recombinaisons radiatives au sein du cœur inorganique devient moins favorable. Le remplacement d'un nombre trop important de ligands PEGylés à la surface des QD et QR peut mener à un certain degré d'agrégation des nanoparticules et donc l'extinction plus ou moins importante de leur fluorescence^[42]. La baisse de fluorescence supplémentaire observée après greffage des protéines peut être attribuée au remplacement progressif des ligands de surface par les protéines qui perturbent l'effet de passivation de la surface produit par les PEG. Il est probable que les protéines réduisent aussi la stabilité colloïdale des particules, surtout dans le cas des protéines A3 qui peut former des agrégats entre elles A3. La portée de ce phénomène est toutefois relativement limitée puisque le cas le plus affecté, c'est-à-dire les QR-A3, présente une perte de luminescence de 38 %.

B.2 Nanoparticules métalliques

B.2.i. AuNP et GNR

Pour étudier l'influence de la bioconjugaison sur les propriétés optiques des nanoparticules plasmoniques, AuNP et GNR, le suivi de l'évolution de leur spectre d'absorption UV—visible est riche en informations. À travers l'analyse de l'éventuel décalage du maximum ou de l'élargissement de la ou des bande(s) plasmon(s) de ces nanoparticules d'or, des informations concernant leur état d'agrégation et l'état de leur chimie de surface peuvent être déduites^[43,44]. En effet, les évolutions de leur spectre d'absorption UV—visible traduisent une modification de l'indice de réfraction local du milieu environnant. Par exemple, le greffage d'un anticorps spécifique aux cellules cancéreuses sur des AuNP stabilisées par le citrate ou sur des GNR stabilisés par le CTAB résulte en un décalage des bandes plasmons de quelques nanomètres vers le rouge^[45]. Toutefois, l'évolution de la position de la bande plasmon dépend du ligand initialement présent à la surface des nanoparticules. Ici, on attend une évolution réduite de cette position lors du greffage des protéines sur des AuNP-C3E6D car il y a peu de différence entre l'indice de réfraction d'un ligand peptidique et celui d'une couche de protéines.

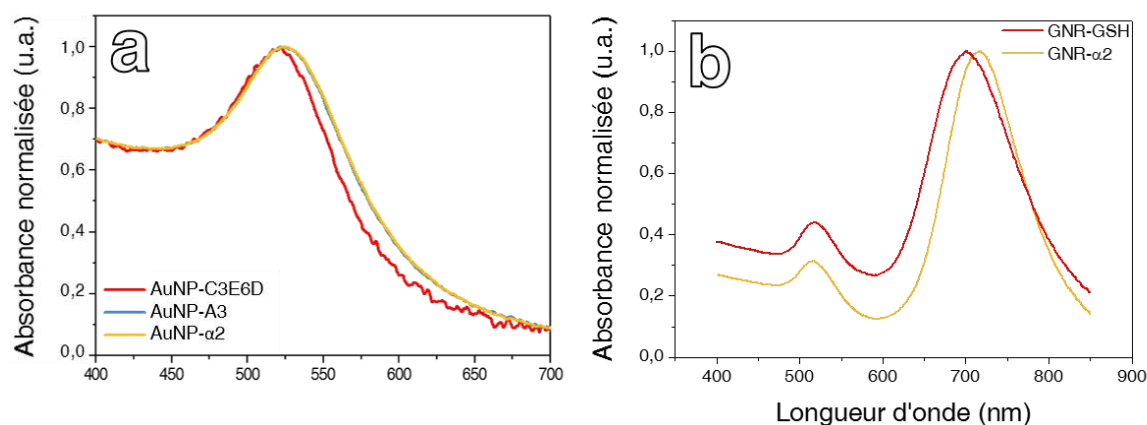


Figure 14. Évolution des spectres d'absorption UV—visible de (a) AuNP et de (b) GNR lors de leur incubation avec les protéines α -Repeat à pH 7,4.

Toutefois, dans le cadre de nos travaux, le suivi de l'évolution de la bande plasmon de AuNP-C3E6D a été effectué lors de leur incubation avec $\alpha 2$ et A3. Comme montré en Figure 14a, la bande plasmon des AuNP-C3E6D est centrée sur 520 nm mais leur incubation avec 100 équivalents d'une des deux protéines la décale de 5 nm vers le rouge. Ces observations sont légèrement différentes de celles qui ont pu être réalisées lors de la

mise au point des auto-assemblages de AuNP par appariement de $\alpha 2$ et A3, et qui rapportaient une absence de décalage de la bande plasmon^[1]. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'ici 100 équivalents molaires de AuNP en protéines sont utilisés, alors que les résultats antérieurs concernent des incubations utilisant 30 ou 20 équivalents. En effet, d'après, les expériences d'électrophorèse, il est raisonnable de supposer que plus la quantité de protéines en contact avec les AuNP est grande, plus le nombre de protéines greffées sur la surface des nanoparticules est grand. De ce fait, la bande plasmon des AuNP devrait être davantage modifiée lors d'une bioconjugaison mettant en jeu une plus grande quantité de biomolécules jusqu'à atteindre une limite correspondant à la saturation de la surface par les protéines.

Les GNR, quant à eux, dévoilent une évolution importante de la position de la bande plasmon longitudinale (Figure 14b). Initialement centrée autour de 700 nm pour des GNR-GSH, ce pic est décalé de 17 nm vers le rouge après 24 h d'incubation avec $\alpha 2$. Cette observation est en accord avec les travaux publiés dans lesquels la formation d'une couche discontinue de protéines sur des GNR est caractérisée par le décalage vers le rouge ou vers le bleu des deux bandes plasmons^[45,46].

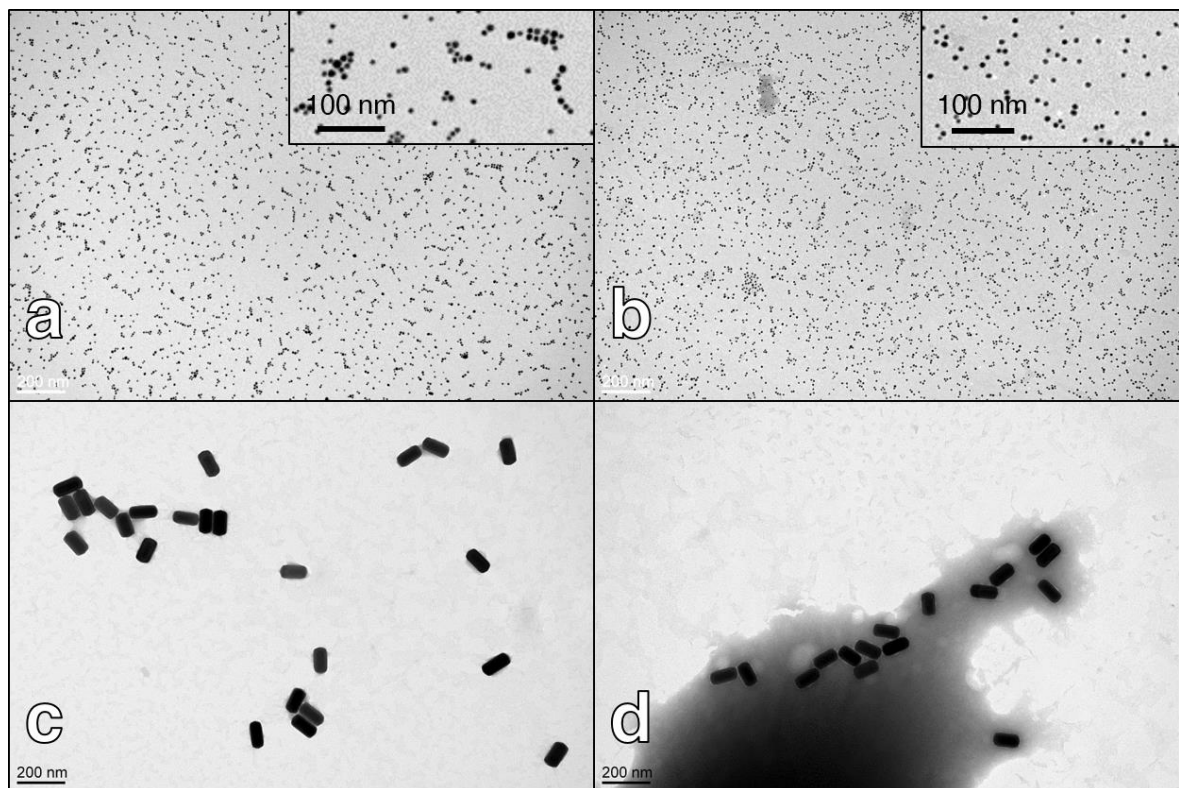


Figure 15. Images TEM de (a) AuNP-a3, (b) AuNP- $\alpha 2$, (c) GNR-A3 et (d) GNR- $\alpha 2$ à pH 7,4.

Il a été ainsi rapporté que la spectroscopie d'absorption UV–Visible permet de rendre compte de la bioconjugaison, au moins partielle, entre des AuNP ou des GNR et les protéines α -Repeat. Dans la continuité de cette étude, la caractérisation de ces nanoparticules plasmoniques par microscopie électronique permet d'étudier l'influence du greffage des protéines sur la stabilité des objets. D'un point de vue général, il peut être observé que les nanoparticules conservent une stabilité satisfaisante après incubation avec les protéines. Les objets, dans leur ensemble, présentent assez peu de points de contact (Figure 15). Toutefois, la formation relativement fréquente de petits agrégats d'AuNP sous forme de grappes ou de colliers apparaît dans le cas des AuNP-A3 visibles en Figure 15a ce qui est cohérent avec la tendance de cette protéine à dimériser.

C. Taille et charge des nanoparticules bioconjuguées

C.1 Evolution du diamètre hydrodynamique des nanoparticules

Afin de caractériser le greffage de $\alpha 2$ et A3 sur des QD rouges d'environ 9 nm de diamètre et des AuNP d'environ 15 nm de diamètre, la mesure du diamètre hydrodynamique de ces nanoparticules est réalisée avant et après leur bioconjugaison avec chacune des protéines α -Repeat (Figure 16).

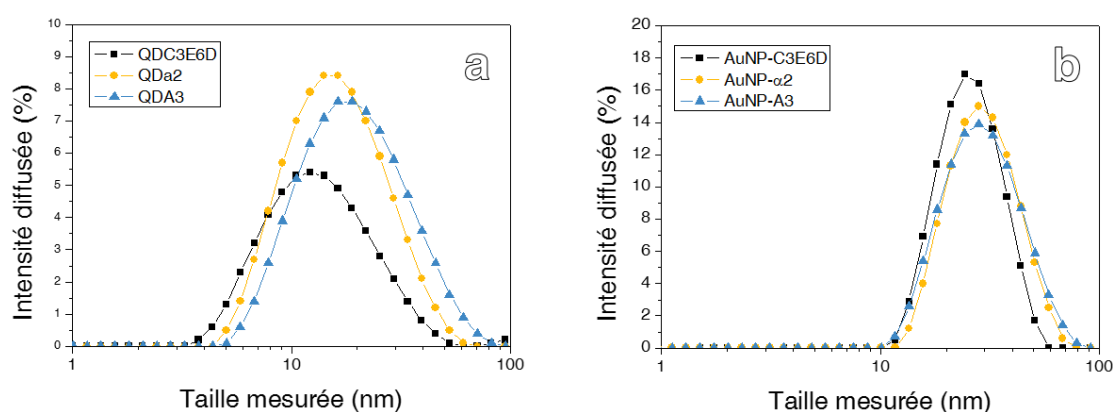


Figure 16. Distributions de tailles de (a) QD et (b) AuNP avant et après leur bioconjugaison avec $\alpha 2$ et A3 mesurées par DLS à pH 7,4.

La technique de DLS (dont le principe est présenté en Annexe I) étant réservée à l'analyse de particules sphériques, cette étude par DLS a été réalisée pour des particules sphériques uniquement. En effet, l'analyse précise de particules non sphériques (QR et GNR, par exemple) nécessite l'utilisation d'angles multiples ou de réaliser des mesures de DLS dépolarisée^[47,48]. D'un point de vue expérimental, la préparation des échantillons de QD et

de AuNP nécessite une étape de filtration (filtres Nuclepore 0,22 μm) à cause de petits agrégats qui, bien que peu nombreux, sont très facilement détectés par DLS.

Pour des QD-C3E6D saturés par $\alpha 2$ et par A3, le diamètre hydrodynamique \varnothing_H des QD présente une augmentation de 2 nm et 8 nm respectivement (Tableau 3) après le greffage des protéines, ce qui est en accord avec la taille attendue pour $\alpha 2$ mais pas dans le cas de la protéine A3 (voir Tableau 1)^[2]. Compte tenu de la capacité de cette dernière à former des dimères A3•A3, il est raisonnable d’attribuer cette augmentation de taille de 8 nm à la présence d’oligomères de A3 à la surface de la particule, notamment à la formation de dimères de A3. D’autre part, le suivi de l’évolution du \varnothing_H de AuNP bioconjuguées est aussi réalisé par DLS et révèle une augmentation de la taille reporté dans le Tableau 3. Pour $\alpha 2$ comme pour A3, une augmentation de 4 nm est mesurée. Il est à constater que dans le cas des nanoparticules d’or, il n’y a pas cette tendance à former des agrégats à la surface des particules.

Tableau 3. Diamètres hydrodynamiques moyens de nanoparticules bioconjuguées mesurés par DLS. L’erreur type du diamètre moyen est calculée à partir de l’écart-type pour trois séries de mesures.

Nanoparticule (NP)	\varnothing_H NP-C3E6D (nm)	\varnothing_H NP- $\alpha 2$ (nm)	\varnothing_H NP-A3 (nm)
QD 9 nm	15 \pm 1,4	18 \pm 0,95	23 \pm 1,3
AuNP 15 nm	28 \pm 0,45	32 \pm 0,90	32 \pm 0,95

Cette augmentation significative du diamètre hydrodynamique des nanoparticules confirme le greffage effectif des biomolécules sur la surface inorganique des QD et des AuNP. Ces bioconjugaisons ont été réalisées avec des quantités permettant d’atteindre la saturation de la surface (100 équivalents), ce qui indique qu’à saturation, la différence de taille mesurée par DLS correspond à la formation d’une couche de protéines autour des nanoparticules. L’ordre de grandeur de l’épaisseur de cette couche est compatible avec une seule couche de protéines excepté dans le cas des QD-A3 où les mesures sont moins claires. Compte tenu de l’encrage des protéines par le tag à la surface, on peut supposer que la surface dispose d’un certain nombre de sites d’encrage qui, lorsqu’ils sont occupés, permettent d’atteindre un état de saturation de surface assez bien défini avec un taux de couverture assez élevé pour donner une augmentation de taille de 4 nm. De plus, les distributions de taille obtenues sont fines et montrent que la taille des objets est homogène,

ce qui est une indication de la bonne stabilité des particules même en présence des protéines à leur surface. Cette stabilité peut s'expliquer par la charge surfacique non nulle des protéines au pH utilisé qui est de 7,4.

C.2 Evolution de la charge

Afin d'avoir de plus amples informations sur l'état de charge des particules, nous avons effectué la mesure du potentiel zêta (ζ) qui permet de caractériser la charge surfacique des nanoparticules en tenant compte de la couche d'hydratation et de contre-ions condensés à leur surface. Le potentiel zêta est un outil permettant d'évaluer la stabilité des nanoparticules. La suspension de nanoparticule est placée dans une cuve possédant deux électrodes. La tension alternative appliquée génère un champ électrique qui induit le mouvement des particules vers l'électrode de charge opposée. La mesure de l'intensité de diffusion sur une brève fenêtre temporelle permet d'extraire la mobilité des nanoparticules chargées. Cette mobilité est proportionnelle au potentiel zêta des nanoparticules^[35]. Pour les nanoparticules bioconjuguées, cette mesure permet d'évaluer l'influence du greffage des protéines α -Repeat sur la charge et donc sur la stabilité des nanoparticules. Ainsi, le potentiel zêta est mesuré avant et après la bioconjugaison de QD et de AuNP. Partant des QD-C3E6D et de AuNP-C3E6D, ces dernières sont mises en présence d'un grand excès (100 équivalents) de $\alpha 2$ ou de A3 et sont caractérisées après purification (Tableau 4).

Tableau 4. Potentiels zêta (ζ) de QD et AuNP avant et après bioconjugaison avec $\alpha 2$ et A3 dans du tampon NaP à pH 7,4.

Nanoparticule (NP)	$\zeta_{\text{NP-C3E6D}}$ (mV)	$\zeta_{\text{NP-}\alpha 2}$ (mV)	$\zeta_{\text{NP-A3}}$ (mV)
QD 9 nm	$-26,1 \pm 1,3$	$-11,9 \pm 1,3$	$-6,4 \pm 1,3$
AuNP 15 nm	$-27 \pm 1,3$	$-13,9 \pm 1,3$	$-5,3 \pm 1,3$

Les potentiels zêta mesurés pour les particules de départ confirment la présence de charges négatives sur la surface des QD et des AuNP utilisés, dues aux groupement acides carboxyliques des ligands de surface C3E6D. Ces valeurs de potentiel zêta sont supérieures en valeur absolue à 20 mV, qui est une valeur généralement considérées comme valeur limite indiquant la stabilité de nanoparticules en suspension^[49]. Pour les QD et les AuNP bioconjugués, la valeur du potentiel est modifiée d'une façon significative et témoigne d'une

stabilité de plus en plus limitée à mesure que les quantités de protéines greffées augmentent. Cette évolution du potentiel zêta vers des valeurs moins négatives (Tableau 5) indique une diminution de la charge des nanoparticules en accord avec les expériences réalisées par électrophorèse. La charge surfacique après le greffage des protéines diminue aussi la stabilisation par répulsion électrostatique entre les nanoparticules. Cette observation est en accord avec les interprétations tirées des migrations électrophorétiques des particules saturées avec ces protéines (Figure 8 et Figure 9).

Tableau 5. Potentiels zêta de QD présentant peu de protéines A3 sur leur surface.

Nanoparticule	QD-A3 _{5 eq}	QD-A3 _{10 eq}	QD-A3 _{100 eq}
Potentiel zêta (mV)	-22,0 ± 1,3	-16,0 ± 1,3	-6,4 ± 1,3

Pour préciser l'effet de la protéine A3, des mesures de potentiel zêta ont été réalisées pour des QD-C3E6D de même taille et incubés avec des plus petites quantités de A3 (5 et 10 équivalents, Tableau 5). Comme expliqué à travers l'étude par électrophorèse sur gel d'agarose présentée plus haut, ces quantités permettent d'obtenir des complexes protéines—particules présentant des stœchiométries faibles. Les valeurs de potentiel zêta ainsi obtenues correspondent à des variations de charge moins importantes que celle mesurée pour des QD à la surface saturée par la protéine A3 (-6 mV) et correspondent probablement à des états de surface intermédiaires entre absence de protéine et saturation de la surface. Ces nanoparticules bioconjuguées avec peu de protéines devraient, de par leur valence plus faible, induire des nanostructures auto-assemblées de nature oligomérique et devraient être mieux stabilisées.

D. Détermination de la stœchiométrie protéines par nanoparticule

D.1 Principe du dosage des protéines greffées sur les nanoparticules d'or

Dans l'optique des auto assemblages de nanoparticules, il est essentiel de contrôler si possible la stœchiométrie du nombre de protéines par nanoparticule définie comme le rapport molaire entre protéines greffées et nanoparticules (protéines/nanoparticules). Cette stœchiométrie, illustré en Figure 17, est une donnée cruciale pour appréhender la capacité d'une nanoparticule bioconjuguée (NP-A3, par exemple) à s'auto-assembler avec une nanoparticule partenaire (NP- α 2) et la géométrie des assemblages formés.

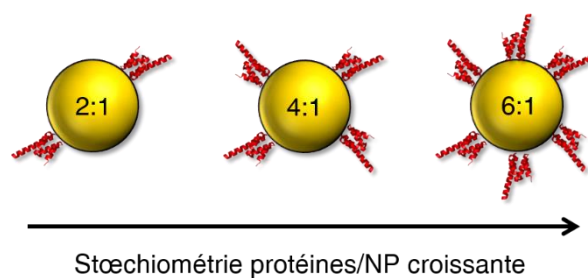


Figure 17. Représentation schématique de différentes stœchiométries protéines/nanoparticule.

Pour la détermination de la stœchiométrie de nanoparticules bioconjuguées avec des protéines, plusieurs méthodes ont été mises en place afin de mesurer la concentration de protéines effectivement greffées sur la surface de nanoparticules. Bien que la microscopie électronique permette de mettre en évidence la présence des protéines autour des nanoparticules via des méthodes de coloration négative^[50], cette méthode ne permet pas de les quantifier. Il en est de même pour la DLS. Par exemple, la mesure du dichroïsme circulaire de protéines (transferrine, albumine plasmatique humaine et ovalbumine) bioconjuguées à des nanoparticules (*carbon dots* et AuNP) a été exploitée par Leblanc *et al.* grâce à l'intensité de l'absorption caractéristique des hélices α mesurée à 208 nm comparée à des gammes étalons^[51]. Toutefois, cette méthode n'est pas totalement satisfaisante à cause d'un certain manque de sensibilité et aussi parce qu'elle repose sur l'hypothèse que les protéines greffées conservent la même conformation tridimensionnelle que celle de protéines libres. Cherchant à mettre au point une méthode plus fiable et plus précise, Dyer *et al.* ont utilisé une stratégie illustrée en Figure 18. La spectroscopie de fluorescence permet de doser les protéines greffées à la surface d'AuNP après leur dissolution. Cette mesure d'émission de fluorescence repose sur la fluorescence du tryptophane présent au sein de la séquence des protéines qui, excité à 280 nm, émet autour de 350 nm^[52]. En comparant ainsi un échantillon de protéines de concentration inconnue à une gamme étalon de protéines libres, cette méthode permet de déterminer la concentration de protéines initialement présentes à la surface des particules d'or.

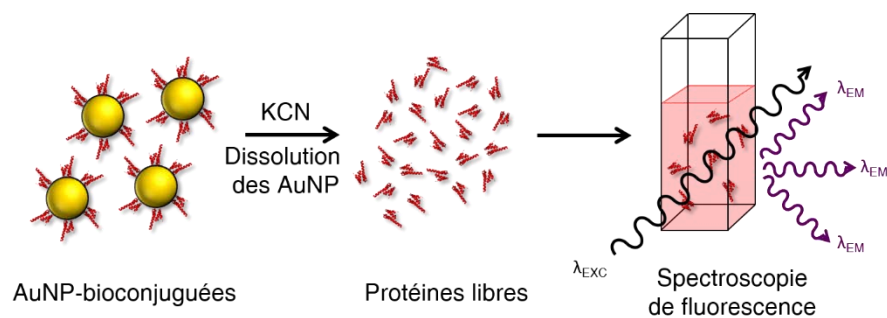


Figure 18. Synoptique du dosage des protéines greffées sur des AuNP.

Ainsi, des AuNP de 10 nm de diamètre ont été fonctionnalisées avec A3 selon la méthode décrite au début de ce chapitre. Seule la protéine A3 est utilisée car elle possède 4 résidus tryptophane qui assurent une intensité de fluorescence suffisante. Dans le cas de $\alpha 2$, son intensité de fluorescence n'est pas suffisante car elle ne possède qu'un seul tryptophane. La bioconjugaison de AuNP-C3E6D est réalisée avec des quantités de A3 suffisantes pour saturer la surface des particules (100 équivalents, $7,45 \mu\text{M}$). Après incubation, des purifications par filtration et centrifugation permettent de séparer les protéines en excès qui n'ont pas réagi avec les AuNP. Ces AuNP-A3 sont ensuite dissoutes par oxydation en présence d'une solution aqueuse saturée de cyanure de potassium (KCN) qui peut complexer les atomes d'au et ainsi dissoudre les nanoparticules^[53,54]. La disparition de la bande plasmon du spectre d'absorption UV—visible des nanoparticules atteste de leur dissolution totale. Finalement, la mesure du spectre d'émission de fluorescence de la solution de nanoparticules dissoutes est réalisée en excitant les résidus tryptophane à 280 nm et en récoltant leur émission entre 300 et 500 nm.

D.2 Résultats

La mesure des spectres d'émission de fluorescence d'une gamme de solutions de protéines A3 de concentrations connues, comprises entre $0,33 \mu\text{M}$ et $4,20 \mu\text{M}$ (Figure 19a), a permis d'établir la courbe étalon de l'intensité d'émission à 359 nm en fonction de la concentration en A3 (Figure 19b). La dissolution des AuNP dans l'échantillon de AuNP-A3 préalablement purifié des protéines A3 en excès, est vérifiée en suivant la disparition des pics d'absorption et de diffusion des nanoparticules. Le spectre d'émission de fluorescence correspond alors aux protéines A3 libérées (Figure 19c). Ce dernier montre une émission de fluorescence autour de 350 nm correspondant au tryptophane, démontrant la présence de protéines A3 initialement fixées à la surface des AuNP. L'hypothèse de la présence de

protéines en excès est écartée du fait des lavages réalisés extemporanément. La droite de régression linéaire tirée de la Figure 19b permet de déterminer la concentration en protéines dans l'échantillon de nanoparticules bioconjuguées : pour 938 170 cps mesurés à 359 nm cette concentration vaut donc 1,91 μM . En prenant en compte la dilution induite par l'ajout du KCN et de tampon, on obtient une concentration initiale de 7,16 μM .

D'autre part, le spectre d'absorption UV–Visible des AuNP-A3 permet de calculer la concentration en AuNP-A3 et donc la concentration en AuNP. Ainsi, $[\text{AuNP}]$ vaut 90 nM tandis que $[\text{A3}]$ vaut 7,16 μM . Le nombre de protéines A3 par AuNP, n_{A3} , peut être calculé :

$$n_{\text{A3}} = \frac{[\text{A3}]}{[\text{AuNP}]} = 80.$$

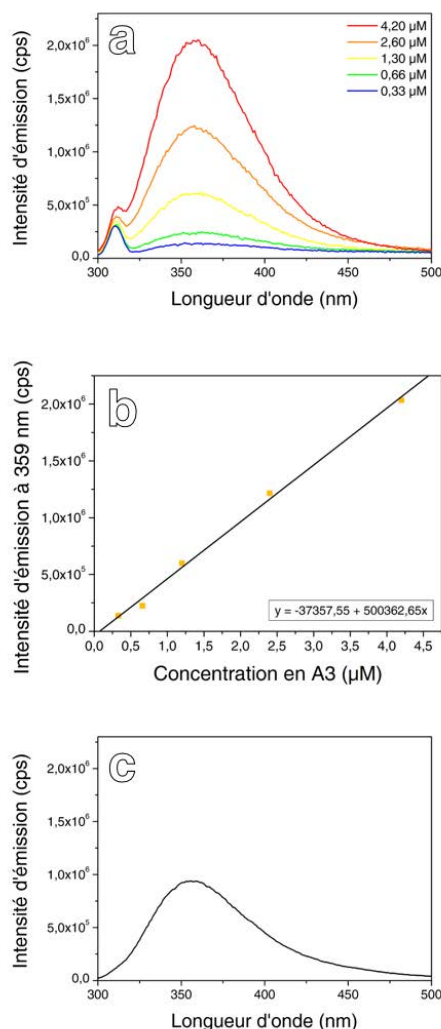


Figure 19. Dosage des protéines A3 greffées sur la surface des AuNP. (a) Spectres d'émission de fluorescence de A3 concentrées entre 0,33 et 4,20 μM . (b) Courbe étalon de l'intensité de fluorescence mesurée à 359 nm en fonction de la concentration de A3 dans des conditions égales à celles de l'échantillon de AuNP dissoutes (présence de KCN saturé). (c) Spectre d'émission de fluorescence de l'échantillon de AuNP-A3 dissoutes. $\lambda_{\text{EXC}} = 280 \text{ nm}$.

D.3 Discussion

Cette étude nous permet de constater que des AuNP-A3 saturées, préparées avec 100 équivalents molaires de A3, contiennent en moyenne 80 protéines A3 par AuNP. Ce résultats sont en accord avec l'estimation réalisée à travers la saturation des AuNP observées sur les gels d'électrophorèse qui est de 75 protéines/AuNP (Tableau 2 et Figure 9). En prenant l'hypothèse d'une corrélation linéaire entre le nombre d'équivalents introduits et la stœchiométrie, nous estimons, par exemple, que des AuNP préparées avec 30 équivalents molaires de A3 serait alors fonctionnalisées avec environ 24 protéines A3 par AuNP.

Dans le cas de la protéine $\alpha 2$, on ne peut pas appliquer la même méthode car la protéine ne possède qu'un seul résidu tryptophane. Toutefois, sa taille hydrodynamique étant théoriquement réduite (de par le nombre d'acides aminés qui la composent), on peut supposer que le nombre de protéines $\alpha 2$ greffées à la surface d'une particule doit être raisonnablement plus grand.

En ce qui concerne les QD, nous n'avons pas pu appliquer de méthode de dissolution des QD qui préserve la structure des protéines. À notre connaissance, seule l'utilisation de mélanges d'acides forts telles que l'eau régale permet de dissoudre efficacement les QD. Il serait tout de même intéressant de réaliser des essais de dissolution des QD en présence d'hydroxyde de sodium NaOH ou d'acide chlorhydrique HCl. D'autre part, les conclusions tirées de l'étude par électrophorèse sur gel d'agarose des QD et AuNP bioconjuguées (voir la sous-partie A), révèlent un greffage de $\alpha 2$ et A3 apparemment similaire sur ces deux types de nanoparticules sphériques (voir les valeurs de $A_{\alpha 2}$ et A_{A3} dans le Tableau 2). C'est pourquoi, faute de mieux, par la suite, nous avons considéré que, pour des tailles de particules similaires, les QD et les AuNP bioconjuguées présentent des nombres semblables de protéines par particules.

Partie III. Étude des interactions protéine—protéine après bioconjugaison

A. Introduction

Les deux protéines présentent une forte affinité l'une pour l'autre et leur complexation en solution a été étudiée en détail par l'équipe de P. Minard (I2BC, université Paris-Sud). Dans le cadre de cette thèse, il convient d'étudier l'affinité des protéines une fois greffées sur les nanoparticules car leur encre sur la surface inorganique est susceptible d'affecter considérablement leurs propriétés de reconnaissance. En particulier, l'orientation et la

concentration surfacique de la protéine sur la particule sont des paramètres clés pour la formation du complexe protéique. À ce titre, en 2015, Chen *et al.* ont publié une étude de l'activité d'une enzyme (la pyrophosphatase) en fonction de son orientation sur la surface de nanoparticules d'or et de la concentration surfacique en protéines greffées^[55]. Il est établi qu'en milieu confiné, lorsque les protéines sont fixées sur une surface ou maintenues dans un volume réduit, leur activité peut être grandement affectée par leur concentration surfacique ^[55,56]. En effet, suivant l'encombrement des protéines (*macromolecular crowding* en anglais) leur repliement tridimensionnel est affecté et leur stabilité ou encore leur capacité à fixer ou à reconnaître un partenaire moléculaire peuvent être de ce fait altérées (Figure 20)^[57,58].

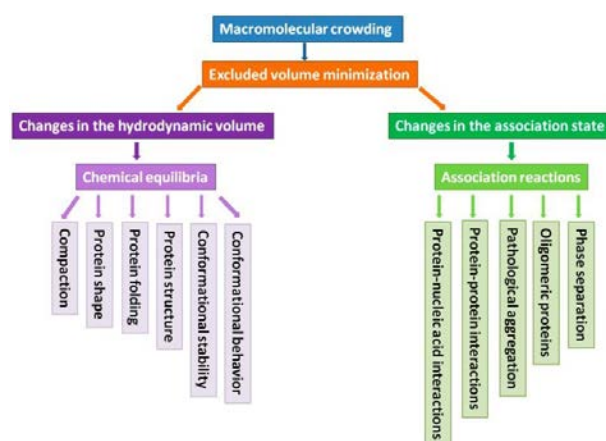


Figure 20. Représentation schématique des effets potentiels du confinement sur le comportement des protéines. Extrait de [57].

Pour ces raisons, l'étude de l'activité de $\alpha 2$ et A3 greffées sur les particules ne peut se limiter à l'étude des protéines libres. De par la spécificité des protéines greffées en terme de confinement, de contraintes et d'orientation, il est nécessaire de réaliser l'étude des interactions entre $\alpha 2$ et A3 greffées sur les nanoparticules. L'objet de cette partie est de mesurer les propriétés de reconnaissance entre les deux protéines greffées sur une surface inorganique.

Dans les domaines de la biochimie, de la biologie cellulaire et de la biologie moléculaire, de nombreuses méthodes biochimiques et biophysiques ont été mises au point pour l'étude des interactions protéine—protéine. Il est ainsi possible d'obtenir des informations quant à la stœchiométrie d'un complexe protéine—protéine^[1,59], ses constantes cinétiques d'association et de dissociation^[60,61], sa taille^[60,62] ou encore ses paramètres thermodynamiques^[63]. Parmi ces techniques, la résonance plasmon de surface (SPR pour

surface plasmon resonance en anglais) est une méthode de choix pour l'étude des interactions biomoléculaires car elle permet de mesurer en temps réel et sans marqueur les constantes cinétiques de la reconnaissance d'une protéine (appelée « ligand ») pour sa cible (appelée « analyte ») qui peut être une autre protéine. Très utilisée en biologie pour la découverte et le développement de médicaments, la toxicologie alimentaire, l'immunologie ou encore la protéomique^[64], peu de travaux concernent l'études par méthode SPR de nanoparticules bioconjuguées avec des protéines. Toutefois, les travaux de Greene *et al.*^[65] publiés en 2017, s'intéressent à l'activité de reconnaissance d'un anticorps (le trastuzumab) modifié et greffé sur des nanoparticules de polymère PLGA/PEG par chimie *click*. Dans cette étude, la SPR révèle la bonne formation des nanoparticules bioconjuguées grâce à un signal de reconnaissance spécifique. Cette technique aussi montre que la reconnaissance de l'antigène dépend de l'orientation de l'anticorps et donc de la disponibilité de son paratope^a et révèle des phénomènes d'encombrement lorsque trop d'anticorps sont greffés. D'autre part, dans les travaux de Chung *et al.*^[66], publiés en 2007, la SPR permet de caractériser l'activité d'une protéine bactérienne (la protéine G) immobilisée à la surface d'une AuNP à l'aide d'un Cystag pour reconnaître l'immunoglobuline. Ici nous cherchons à évaluer les propriétés de reconnaissance des quantum dots bioconjuguées avec les protéines α -Repeat. La méthode SPR permet d'étudier la cinétique de l'association et la dissociation des QD-protéine sur une surface d'or sur laquelle a été immobilisée la protéine complémentaire. Le principe de cette technique de caractérisation d'interactions biomoléculaires est détaillé en Annexe II.

B. Résultats

Dans le but de comprendre la nature de l'interaction $\alpha 2 \cdot A3$ après la bioconjugaison d'une des deux protéines sur une nanoparticule, deux types d'expériences de SPR ont été réalisées sur l'appareil du laboratoire de l'Institut de Biologie Paris-Seine, en collaboration avec Tahar Bouceba (Sorbonne Université, CNRS, Service de Synthèse Peptidique et d'Interactions Moléculaires). Comme schématisé en Figure 21, des mesures d'affinité sont d'abord effectuées. Elles reposent sur le principe suivant : un même analyte (ici un

^a Le paratope est la partie de l'anticorps qui assure sa fonction de reconnaissance de la partie de l'antigène appelée l'épitope.

QD-protéine ou une protéine libre) est mis en contact avec plusieurs surfaces sur lesquelles différents ligands (protéines ici) ont été préalablement immobilisés. La fixation de l'analyte (protéine ou QD-protéine) sur le ligand immobilisé sur la surface induit une modification de la fréquence de résonance plasmon liée au changement de l'indice de réfraction au voisinage de la surface. Alors un signal spécifique est observable sur le sensorgramme obtenu.

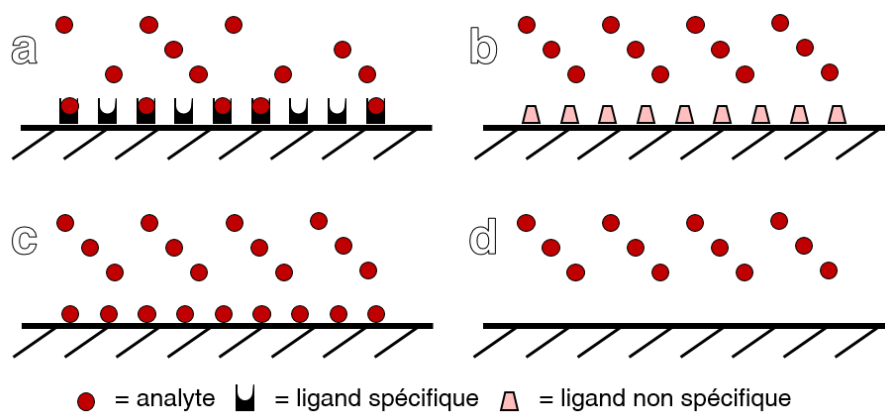


Figure 21. Représentation schématique d'une mesure d'affinité en SPR. Un même analyte est injecté sur des surfaces sur lesquelles sont immobilisés (a) son ligand spécifique, (b) un ligand non spécifique, (c) l'analyte lui-même ou (d) sur une surface nue.

D'autre part, dans un deuxième temps, des expériences de cinétique permettant a priori de mesurer les constantes cinétiques de la reconnaissance ligand—analyte sont effectuées. Pour cela, un même analyte est injecté à différentes concentrations sur une même surface. Après ajustement des cinétiques d'association et de dissociation obtenues, il est possible de déterminer k_a , k_d et la constante de dissociation à l'équilibre K_D associée moyennant une stœchiométrie 1 :1 du complexe formé. La première, k_a , est ici exprimée en $M^{-1}.s^{-1}$ et elle rend compte du temps réactionnel nécessaire pour atteindre l'équilibre de la phase d'association. À l'inverse, k_d est exprimé en s^{-1} et rend compte de la réversibilité de la liaison. Finalement, le K_D , exprimé en $mol.L^{-1}$, est couramment appelé constante d'affinité et vaut k_d/k_a . Plus cette constante est faible et plus elle traduit une interaction forte entre les deux partenaires protéiques.

B.1 Affinité entre les protéines A3 et $\alpha 2$ libres

B.1.i. Mesure d'affinité

Afin de valider l'expérience, la spécificité de l'affinité entre les protéines seules est testée dans un premier temps. À cet effet, une mesure d'affinité est réalisée par SPR dans laquelle $\alpha 2$ est injectée sur 4 surfaces différentes (Figure 22). Tandis que la surface sur laquelle la protéine A3 a été immobilisée montre un signal d'association important (40 RU) lors de l'injection de $\alpha 2$ à 2 nM, les deux surfaces fonctionnalisées avec des protéines non spécifiques (BSA et $\alpha 2$ elle-même) ne donnent aucun signal. Ce résultat indique très clairement la spécificité de l'affinité $\alpha 2 \cdot A3$. D'autre part, l'allure exponentielle de la phase d'association démontre le mécanisme d'association 1:1 entre $\alpha 2$ et A3 (c'est-à-dire $\alpha 2 + A3 = \alpha 2 \cdot A3$)^[67]. Cette observation confirme les résultats obtenus lors de la caractérisation de la paire $\alpha 2/A3$ par titration calorimétrique isotherme (ITC) à travers laquelle un coefficient de stœchiométrie expérimental valant $0,81 \pm 0,01$ a été déduit^[1].

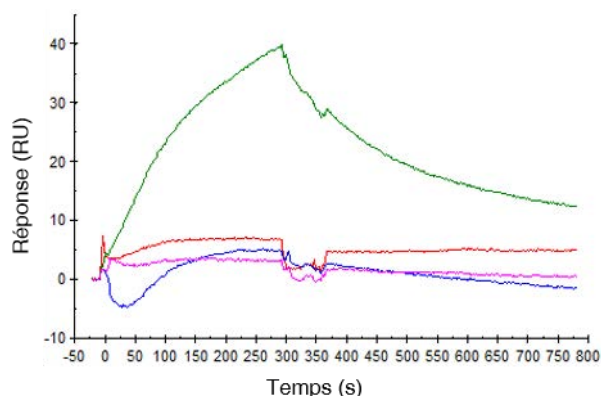


Figure 22. Sensorgrammes montrant la mesure d'affinité de $\alpha 2$ avec A3 (courbe verte), la BSA (courbe bleue), $\alpha 2$ (courbe rose) et la surface nue (courbe rouge).

B.1.ii. Cinétique de l'interaction entre protéines libres

La suite de cette étude consiste à analyser la cinétique de l'affinité entre les deux protéines libres. Pour cela, des solutions de $\alpha 2$ à différentes concentrations sont injectées sur une surface fonctionnalisée avec A3 (Figure 23). Pour la détermination de la constante d'affinité K_D caractérisant l'interaction entre ces protéines, nous nous basons sur les bases du travail réalisé par J. Prasad et S. Viollet qui s'appuie sur trois méthodes différentes^[68]. Elles sont toutes les trois basées sur un modèle d'interaction de Langmuir de type 1:1. La première

méthode consiste à utiliser le logiciel BIAevaluation qui effectue un ajustement des courbes en association et en dissociation et qui détermine une constante d'affinité $K_{D(\text{Biacore})}$. Ainsi, la mesure de cinétique effectuée avec $\alpha 2$ injectée sur la surface A3 permet de calculer une constante de dissociation à l'équilibre $K_{D(\text{Biacore})}$ qui vaut $4,4 \pm 0,9$ nM (Figure 23).

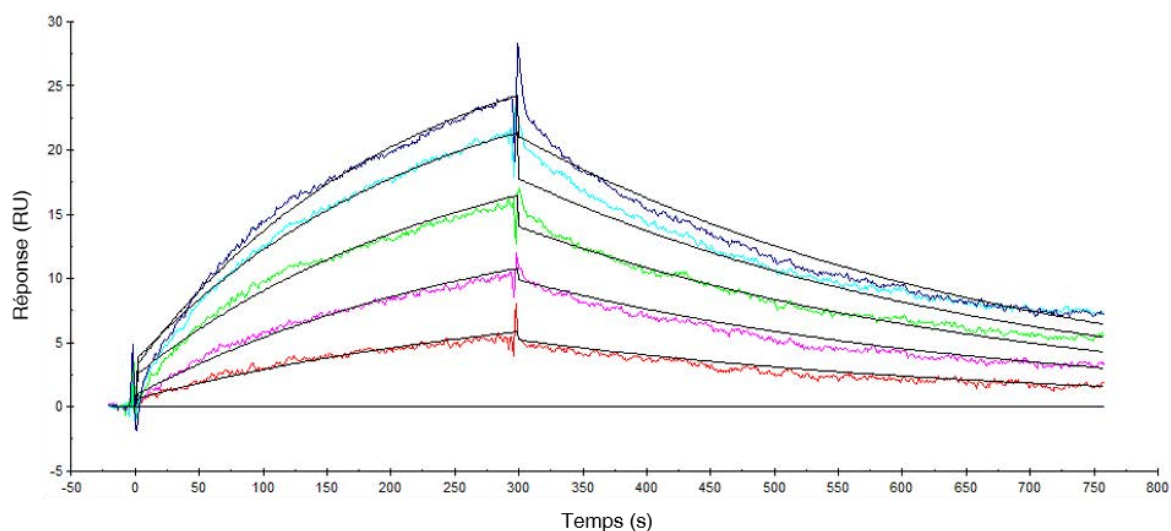


Figure 23. Analyse cinétique de l'association entre $\alpha 2$ et A3. Des solutions en protéines à différentes concentrations de $\alpha 2$ sont mises en contact avec une surface fonctionnalisée avec A3. Les concentrations en $\alpha 2$ sont (de bas en haut) 0 nM ; 0,4 nM ; 0,8 nM ; 1,2 nM ; 1,6 nM ; 2,0 nM et 2,4 nM.

La seconde méthode utilisée pour la détermination du K_D est basée sur des ajustements de courbe manuels utilisant le modèle d'association décrit par l'équation suivante (pour $0 \leq t \leq t_1$) :

$$R(t) = R_{eq}(1 - e^{-(k_a[\text{analyte}] + k_d).t}) \quad \text{Eq. 1}$$

En dissociation, le modèle utilisé est décrit par l'équation suivante (pour $t \geq t_1$) :

$$R(t) = R_\infty + (R_1 - R_\infty)e^{-k_d.(t-t_1)} \quad \text{Eq. 2}$$

R_{eq} et R_∞ définissent respectivement les valeurs asymptotiques du signal mesuré à l'équilibre des phases d'association et de dissociation. t_1 et R_1 sont le temps et le signal SPR au début de la phase de dissociation. $[\text{analyte}]$ désigne la concentration molaire de la solution d'analyte injectée sur la surface de la puce.

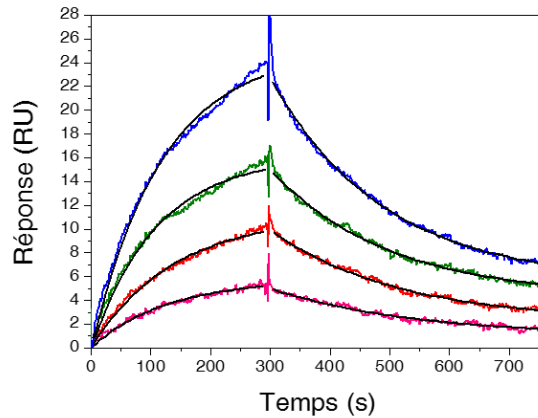


Figure 24. Ajustements de courbes effectués manuellement pour les phases d'association et de dissociation (courbes noires) de la mesure de cinétique effectuée avec des solutions de $\alpha 2$ injectées sur une surface A3. Les concentrations en $\alpha 2$ sont (de bas en haut) 0 nM ; 0,4 nM ; 0,8 nM ; 1,2 nM ; 1,6 nM et 2,4 nM.

Pour la mesure de cinétique effectuée avec $\alpha 2$ injectée sur une surface A3, des ajustements de courbes ainsi réalisés en association et en dissociation (Figure 24) permettent d'établir une seconde méthode de détermination des paramètres cinétiques. Pour la phase d'association, l'Eq. 1 nous permet de tracer une droite de type $y = ax + b$ avec $a = k_a$; $x = [\text{analyte}]$ et $b = k_d$. Le coefficient directeur de la droite ainsi tracée vaut k_a . D'autre part, le calcul de k_d est effectué à partir de la phase de dissociation à l'aide de l'Eq. 2 : à l'aide des différentes concentrations nous calculons une valeur moyenne de $1/t_1$ qui vaut k_d . La constante d'affinité est alors calculée à l'aide de $K_{D(\text{fit})} = k_d/k_a$. En appliquant cette méthode à la mesure effectuée par injection de $\alpha 2$ sur une surface A3, nous obtenons un k_d compris entre $6,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et $4,9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et un k_a de $4,3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ainsi, nous déterminons un $K_{D(\text{fit})}$ qui vaut $12,95 \pm 2,25 \text{ nM}$.

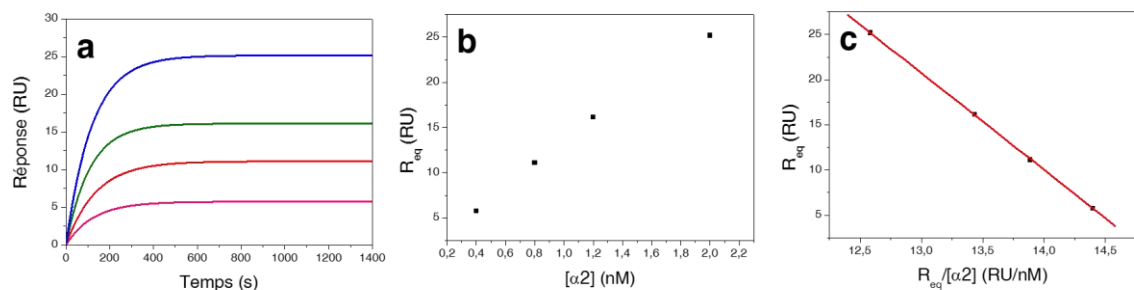


Figure 25. (a) Prolongement des ajustements de courbes opérés pour la phase d'association. (b) Relation linéaire entre R_{eq} et $[\alpha 2]$. (c) Scatchard *plot* permettant de déterminer $K_{D(\text{Scatchard})}$ à partir de la pente de la droite de régression linéaire effectuée (courbe rouge).

Finalement, la qualité des ajustements de courbes de la phase d'association nous permet de déterminer une valeur asymptotique du signal mesuré à l'équilibre des phases d'association, R_{eq} . La prolongation de ces ajustements de courbe (Figure 25a) permet de vérifier qu'elles ne se croisent pas. Ces valeurs de R_{eq} déterminées pour différentes concentrations en analyte montrent que nous nous situons dans le domaine quasi-linéaire du modèle d'isotherme de Langmuir (Figure 25b) et elles sont ensuite traitées à l'aide de la méthode de Scatchard. Cette méthode présente l'avantage d'éviter de déterminer les constantes k_d et k_a et l'on trace alors le Scatchard *plot* (Figure 25c) selon l'équation suivante :

$$R_{eq} = \frac{R_{eq}}{[analyte]} \times (-K_D) + R_{max} \quad \text{Eq. 3}$$

La linéarité du graphe obtenu valide cette approche (Figure 25c). Alors, ce graphe permet d'extraire la valeur de K_D de l'interaction étudiée directement à partir du coefficient directeur de la droite obtenue lorsque l'on trace R_{eq} en fonction de $R_{eq}/[analyte]$. Pour la mesure de cinétique effectuée avec $\alpha 2$ injectée sur une surface A3 (Figure 25c), nous déterminons une pente $K_{D(\text{Scatchard})}$ qui vaut 10,7 nM.

À partir des mesures de cinétiques effectuées en injectant $\alpha 2$ sur une surface A3, nous obtenons des valeurs expérimentales $K_{D(\text{Biacore})}$, $K_{D(\text{fit})}$ et $K_{D(\text{Scatchard})}$ déterminées par les trois méthodes présentées ici. Celles-ci sont comprises entre 4,4 nM et 12,95 nM et sont en accord avec la valeur de $K_D = 4,2 \pm 3,8$ nM déterminée par ITC pour l'interaction $\alpha 2$ –A3^[1]. D'autre part, la mesure symétrique, c'est-à-dire A3 injectée sur la surface $\alpha 2$ donne des ajustements de courbe moins satisfaisants et un $K_{D(\text{Biacore})}$ de $31 \pm 7,0$ nM (Figure 26). L'asymétrie observée dans l'interaction entre $\alpha 2$ et A3 est attribuée à l'oligomérisation possible (en particulier la dimérisation de A3) qui peut partiellement limiter la réaction par le transport de masse lors de son injection sur la surface $\alpha 2$. Pour réduire cette limitation, des mesures complémentaires pourraient être envisagées avec une faible concentration surfacique de protéines $\alpha 2$ immobilisées^[69] qui reste cependant difficile à contrôler.

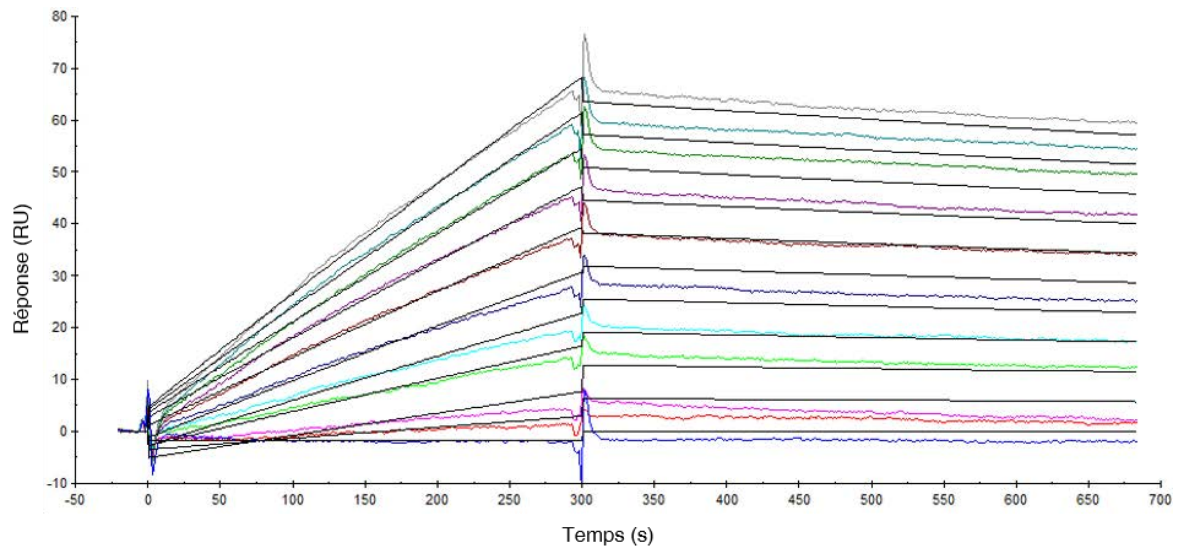


Figure 26. Analyse cinétique de l'association entre $\alpha 2$ et A3. Des solutions en protéines à différentes concentrations de A3 sont mises en contact avec une surface fonctionnalisée avec $\alpha 2$. Les concentrations en A3 sont (de bas en haut) 0 nM ; 0,5 nM ; 1,0 nM ; 1,5 nM ; 2,0 nM ; 2,5 nM ; 3,0 nM ; 3,5 nM ; 4,0 nM ; 4,5 nM et 5,0 nM.

B.2 Nanoparticules bioconjuguées

Passant désormais à l'étude des interactions entre $\alpha 2$ et A3 après le greffage d'une des deux protéines sur des nanoparticules, l'idée est de vérifier la conservation de l'activité des protéines greffées et d'évaluer l'influence de la stoechiométrie sur cette interaction. Pour ces travaux, des QD synthétisés au laboratoire et présentant une émission de fluorescence centrée sur 559 nm et un diamètre moyen de 3,3 nm sont utilisés. Après synthèse, ces QD sont fonctionnalisés et bioconjugués selon les méthodes déjà présentées.

B.2.i. Conservation de l'affinité

Des premières mesures permettent de vérifier si l'affinité spécifique entre $\alpha 2$ et A3 est conservée après le greffage d'une des deux protéines sur la surface d'une NP. Pour ce faire, des mesures d'affinité sont effectuées en injectant des QD-protéine sur la surface de la puce fonctionnalisée avec son partenaire protéique. Nous réalisons ces mesures avec des QD-protéine préparés par incubation des QD-peptide avec un nombre d'équivalents molaires variable de protéines. Différentes stoechiométries protéine/QD utilisées sont utilisées afin d'obtenir des QD dont la surface est saturée (QD- $\alpha 2_{(40)}$ et QD-A3₍₈₎) ou non (QD- $\alpha 2_{(4)}$) par la protéine. Le choix de ces stoechiométries a été déterminé par les résultats obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose dans le cas des QD.

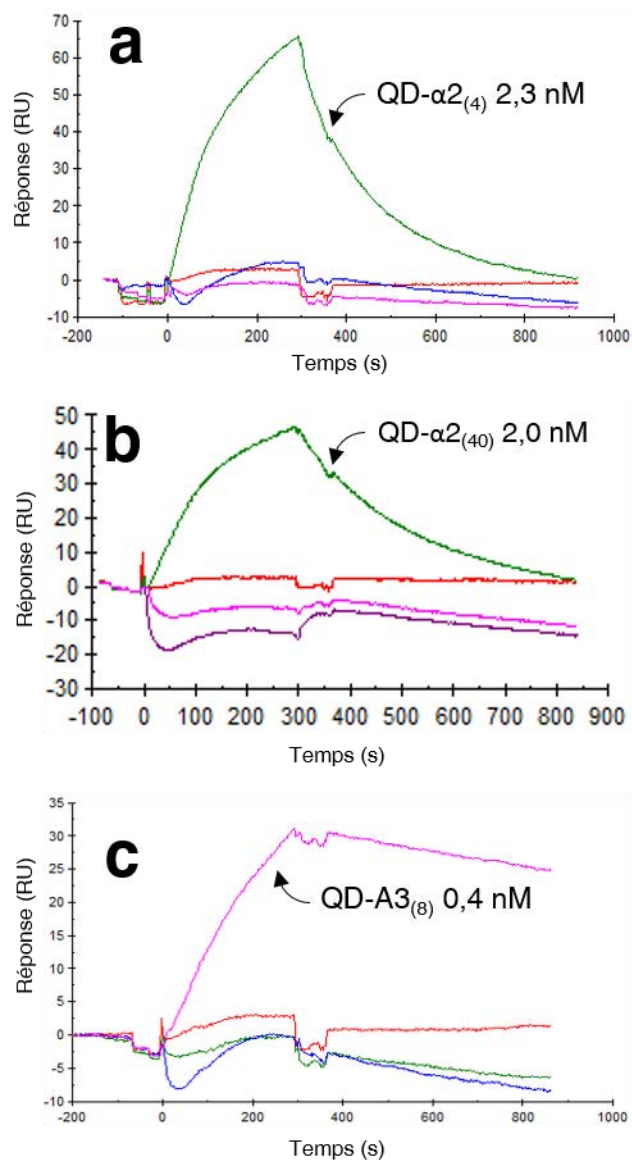


Figure 27. Mesures d'affinité de (a) QD- $\alpha 2_{(4)}$ non saturés, (b) de QD- $\alpha 2_{(40)}$ saturés et (c) de QD-A3 $_{(8)}$ saturés. La courbe correspondant à l'interaction spécifique $\alpha 2 \cdot A3$ est indiquée tandis que les autres courbes correspondent aux surfaces non spécifiques (BSA, surface nue et la même protéine que celle greffée sur les QD).

Les QD- $\alpha 2$ et QD-A3 ainsi obtenus sont injectés durant la mesure SPR afin de mettre en évidence leur affinité avec leur partenaire protéique (Figure 27). L'injection des QD- $\alpha 2$ sur la surface complémentaire A3 (Figure 27a et b) induit une phase d'association intense. Lorsque les solutions de QD- $\alpha 2$ sont remplacées par du tampon, la décroissance du signal mesuré indique une phase de dissociation durant laquelle les QD- $\alpha 2$ greffés sur la surface A3 en sont dissociés jusqu'à ce que le système atteigne un nouvel état d'équilibre. Cette observation est similaire à celle obtenue pour la protéine libre (Figure 22). De plus, l'absence de signal lorsque les particules sont mises en contact avec les différentes surfaces

non spécifiques confirme bien la formation de complexes QD- $\alpha 2$ •A3. L'allure de la courbe qui semble être de type mono-exponentielle est en accord avec un modèle d'absorption/désorption correspondant à un complexe 1:1. Pour des QD saturés ou non en protéines $\alpha 2$, ces résultats indiquent la conservation de l'affinité spécifique entre $\alpha 2$ et A3. D'autre part, les mesures analogues sont réalisées de façon symétrique en immobilisant $\alpha 2$ sur la surface avec des QD-A3₍₈₎ (Figure 27c). Les courbes d'interaction obtenues sont très différentes, et correspondent à une très forte adhésion. La cinétique de la dissociation des complexes QD-A3• $\alpha 2$ observée est très lente. Cette dissymétrie dans l'interaction entre les QD-protéine et la protéine fixée sur la surface peut vraisemblablement s'expliquer par la dimérisation de la protéine A3 induisant l'agrégation partielle des QD-A3.

B.2.ii. Analyses cinétiques – effet de la stœchiométrie sur l'interaction

Après avoir mis en évidence la conservation de la spécificité de reconnaissance entre $\alpha 2$ et A3, notre étude porte maintenant sur l'évaluation de l'influence de la stœchiométrie protéine/particule sur l'affinité de reconnaissance. L'objectif est d'évaluer le rôle de la concentration surfacique en protéines greffées sur la constante d'affinité K_D , paramètre qui peut être déterminant lors de l'auto-assemblage des nanoparticules. Comme pour les protéines libres, nous utilisons ici trois méthodes différentes pour la détermination du K_D .

Pour cette étude, nous réalisons des mesures de cinétique par méthode SPR en utilisant des QD- $\alpha 2$ à la surface saturée (QD- $\alpha 2_{(40)}$) ou non (QD- $\alpha 2_{(4)}$) en protéines $\alpha 2$ qui sont injectées à différentes concentrations sur une surface fonctionnalisée avec A3.

Nanoparticules non saturées en protéines :

Des premières mesures de cinétique sont réalisées avec différentes concentrations de QD- $\alpha 2_{(4)}$. Une première estimation du K_D est obtenue à l'aide du logiciel BIAevaluation qui après ajustement des courbes (Figure 28a) calcule un $K_{D(\text{Biacore})}$ qui vaut $3,55 \pm 1,2$ nM.

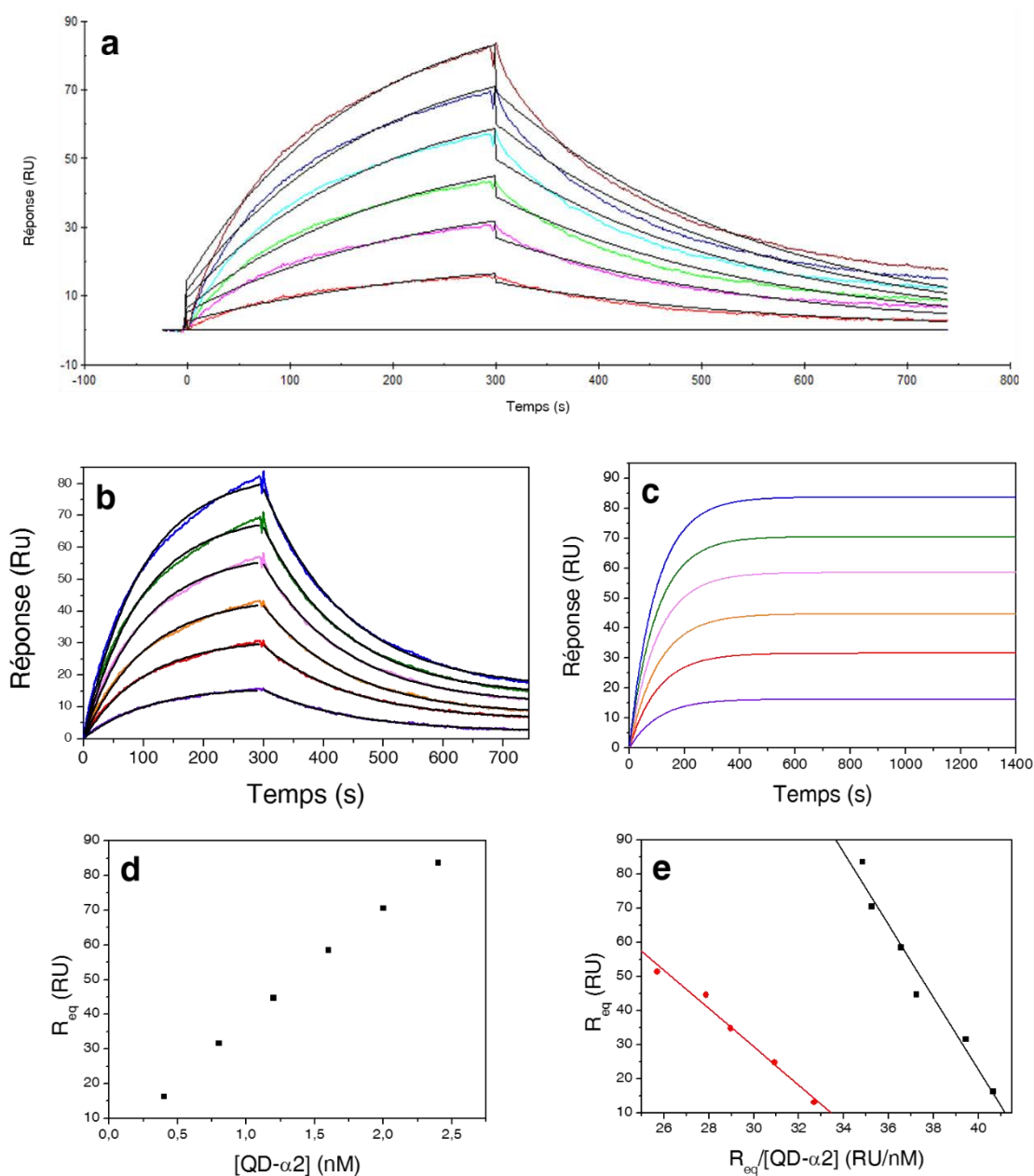


Figure 28. (a) Analyse cinétique de l'association entre des QD- $\alpha 2_{(4)}$ non saturés et A3. Les concentrations en QD- $\alpha 2_{(4)}$ sont (de bas en haut) 0 nM ; 0,4 nM ; 0,8 nM ; 1,2 nM ; 1,6 nM ; 2,0 nM and 2,4 nM. (b) Ajustements de courbes effectués manuellement pour les phases d'association et de dissociation (courbes noires) pour l'association entre des QD- $\alpha 2_{(4)}$ non saturés et A3. (c) Prolongement des ajustements de courbes opérés pour la phase d'association. (d) Relation linéaire en R_{eq} et $[QD-\alpha 2_{(4)}]$. (e) Scatchard *plot* de deux mesures, permettant de déterminer deux valeurs de K_D à partir de la pente des droites de régression linéaire rouges et noires.

En complément, la seconde méthode de détermination du K_D est effectuée à travers l'ajustement manuel des courbes pour les phases d'association et de dissociation (Figure

28b). Nous calculons alors un k_d de $6,72 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ et un k_a de $1,16 \cdot 10^6 \pm 0,14 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Ainsi nous déterminons un $K_D(\text{fit})$ qui vaut $5,95 \pm 1,0 \text{ nM}$.

Finalement, la méthode de Scatchard est utilisée pour obtenir une troisième approximation du K_D de l'interaction entre les QD- $\alpha 2$ non saturés et A3. Les ajustements de courbes manuels de la phase d'association ne se croisent pas (Figure 28c) et permettent de déterminer le R_{eq} aux différentes concentrations en QD- $\alpha 2_{(4)}$. Ces valeurs montrent que nous nous situons à nouveau dans le domaine-quasi linéaire du modèle d'isotherme de Langmuir (Figure 28d) et les différents R_{eq} nous permettent de tracer le Scatchard *plot* pour deux séries de mesures (Figure 28e). La linéarité du Scatchard *plot* obtenu confirme l'hypothèse des sites d'interactions équivalents et indépendants. Les deux séries de mesures indique un $K_D(\text{Scatchard})$ moyen valant $8,1 \pm 2,5 \text{ nM}$.

Dans le cas des QD- $\alpha 2_{(4)}$, les valeur de K_D obtenues par les trois méthodes sont très proches de celles des protéines libres (comprises entre 4,4 nM et 12,95 nM) et celle déterminée par ITC^[1]. Tout se passe comme si chaque particule agissait comme une seule protéine $\alpha 2$ active. Ceci est compatible avec l'hypothèse de très peu de protéines greffées par particule. Cette hypothèse est confortée par la faible différence de migration entre des QD-C3E6D et des QD- $\alpha 2_{(4)}$ dans les gels d'électrophorèse (Figure 8).

Nanoparticules saturées en protéines :

Selon la même méthodologie, nous cherchons à étudier le K_D caractérisant l'interaction entre des NP- $\alpha 2$ dont la surface est saturée par les protéines (QD- $\alpha 2_{(40)}$) et A3. Après avoir effectué les mesures de cinétique avec des solutions de QD- $\alpha 2_{(40)}$ à différentes concentrations (Figure 29a), nous obtenons la valeur de K_D obtenue par l'ajustement des courbes opéré par le logiciel BIAevaluation. Pour les QD- $\alpha 2_{(40)}$, cette méthode indique une $K_D(\text{Biacore})$ qui vaut $100 \pm 10 \text{ nM}$, beaucoup plus grand que celui mesuré avec les QD- $\alpha 2_{(4)}$ non saturés (voir ci-dessus). Cherchant à utiliser les deux autres méthodes de détermination du K_D fonctionnant à l'aide des ajustements de courbes manuels, nous faisons face à des difficultés. Tout d'abord, la méthode reposant sur l'extraction du k_a et du k_d pose problème malgré des ajustement de courbe manuels satisfaisants pour les phases d'association et de dissociation (Figure 29b). Nous obtenons notamment un k_a négatif.

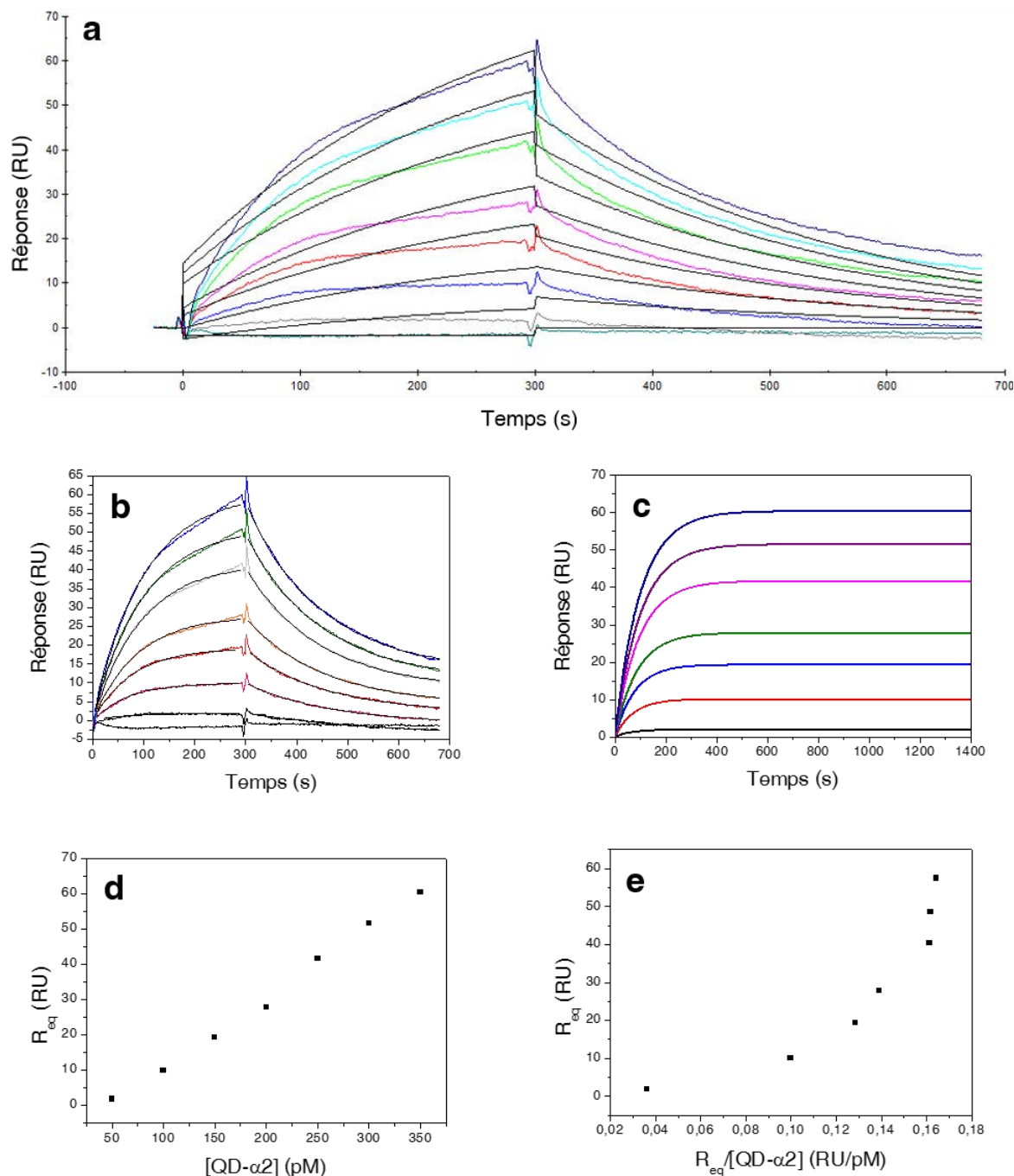


Figure 29. (a) Analyse cinétique de l'association entre des QD- $\alpha 2_{(40)}$ saturés et A3. Les concentrations en QD- $\alpha 2_{(40)}$ sont (de bas en haut) 0 nM ; 50 pM ; 100 pM ; 150 pM ; 200 pM ; 250 pM ; 300 pM et 350 pM. (b) Ajustements de courbes effectués manuellement pour les phases d'association et de dissociation (courbes noires) pour l'association entre des QD- $\alpha 2_{(40)}$ saturés et A3. (c) Prolongement des ajustements de courbes opérés pour la phase d'association. (d) Relation linéaire en R_{eq} et $[QD-\alpha 2_{(4)}]$. (e) Scatchard *plot* non linéaire et à pente positive ne permettant pas de déterminer le K_D .

Finalement, la méthode de Scatchard est elle aussi utilisée pour la détermination d'un K_D qui viendrait compléter la mesure de K_D effectuée par l'appareil de SPR utilisé. Malgré les ajustements de courbes satisfaisants (Figure 29c) et la corrélation linéaire entre les R_{eq} et

la concentration en QD- $\alpha 2_{(40)}$ (Figure 29d), le Scatchard *plot* obtenu n'est pas linéaire et la courbe observée est de tendance croissante (Figure 29e). La non linéarité d'un Scatchard *plot* est caractéristique d'interactions ligand—récepteur complexes^[70]. La coopérativité est souvent citée pour expliquer ces phénomènes inhabituels^[71–73]. Par exemple, pour une protéine avec plusieurs sites de fixation, un Scatchard *plot* courbé vers le haut indique une coopération négative pour la fixation du ligand (les sites de fixation sont identiques, mais la fixation sur un site diminue l'affinité des autres sites)^[74]. En plus des interactions ligand—protéine, ces complications peuvent aussi s'expliquer par des interactions protéine—protéine^[75]. Cette hypothèse a du sens puisqu'il s'agit ici de l'interaction QD- $\alpha 2$ •A3 avec des QD- $\alpha 2$ saturés. Le confinement des protéines saturant la surface peut expliquer cette complexité dans l'interaction. Il est également évoqué qu'une certaine instabilité du ligand peut mener à des pentes positives sur au moins une partie du Scatchard *plot*^[76]. Par ailleurs, les concentrations en QD- $\alpha 2$ avec lesquelles ces mesures sont réalisées (entre 50 et 350 pM) sont particulièrement faibles, ce qui peut empêcher le système d'atteindre l'équilibre pour la phase de dissociation. Enfin, il a été rapporté que certains systèmes de protéines voient leurs constantes d'affinité varier avec la concentration en ligands. Ces systèmes montrent des Scatchard *plots* avec un maximum créé par l'évolution d'une pente positive dans un premier domaine de concentration vers une pente négative pour des concentrations plus grande^[77].

C. Conclusion partielle

Notre étude de l'interaction protéine—protéine dans le cas des protéines libres ou des protéines greffées nous a permis de mettre en évidence de façon qualitative la conservation de l'affinité spécifique entre $\alpha 2$ et A3 après leur greffage sur des NP. D'un point de vue quantitatif, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence de la saturation ou non des NP sur la cinétique de l'affinité entre $\alpha 2$ et A3. Les résultats obtenus sont compilés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Constantes d'affinité déduites de mesures de cinétique réalisées avec les QD- $\alpha 2$ saturés, non saturés et avec $\alpha 2$ libre.

Interaction	$K_D(\text{Biacore})$ (nM)	$K_D(\text{fit})$ (nM)	$K_D(\text{Scatchard})$ (nM)	$K_D(\text{ITC})$ (nM)
QD- $\alpha 2_{(4)}$ + A3	$3,55 \pm 1,2$	$5,95 \pm 1,0$	$8,1 \pm 2,25$	non calculé
QD- $\alpha 2_{(40)}$ + A3	100 ± 10	non calculé	non calculé	non calculé
$\alpha 2$ + A3	$4,4 \pm 0,9$	$12,95 \pm 2,25$	10,7	$4,2 \pm 3,8^{[1]}$

Tandis que la valeur de K_D obtenue pour les QD- $\alpha 2_{(4)}$ est en accord avec celle obtenue avec la protéine $\alpha 2$ libre et celle déterminée par ITC^[1], la constante d'affinité des QD- $\alpha 2_{(40)}$ saturés pour A3 mesurée par l'appareil Biacore est nettement supérieure. Pour tirer des conclusions plus précises sur la nature du phénomène observé avec ces QD saturés en protéine, il paraît nécessaire d'effectuer des mesures complémentaires avec des concentrations plus importantes en QD. Ces mesures permettraient à la fois d'atteindre plus facilement l'équilibre de la phase d'association et de peut-être réduire l'influence d'éventuels phénomènes de coopération positive ou négative dans la reconnaissance de A3 par les QD- $\alpha 2$.

Conclusion

Cherchant à mener l'étude approfondie de la bioconjugaison entre les nanoparticules (semi-conductrices et métalliques) et les protéines α -Repeat ($\alpha 2$ et A3) ce chapitre a été l'occasion d'obtenir de nombreuses informations sur, d'une part, l'état des nanoparticules (taille hydrodynamique, charge et propriétés optiques) et, d'autre part, l'interaction entre protéines après leur greffage.

Si la stratégie de bioconjugaison présentée ici est, d'un point de vue conceptuel, assez simple, sa mise au point a été le fruit d'un long travail pour trouver la bonne préparation des protéines et les conditions optimales de greffage. Toutefois, l'ensemble des techniques de caractérisation permettent de mettre en évidence la bioconjugaison effective des nanoparticules. Plus spécifiquement, l'électrophorèse sur gel d'agarose et la mesure du potentiel zêta montrent qu'il est possible de former des nanoparticules avec les protéines α -Repeat et présentant différents degrés de saturation. L'utilisation de différentes quantités de protéines lors du greffage permet d'obtenir des nanoparticules aux états de surface intermédiaires, entre surface sans protéines et surface saturée. Il a également pu être observé, à travers les études réalisées par électrophorèse et mesure du potentiel zêta que les nanoparticules bioconjuguées avec les plus grandes quantités de protéines présentent une moins bonne stabilité.

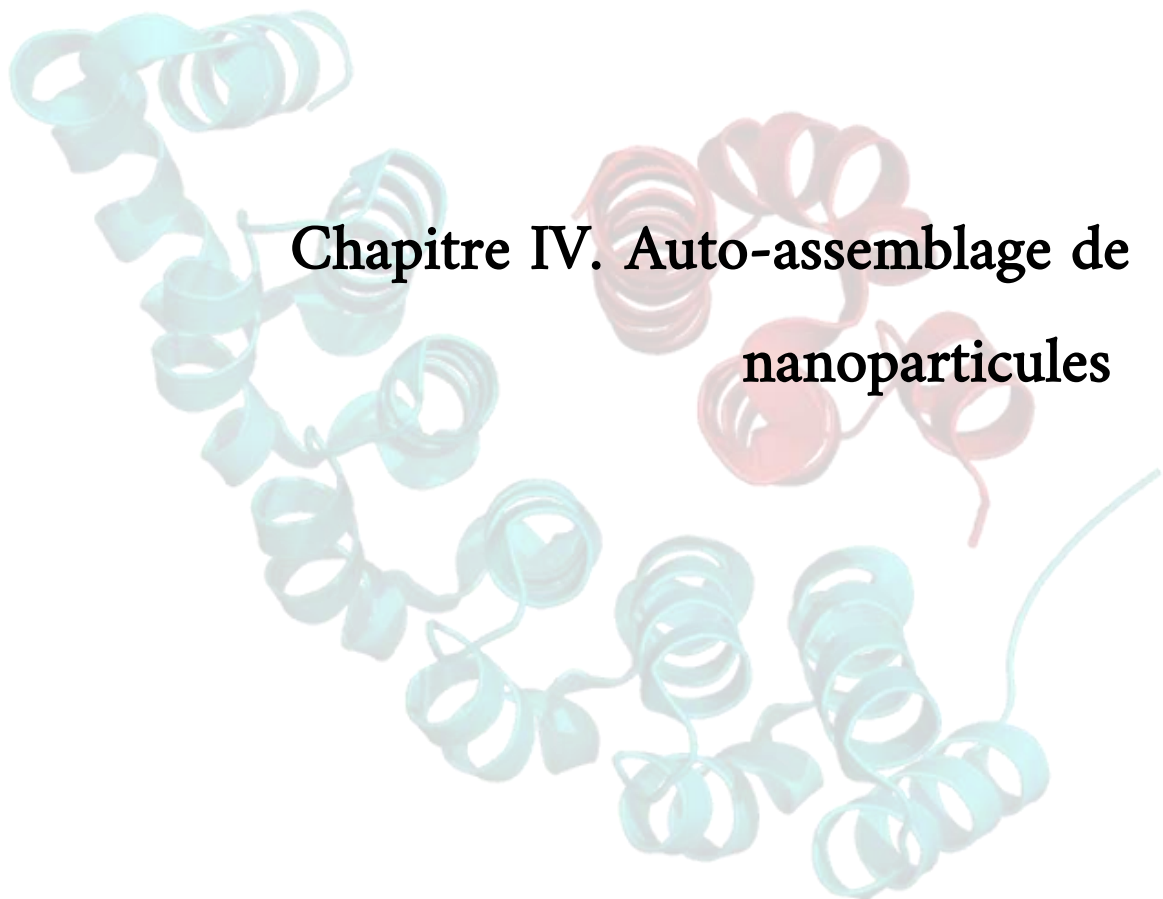
Finalement, l'étude menée par méthode SPR cherchant à caractériser les interactions entre $\alpha 2$ et A3 a permis de démontrer la conservation de l'affinité entre les deux protéines après leur immobilisation sur les nanoparticules. Cette étude des interactions biomoléculaires a également montré que la concentration surfacique en protéines immobilisées exerce une influence certaine sur l'affinité entre $\alpha 2$ et A3. Ces données sont des informations cruciales pour l'élaboration des nanostructures auto-assemblées.

Références

- [1] K. L. Gurunatha, A. C. Fournier, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, V. Marchi, P. Minard, E. Dujardin, *ACS Nano* **2016**, *10*, 3176–3185.
- [2] A. Urvoas, A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, M. Graille, D. Durand, D. C. Desravines, H. van Tilbeurgh, M. Desmadril, P. Minard, *Journal of Molecular Biology* **2010**, *404*, 307–327.
- [3] A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, A. Urvoas, A. Chevrel, M. Graille, Z. Fourati-Kammoun, M. Desmadril, H. van Tilbeurgh, P. Minard, *PLoS ONE* **2013**, *8*, 71512.
- [4] M. A. Andrade, C. Petosa, S. I. O'Donoghue, C. W. Müller, P. Bork, *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1–18.
- [5] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, 235–242.
- [6] G. Kargal Laxminarayana, *Approches Colloïdale et Bio-Inspirée En Nanoplasmonique*, thesis, Toulouse **3**, **2012**.
- [7] C. Léger, T. D. Meo, M. Aumont-Nicaise, C. Velours, D. Durand, I. L. de la Sierra-Gallay, H. van Tilbeurgh, N. Hildebrandt, M. Desmadril, A. Urvoas, et al., *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1178.
- [8] M. Pereira, E. P. Lai, *Journal of Nanobiotechnology* **2008**, *6*, 10.
- [9] A. Dif, F. Boulmedais, M. Pinot, V. Roullier, M. Baudy-Floc'h, F. M. Coquelle, S. Clarke, P. Neveu, F. Vignaux, R. L. Borgne, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14738–14746.
- [10] A. Dif, E. Henry, F. Artzner, M. Baudy-Floc'h, M. Schmutz, M. Dahan, V. Marchi-Artzner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8289–8296.
- [11] T. Bizien, P. Even-Hernandez, M. Postic, E. Mazari, S. Chevance, A. Bondon, C. Hamon, D. Troadec, L. Largeau, C. Dupuis, et al., *Small* **2014**, *10*, 3707–3716.
- [12] E. Hochuli, W. Bannwarth, H. Döbeli, R. Gentz, D. Stüber, *Bio/Technology* **1988**, *6*, 1321–1325.
- [13] A. Dif, F. Boulmedais, M. Pinot, V. Roullier, M. Baudy-Floc'h, F. M. Coquelle, S. Clarke, P. Neveu, F. Vignaux, R. L. Borgne, et al., *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 14738–14746.
- [14] I. L. Medintz, A. R. Clapp, H. Mattoussi, E. R. Goldman, B. Fisher, J. M. Mauro, *Nature Materials* **2003**, *2*, 630–638.
- [15] E. R. Goldman, I. L. Medintz, A. Hayhurst, G. P. Anderson, J. M. Mauro, B. L. Iverson, G. Georgiou, H. Mattoussi, *Analytica Chimica Acta* **2005**, *534*, 63–67.
- [16] K. E. Sapsford, T. Pons, I. L. Medintz, S. Higashiya, F. M. Brunel, P. E. Dawson, H. Mattoussi, *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 11528–11538.
- [17] W. Bae, R. K. Mehra, *Journal of Inorganic Biochemistry* **1998**, *70*, 125–135.
- [18] S.-W. Lee, C. Mao, C. E. Flynn, A. M. Belcher, *Science* **2002**, *296*, 892–895.
- [19] F. Pinaud, D. King, H.-P. Moore, S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 6115–6123.
- [20] H. Mattoussi, J. M. Mauro, E. R. Goldman, G. P. Anderson, V. C. Sundar, F. V. Mikulec, M. G. Bawendi, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142–12150.
- [21] A. R. Clapp, I. L. Medintz, H. T. Uyeda, B. R. Fisher, E. R. Goldman, M. G. Bawendi, H. Mattoussi, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 18212–18221.
- [22] E. Layne, in *Methods in Enzymology*, Academic Press, **1957**, pp. 447–454.

- [23] D. G. Mullen, A. M. Desai, J. N. Waddell, X. Cheng, C. V. Kelly, D. Q. McNerny, I. J. Majoros, J. R. Baker, L. M. Sander, B. G. Orr, et al., *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1748–1752.
- [24] S. K. R. Williams, J. R. Runyon, A. A. Ashames, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 634–642.
- [25] N. Surugau, P. L. Urban, *Journal of Separation Science* **2009**, *32*, 1889–1906.
- [26] J. A. Jamison, K. M. Krueger, J. T. Mayo, C. T. Yavuz, J. J. Redden, V. L. Colvin, *Nanotechnology* **2009**, *20*, 355702.
- [27] E. M. Southern, *Journal of Molecular Biology* **1975**, *98*, 503–517.
- [28] H. Lehrach, D. Diamond, J. M. Wozney, H. Boedtker, *Biochemistry* **1977**, *16*, 4743–4751.
- [29] K. Weber, M. Osborn, *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 4406–4412.
- [30] T. Pellegrino, R. A. Sperling, A. P. Alivisatos, W. J. Parak, *BioMed Research International* **2007**, *2007*.
- [31] S. Park, K. Hamad-Schifferli, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 7611–7616.
- [32] L. Berti, P. S. D'Agostino, K. Boeneman, I. L. Medintz, *Nano Res.* **2009**, *2*, 121–129.
- [33] W. Bücking, S. Massadeh, A. Merkulov, S. Xu, T. Nann, *Anal Bioanal Chem* **2010**, *396*, 1087–1094.
- [34] M. Howarth, W. Liu, S. Puthenveetil, Y. Zheng, L. F. Marshall, M. M. Schmidt, K. D. Wittrup, M. G. Bawendi, A. Y. Ting, *Nature Methods* **2008**, *5*, 397–399.
- [35] T. Pons, H. T. Uyeda, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 20308–20316.
- [36] M. Hanauer, S. Pierrat, I. Zins, A. Lotz, C. Sönnichsen, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2881–2885.
- [37] C.-A. J. Lin, T.-Y. Yang, C.-H. Lee, S. H. Huang, R. A. Sperling, M. Zanella, J. K. Li, J.-L. Shen, H.-H. Wang, H.-I. Yeh, et al., *ACS Nano* **2009**, *3*, 395–401.
- [38] K. E. Sapsford, T. Pons, I. L. Medintz, H. Mattoussi, *Sensors* **2006**, *6*, 925–953.
- [39] F. Aldeek, M. Safi, N. Zhan, G. Palui, H. Mattoussi, *ACS Nano* **2013**, *7*, 10197–10210.
- [40] H. S. Mansur, A. A. P. Mansur, E. Curti, M. V. De Almeida, *Carbohydrate Polymers* **2012**, *90*, 189–196.
- [41] X. He, L. Gao, N. Ma, *Scientific Reports* **2013**, *3*, 2825.
- [42] M. Noh, T. Kim, H. Lee, C.-K. Kim, S.-W. Joo, K. Lee, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, *359*, 39–44.
- [43] C. Hamon, M. Postic, E. Mazari, T. Bizien, C. Dupuis, P. Even-Hernandez, A. Jimenez, L. Courbin, C. Gosse, F. Artzner, et al., *ACS Nano* **2012**, *6*, 4137–4146.
- [44] C. Hamon, T. Bizien, F. Artzner, P. Even-Hernandez, V. Marchi, *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *424*, 90–97.
- [45] R. G. Rayavarapu, W. Petersen, C. Ungureanu, J. N. Post, T. G. van Leeuwen, S. Manohar, “Synthesis and Bioconjugation of Gold Nanoparticles as Potential Molecular Probes for Light-Based Imaging Techniques,” DOI 10.1155/2007/29817 can be found under <https://www.hindawi.com/journals/ijbi/2007/029817/abs/>, **2007**.
- [46] M. Tebbe, C. Kuttner, M. Männel, A. Fery, M. Chanana, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 5984–5991.
- [47] B. M. I. van der Zande, J. K. G. Dhont, M. R. Böhmer, A. P. Philipse, *Langmuir* **2000**, *16*, 459–464.
- [48] D. Lehner, H. Lindner, O. Glatter, *Langmuir* **2000**, *16*, 1689–1695.
- [49] K. Rege, I. L. Medintz, *Methods in Bioengineering: Nanoscale Bioengineering and Nanomedicine*, Artech House, **2009**.

- [50] K. Giri, K. Shameer, M. T. Zimmermann, S. Saha, P. K. Chakraborty, A. Sharma, R. R. Arvizo, B. J. Madden, D. J. McCormick, J.-P. A. Kocher, et al., *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 1078–1090.
- [51] S. Li, Z. Peng, R. M. Leblanc, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6455–6459.
- [52] A. B. T. Ghisaidoobe, S. J. Chung, *Int J Mol Sci* **2014**, *15*, 22518–22538.
- [53] Y. Xia, X.-M. Zhao, G. M. Whitesides, *Microelectronic Engineering* **1996**, *32*, 255–268.
- [54] Y. Xia, X.-M. Zhao, E. Kim, G. M. Whitesides, *Chem. Mater.* **1995**, *7*, 2332–2337.
- [55] F. Liu, L. Wang, H. Wang, L. Yuan, J. Li, J. L. Brash, H. Chen, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 3717–3724.
- [56] A. Küchler, M. Yoshimoto, S. Luginbühl, F. Mavelli, P. Walde, *Nature Nanotechnology* **2016**, *11*, 409–420.
- [57] I. M. Kuznetsova, K. K. Turoverov, V. N. Uversky, *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, *15*, 23090–23140.
- [58] H.-X. Zhou, *Arch Biochem Biophys* **2008**, *469*, 76–82.
- [59] M. M. Pierce, C. S. Raman, B. T. Nall, *Methods* **1999**, *19*, 213–221.
- [60] A. D. Hanlon, M. I. Larkin, R. M. Reddick, *Biophysical Journal* **2010**, *98*, 297–304.
- [61] J. A. Ream, L. K. Lewis, K. A. Lewis, *Analytical Biochemistry* **2016**, *511*, 36–41.
- [62] D. Some, S. Kenrick, *Protein Interactions* **2012**, DOI 10.5772/37240.
- [63] M. Bellucci, *Protein-Protein Interactions*, VDM Verlag Dr. Müller, **2010**.
- [64] R. Karlsson, *Journal of Molecular Recognition* **2004**, *17*, 151–161.
- [65] M. K. Greene, D. A. Richards, J. C. F. Nogueira, K. Campbell, P. Smyth, M. Fernández, C. J. Scott, V. Chudasama, *Chem. Sci.* **2017**, *9*, 79–87.
- [66] J. M. Lee, H. K. Park, Y. Jung, J. K. Kim, S. O. Jung, B. H. Chung, *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 2680–2687.
- [67] R. L. Rich, D. G. Myszka, *Journal of Molecular Recognition* **2008**, *21*, 355–400.
- [68] J. Prasad, S. Viollet, K. L. Gurunatha, A. Urvoas, A. C. Fournier, M. Valerio-Lepiniec, C. Marcelot, B. Baris, P. Minard, E. Dujardin, *Nanoscale* **2019**, DOI 10.1039/C9NR04497C.
- [69] C. Hahnefeld, S. Drewianka, F. W. Herberg, in *Molecular Diagnosis of Infectious Diseases* (Eds.: J. Decler, U. Reischl), Humana Press, Totowa, NJ, **2004**, pp. 299–320.
- [70] C. J. Bowmer, W. E. Lindup, *JPharmSci* **1978**, *67*, 1193–1195.
- [71] R. A. Cook, D. E. Koshland, *Biochemistry* **1970**, *9*, 3337–3342.
- [72] M. E. Eldefrawi, A. T. Eldefrawi, *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 3145–3150.
- [73] R. A. Henriksen, C. M. Jackson, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1975**, *170*, 149–159.
- [74] A. K. Bordbar, A. A. Saboury, A. A. Moosavi-Movahedi, *Biochemical Education* **1996**, *24*, 172–175.
- [75] L. S. Clegg, W. E. Lindup, *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **1984**, *36*, 776–779.
- [76] K. D. Wilkinson, in *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications* (Ed.: H. Fu), Humana Press, Totowa, NJ, **2004**, pp. 15–31.
- [77] L. W. Nichol, D. J. Winzor, *Biochemistry* **1976**, *15*, 3015–3019.



Chapitre IV. Auto-assemblage de nanoparticules

Table des matières

Introduction.....	187
Partie I. Principe et méthode de préparation des nanoparticules greffées avec les protéines	189
<i>A. Purification des nanoparticules bioconjuguées</i>	190
<i>B. Mise en évidence de la bioconjugaison</i>	191
<i>C. Mise en évidence de la stabilité des populations NP-α2 et NP-A3</i>	191
Partie II. Auto-assemblage de nanoparticules semi-conductrices	192
<i>A. Auto-assemblages de QR</i>	193
A.1 Auto-assemblages massif de QR.....	193
A.2 Vers le contrôle de la morphologie de l'auto-assemblage de QR.....	196
<i>B. Auto-assemblage de QD</i>	198
B.1 Influence du ratio de mélange.....	198
B.2 Influence de la stoechiométrie : vers le contrôle de la morphologie des assemblages	201
<i>C. Conclusion</i>	205
Partie III. Auto-assemblages hybrides de nanoparticules métalliques et semi-conductrices	206
<i>A. Auto-assemblages hybrides sphères—nanobâtonnets</i>	206
A.1 GNR et QD.....	206
A.1.i Propriétés optiques des particules utilisées	206
A.1.ii Morphologie des assemblages GNR—QD	208
A.2 AuNP et QR.....	211
A.2.i Propriétés optiques des particules utilisées	211
A.2.ii Cas d'une stoechiométrie protéine:nanoparticule élevée	212
A.2.iii Cas d'une stoechiométrie protéine:nanoparticule réduite	215
<i>B. Auto-assemblage hybrides sphères—sphères de AuNP et de QD</i>	218

B.1.i. Propriétés des particules utilisées.....	218
B.1.ii. Auto-assemblages hybrides massifs à partir de nanoparticules saturées en protéines.....	219
B.1.iii. Auto-assemblages hybrides oligomériques.....	221
C. Conclusion partielle sur la morphologie des assemblages.....	223
Partie IV. Analyse structurale des auto-assemblages.....	224
A. Détermination de l'interdistance moyenne QD—QD.....	224
A.1 Principe de la méthode SAXS.....	224
A.1 Auto-assemblages de QR.....	225
A.2 Méthode et résultats.....	226
A.3 Comparaison de l'interdistance observée dans les mélanges complémentaires avec le complexe formé par les protéines appariées.....	228
B. Cas des auto-assemblages hybrides QD—AuNP.....	230
Partie V. Influence de l'auto-assemblage sur les propriétés optiques.....	231
A. Couplage d'exciton entre QD auto-assemblés.....	231
B. Fluorescence de QD couplés à des nanoparticules plasmoniques.....	232
B.1 QD—GNR.....	232
B.2 QD—AuNP.....	234
Partie VI. Cas particulier de dimères de QD.....	236
A. Observations.....	236
A.1 Morphologie.....	236
A.2 Taille hydrodynamique et fluorescence.....	238
B. Discussion.....	239
B.1 Structure cristalline, morphologie des QD et ligand utilisé.....	239
B.2 Le dimère A3•A3.....	241
C. Conclusion sur la formation des dimères de QD.....	243
Partie VII. Vers des auto-assemblages orthogonaux.....	244
A. Une protéine α -Repeat bi-domaine.....	244

<i>B. bGFP sur QD.....</i>	<i>245</i>
<i>C. Assemblage orthogonal hybride AuNP—QD.....</i>	<i>246</i>
Conclusion	250
Références.....	252

Introduction

Après avoir validé l'efficacité du greffage des protéines sur les nanoparticules, ce chapitre rend compte de la mise en évidence des auto-assemblages de nanoparticules métalliques et semi conductrices dirigés par la reconnaissance de protéines α -Repeat ainsi que l'étude de leur structure et de leurs propriétés optiques.

Dans la perspective de mettre à profit les protéines α -Repeat pour le développement de nanomatériaux auto-assemblés aux propriétés optiques contrôlées, nous nous penchons sur la mise au point de deux types d'auto-assemblage. Une première construction se compose exclusivement de nanoparticules semi-conductrices de forme variée (quantum rods ou quantum dots). La seconde concerne les auto-assemblages hybrides composés des nanoparticules semi-conductrices et de nanoparticules métalliques. Nous avons aussi exploré la possibilité d'assembler des nanoparticules de formes différentes (sphères—nanobâtonnets) ou semblables (sphères—sphères) afin de moduler les couplages plasmon—exciton.

Après une brève introduction au principe expérimental de l'auto-assemblage de nanoparticules, nous présenterons l'étude de la morphologie des deux types d'architecture. Les paramètres structuraux des nanostructures seront ensuite étudiés par deux techniques complémentaires : la diffusion des rayons X aux petits angles et la microscopie électronique à transmission. Leurs propriétés optiques sont ensuite analysées par fluorimétrie. Enfin ce chapitre présente les travaux préliminaires basés sur une autre paire de protéines α -Repeat qui ouvre la voie vers la mise au point de nanostructures auto-assemblées orthogonales.

Partie I. Principe et méthode de préparation des nanoparticules greffées avec les protéines

Pour l'auto-assemblage de nanoparticules, l'interaction entre protéines α -Repeat est mise à profit en mélangeant deux suspensions de nanoparticules fonctionnalisées avec chacune des protéines du couple $\alpha 2/A3$. Ces deux suspensions, sont alors considérées comme des « populations complémentaires » car il est attendu que la mise en contact de l'une avec l'autre génère leur auto-assemblage (Figure 1). L'étude de la bioconjugaison des nanoparticules nous a permis d'obtenir des informations concernant la fonction de reconnaissance des protéines greffées et la stabilité des particules fonctionnalisées en fonction de leur taux de couverture par les protéines. Les travaux présentés dans ce chapitre ont maintenant pour objectif d'étudier d'une part l'influence de la concentration et de la stœchiométrie protéine:particule sur l'auto-assemblage et plus particulièrement sur la morphologie des structures obtenues. D'autre part, l'étude de l'influence de l'auto-assemblage sur les propriétés optiques des particules est l'occasion de s'intéresser à l'évolution de la fluorescence de QD au sein d'assemblage QD—QD ou d'autre assemblages hybrides QD—métal. Toutefois, avant d'aborder les résultats de ces travaux, les conditions expérimentales de la mise au point de ces structures méritent d'être discutées.

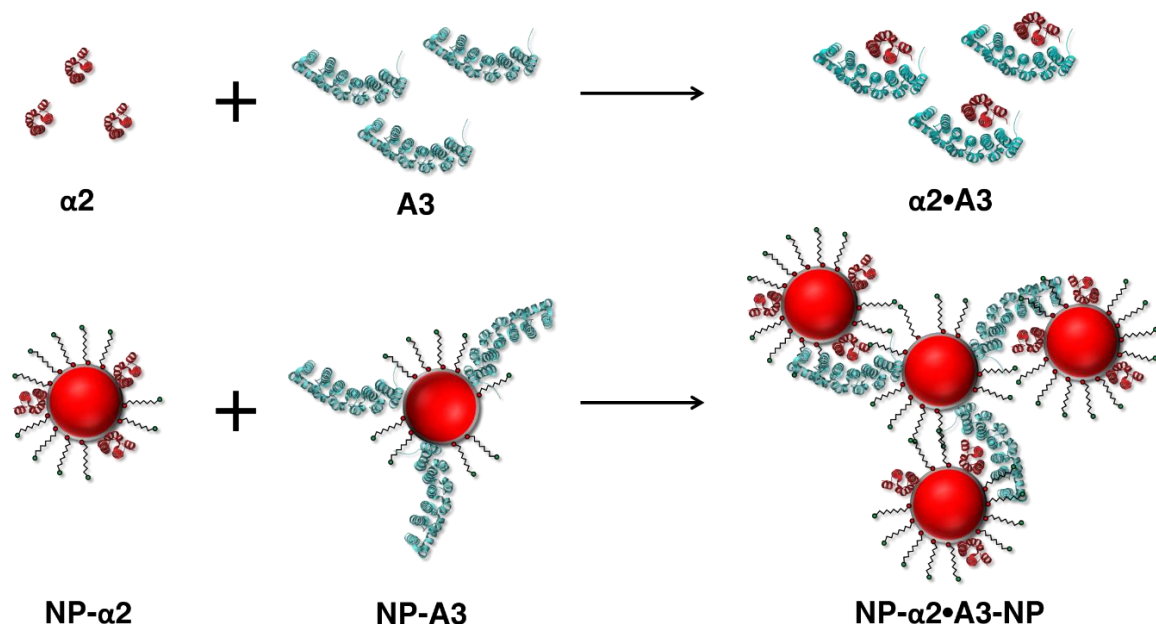


Figure 1. Synoptique décrivant le principe de l'auto-assemblage de NP induit par la reconnaissance entre $\alpha 2$ et A3.

A. Purification des nanoparticules bioconjuguées

Des nanoparticules hydrophiles stabilisées par un peptide tricystéine sont bioconjuguées avec $\alpha 2$ et A3 selon la méthode décrite dans le chapitre précédent afin d'obtenir deux populations : des NP- $\alpha 2$ et des NP-A3. Contrairement aux travaux relatifs à la caractérisation du greffage des protéines, ceux concernant l'auto-assemblage de nanoparticules nécessite une étape de purification. En effet, l'incubation des nanoparticules avec une certaine quantité de protéines induit la présence de protéines n'ayant pas réagi avec la surface des particules. Ces protéines libres en solution doivent être alors éliminées avec la plus grande efficacité possible afin d'augmenter la probabilité de reconnaissance entre deux protéines greffées sur deux particules différentes. Il s'agit ainsi, à travers cette étape de purification, de réduire la compétition qui peut avoir lieu lors du mélange des deux populations complémentaires entre des protéines libres et les protéines greffées. Pour purifier les suspensions en NP bioconjugués, la filtration centrifuge se révèle très efficace. Cette méthode de routine est réalisée dans des microtubes équipés d'un filtre (Amicon, Merck) et permet de séparer les protéines libres des particules bioconjuguées tout en les concentrant (Figure 2). Pour ce faire, le seuil de rétention (ou *molecular weight cut-off* en anglais) doit laisser passer les protéines (plus petites) et retenir les nanoparticules (plus grosses). Dans le cas des QD, un seuil de rétention de 30 kDa est suffisant pour les retenir dans leur intégralité puisque la masse molaire des QD CdSe/ZnS d'un diamètre compris entre 2,5 et 7 nm est comprise entre 50 et 700 kDa^[1]. Les protéines $\alpha 2$ et A3, elles, ne sont pas retenues à cause de leur poids moléculaire inférieur à 30 kDa (respectivement 12,3 et 22,6 kDa).

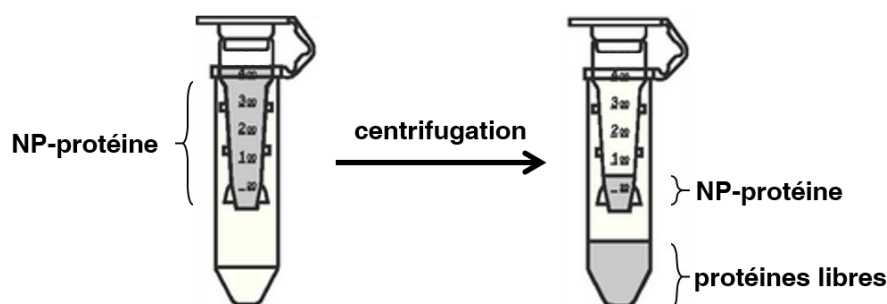


Figure 2. Synoptique du principe de la filtration centrifuge. Adapté depuis www.merckmillipore.com.

Ces étapes de purification sont l'occasion d'observer que, dans le cas des QD et des AuNP, les NP bioconjuguées avec les plus grandes quantités de protéines (au-delà de 100 équivalents molaires) présentent une stabilité médiocre. En effet, ces nanoparticules ont

tendance à précipiter sur les parois du filtre tandis que celles préparées avec des quantités de protéines inférieures restent stables et peuvent être concentrées sans problème avec un rendement de purification de l'ordre de 80 %. Des suspensions présentant des concentrations comprises entre 100 et 300 nM peuvent être ainsi obtenues dans le cas des AuNP, des QD et des QR.

B. Mise en évidence de la bioconjugaison

À la suite de l'étape de purification, la vérification de la bioconjugaison des NP avec $\alpha 2$ et A3 est effectuée. Cette vérification est réalisée en routine par électrophorèse sur gel d'agarose. Comme montré en Figure 3 à travers l'exemple de QD, les migrations électrophorétiques de QD-C3E6D, de QD- $\alpha 2$ et de QD-A3 après purification sont comparées. En accord avec les observations précédemment rapportées lors de l'étude du greffage des protéines, ces migrations électrophorétiques montrent un ralentissement des QD après leur incubation avec 100 équivalents molaires de protéines (puits b et c) qui démontrent leur fonctionnalisation. De plus, la conservation de bandes fines et bien définies est un bon critère d'évaluation de la stabilité des QD-protéine préparés.

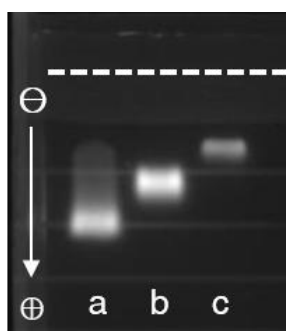


Figure 3. Photographie de fluorescence de la migration électrophorétique de (a) QD-C3E6D, (b) QD- $\alpha 2$ et (c) QD-A3 greffés avec 100 équivalents molaires de protéines. La migration est effectuée dans un gel d'agarose à 0,5 % et dans un tampon borate à pH 8,0.

C. Mise en évidence de la stabilité des populations NP- $\alpha 2$ et NP-A3

Finalement, une dernière vérification concerne la stabilité des populations de départ, à savoir les NP- $\alpha 2$ et les NP-A3. Cette dernière étape consiste à caractériser leur stabilité par microscopie électronique. Plus particulièrement, l'absence d'agrégats de nanoparticules avant le mélange des populations complémentaires sera le critère choisi pour valider la préparation des nanoparticules conjuguées aux protéines. Afin de limiter les effets de l'étape

de séchage inhérente à la préparation des échantillons pour le TEM, du papier absorbant est utilisé pour absorber la goutte d'échantillon déposée sur la grille de TEM après une courte période de mise en contact de l'ordre de 1 min. Cela permet d'éliminer la grande majorité du solvant restant sur la grille. De cette façon il est possible d'éviter des effets de séchage qui peuvent induire la formation d'agrégats de nanoparticules à travers des phénomènes tels que l'effet « rond de café »^[2,3].

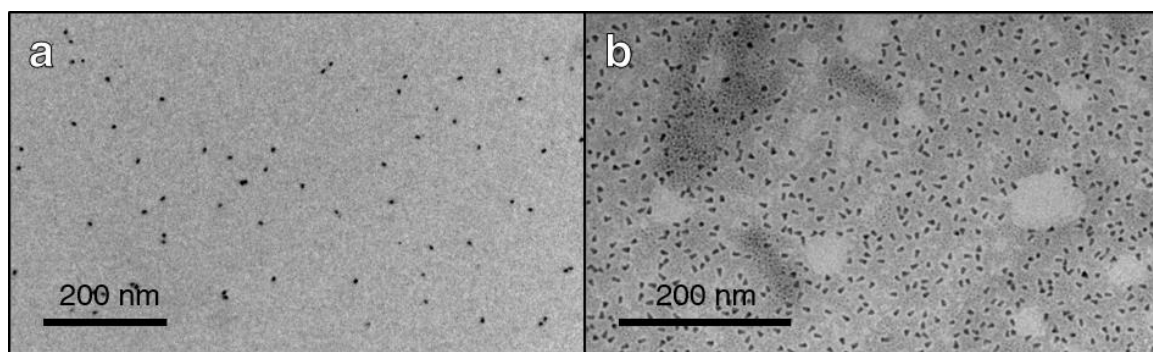


Figure 4. Images TEM de (a) QD-A3 et (b) de QD- α 2 préparés avec 100 équivalents molaires de protéines.

Dans le cas des populations de départ préparées avec 100 équivalents de protéines chacune, l'observation des QD- α 2 et des QD-A3 (par exemple) est faite par microscopie électronique en transmission (Figure 4). Les QD-A3 sont en majorité bien dispersés mais laissent apparaître de petits agrégats, qui pourraient s'expliquer par la tendance de A3 à interagir avec elle-même pour former un dimère. D'autre part, la bonne dispersion des QD- α 2 témoigne de leur bonne stabilité.

En conclusion, il apparaît, à travers l'exemple des QD montrés ici, que les QD- α 2 et les QD-A3 sont bien fonctionnalisées et stables. Ces particules peuvent être purifiées, reconcentrées et le greffage des protéines α 2 et A3 est contrôlée par électrophorèse avant leur utilisation. Ces vérifications systématiques permettent de valider les lots de NP-protéines qui sont appropriés pour la mise au point de nanostructures auto-assemblées.

Partie II. Auto-assemblage de nanoparticules semi-conductrices

Dans cette partie sont présentés les résultats sur les superstructures obtenues par auto-assemblages de QD et de QR. Elles ont été systématiquement analysées par des techniques complémentaires afin de détecter la taille des agrégats, l'interdistance entre particules et l'éventuelle organisation au sein des agrégats obtenus. Nous cherchons à moduler la morphologie des assemblages obtenus. Dans l'optique de la contrôler, nous nous sommes intéressés à l'influence de deux facteurs déterminants : le ratio de chaque population dans

le mélange (NP- $\alpha 2$ et NP-A3) et la stoechiométrie protéine/particule déterminant le nombre de protéines par particule.

A. Auto-assemblages de QR

Parmi les différentes stratégies précédemment élaborées au laboratoire^[4,5], l'assemblage de nanobâtonnets métalliques^[6] ou semi-conducteurs^[7,8] a été obtenu grâce à l'optimisation de ligands PEGylés dérivés peptidiques^[9]. Le séchage contrôlé des QR en suspension aqueuse sur des substrats décorés induit la formation de superstructures tridimensionnelles de QR ordonnées en phase smectique sur des échelles mésoscopiques (jusqu'au millimètre) avec un très bon contrôle de l'interdistance entre bâtonnets. Ici, l'idée est de mettre à profit la paire $\alpha 2/A3$ pour initier l'auto-assemblage de QR mais aussi pour imposer une interdistance déterminée par la taille du complexe de protéines. Pour ces travaux, les QR utilisés sont synthétisés au laboratoire et présentent des dimensions de $12,1 \pm 1,5$ nm sur $2,9 \pm 0,3$ nm. Ces QR sont choisis avec un rapport d'aspect modéré pour limiter les risques de défauts cristallins. Les interactions dipolaires des QR induisent une attraction latérale d'autant plus forte que le rapport d'aspect est grand. Ces interactions de van der Waals induisent la formation de phases smectiques et la formation de superstructures dans lesquelles les QR sont empilés les uns contre les autres comme dans une ceinture de cartouches.

A.1 Auto-assemblages massif de QR

À partir de QR-C5PEG4, la fonctionnalisation est effectuée à l'aide de 200 équivalents molaires de $\alpha 2$ et A3 afin de préparer les suspensions de QR- $\alpha 2$ et de QR-A3. Cette quantité de protéines est suffisante pour saturer la surface de ces bâtonnets puisque leur surface totale est d'environ 140 nm^2 par particule. Pour des QD d'un diamètre de 9 nm, 200 équivalents de $\alpha 2$ ou 100 équivalents de A3 permettent de saturer la surface de plus de 250 nm^2 de ces particules sphériques (voir la Partie II.A du Chapitre III).

Après purification de l'excès de protéines par filtration centrifuge, les suspensions de QR- $\alpha 2$ et QR-A3 sont caractérisées par TEM (Figure 5). Ces QR-protéine ne s'agrègent ni sous forme d'agrégats massifs ni en cartouche, ce qui est un bon indicateur de stabilité malgré la saturation de leur surface par les protéines. On remarque toutefois la récurrence surprenante d'un contact pointe à pointe entre deux QR.

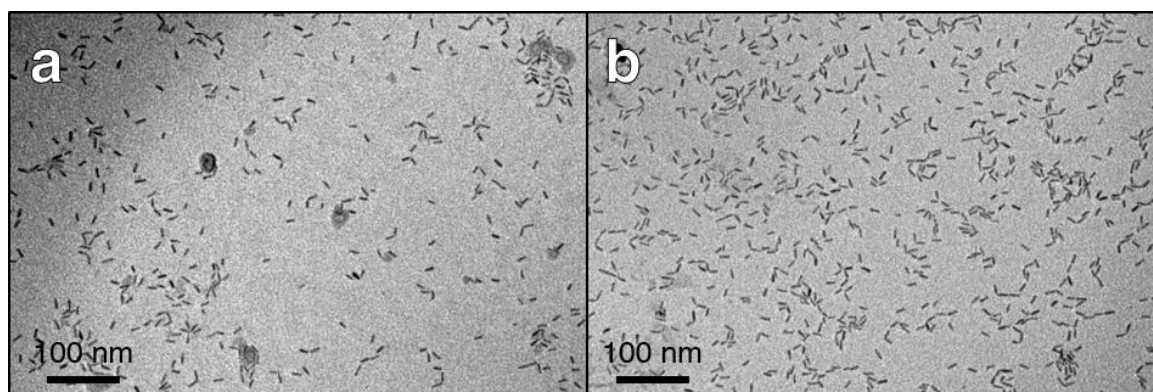


Figure 5. Images TEM de (a) QR-A3 et de (b) QR- α 2 dans du tampon NaP à pH 7,4.

Pour initier l'auto-assemblage de ces QR, la suspension de QR- α 2 est mélangée à la suspension de QR-A3 (voir le détail en partie expérimentale). Plusieurs mélanges sont réalisés en variant les concentrations relatives en QR- α 2 et QR-A3 dans le but d'étudier l'influence du ratio molaire QR-A3:QR- α 2 sur la morphologie des assemblages de QR. Après mélange des suspensions de QR- α 2 et de QR-A3, les suspensions obtenues sont incubées à 6 °C pendant au moins 24 heures. Dans le but de mettre en évidence l'auto-assemblage de QR, l'ensemble des suspensions est caractérisé par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 6).

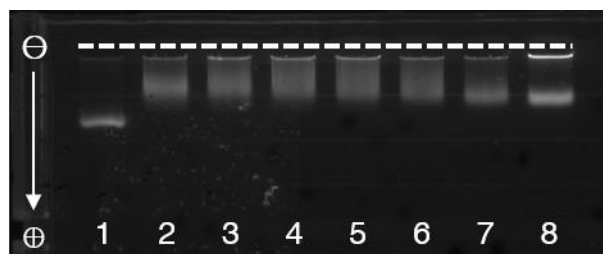


Figure 6. Photographie de fluorescence de la migration électrophorétique des mélanges de QR (Puit 1 : QR-C5PEG4 ; puit 2 : QR-A3 ; puits 3—7 : mélanges de QR avec les ratios de 5:1 à 1:5 et puit 8 : QR- α 2). La migration est effectuée pendant 20 minutes à 50 V dans un gel à 0,5 % d'agarose immergé dans du tampon borate à pH 8.

On observe qu'en présence de protéine, la migration des particules est ralentie, ce qui est cohérent avec le greffage des protéines à la surface qui change la taille et la charge de la particule. De plus, le spot fluorescent des QR-A3 purs tend à former une traînée qui témoigne de leur tendance à l'agrégation. Les spots observés pour les mélanges présentent tous une traînée plus marquée que celle des QR-A3 purs ce qui témoigne de la polydispersité des objets migrants résultants de l'association des deux types de QR. Par ailleurs la migration des mélanges évolue de façon monotone avec le ratio molaire des deux populations et entre celles des QR-A3 et des QR- α 2 purs.

Pour rendre compte de la morphologie des structures auto-assemblées, les mélanges sont caractérisés par microscopie électronique (Figure 7). Pour chaque mélange, on peut observer que les QR s'assemblent en fagots imbriqués suivant des interactions latérales et entre pointes sans ordre apparent. Ces assemblages sont de dimension très variable sans corrélation évidente avec le ratio molaire des QR- $\alpha 2$ et des QR-A3. En dehors des agrégats observés coexistent un nombre important de QR non assemblés. On peut aussi remarquer que l'assemblage initial en forme de V entre deux QD est conservé, ce qui rend compte de la conservation des interactions pointe à pointe. Les structures auto-assemblées ne laissent pas apparaître d'interdistance évidente comme cela avait été observé par séchage contrôlé de QR^[7]. Ces observations démontrent que l'association de nombreux QR liés entre eux par des complexes $\alpha 2 \cdot A3$ induit la formation d'agrégats massifs de taille non contrôlée.

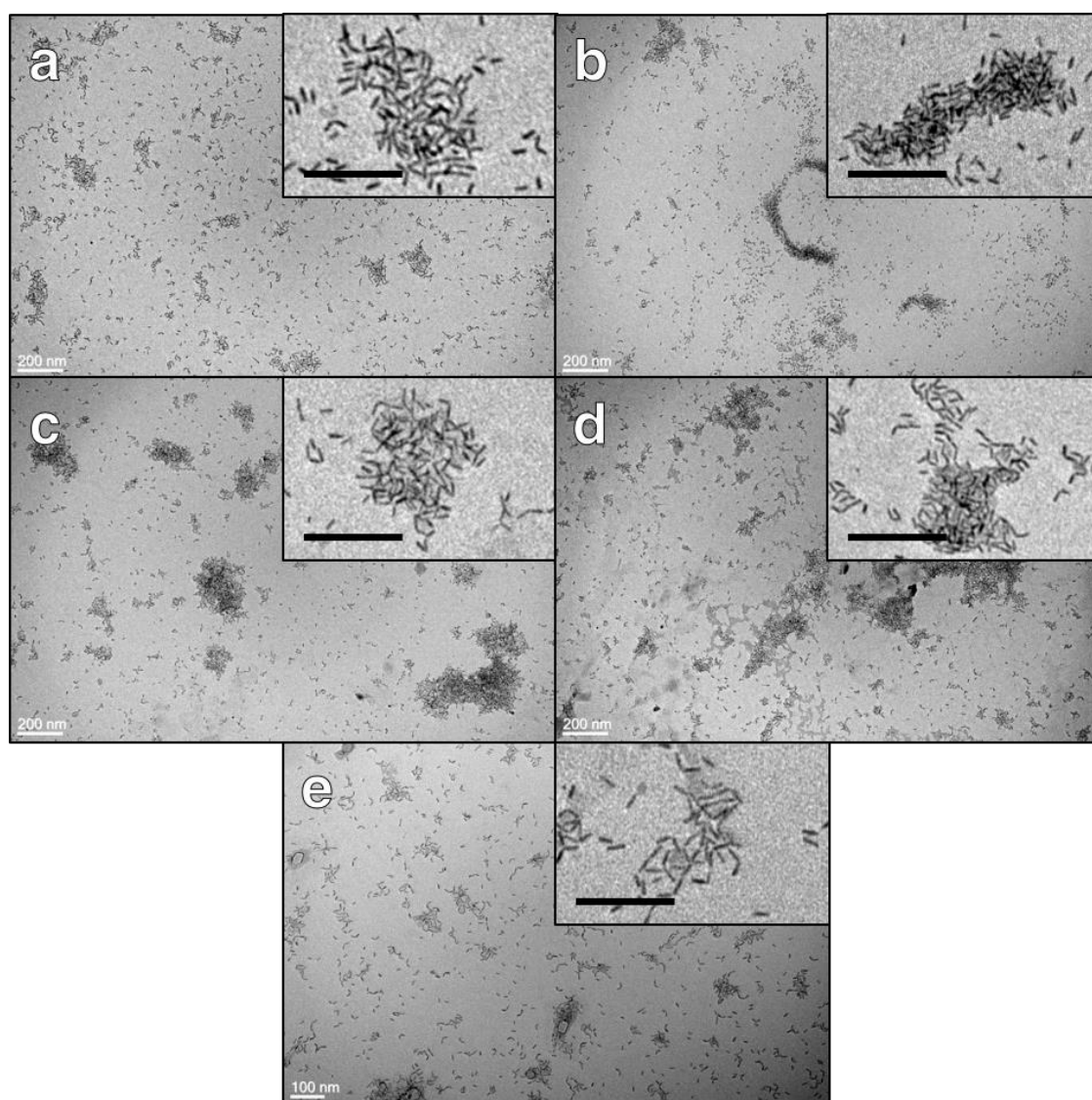


Figure 7. Images TEM des mélanges de QR dont les ratios molaires QR-A3:QR- $\alpha 2$ sont de (a) 5:1, (b) 2:1, (c) 1:1, (d) 1:2 et (e) 1:5. Les barres d'échelles noires représentent toutes 100 nm.

A.2 Vers le contrôle de la morphologie de l'auto-assemblage de QR

Dans le but de mieux contrôler l'auto-assemblage des QR, le nombre de protéines greffées à la surface de chaque type de nanobâtonnet semi-conducteur a été réduit de façon à diminuer le nombre d'ancrage possible par particule et ainsi les rendre « moins réactifs ». De cette façon, le phénomène d'auto-assemblage devrait se limiter à la formation de structures plus petites qui favorisent potentiellement une meilleure organisation des QR auto-assemblés.

Pour ces travaux, les mêmes QR-C5PEG4 sont fonctionnalisés avec 50 équivalents molaires de protéines. Après purification, les QR fonctionnalisés avec chacune des biomolécules ne présentent pas d'agrégation (Figure 8). De plus, en comparaison avec les suspensions de QR- $\alpha 2$ et de QR-A3 fonctionnalisés à saturation, ces QR montrent des interactions latérales plus fréquentes, ce qui va dans le sens d'un échange de ligands moins important. Ces QR ont tendance à s'assembler de façon assez définie via des interactions « pointe à pointe » qui dépassent les simples dimères de QR comme il peut être observé avec des QR bioconjugués avec plus de protéines.

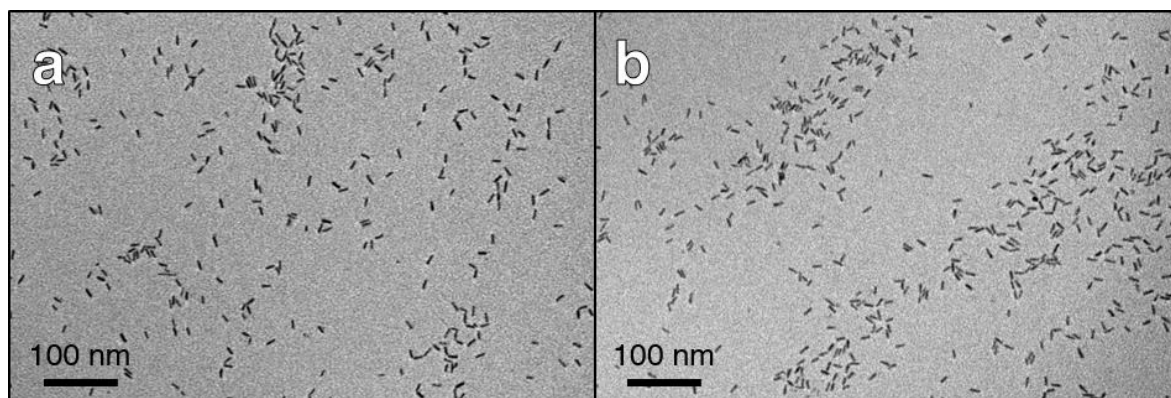


Figure 8. Images TEM de (a) QR-A3 et (b) QR- $\alpha 2$ fonctionnalisés avec peu de protéines.

Après purification, les suspensions de QR- $\alpha 2$ (77 nM) et de QR-A3 (77 nM) sont mélangées pour former des mélanges complémentaires dont les concentrations en chacun des deux types de QR-protéine varie entre 64 nM et 13 nM (détails dans la partie expérimentale).

Les mélanges de QR sont incubés pendant au moins 24 heures avant d'être caractérisés par microscopie électronique (Figure 9). Contrairement aux vastes zones d'assemblages très marquées qui ressortent des mélanges de QR saturés en protéines, ces QR dont la densité en protéine greffées est plus modérée ont un comportement moins clair.

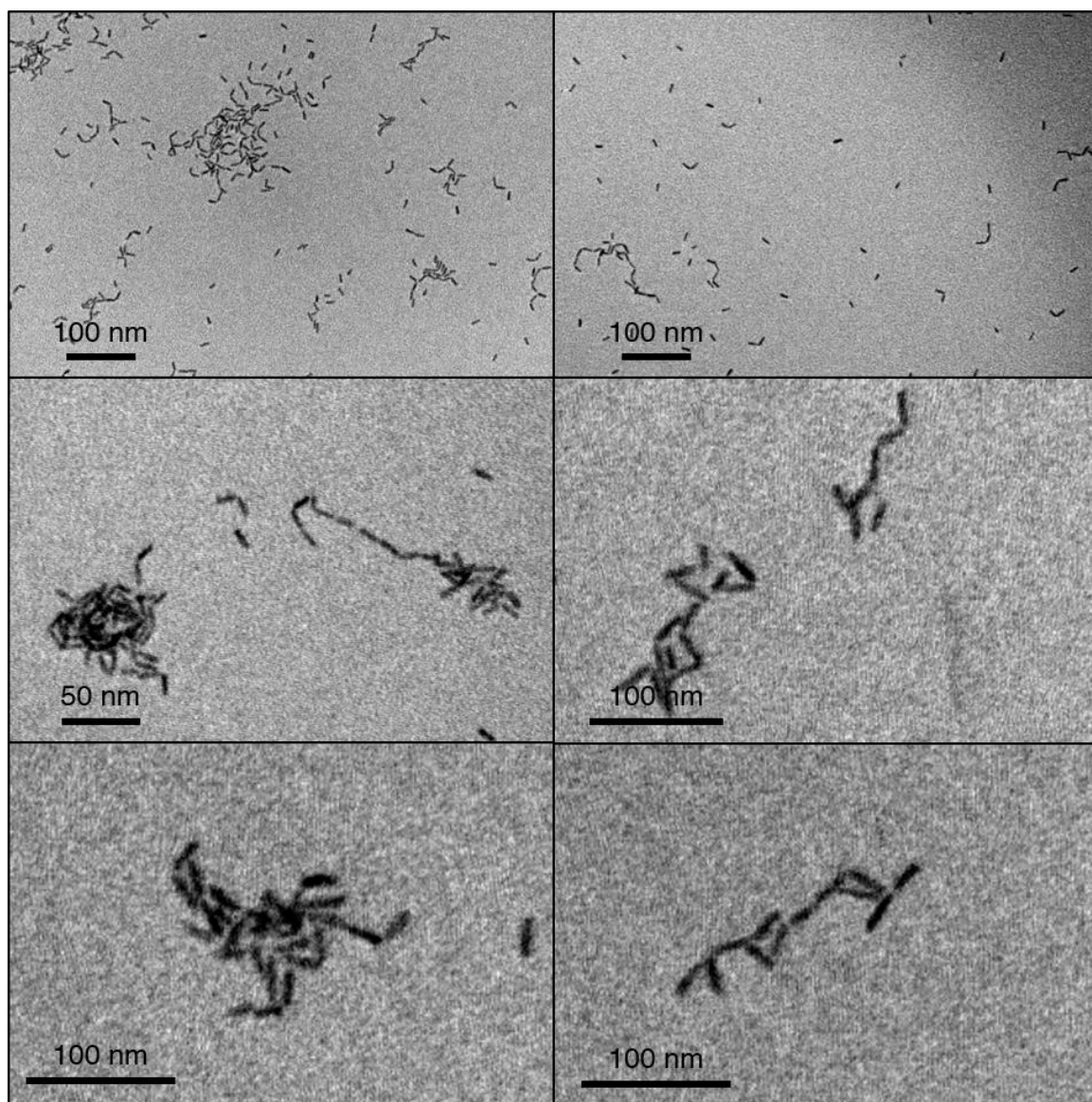


Figure 9. Images TEM issues de l'observation du mélange de QR- α 2 et de QR-A3 aux concentrations relatives 1:1 pour des QR fonctionnalisés avec une quantité réduite de protéines.

Ici, le mélange équimolaire de QR- α 2 et de QR-A3 ne semble pas initier l'auto-assemblage des nanobâtonnets. On retrouve, comme pour chaque autre mélange, des agrégats de taille limitée qui semblent résulter majoritairement d'interactions « pointe à pointe » comme observé dans le cas des deux populations séparées (Figure 8). Il est ainsi difficile de relier la présence de ces petites structures à l'auto-assemblage de QR induit par la reconnaissance entre α 2 et A3. Le caractère mal défini de l'association QR—QR peut ici s'expliquer par un greffage de protéine trop limité. En effet, le ligand de départ assurant l'hydrophilie des nanobâtonnets est ici le C5PEG4, qui est un ligand tricystéine mais qui dispose également d'une chaîne alkyle à 11 atomes de carbone (dont la structure est détaillée dans le Tableau 1 du Chapitre II). Ce ligand forme une couche dense à la surface des QR

stabilisée par des interactions latérales attractives de type van der Waals, ce qui peut rendre plus difficile le greffage des protéines^[7]. Ce phénomène est d'autant plus important que la quantité de protéines utilisée est ici plutôt faible (50 équivalents).

En conclusion, ces expériences ont démontré qu'il est possible, à partir de QR, de former des superstructures désordonnées pour lesquelles les images de microscopie ne permettent pas de faire apparaître des interdistances bien définies entre particules.

B. Auto-assemblage de QD

B.1 Influence du ratio de mélange

Différents mélanges de populations complémentaires de QD-protéine ont été réalisés puis analysés par électrophorèse. Cette approche permet d'évaluer l'influence de la présence en plus ou moins grande proportion de l'une ou l'autre population. Expérimentalement, des lots de QD- $\alpha 2$ et de QD-A3 sont préparés avec 100 équivalents de protéines et sont, après purification, dilués à 100 nM afin de réaliser une série de mélanges à une concentration en QD finale de 100 nM avec des concentrations en QD- $\alpha 2$ ou en QD-A3 allant de 83 à 17 nM (détails dans la partie expérimentale). La concentration totale en QD est choisie de façon à former des complexes $\alpha 2 \cdot A3$, en se référant à l'analyse des interactions protéine-protéine présentée dans le chapitre précédent.

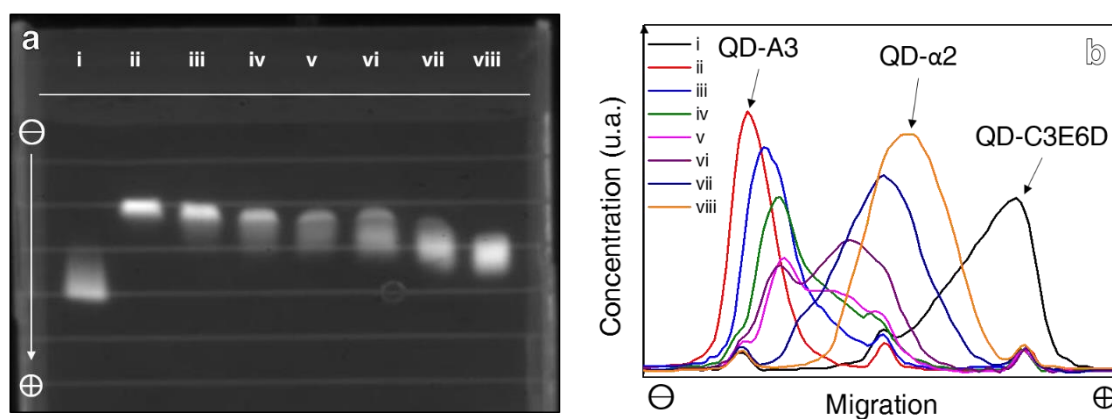


Figure 10. (a) Photographie de fluorescence de la migration électrophorétique de QD-C3E6D, de QD-A3, des mélanges de QD aux ratios 5:1, 2:1, 1:1, 1:2 et 1:5 et de QD- $\alpha 2$ (respectivement dans les puits i à viii). (B) Tracé des profils colorimétriques de migration pour les puits de i à viii. Les trois pics de faible amplitude correspondent aux traits disposés sur le support du gel d'agarose.

Après une incubation à 6 °C pendant 24 heures, la formation de nanostructures auto-assemblées est caractérisée par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 10) et par microscopie électronique en transmission (Figure 11). Après une exposition de 45 minutes

à une tension de 50 V, la migration électrophorétique des QD-A3 et des QD- α 2 est clairement différente de celle des QD-C3E6D (disposés respectivement dans les puits ii, viii et i de la Figure 10a) qui atteste de la fonctionnalisation réussie de ces nanoparticules. Quant aux mélanges de QD complémentaires, ces échantillons présentent des migrations électrophorétiques similaires à celles obtenues lors des auto-assemblages de AuNP qui ont fait l'objet de travaux antérieurs^[10]. Ces distances de migration intermédiaires sont dues aux interactions entre QD complémentaires, ayant pour effet de modifier la taille et la charge des nanostructures nouvellement formées. De plus, il apparaît que la distance de migration dépend directement de la composition du mélange de QD : les mélanges contenant une des deux populations en excès présente une position finale dans le gel proche de celle de la population majoritaire. Le mélange observé dans le puit iii (avec un large excès de QD-A3) migre à une position très proche de celle de l'échantillon du puit ii (les QD-A3 seuls). De façon symétrique, le mélange observé dans le puit vii (avec un large excès de QD- α 2) migre à position très proche de celle de l'échantillon du puit viii (les QD- α 2 seuls). La mesure des profils colorimétriques de la migration de ces mélanges de QD met bien en évidence ce phénomène (Figure 10b), à travers la position des pics correspondant aux mélanges de QD disposés entre le pic des QD-A3 et le pic de QD- α 2. Cet ensemble de migrations intermédiaires s'explique par les différences en taille et en charge qui ont pu être observées lors de la caractérisation de ces QD fonctionnalisés et qui a fait l'objet du chapitre précédent : les QD-A3 sont plus « gros » et moins chargés que les QD- α 2. De ce fait, les QD- α 2, qui migrent normalement plus loin lorsqu'ils sont seuls, sont ralentis du fait de leur assemblage avec des QD-A3.

Finalement, les mélanges de populations complémentaires sont caractérisés par TEM. La Figure 11 présente les clichés obtenus pour les mélanges 1:1 et 1:5 (QD-A3:QD- α 2). Pour ces deux proportions de mélange, les images TEM révèlent la formation de nanostructures de QD auto-assemblés limités spatialement. En effet, des assemblages, comprenant 2 à 40 nanoparticules environ, sont répartis sur la grille d'observation et de façon particulièrement homogène pour le mélange 1:1 (images a, b et c). Le mélange comprenant un excès de QD- α 2 présente à la fois des assemblages plus petits de QD (images d et e) et d'autres comparables à ceux de l'échantillon 1:1 (image f). Il est intéressant de noter que ces assemblages présentent une interdistance entre QD qui semble bien définie et que l'on retrouve entre chaque QD assemblés (ces deniers n'étant jamais en réel contact surface-

surface), ce qui est compatible avec l'idée que les protéines forment un complexe rigide séparant les deux particules.

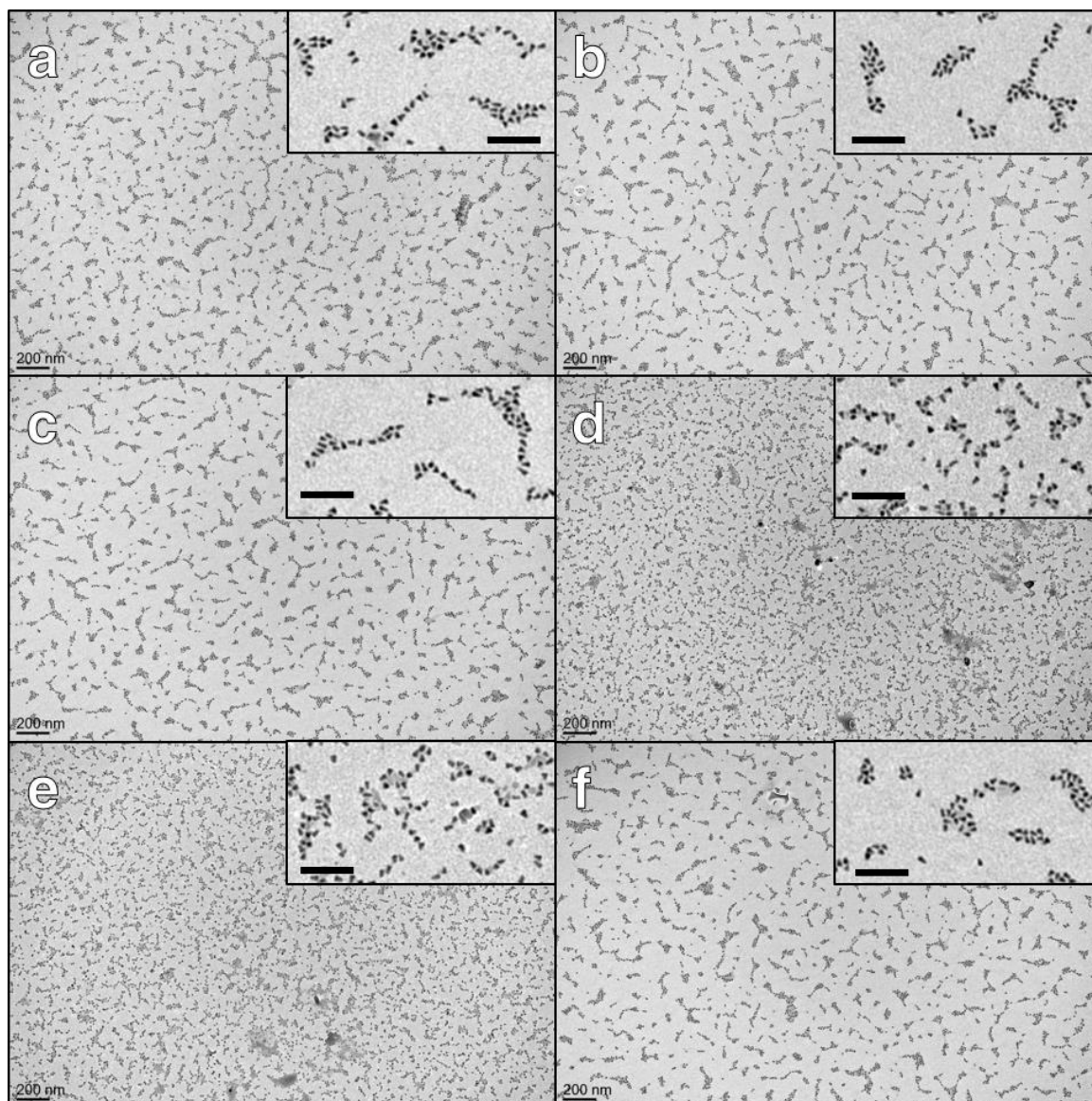


Figure 11. Images TEM des mélanges (a—c) 1:1 et (d—f) 1:5 de QD complémentaires. Les barres d'échelle dans les incrustations représentent 100 nm.

Par ailleurs la modulation du ratio QD-A3:QD- α 2 ne semble pas affecter ni la taille ni la morphologie des assemblages de QD. Les superstructures observées gardent les mêmes dimensions (c'est-à-dire composées en moyenne du même nombre de QD), peu importe la proportion de chacune des populations présentes dans le mélange.

B.2 Influence de la stœchiométrie : vers le contrôle de la morphologie des assemblages

Nous avons alors cherché à varier le nombre de sites d'ancrage par particule en jouant sur le nombre de protéines greffées par particule. Des assemblages plus petits sont attendus pour avec des particules présentant peu de protéines à leur surface (valence faible) comme le montre la figure 12.

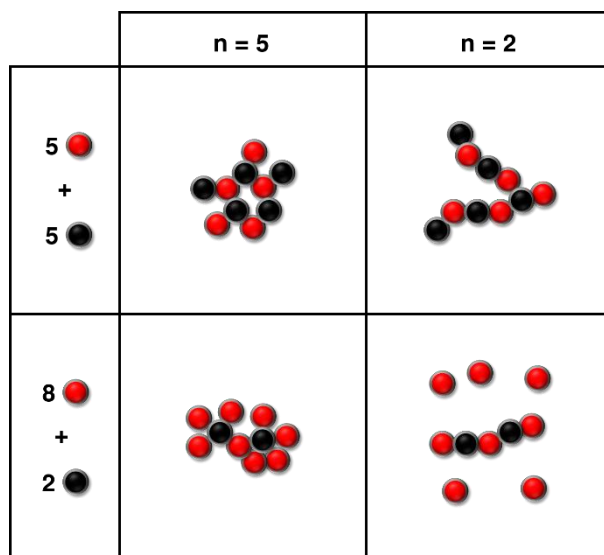


Figure 12. Tableau représentant la morphologie de l'assemblage entre deux particules complémentaires (noires et rouges) en fonction du ratio de leurs concentrations et de n , le nombre de site d'encrage par particule.

Il a été montré dans la littérature que le nombre de brins d'ADN greffés par particule influe sur la taille des nanostructures auto-assemblées. En 1996 par exemple, les travaux des équipes de Schultz *et al.* et de Storhoff *et al.* ont montré qu'un grand nombre de brins d'ADN par AuNP induit la formation de larges réseaux de nanoparticules^[11] (Figure 13a) tandis qu'un nombre réduit de brins greffés permet de former des nanostructures aux tailles limitées^[12] (Figure 13b). D'une façon similaire, le nombre de protéines greffées sur les QD peut alors permettre de favoriser la formation de superstructures oligomériques, telles que des dimères, des trimères ou plus généralement des assemblages de moins de 10 nanoparticules. Ce point a d'ailleurs été abordé lors de la mise au point des premiers assemblages de AuNP par reconnaissance entre protéines α -Repeat^[10].

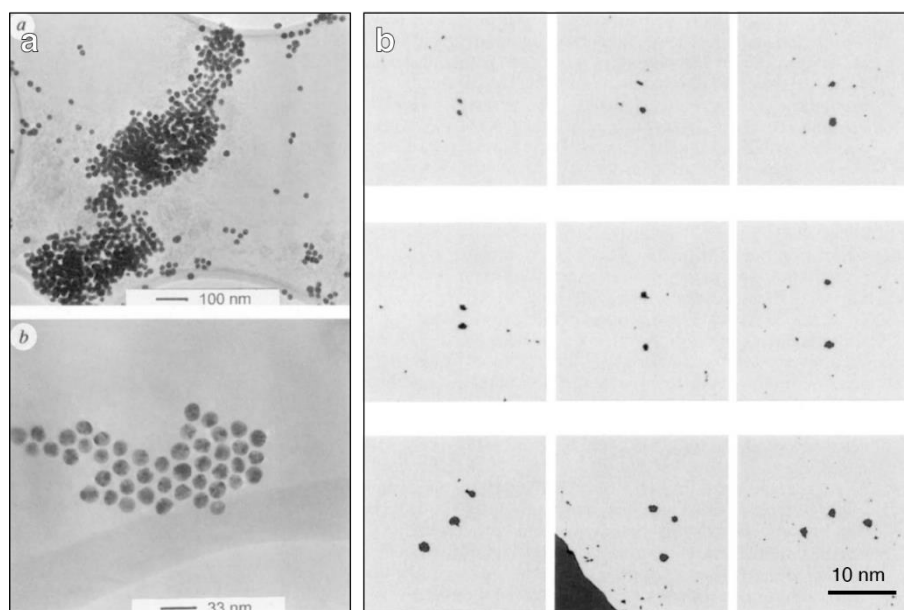


Figure 13. Images TEM de (a) larges structures de AuNP auto-assemblées (issues de [11]) et de (b) dimères et trimères de AuNP auto-assemblées (issues de [12]).

L'étude de la bioconjugaison entre QD et protéines α -Repeat (voir Chapitre III) a permis de montrer qu'il est possible de contrôler le nombre moyen de protéines greffées par particule en utilisant des quantités différentes de $\alpha 2$ et A3 lors de la bioconjugaison. Dans le but de préparer des QD-protéines ayant des chances de promouvoir la formation de petits assemblages, des QD-C3E6D d'un diamètre moyen de 9 nm sont incubés avec 5 équivalents molaires de $\alpha 2$ et A3 (notés QD₅). A considérant que l'aire occupée par protéine est constante et compte tenu du nombre moyen de 80 protéines A3 greffées sur des AuNP de 8 nm de diamètre (déterminé dans le Chapitre III, Partie II), les QD₅ incubés avec cette quantité de A3 devrait résulter en l'immobilisation de 4 protéines A3 en moyenne par QD. Dans le cas des QD- $\alpha 2$, ce chiffre devrait être plus grand du fait de sa plus petite taille.

Après élimination des protéines libres par filtration centrifuge, ces populations de QD- $\alpha 2$ et de QD-A3 avec un faible taux de protéines greffées sont mélangées avec un ratio molaire de mélange de 2:1 (QD-A3:QD- $\alpha 2$) avec une concentration totale en QD de 80 nM. Après une incubation à 6 °C pendant 24 heures, ce mélange de QD complémentaires est observé par microscopie électronique (Figure 14).

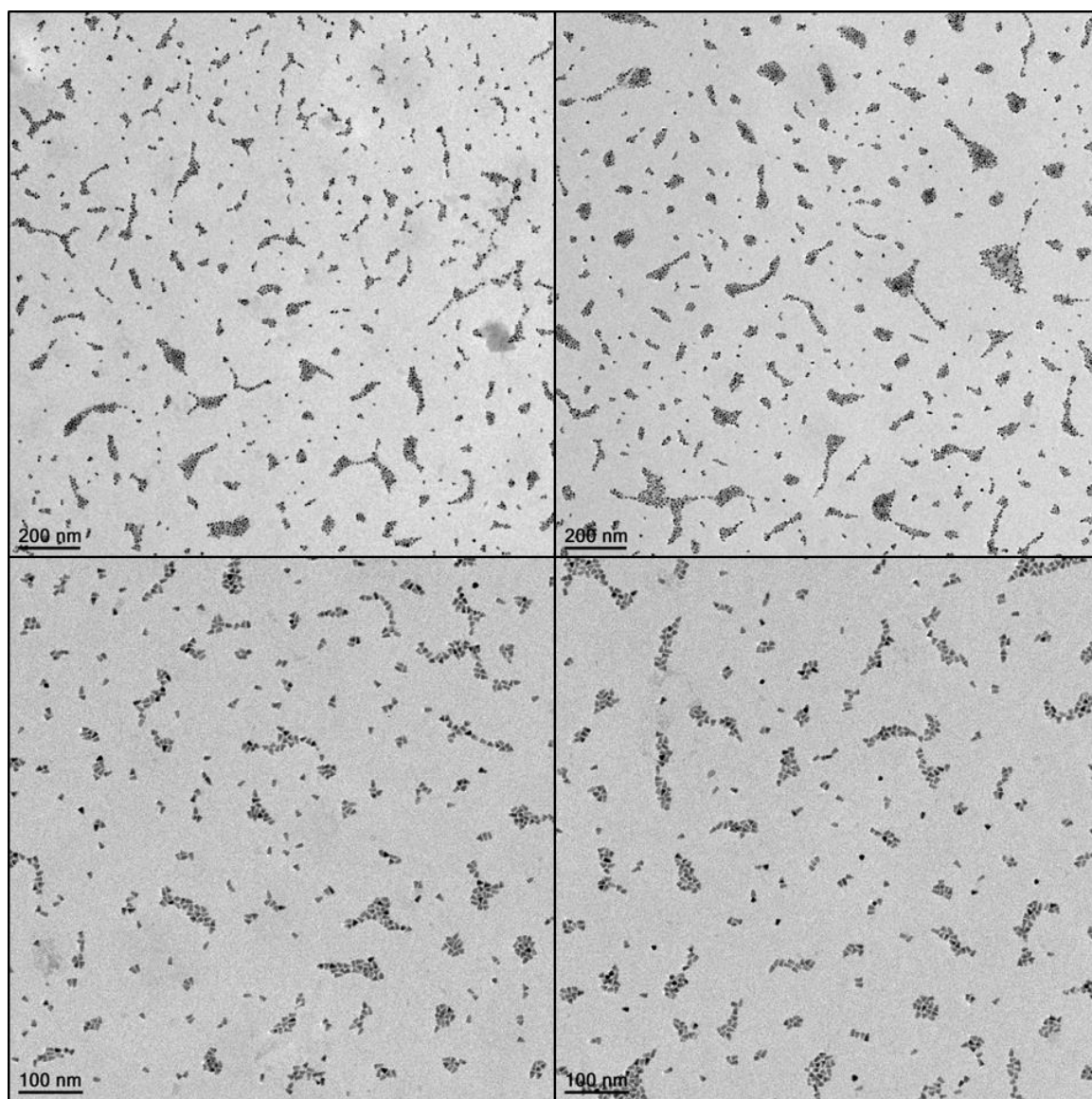


Figure 14. Images TEM de mélanges de QD-A3 et de QD- α 2 préparés avec 5 équivalents molaires de protéines.

Ces clichés TEM montrent l'assemblage de QD sous la forme d'agrégats dont la forme et la taille rappellent ceux observés précédemment. Pour apprécier l'influence de la faible stœchiométrie protéine/QD, ces assemblages sont comparés à ceux obtenus par le mélange de QD-protéines préparés avec 100 équivalents molaires de protéines (QD₁₀₀). Cette comparaison est effectuée en comptant (à l'aide du logiciel ImageJ) le nombre de QD contenus dans les assemblages observés sur des images couvrant une surface de $7,1 \mu\text{m}^2$ dans le cas des QD₁₀₀ et de $3 \mu\text{m}^2$ dans le cas des QD₅. Les résultats de ce recensement sont alors classés statistiquement selon les 4 classes suivants : « monomères » correspondant aux QD seuls non assemblés, « dimères », « oligomères » correspondant à des assemblages de 3 à 5 QD et « grands assemblages » pour des agrégats de 6 QD minimum. Les résultats sont représentés dans la Figure 15.

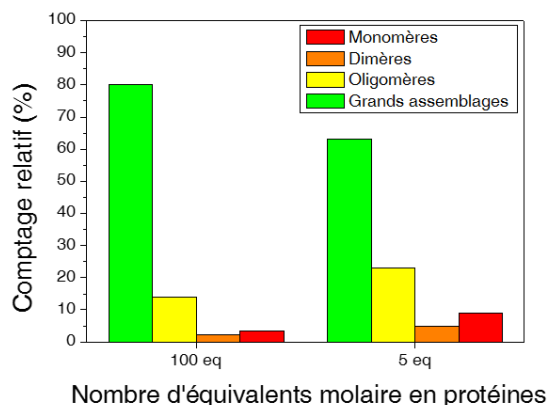


Figure 15. Distribution statistique des QD assemblés en dimères, oligomères ou en grands assemblages en fonction du nombre d'équivalents molaires de protéines utilisés (détails des comptages en partie expérimentale).

Ces résultats permettent de mettre en évidence une différence de comportement dans l'auto-assemblage des QD. D'une part, la part de QD seuls non assemblés (monomères) passe de 3 % pour les QD₁₀₀ à 9 % pour les QD₅. Cette plus grande proportion de QD seuls peut être attribuée à la présence de QD sans protéines greffées. Aussi, ces QD peuvent être seuls du fait du faible nombre de protéines greffées à leur surface, réduisant la probabilité de leur appariement avec des QD complémentaires. La part de QD auto-assemblés sous forme de dimères augmente (5 % pour les QD₅ contre 2 % pour les QD₁₀₀), tout comme la part de QD retrouvés dans des petites nanostructures de moins de 6 particules (23 % pour les QD₅ contre 14 % pour les QD₁₀₀). Ces petites structures, montrées en Figure 16, sont ainsi favorisées par l'utilisation de QD sur lesquels peu de protéines ont été immobilisées.

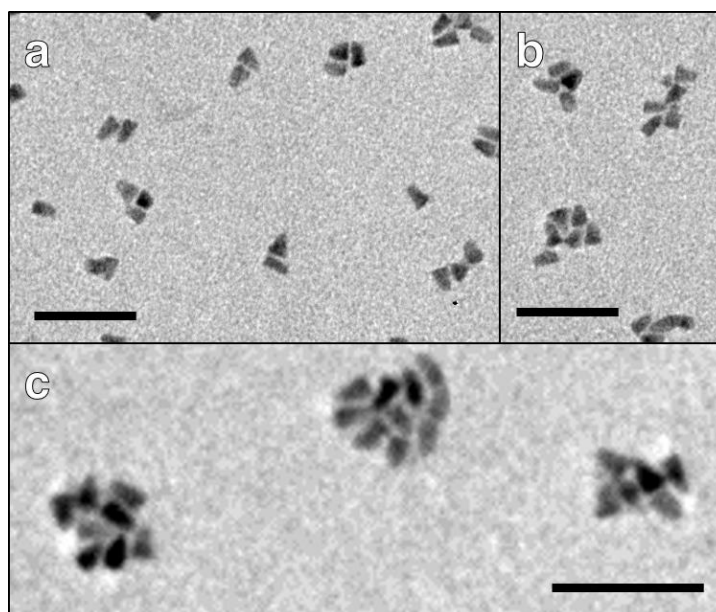


Figure 16. Agrandissements d'images TEM montrant (a) des dimères et trimères de QD et (b et c) des oligomères de QD obtenus avec des QD bioconjugués avec 5 équivalents molaires de protéines. La barre d'échelle représente 50 nm.

En dehors de ces petits oligomères, il faut noter que 60 % des QD₅ restent tout de même auto-assemblés dans des structures plus grandes, composées de 6 QD₅ au minimum. Cette efficacité limitée est possiblement causée par le fait que, comme il a été expliqué plus haut, 5 équivalents molaires de $\alpha 2$ ou A3 doivent mener à l'immobilisation d'environ 4 molécules de A3 et un nombre certainement plus grand de molécules de $\alpha 2$ par QD. De plus, une certaine dispersion dans la bioconjugaison peut amplifier cet effet. Bien que cette stœchiométrie soit plus faible que celle obtenue avec 100 équivalents molaires (environ 80 molécules de A3 par QD), il est possible qu'elle soit encore trop grande pour limiter le phénomène d'auto-assemblage des QD à la formation de nanostructures très petites. L'idée serait alors de parvenir à la formation de QD fonctionnalisés avec un nombre très limité de protéines (1, 2 ou 3)^[10]. Par exemple, des QD-A3 « monovalents » pourraient être mélangés à des QD- $\alpha 2$ « divalents » pour favoriser la formation de trimères de QD tel qui l'a pu être montré avec des AuNP par Alivisatos *et al.*^[13].

C. Conclusion

À travers ces travaux d'auto-assemblage de nanoparticules semi-conductrices, plusieurs constats peuvent être tirés. Premièrement, l'auto-assemblage de QR est réalisé avec succès en saturant la surface des nanobâtonnets avec les protéines α -Repeat. Ces nano-objets présentent une grande surface contact leur conférant une grande réactivité pour former les assemblages massifs et désorganisés qui sont observés par microscopie électronique. La diminution du nombre de protéines par QR ne permet pas de moduler efficacement la taille des agrégats obtenus. Dans ce cas, il est difficile de relier l'assemblage de certains QR à la formation du complexe $\alpha 2 \cdot A3$. Les quantités de protéines utilisées sont sans doute trop faibles pour parvenir à échanger les protéines avec les ligands de départ qui possèdent une longue chaîne alkyle qui tend à stabiliser une monocouche particulièrement robuste à la surface des nanobâtonnets.

L'auto-assemblage de QD saturés en protéines résulte en la formation de superstructures de tailles plus réduites comprenant au maximum quelques dizaines de nanoparticules. Deux paramètres ont été étudiés afin de mieux contrôler la morphologie des assemblages générés. La variation des concentrations relatives à chacun de protagonistes (NP- $\alpha 2$ et NP-A3) n'affecte ni l'organisation ni l'étendue des assemblages formés. D'autre part, la diminution de la concentration surfacique en protéine permet d'obtenir une proportion notable d'oligomères de moins de 6 QD.

Partie III. Auto-assemblages hybrides de nanoparticules métalliques et semi-conductrices

Après avoir mis au point la synthèse et de fonctionnalisation des nanoparticules métalliques et semi-conductrices, l'étape suivante consiste à assembler ces deux types de nanoparticules. Il s'agit de comprendre le couplage entre la fluorescence des nanoparticules semi-conductrices et le champ électrique local induit par les plasmons de surface des nanoparticules métalliques. Des particules semi-conductrices et métalliques de formes variées ont été fonctionnalisées avec chacune des protéines $\alpha 2$ et A3 et l'interaction spécifique entre ces deux protéines sert à les auto-assembler. L'intérêt des nanobâtonnets est double par rapport à cet objectif. D'un part l'anisotropie de forme induit des interactions de van der Waals de type dipôle induit qui favorisent l'organisation smectique ou nématique des nanobâtonnets. D'autre part, dans le cas des NP métalliques, les GNR anisotropes permettent de moduler la longueur d'onde des modes plasmon (en particulier le mode longitudinal selon le grand axe du cylindre) vers les basses énergies jusqu'à l'infrarouge alors que le confinement des particules sphériques donne une bande plasmon unique autour de 520 nm qui varie peu avec la taille.

A. Auto-assemblages hybrides sphères—nanobâtonnets

Deux premières séries d'assemblages hybrides métal/semi-conducteur ont été étudiées par auto-assemblage de bâtonnets et de sphères (GNR/QD et AuNP/QR).

A.1 GNR et QD

A.1.i. Propriétés optiques des particules utilisées

Les travaux concernant l'auto-assemblage de GNR et de QD ont été l'occasion de travailler en collaboration avec L. Moreau, étudiante de Master 2 à l'Université de Rennes 1. Pour cet auto-assemblage hybride entre des GNR et des QD, deux lots de GNR sont utilisés afin de les combiner avec des QD de diamètre moyen 9 nm avec un maximum d'émission à 655 nm. Ces deux populations de GNR, appelées GNR₆₉₅ et GNR₇₃₀, sont préparées selon la méthode de Murray^[14] (GNR_{Murray} dans le Chapitre II). Leurs propriétés morphologiques (déduites d'observations par TEM) et leurs propriétés optiques sont résumées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Propriétés morphologiques et optiques des GNR utilisés.

Lot	Longueur (nm)	Largeur (nm)	rapport d'aspect	λ_{TSP} (nm)	λ_{LSP} (nm)
GNR ₇₃₀	71 ± 4,7	16 ± 2,9	4,4	514	730
GNR ₆₉₅	60 ± 7	24 ± 5	2,5	535	695

Comme il est montré en Figure 17, le pic d'émission de fluorescence des QD présente un recouvrement avec la bande plasmon de GNR qui correspond à leur mode de résonance plasmon longitudinal (λ_{LSP}). Suivant l'étendue de ce recouvrement, un transfert d'énergie non radiatif entre les QD (donneur d'énergie) et les GNR (accepteur d'énergie) peut s'établir. Le recouvrement entre l'émission et l'absorption est plus grand pour les GNR₆₉₅ que pour les GNR₇₃₀. Cette différence dans les propriétés optiques des GNR nous permet ainsi d'étudier l'influence du couplage des propriétés optiques entre émetteur et accepteur d'énergie.

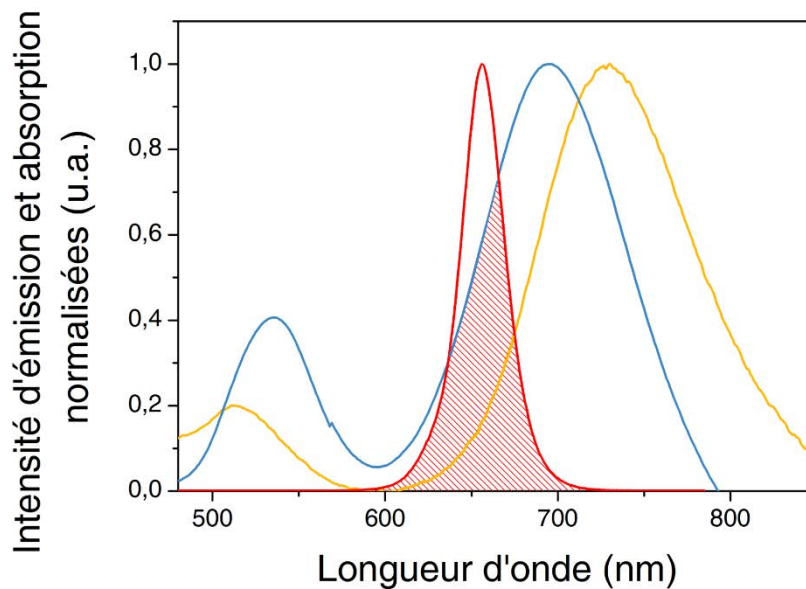


Figure 17. Spectres d'absorption normalisée UV-visible des GNR₆₉₅ (ligne bleue) et des GNR₇₃₀ (ligne jaune). Spectre d'émission de fluorescence normalisée des QD (ligne rouge) et son recouvrement par les bandes plasmons des GNR (hachuré en rouge).

A.1.ii. Morphologie des assemblages GNR—QD

Pour l'auto-assemblage de ces deux types de nanoparticules, les GNR₇₃₀ sont bioconjugués avec la protéine $\alpha 2$ (300 équivalents molaires) tandis que les QD sont bioconjugués avec la protéine A3 (100 équivalents molaires). Pour l'étude des propriétés morphologiques et optiques de ces assemblages hybrides, l'influence du ratio molaire GNR:QD est analysé par électrophorèse et microscopie électronique en réalisant différents mélanges complémentaires entre les GNR- $\alpha 2$ et les QD-A3 dont les concentrations de départ sont de 23 nM (détails dans la partie expérimentale). En parallèle, des mélanges non-complémentaires entre des GNR- $\alpha 2$ et des QD- $\alpha 2$ sont effectués pour contrôler la spécificité des assemblages observés.

Après 24 heures d'incubation à 6 °C, les mélanges de GNR et QD sont caractérisés par microscopie électronique. Pour le premier mélange de GNR et QD complémentaires présentant un grand excès de GNR (9:1), les observations révèlent la présence de QD en petits nombres accolés autour des bâtonnets métalliques (Figure 18a et b). En parallèle, aucun QD n'est observé dans les mélanges non spécifiques (Figure 18c et d). Leur faible concentration et leur faible contraste rend difficile leur repérage lorsqu'ils n'interagissent pas avec les nanobâtonnets d'or.

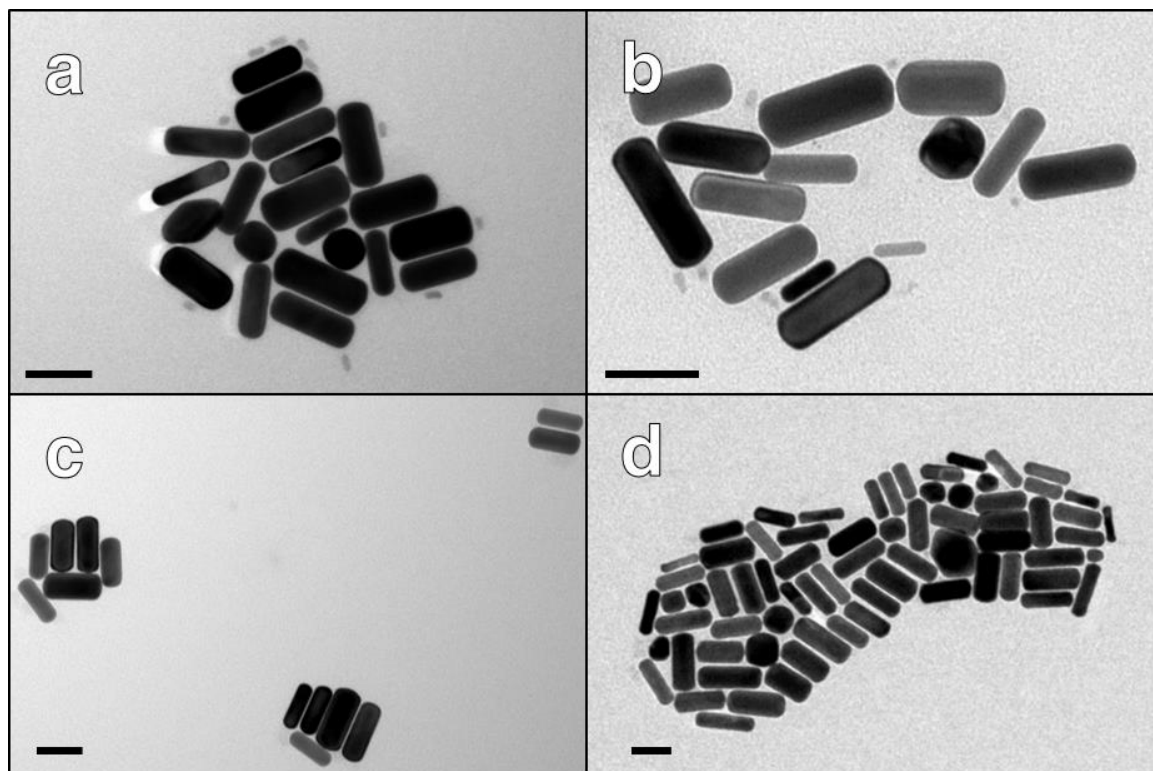


Figure 18. Images TEM des mélanges 9:1 de GNR et QD complémentaires (a, b) et non complémentaires (c, d). Les barres d'échelle représentent 50 nm.

Lorsque la proportion de QD est augmentée, dans le cas du mélange équimolaire de GNR et QD complémentaires par exemple, on observe que de nombreux QD sont assemblés sur la surface des GNR pendant que d'autres QD sont dispersés loin des GNR (Figure 19a et b). Le contrôle dans les mêmes proportions révèle quelques QD aléatoirement disposés à proximité des GNR et dispersés (Figure 19c et d). Comparé au mélange de particules complémentaires, la part de GNR sans aucun QD assemblés à leur surface est nettement plus grande.

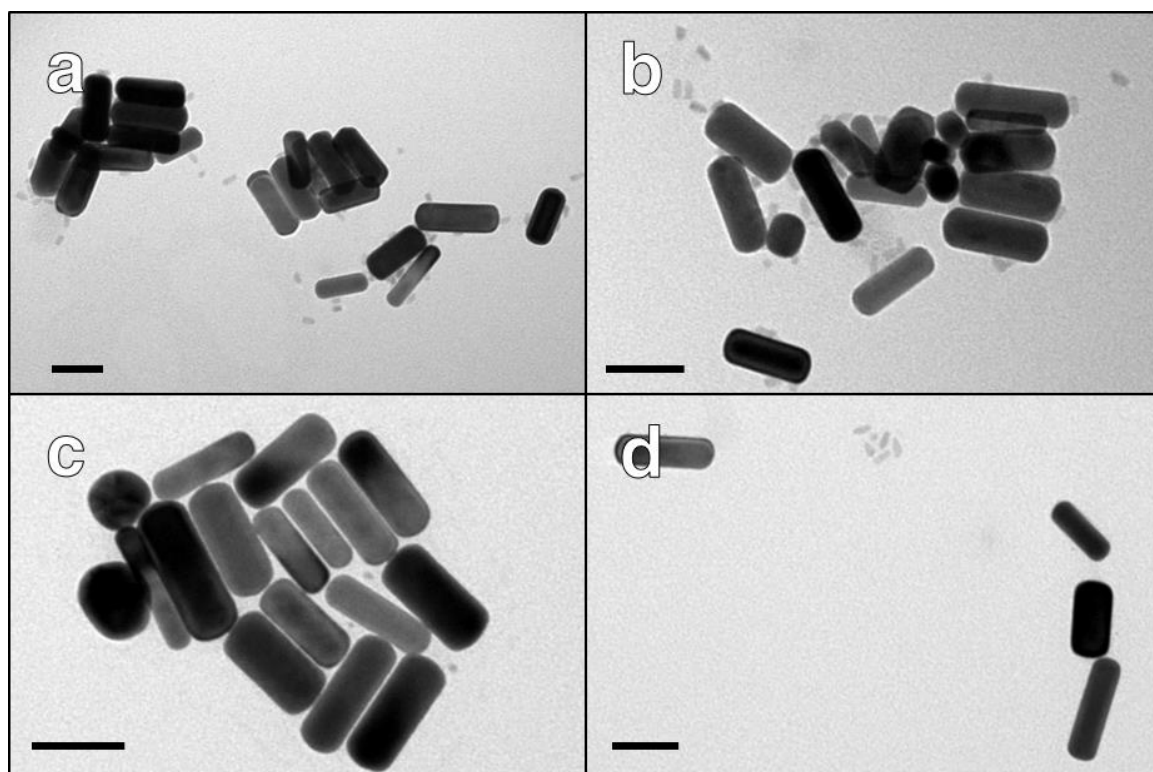


Figure 19. Images TEM des mélanges 1:1 de GNR et QD complémentaires (a, b) et non complémentaires (c, d). Les barres d'échelle représentent 50 nm.

Finalement, le mélange de GNR et QD complémentaires présentant un large excès de QD (1:9) présente un phénomène d'auto-assemblage entre QD et GNR avec une sélectivité la plus marquée vis à vis du contrôle. En effet, la microscopie électronique montre, dans le cas du mélange de particules complémentaires, la disposition des QD tout autour des GNR qui par conséquent s'assemblent moins facilement en cartouches comme il a pu être observé sur les images précédentes (Figure 20a et b). Au contraire, le mélange de GNR et QD non complémentaires montre des QD bien dispersés et très peu d'entre eux se retrouvent au contact des GNR (Figure 20c et d).

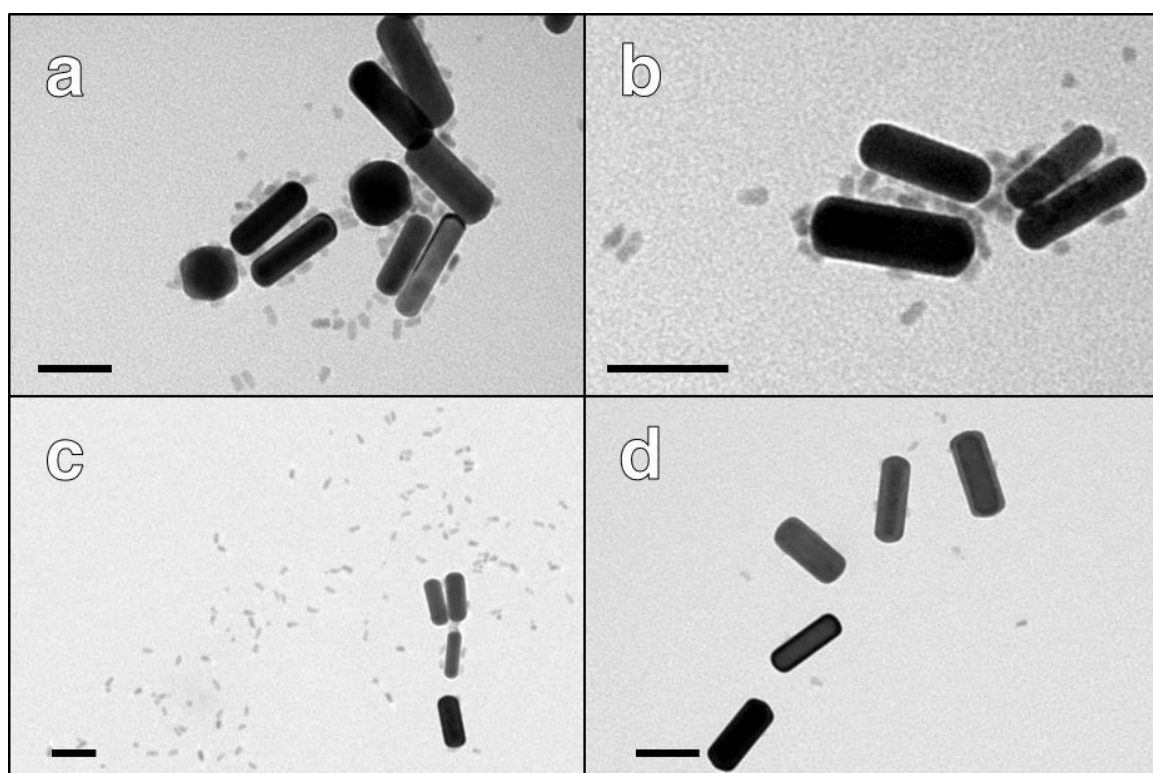


Figure 20. Images TEM des mélanges 1:9 de GNR et QD complémentaires (a, b) et non complémentaires (c, d). Les barres d'échelle représentent 50 nm.

Afin de quantifier cette tendance clairement observable d'assemblage sélectif entre QD et GNR complémentaires, une analyse statistique a été effectuée sur les proportions de QD assemblés autour des GNR dans le cas des protéines complémentaires (GNR- α 2 et QD-A3) et dans le cas des protéines non complémentaires (GNR- α 2 et QD- α 2). Pour ce faire, les QD assemblés à la surface des GNR et les QD dispersés sont comptés sur la grille d'observation sur un échantillon représentatif (Tableau 2).

Tableau 2. Analyse statistique de l'assemblage entre QD et GNR dans le cas des mélanges de particules complémentaires (QD-A3) et des particules non complémentaires (QD- α 2).

Ratio molaire (GNR:QD)	Nombre de QD total	Part de QD-A3 assemblés (%)	Part de QD- α 2 assemblés (%)
9:1	74	82	
1:1	95	93	27
1:9	320	98	30

L'analyse statistique réalisée montre que les proportions de QD-A3 accolés aux GNR- α 2 (mélanges complémentaires) sont beaucoup plus grandes que les proportions des QD- α 2 (mélanges non complémentaires). Une part d'environ 30 % de QD assemblés sur les GNR non complémentaires lorsque les QD sont en excès peut s'expliquer par des effets de séchage mal contrôlés et par des interactions de type van der Waals entre QD et GNR^[15].

A.2 AuNP et QR

Dans cette partie nous utilisons des particules semi conductrices qui sont cylindriques (QR CdSe/CdS) et des particules métalliques sphériques.

A.2.i. Propriétés optiques des particules utilisées

Pour ces travaux, des AuNP et des QR CdSe/CdS sont synthétisés au laboratoire. Les AuNP présentent un diamètre moyen de 24 nm et les QR utilisés ont des dimensions moyennes de $35,9 \pm 4,3$ nm x $5,8 \pm 0,6$ nm. Comme il est montré en Figure 21, le spectre d'absorption UV-visible des AuNP révèle une intense bande plasmon centrée sur 519 nm. Les QR présentent une bande d'émission de fluorescence dont le maximum est situé dans le vert à 566 nm.

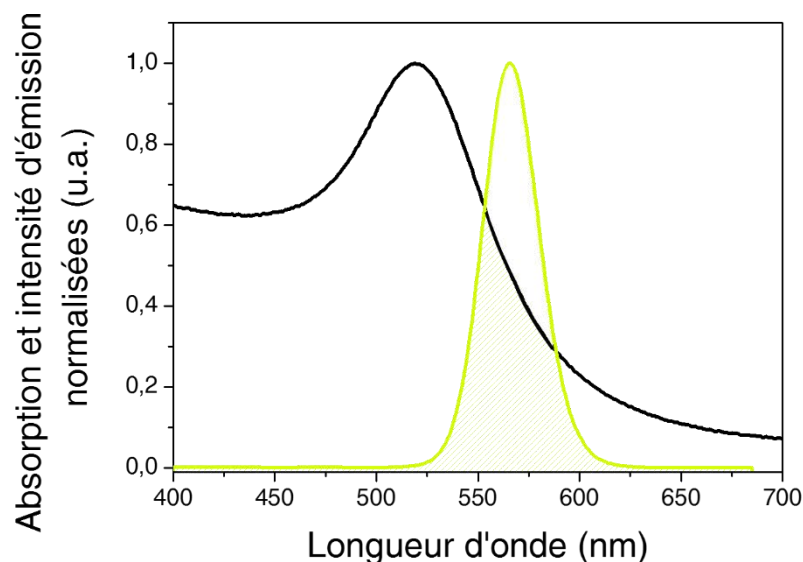


Figure 21. Spectre d'absorption UV-visible normalisée des AuNP (ligne noire) et spectre d'émission de fluorescence normalisée des QR (ligne verte) et son recouvrement par la bande plasmon des AuNP (hachuré en vert).

De la même façon que pour les assemblages de QD et de GNR abordés précédemment, ce système QR-AuNP la position de la bande d'émission des QR permet un fort recouvrement de leur émission par l'absorption des AuNP.

A.2.ii. Cas d'une stoechiométrie protéine:nanoparticule élevée

Pour l'auto-assemblage hybride entre QR et AuNP, ces deux types de nanoparticules sont bioconjuguées avec $\alpha 2$ et A3. De cette façon, des AuNP- $\alpha 2$ sont préparées avec 100 équivalents molaires de $\alpha 2$ tandis que des QR-A3 sont préparés à partir de QR-C5PEG4 et de 200 équivalents molaires de A3. Ces quantités de protéines relativement importantes sont utilisées dans le but de favoriser les interactions entre les deux types de particules. Après purification, des mélanges de ces deux populations complémentaires sont réalisés à une concentration totale en nanoparticules de 75 nM avec différentes fractions molaires de QR et de AuNP (détails dans la partie expérimentale). En parallèle, des mélanges de populations non complémentaires sont réalisés à partir de QR- $\alpha 2$ et de AuNP- $\alpha 2$ aux mêmes concentrations.

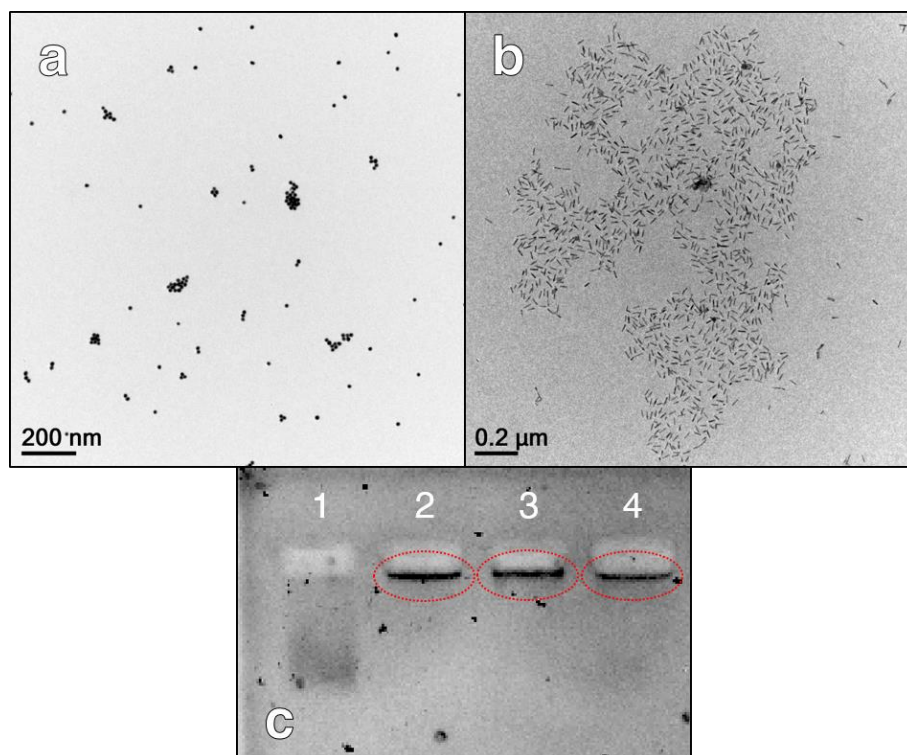


Figure 22. Images TEM (a) des AuNP-A3 et (b) des QR- $\alpha 2$ dans du tampon NaP à pH 7,4. (c) Photographie en lumière visible de la migration électrophorétique (1) des AuNP-A3 seules et (2-4) des mélanges de AuNP-A3 et QR- $\alpha 2$ aux proportions respectives 2:1, 1:1 et 1:2. Les cercles en pointillés rouges entourent les nanoparticules agrégées qui ne peuvent pas pénétrer dans le gel d'agarose.

Les nanoparticules bioconjuguées pures QR- $\alpha 2$ et AuNP-A3, avec lesquelles sont fait les mélanges, sont caractérisées par microscopie électronique ce qui permet de contrôler leur bonne stabilité (Figure 22a et b). En particulier, les QR- $\alpha 2$ se tiennent bien à distance les uns par rapport aux autres. En revanche, la suspension de départ de AuNP-A3 révèle la

présence de quelques grappes de nanoparticules d'or. Cette observation peut s'expliquer par la tendance à la dimérisation de la protéine A3 lorsqu'elle est suffisamment concentrée. Comme une quantité relativement élevée de A3 (100 équivalents molaires) a été utilisée, il est possible que l'on soit dans un régime intermédiaire dans lequel la formation de dimères A3•A3 ne peut pas être négligée.

Après l'incubation de mélanges de QR- α 2 et AuNP-A3 à 6 °C pendant 12 à 48 heures, l'ensemble des échantillons montrent des AuNP très agrégées qui précipitent au fond des microtubes. En revanche, les mélanges constitués de QR et AuNP non complémentaires ne présentent aucun état d'agrégation détectables à l'œil. De même, la migration électrophorétique des AuNP-A3 seules montrent une bande de migration assez bien définie, tandis que les mélanges spécifiques de QR- α 2 et de AuNP-A3 ne parviennent pas à pénétrer le gel d'agarose et restent coincés dans les puits d'injection (Figure 22c).

L'utilisation d'un bain à ultrasons permet de redisperser de façon temporaire les mélanges de QR et de AuNP complémentaires afin de préparer des grilles de TEM pour les caractériser par microscopie électronique. Pour les trois mélanges de QR- α 2 et de AuNP-A3, les observations par TEM révèlent la présence d'assemblages hybrides constitués de ces deux types de particules (Figure 23). Plus précisément, les structures observées montrent, selon les concentrations molaires relatives entre QR et AuNP, des AuNP agrégées au milieu d'un nombre plus ou moins grand de QR. Ces derniers, par ailleurs, présentent un état d'agrégation particulièrement élevé pour le mélange équimolaire et le mélange avec un excès de QR (Figure 23c–f). De très nombreux points de contact entre QR peuvent y être observés, formant ainsi une sorte de fond continu au sein duquel les AuNP sont disposées.

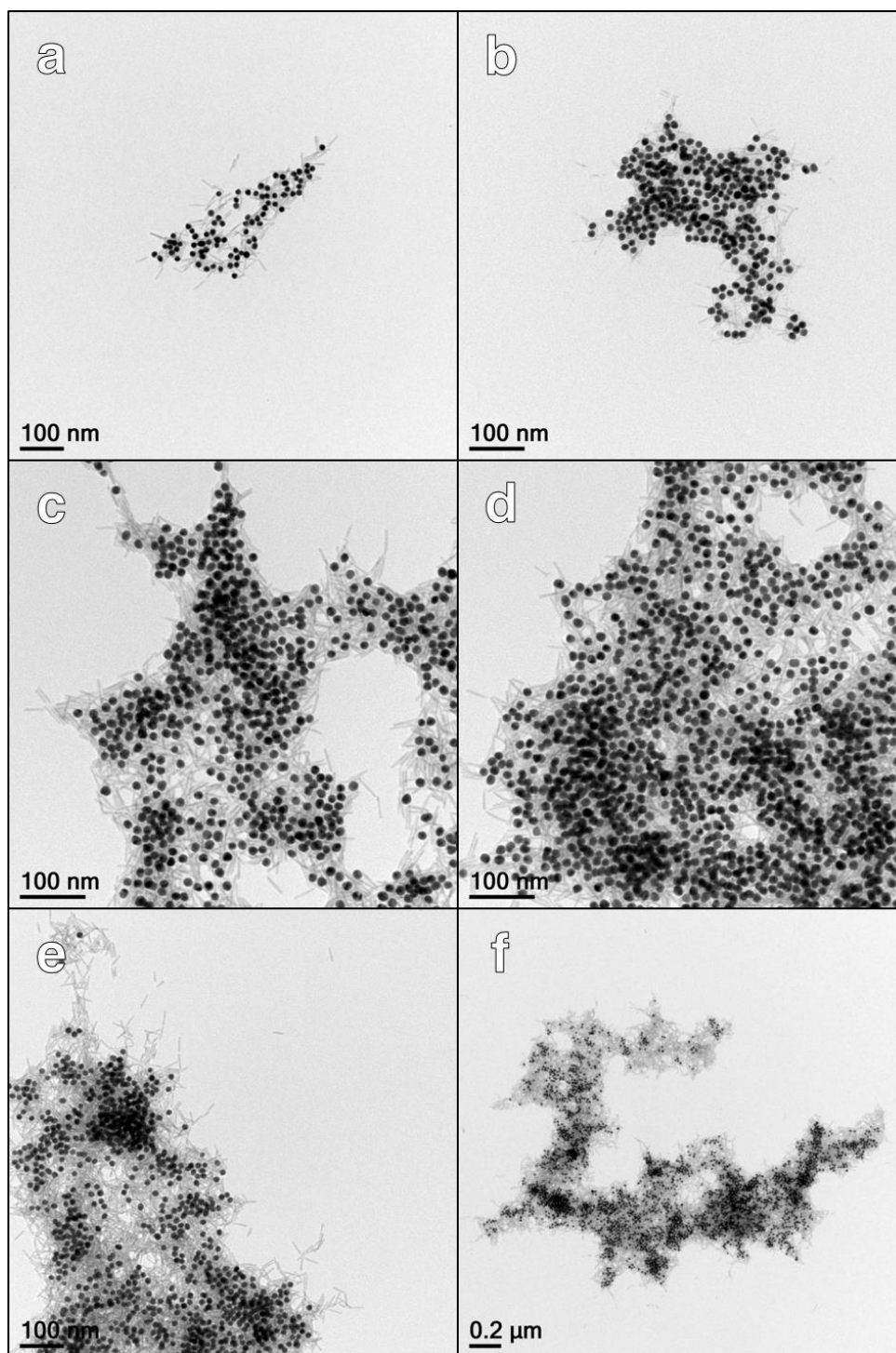


Figure 23. Images TEM des mélanges de QR- α 2 de AuNP-A3 avec des rapport de concentrations molaires QR:AuNP (a et b) de 2:1, (c et d) de 1:1 et (e et f) de 1:2.

D'autre part, les mélanges de populations non complémentaires QR- α 2 et AuNP- α 2 révèlent par TEM des QR- α 2 bien dispersés (Figure 24) dont la stabilité semble proche de celle des QR- α 2 de départ des mélanges complémentaires (Figure 22b). Par ailleurs on ne retrouve que très peu d'AuNP dans l'échantillon qui sont au contact de QR agrégés,

rappelant ainsi la disposition entre QR- $\alpha 2$ et AuNP-A3. Cette dernière observation reste cependant rare du fait que peu de AuNP- $\alpha 2$ sont retrouvés dans l'échantillon.

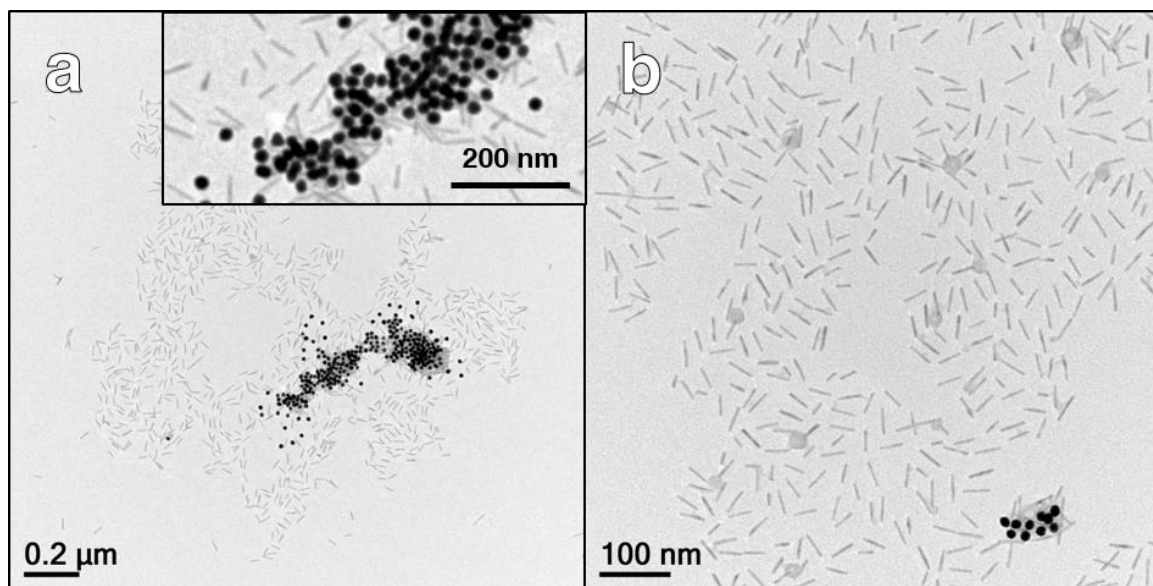


Figure 24. Images TEM d'un mélange de QR- $\alpha 2$ et de AuNP- $\alpha 2$ non complémentaires (mélange équimolaire).

A.2.iii. Cas d'une stœchiométrie protéine:nanoparticule réduite

Dans le but de limiter l'instabilité des QR bioconjugués avec $\alpha 2$, ces derniers sont bioconjugués en réduisant de moitié la quantité de protéine $\alpha 2$. On considère que 100 équivalents molaires de $\alpha 2$ doivent être suffisants pour favoriser la reconnaissance protéine—protéine. D'autre part, les AuNP sont bioconjuguées avec 30 équivalents molaires de A3 afin de réduire la formation de grappes de AuNP observables lorsqu'elles présentent un trop grand nombre de protéines A3 à leur surface. La caractérisation de ces deux populations, après leur purification, montre bien la stabilité des QR- $\alpha 2$ (Figure 25). Les AuNP-A3, malgré la stœchiométrie A3:AuNP plus faible, forment encore des grappes témoignant des interactions A3•A3 au sein de l'échantillon.

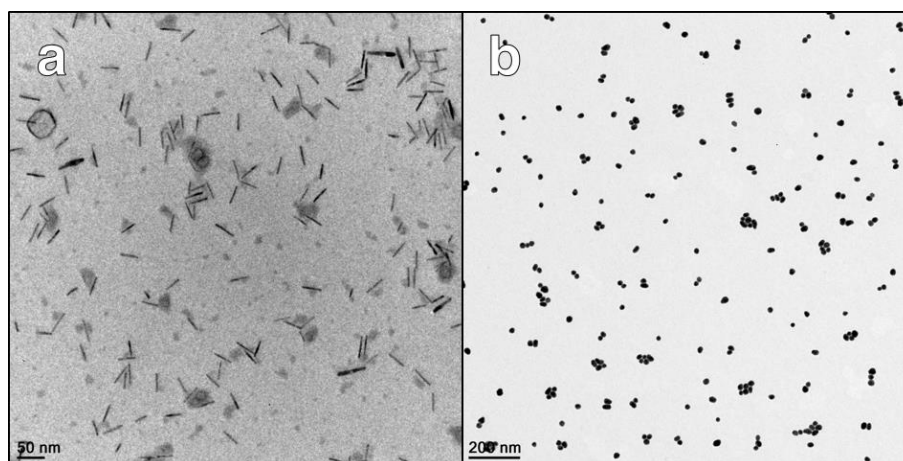


Figure 25. Images TEM (a) des QR- α 2 et (b) des AuNP-A3 bioconjugués avec un nombre réduit de protéines dans du tampon NaP à pH 7,4.

Pour l'auto-assemblage de QR- α 2 et AuNP-A3 bioconjuguées avec des quantités réduites de protéines, un mélange équimolaire est réalisé dont la concentration finale en nanoparticules est de 55 nM. D'autre part, un mélange équimolaire de QR- α 2 et de QD- α 2 est réalisé à la même concentration afin d'évaluer le comportement de nanoparticule en l'absence de l'interaction α 2•A3.

Le mélange complémentaire, contrairement aux mélanges instables de QR et AuNP sur lesquels un grand nombre de protéines sont immobilisés, ne présente à l'œil nu aucun signe d'agrégation après 24 h d'incubation à 6 °C. Sa caractérisation par microscopie électronique permet de mettre en lumière des QR toujours bien dispersés (Figure 26). Cette observation confirme la meilleure stabilité des QR lorsqu'ils sont préparés avec un nombre réduit de protéines à leur surface. Pour le mélange de populations complémentaires, les QR- α 2 semblent en contact avec leurs partenaires AuNP-A3, et cela de façon récurrente (Figure 26 a–d). Plus précisément, il s'agit souvent d'un unique QR interagissant avec un dimère ou trimère de AuNP-A3. On retrouve également quelques structures auto-assemblées plus massives mais dont la taille ne dépasse pas la dizaine de nanoparticules.

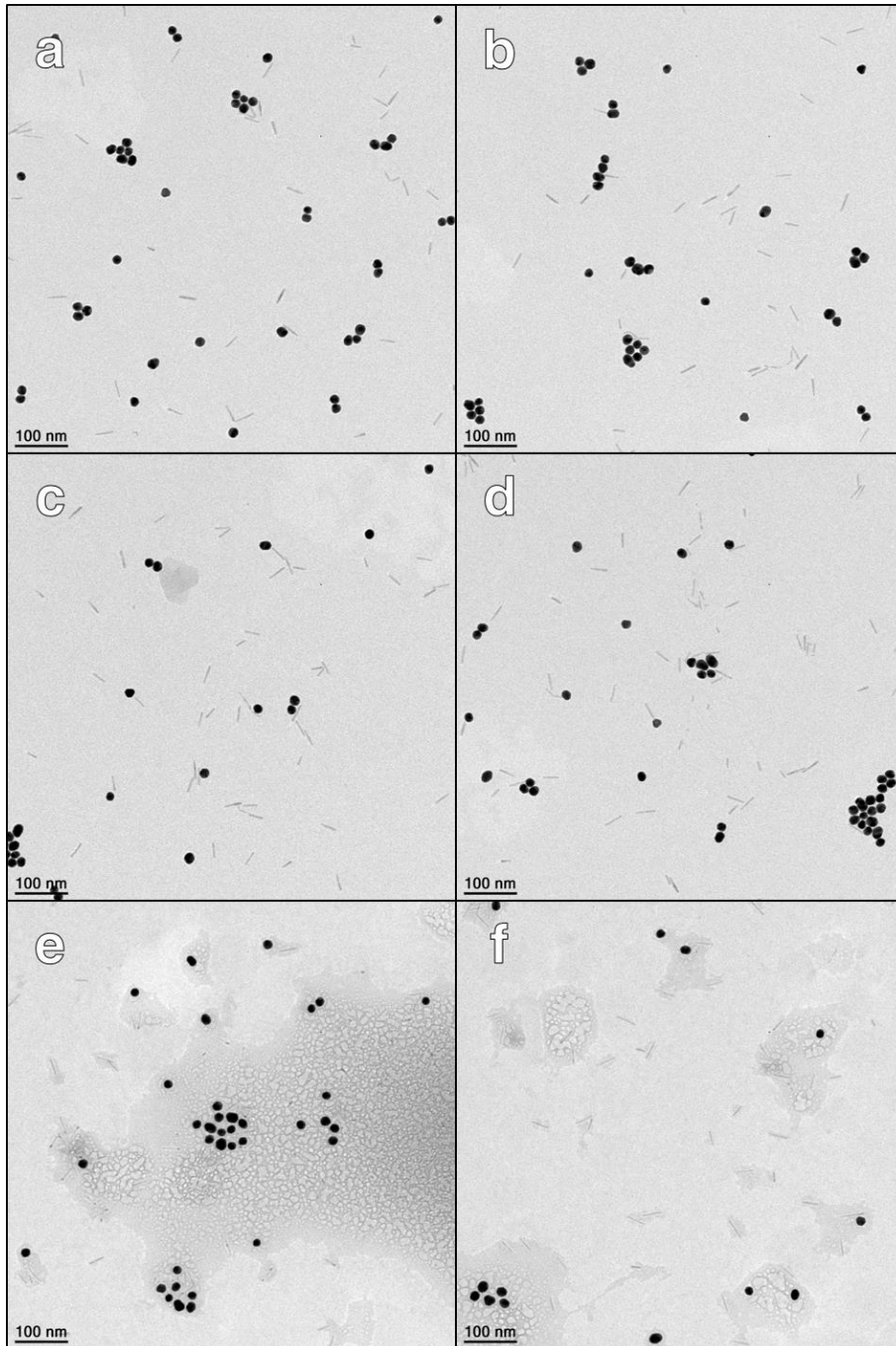


Figure 26. Images TEM (a—d) du mélange complémentaire de QR- α 2 et de AuNP-A3 et (e et f) du mélange non complémentaire de QR- α 2 et de AuNP- α 2.

Cette fois-ci, les contacts observés entre QR- α 2 et AuNP-A3 avec des nanoparticules présentant un nombre réduit de protéines à leur surface semblent plus spécifiques à l'interaction α 2•A3. En effet, contrairement au cas des nanoparticules présentant un nombre important de protéines, le mélange non complémentaire de QR- α 2 et de AuNP- α 2 ne présente pas d'interaction notable entre les deux types de nanoparticules (Figure 26). Malgré les traces de séchage du tampon visible sur la grille d'observation, les QR- α 2 et les

AuNP- $\alpha 2$ restent bien dispersés. Plus précisément, l'analyse statistique des images TEM du mélange non complémentaire montre que sur 130 AuNP comptées, seulement 10 % se retrouvent en contact avec un QR. Ces dernières, en l'absence de l'interaction A3•A3, ne forment ici pas de grappes. Pour le mélange complémentaire, cette fraction de AuNP en contact avec un ou plusieurs QR s'élève à 30 % et confirme la mise en évidence de l'efficacité de la reconnaissance protéine—protéine comme force motrice de l'interaction entre QR et AuNP pour la formation de petits assemblages.

B. Auto-assemblage hybrides sphères—sphères de AuNP et de QD

Pour l'auto-assemblage hybride de nanoparticules semi-conductrices et métalliques, des travaux sont aussi réalisés à partir de deux populations se présentant sous forme de sphère (ou de quasi-sphères), à savoir des QD et des AuNP. Il s'agit ici de réaliser l'auto-assemblage de ces deux types de NP qui ont les chimies de surface les plus faciles à maîtriser et qui présentent la plus grande stabilité.

B.1.i. Propriétés des particules utilisées

Pour ces travaux, les propriétés optiques et morphologiques de AuNP et des QD CdSe/ZnS utilisés sont résumées dans la Figure 27. Il s'agit de AuNP et de QD présentant des diamètres respectifs de $8 \pm 0,9$ nm et de $8,9 \pm 1,4$ nm. Ces QD rouges ne sont pas quasi-sphériques mais plutôt pyramidaux cependant ils présentent l'avantage d'être très faciles à localiser en microscopie électronique par rapport à des QD verts. La stabilité colloïdale des deux types de nanoparticules est assurée par le C5PEG4 dans du tampon NaP à pH 7,4 dans lequel leur bioconjugaison avec les protéines α -Repeat est réalisée. Pour cette étape de bioconjugaison, 100 ou 30 équivalents molaires de protéines sont utilisés. Pour des particules bioconjuguées avec 100 équivalents de $\alpha 2$ et A3, leur observation par microscopie électronique montre l'absence d'agrégats et des particules bien stables (Figure 27a et b). Les AuNP- $\alpha 2$ présentent une bande plasmon centrée sur 520 nm tandis que les QD-A3 présentent une bande d'émission de fluorescence intense et centrée sur 655 nm. Le décalage de la bande plasmon des AuNP par rapport à la bande d'émission de QD rend le recouvrement entre absorption et émission plutôt faible (Figure 27c).

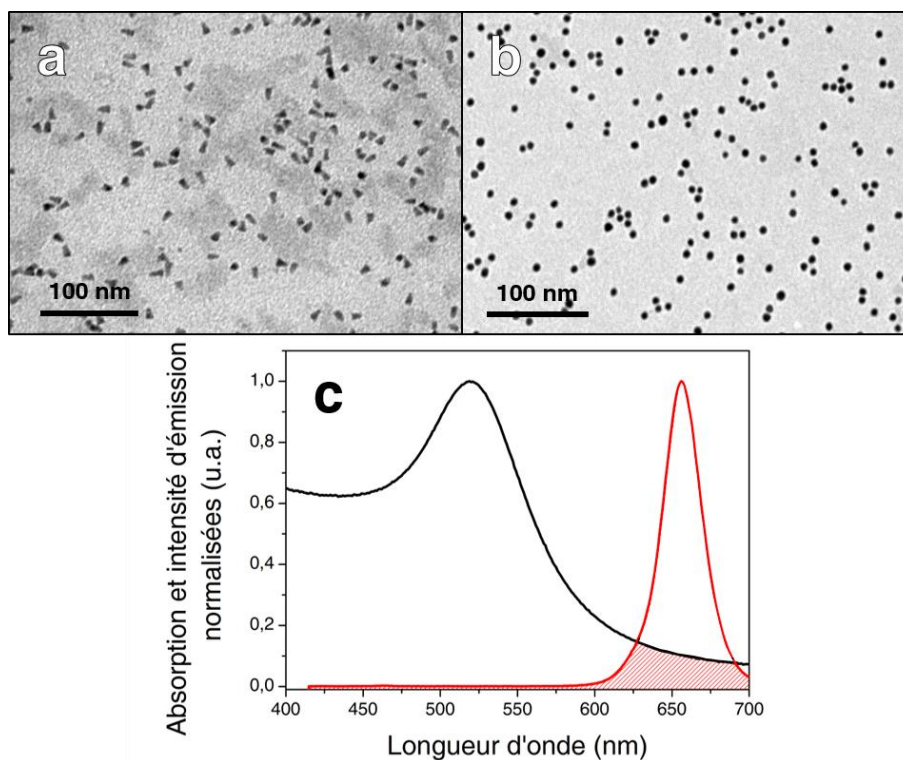


Figure 27. Images TEM (a) des QD-A3 et (b) des AuNP- α 2 dans du tampon NaP pH 7,4 et bioconjugués avec 100 équivalents molaires de protéines. (c) Spectres normalisés de l'absorption des AuNP (courbe noire) et de l'émission de fluorescence des QD (courbe rouge).

B.1.ii. Auto-assemblages hybrides massifs à partir de nanoparticules saturées en protéines

Une première série de travaux porte sur l'auto-assemblage hybride entre de AuNP et de QD saturés en protéines. Pour ce faire, des mélanges sont réalisés à partir d'une suspension de AuNP- α 2 et d'une suspension de QD-A3 toutes deux concentrées à 96 nM. Trois mélanges sont ainsi préparés et présentent différentes concentrations molaires relatives en AuNP- α 2 et en QD-A3 (détails dans la partie expérimentale).

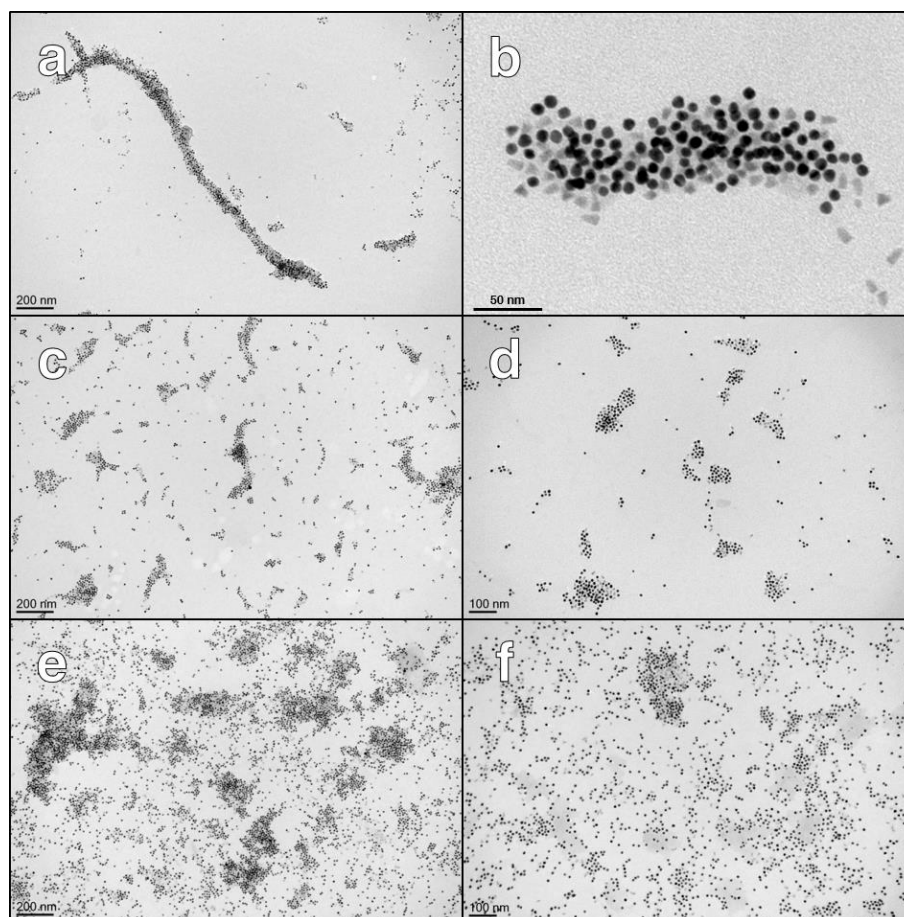


Figure 28. Images TEM des mélanges complémentaires de QD-A3 et de AuNP- α 2 avec des rapports de concentrations molaires QD:AuNP (a et b) de 1:1, (c et d) de 1:2 et (e et f) de 1:5.

Après incubation à 6 °C pendant au moins 24 h, les mélanges sont caractérisés par microscopie électronique (Figure 28). Ces images TEM révèlent la formation d'auto-assemblages hybrides, dirigés par la reconnaissance protéique entre α 2 et A3, et au sein desquels les AuNP et les QD coexistent et s'alternent de façon systématique. Ces assemblages obtenus avec des particules dont la surface est saturée par les protéines α -Repeat sont étendus et comprennent jusqu'à plusieurs centaines de nanoparticules. Le contraste différent entre celui des QD (gris) et celui des AuNP (noires) permettent de bien distinguer les deux types de particules et rend bien compte du caractère hybride des auto-assemblages ainsi formés. Il est également intéressant de noter l'effet du ratio sur la morphologie des agrégats. Pour le ratio 1:1, les structures générées semblent être les plus étendues (Figure 28a et b), tandis qu'un excès de AuNP- α 2 semble générer des assemblages moins grands et laissant de nombreuses particules individuelles. La spécificité du phénomène d'auto-assemblage hybride est vérifiée grâce au contrôle réalisé avec des mélanges non complémentaires de

AuNP- $\alpha 2$ et de QD- $\alpha 2$ au sein desquels les structures auto-assemblées hybrides sont inexistantes (Figure 29).

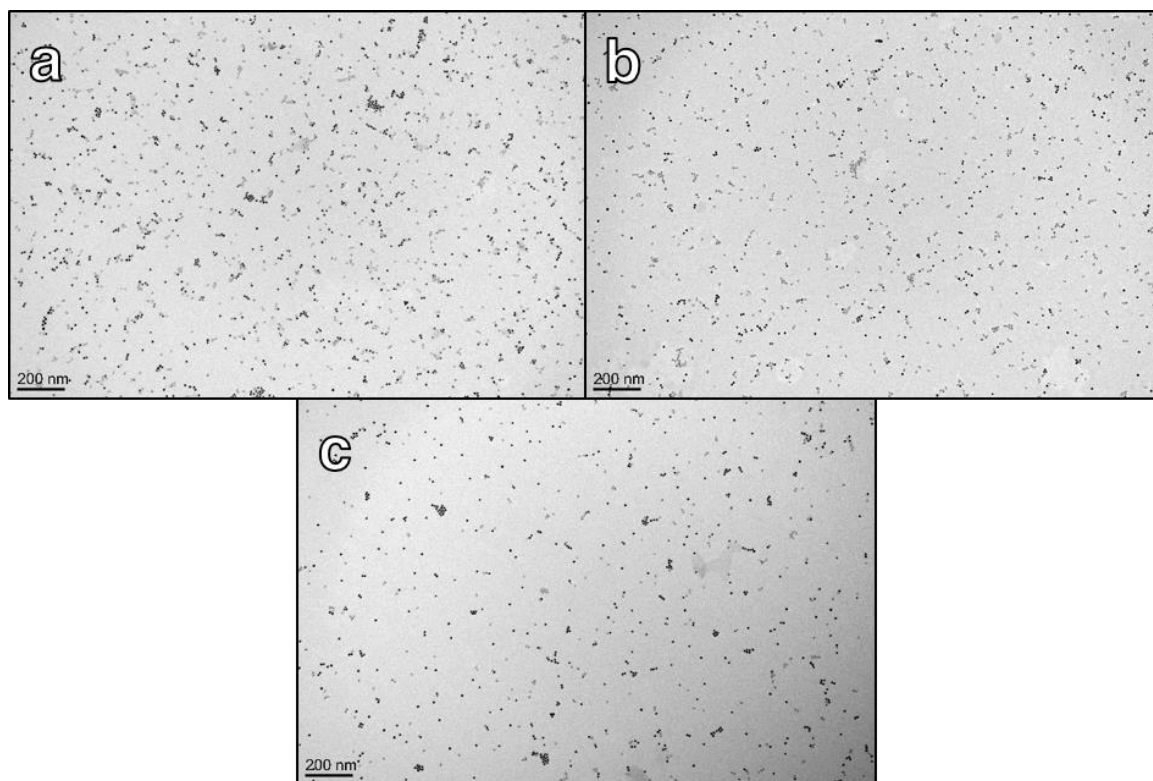


Figure 29. Images TEM des mélanges non complémentaires de QD- $\alpha 2$ et de AuNP- $\alpha 2$ avec des rapports de concentrations molaires QD:AuNP (a et b) de 1:1, (c et d) de 1:2 et (e et f) de 1:5.

B.1.iii. Auto-assemblages hybrides oligomériques

Dans le but de limiter la portée du phénomène d'auto-assemblage hybride entre QD et AuNP, des travaux complémentaires sont réalisés à partir de NP fonctionnalisées avec une quantité réduite de protéines $\alpha 2$ ou A3 (30 équivalents molaires). Pour l'étude de l'influence de cette plus faible stœchiométrie protéine:particule un mélange équimolaire de QD-A3 et de AuNP- $\alpha 2$ est réalisé à une concentration finale en nanoparticules de 90 nM. La microscopie électronique de haute résolution révèle que ces nanoparticules présentant une densité modérée de protéines à leur surface génèrent des nanostructures hybrides auto-assemblées de nature oligomérique (Figure 30).

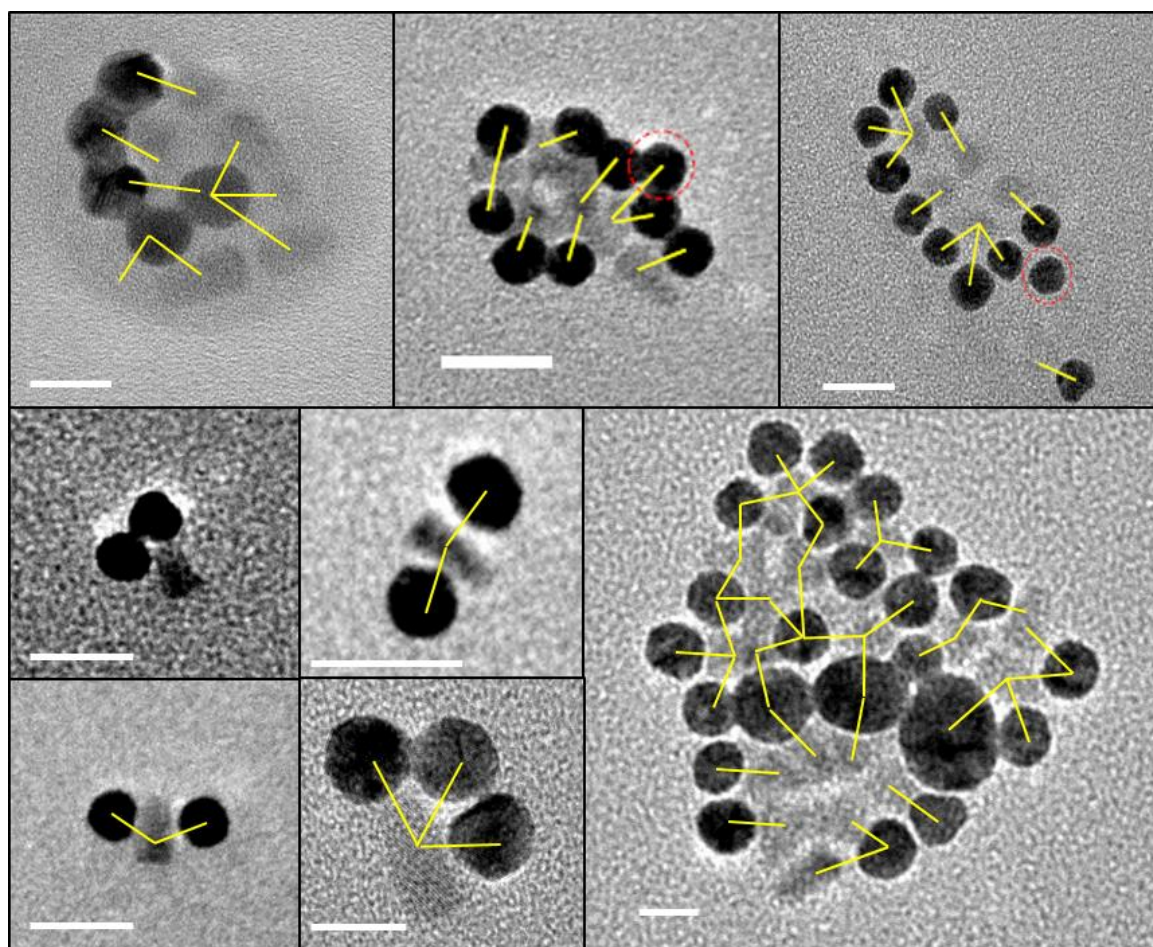


Figure 30. Images HRTEM de petits auto-assemblages de AuNP- α 2 et QD-A3. La barre d'échelle représente 10 nm. Les barres jaunes représentent une paire de QD—AuNP potentiellement reliés par la paire de protéines α 2/A3. Les cercles en pointillés rouges désignent des AuNP qui ne présentent pas de lien évident avec un QD.

Les assemblages de taille très limitée ainsi observés contiennent des nombres de particules bien inférieurs à ceux obtenus avec les particules saturées en protéines. On retrouve ici des dimères, des trimères et des oligomères de quelques dizaines de nanoparticules. De plus, contrairement à l'auto-assemblage de QD fonctionnalisés avec peu de protéines (Partie II.B.2), ces assemblages hybrides se distinguent par l'absence quasi-totale de nanoparticules non assemblées. L'analyse en détail de ces structures auto-assemblées (Tableau 3) montre que plus de 98 % des QD et plus de 90 % des AuNP observés sont compris dans au moins une paire auto-assemblée QD—AuNP.

Tableau 3. Analyse statistique des oligomères de QD—AuNP.

Nombre de QD comptés	QD seuls	Nombre de AuNP comptées	AuNP seules	Nombre de liens QD-AuNP	Nombre de liens moyen par QD	Nombre de liens moyen par AuNP
56	1 (1,7 %)	100	8 (8 %)	104	1,85	1,04

C. Conclusion partielle sur la morphologie des assemblages

Concernant l'auto-assemblage de nanoparticules quasi sphériques, les résultats montrent clairement la capacité du couple $\alpha 2/A3$ à induire un auto-assemblage spécifique. Plus particulièrement, la concentration surfacique en protéine est un paramètre qui permet de moduler la taille des superstructures obtenues. Ainsi le greffage d'un grand nombre de protéines sur la surface des nanoparticules favorise la formation de structures massives. Au contraire, l'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées avec un nombre modéré de protéines semble favoriser la formation d'assemblages réduits. Ce constat est particulièrement clair dans le cas de l'auto-assemblage hybride entre des QD et des AuNP, tandis que l'efficacité de cette stratégie se vérifie moins bien pour l'auto-assemblage de QD.

D'autre part, l'auto-assemblage de nanoparticules anisotropes donne des assemblages moins bien définis avec une orientation mal contrôlée des bâtonnets les uns par rapport aux autres. Ce contrôle partiel peut s'expliquer par la chimie de surface plus difficile à maîtriser dans le cas de GNR. De plus, les nanobâtonnets ont tendance à s'auto assembler par des interactions non spécifiques de type van der Waals (dipôles induits) par leur rapport d'aspect plutôt élevé.

L'analyse par TEM ne permet pas de dégager clairement les propriétés structurales des diverses morphologies d'assemblages observées, il s'agit maintenant d'essayer de mieux quantifier les propriétés structurales et optiques des assemblages de nanoparticules.

Partie IV. Analyse structurale des auto-assemblages

A. Détermination de l'interdistance moyenne QD—QD

Dans le but de caractériser structurellement les nanostructures de QD auto-assemblés, des mesures de diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) ont été effectuées en collaboration avec F. Artzner et C. Mériadec (Institut de Physique de Rennes, Université de Rennes 1). Cette technique de caractérisation de nanomatériaux permet d'obtenir des informations sur leur taille, leur distribution de tailles, leur forme, leur organisation tridimensionnelle ou la structure de leur surface^[16,17]. Elle présente également l'avantage d'être non destructive et de réaliser les mesures in situ, contrairement à la microscopie électronique par transmission qui passe par un processus de dépôt sur grille puis de séchage^a. De plus, les mesures de SAXS permettent de calculer l'interdistance moyenne entre les particules au sein d'un système organisé comme il a été fait pour des AuNP auto-assemblées par des brins d'ADN notamment par le groupe de Mirkin^[18] et sur des systèmes hybrides Au-QD par l'équipe de Oleg Gang et par d'autres groupes encore^[19–22]. La valeur et la définition de l'interdistance permet alors d'en apprendre davantage sur le rôle et l'orientation du couple de protéines α -Repeat $\alpha 2/A3$ et son contrôle est crucial pour comprendre comment relier les propriétés optiques émergentes des superstructures à l'organisation des NP au sein de l'assemblage.

A.1 Principe de la méthode SAXS

La diffusion des rayons X aux petits angles repose sur le phénomène de diffusion de ces rayonnements par un échantillon dont les dimensions caractéristiques sont de l'ordre de l'Angstrom. Cette méthode a été développée originellement pour l'étude des alliages métalliques^[23] mais a été depuis étendue à l'étude d'autres matériaux, tels que les polymères, les systèmes colloïdaux et les macromolécules biologiques. Expérimentalement, un échantillon en solution est illuminé par un faisceau monochromatique de rayons X (Figure 31).

^a D'ailleurs, dans notre cas, ce problème pourrait être contourné en utilisant une méthode de cryofixation en plongeant l'échantillon dans de l'azote liquide pour le geler rapidement.

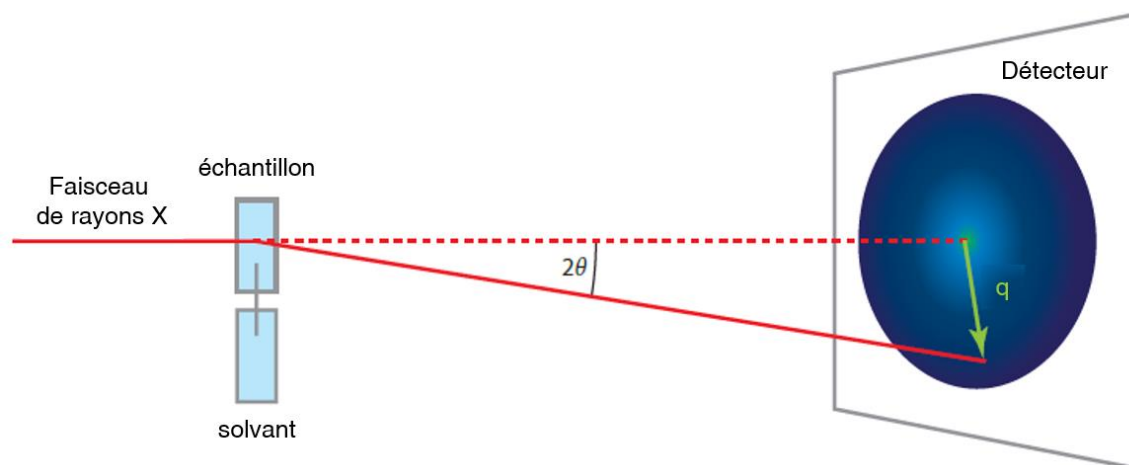


Figure 31. Principe de la diffusion des rayons x aux petits angles. Schéma adapté depuis [24].

L'interaction entre les rayons X de longueur d'onde λ et de la matière ordonnée peut résulter en la déviation de ces rayonnements à travers un phénomène de diffusion inélastique. Ces rayons X diffusés sont alors collectés par un détecteur à deux dimensions qui mesure l'intensité diffusée en fonction de l'angle 2θ . Dans le cas où les distances mesurées sont grandes (de l'ordre de plusieurs nanomètres), les angles de diffraction 2θ sont petits. Pour une distance d_{RX} caractérisant l'organisation d'un système diffusant les rayons X, l'équation de Bragg dans l'espace réciproque permet de relier d_{RX} à q , le vecteur d'onde de l'espace réciproque qui décrit l'angle de diffusion θ (Eq. 1).

$$q = \frac{2\pi}{d_{RX}} = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda} \quad \text{Eq. 1}$$

Le détecteur enregistre ainsi des cercles concentriques formés par les rayons diffusés et leur intégration mène au profil de l'intensité diffusée en fonction de q (en \AA^{-1}). D'un point de vue expérimental, l'intensité du rayonnement X diffusé est proportionnelle à la concentration en particules, c'est pourquoi il est nécessaire de travailler avec des échantillons concentrés (de l'ordre de 100 nM – 1 μM) afin d'obtenir la meilleure résolution possible.

A.1 Auto-assemblages de QR

L'étude structurale des auto-assemblages de QR est réalisée à partir d'un mélange 1:1 de QR- $\alpha 2$ et de QR-A3 dont la morphologie a été présentée dans la Partie II.A de ce chapitre.

Pour ce faire, le profil de diffusion aux petits angles est mesuré pour les suspensions de QR- $\alpha 2$ et QR-A3 séparées puis pour le mélange 1:1 entre ces deux populations (Figure 32).

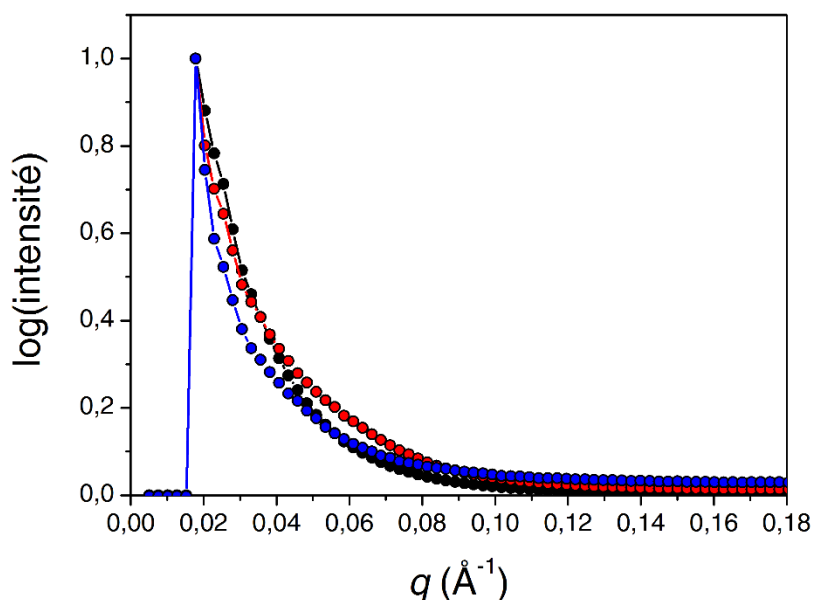


Figure 32. Spectres de diffusion des rayons X aux petits angles des QR-A3 (courbe noire), des QR- $\alpha 2$ (courbe rouge) et d'un mélange 1:1 (courbe bleue).

Les observations par TEM montrent que les QR s'assemblent en fagots imbriqués suivant des interactions latérales et entre pointes sans ordre apparent (Figure 17). Ici, l'absence de pic dans le profil de diffusion du mélange complémentaire confirme l'absence d'une interdistance bien définie. Ces résultats sont donc en accord avec l'auto-assemblage de QR en agrégats massifs sans organisation apparente.

A.2 Méthode et résultats

Pour l'étude structurale de QD auto-assemblés, une série d'échantillons (Tableau 4) ont été préparés et introduits dans des tubes capillaires en verre ou en quartz présentant un chemin optique de 1 mm. Ces échantillons sont réalisés en milieu tampon NaP à pH 7,4 et ont pour intérêt de comparer le signal obtenu pour des QD seuls (QD-A3₁₀₀), avec celui d'un mélange équimolaire de QD (QD-A3₁₀₀ + QD- $\alpha 2$ ₁₀₀) et celui de QD désassemblés par ajout d'un excès de protéine $\alpha 2$ libre (QD-A3₁₀₀ + QD- $\alpha 2$ ₁₀₀ + $\alpha 2$ libre) 24 heures plus tard. Le mélange de QD complémentaires étudié ici est identique à ceux qui ont fourni les auto-assemblages montrés plus haut. Ces mesures par SAXS permettent de sonder

l'interaction responsable de l'auto-assemblage de QD dirigé par la reconnaissance de protéines α -Repeat et d'obtenir des informations structurales quantitatives.

Tableau 4. Détail des échantillons pour la caractérisation des auto-assemblages de QD par SAXS.

Échantillon ^a	Concentration molaire totale (nM)	Concentration massique totale (mg/mL)
QD-A3 ₁₀₀	600	0,46
QD-A3 ₁₀₀ + QD- α 2 ₁₀₀	550	0,43
QD-A3 ₁₀₀ + QD- α 2 ₁₀₀ + α 2 libre	75	0,06

^a Ces échantillons sont préparés avec 100 équivalents molaires de protéines

Les profils de diffusion aux petits angles (Figure 33) sont obtenus après soustraction du signal mesuré à travers un tube capillaire rempli d'eau. Il est intéressant de remarquer que le profil de diffusion du mélange de QD complémentaires (QD-A3₁₀₀ + QD- α 2₁₀₀) présente un pic bien défini pour une valeur de $q = 0,038 \text{ \AA}^{-1}$. Le contrôle effectué avec des QD-A3 seuls ne présente aucune bosse. De plus, le même mélange de QD- α 2 et QD-A3 dans lequel est ajouté un excès de α 2 libre 24 heures plus tard ne présente plus le pic caractéristique de l'interaction entre QD complémentaires : il a complètement disparu (Figure 33, courbe rouge). L'analyse du mélange complémentaire, après soustraction de la ligne de fond, permet d'ajuster la courbe du pic de diffusion observée par une fonction gaussienne centrée sur $q_0 = 0.0364 \text{ \AA}^{-1}$ (Figure 33, insert). Selon la théorie de Debye et Scherrer^[25], ce pic est caractéristique d'un petit cristal avec une interdistance centre à centre entre particules qui vaut $d_{RX} = 17,2 \text{ nm}$. De plus, la largeur du pic Δq_0 vaut $0,0180 \text{ \AA}^{-1}$, ce qui permet de calculer $N = q_0/\Delta q_0 \approx 2$. Cela suggère que cette large diffusion provient d'une fonction de corrélation d'une paire formée par deux QD interagissant de type QD- α 2•QD-A3 comme cela a déjà été observé dans la littérature^[26].

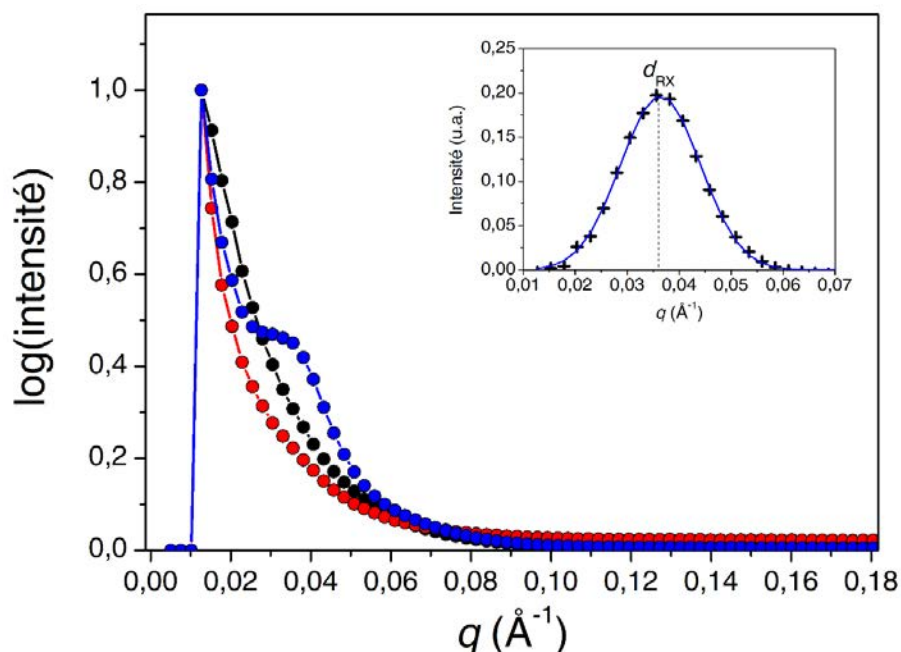


Figure 33. Spectres de diffusion des rayons X aux petits angles des QD-A3 seuls (courbe noire), mélangés avec des QD- $\alpha 2$ (courbe bleue) et le mélange de QD-A3 et QD- $\alpha 2$ dissociés par ajout de $\alpha 2$ libre (courbe rouge). L'encart correspond au pic du mélange QD-A3/QD- $\alpha 2$ (croix noires) et un ajustement de courbe selon une fonction gaussienne (courbe bleue).

A.3 Comparaison de l'interdistance observée dans les mélanges complémentaires avec le complexe formé par les protéines appariées

Pour la compréhension de la structure de l'auto-assemblage entre QD, il est intéressant de comparer la distance d_{RX} observée pour le mélange QD-A3₁₀₀ + QD- $\alpha 2$ ₁₀₀ à la taille du complexe $\alpha 2/A3$. Comme la méthode par SAXS mesure les distances « centre à centre » entre les deux particules interagissant. Ainsi la distance $d_{RX} = 17,2$ nm est alors déduite de la position du pic observé dans le profil de diffusion du mélange QD-A3₁₀₀ + QD- $\alpha 2$ ₁₀₀. Comme le diamètre moyen d des QD utilisés ici est de $8,9 \pm 1,4$ nm, la distance « bord à bord » entre QD est déduite par simple soustraction et vaut donc $8,3 \pm 1,4$ nm (voir Figure 34).

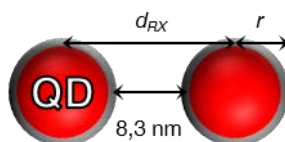


Figure 34. Représentation schématique de d , l'interdistance centre à centre entre deux QD auto-assemblés et de rayon r .

Par ailleurs, l'interdistance bord à bord mesurée par TEM entre les QD auto-assemblés (Figure 11) est mesurée afin de la comparer à la distance bord à bord déterminée par SAXS

(Figure 35a). Une interdistance moyenne de $7,6 \pm 2,5$ nm est mesurée par TEM, ce qui est tout à fait en accord avec la mesure par SAXS.

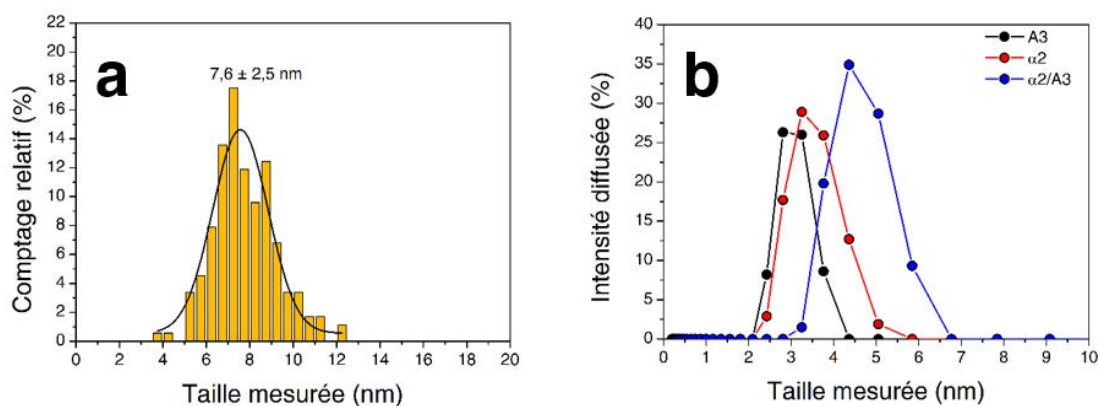


Figure 35. (a) Distribution statistique des tailles bord à bord mesurées manuellement à partir des clichés TEM des assemblages de QD. (b) Mesure de la taille des protéines $\alpha 2$ et A3 et du complexe $\alpha 2/A3$ par DLS.

De plus, la valeur de cette interdistance correspond bien à la taille attendue du complexe $\alpha 2 \cdot A3$. La construction schématique représentée en Figure 36a montre les dimensions du complexe $\alpha 2 \cdot A3$ déterminée par diffraction des rayons X^[27].

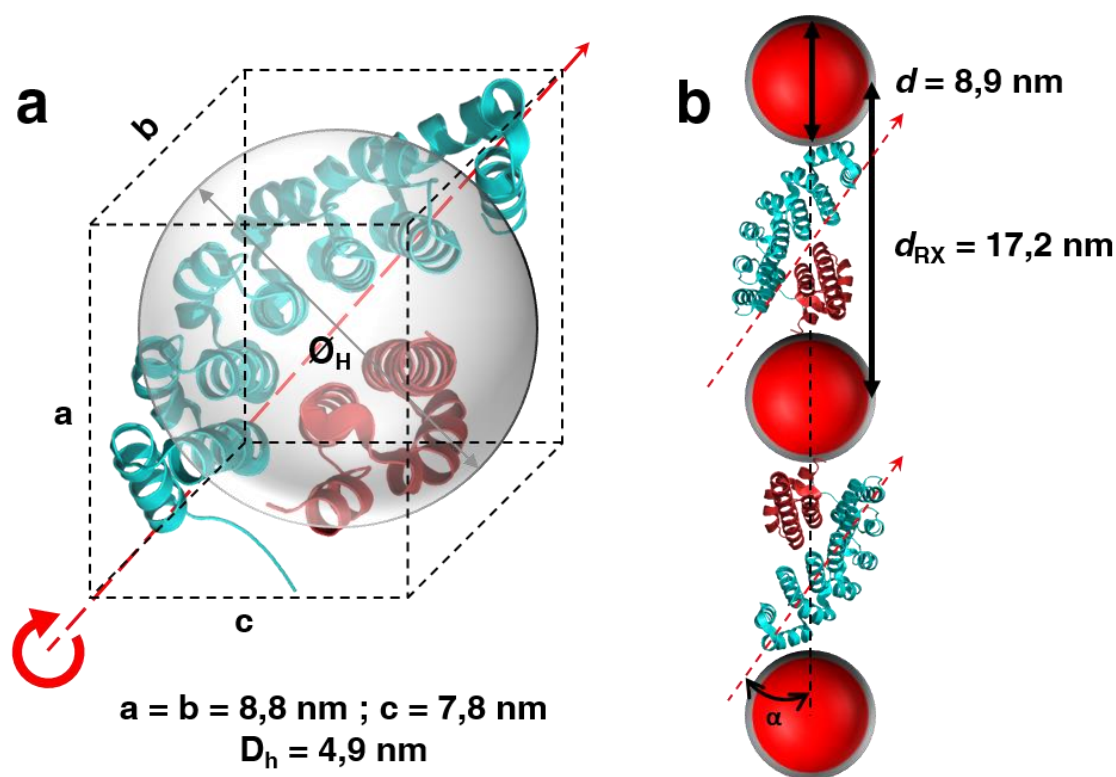


Figure 36. (a) Construction schématique du rayon hydrodynamique \varnothing_H et des paramètres cristallographiques du complexe $\alpha 2 \cdot A3$. (b) Modèle schématique de l'interdistance d_{RX} en fonction du diamètre d des QD au sein des assemblages QD·QD.

Il apparaît que l'espace séparant deux QD adjacents correspond bien aux tailles attendues du complexe $\alpha 2 \cdot A3$ et la structure de l'auto-assemblage induit par le complexe peut être schématisé selon la Figure 36b. De plus, la taille hydrodynamique du complexe $\alpha 2 \cdot A3$ a été aussi déterminée par DLS (Figure 35b). Le diamètre hydrodynamique \varnothing_H est mesuré pour chaque protéine et pour mélange équimolaire de $\alpha 2$ et A3 incubé à 6 °C pendant une heure (Figure 35). Séparément, $\alpha 2$ et A3 présentent un \varnothing_H respectif de $3,4 \pm 0,06$ nm et $3,0 \pm 0,16$ nm. Après une heure d'incubation, le mélange de ces 2 protéines présente un pic correspondant à un diamètre hydrodynamique \varnothing_H de $4,8 \pm 0,16$ nm qui est en accord avec la formation du complexe spécifique $\alpha 2 \cdot A3$.

En conclusion, la structure des assemblages de QD étudiée par TEM et par SAXS, révèle une interdistance assez bien définie de l'ordre de 8 nm tout à fait compatible avec la formation du complexe de protéines induit par la reconnaissance moléculaire entre $\alpha 2$ et A3. Ce phénomène d'auto-assemblage est de plus réversible puisque l'ajout d'un excès de protéines libres fait disparaître le pic caractéristique de l'assemblage ce qui s'explique par la dissociation des complexes QD- $\alpha 2 \cdot A3$ -QD par effet entropique. Il faut remarquer que cette réversibilité n'a pas été facile à obtenir par TEM

B. Cas des auto-assemblages hybrides QD-AuNP

Concernant l'auto-assemblage QD-AuNP dont la morphologie est efficacement contrôlée selon le nombre de protéines greffées à la surface des NP, des mesures sont effectuées à partir des images TEM (Figure 37).

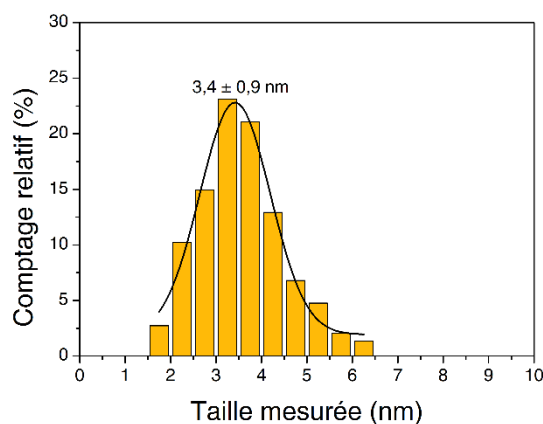


Figure 37. Distribution statistique de l'interdistance entre QD et AuNP auto-assemblés.

Cette interdistance QD—AuNP de $3,4 \pm 0,9$ nm est en accord avec celle mesurée par TEM ($3,5 \pm 0,1$ nm), par SEM ($4,3 \pm 0,1$ nm) et par simulation 2D d'une fonction d'autocorrélation (environ 5,5 nm) au sein des auto-assemblages de AuNP•AuNP^[10]. Elle est bien inférieure à l'interdistance d_{RX} entre QD auto-assemblées déterminée au sein des assemblages QD•QD par SAXS et par TEM. De plus les interdistances mesurée pour les assemblages hybrides QD•AuNP et AuNP•AuNP sont très proches. Cette observation suggère que la présence des particules d'or induit une interdistance différente de celle que l'on retrouve dans les assemblages QD•QD. Il est possible que, dans le cas des assemblages en présence de AuNP, le complexe $\alpha 2 \cdot A 3$ adopte une conformation différente de celle que l'on retrouve entre deux QD adjacents. Le greffage privilégié par le Cystag ou par le Histag pour au moins une des deux protéines peut modifier la conformation ou l'orientation du complexe entre les deux particules.

Partie V. Influence de l'auto-assemblage sur les propriétés optiques

A. Couplage d'exciton entre QD auto-assemblés

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, l'auto-assemblage de QD dirigé par les protéines α -Repeat permet de positionner les QD à une distance moyenne de $8,3 \pm 1,4$ nm. À cette distance, nous attendons des effets de couplage exciton—exciton entre QD auto-assemblés. Pour étudier l'influence de l'auto-assemblage dirigé par les protéines α -Repeat sur les propriétés optiques des QD, la photoluminescence de mélanges de QD complémentaires (réalisés avec des populations QD- $\alpha 2$ et QD-A3 bioconjugués avec 100 équivalents molaires de protéines) est caractérisée par spectroscopie de fluorescence avant et après auto-assemblage. Pour ce faire, les spectres d'émission des QD- $\alpha 2$ et des QD-A3 avant leur mélange sont utilisés comme références. Une fois les mélanges de populations complémentaires préparés, leur spectre d'émission de fluorescence sont enregistrés après 24 heures d'incubation à 6 °C, ce qui est une durée suffisante pour la formation de ces nanostructures auto-assemblées. Les Figure 38a et b montrent ainsi les spectres d'émission de fluorescence des QD pour différents ratio de mélange et le comportement de leur luminescence.

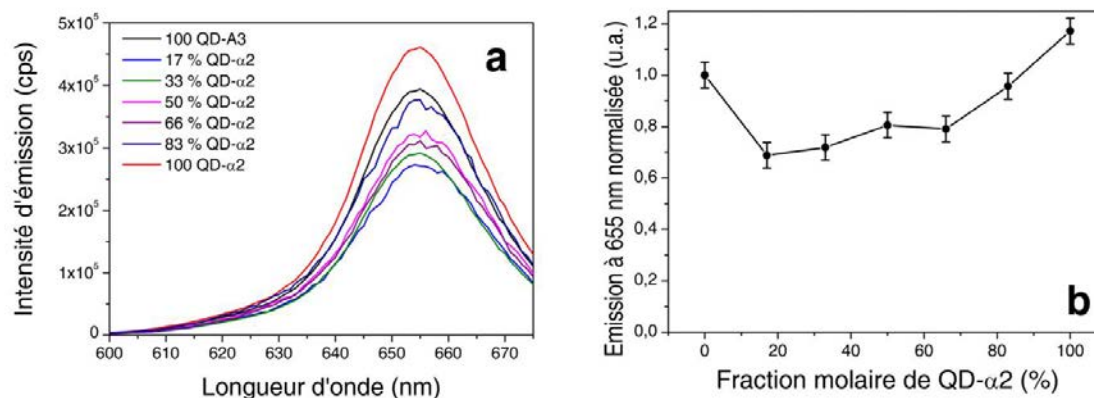


Figure 38. (a) Spectres d'émission de fluorescence des QD séparés et des QD auto-assemblés ($\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm). (b) Évolution de l'émission des QD à 655 nm normalisée.

Il apparaît ici que la fluorescence des QD décroît de façon progressive à mesure que l'on ajoute des QD- $\alpha 2$ dans une solution de QD-A3 et présente un extremum pour les ratios correspondant à la formation de superstructures. La perte de luminescence est modérée puisque l'intensité d'émission reste supérieure à 70 % de son intensité de départ. L'émission retrouve sa valeur initiale lorsque les QD- $\alpha 2$ sont en excès. L'extinction de la fluorescence de QD agrégés ou auto-assemblés est un phénomène que l'on retrouve dans la littérature^[5,28–32]. Aucun décalage du maximum d'émission n'accompagne cette diminution de l'intensité de fluorescence. Ainsi on peut raisonnablement exclure un transfert d'énergie de type homo-FRET puisque nous n'observons pas de décalage de l'émission des QD vers de plus grandes longueurs d'onde.

Des mesures de fluorescence résolue en temps réalisée avec les assemblages de QD fournirait la durée de vie de leur fluorescence qui, par comparaison avec celle des QD- $\alpha 2$ et des QD-A3 seuls, permettrait d'accéder à une meilleure compréhension de leurs propriétés optiques.

B. Fluorescence de QD couplés à des nanoparticules plasmoniques

Nous réalisons maintenant l'étude des propriétés optiques des nanostructures auto-assemblées hybrides entre des NP semi-conductrices et des NP métalliques afin d'étudier les interactions exciton—plasmon induites par la reconnaissance des protéines α -Repeat.

B.1 QD—GNR

Pour étudier les propriétés optiques des nanostructures auto-assemblées composées de GNR et de QD, l'évolution de l'intensité de fluorescence des QD a été suivie selon deux

paramètres: d'une part le rapport de concentration molaire entre QD et GNR et d'autre part la position de la bande plasmon des GNR₆₉₅ et GNR₇₃₀ (Figure 17) pour faire varier le recouvrement entre l'émission QD (émetteur) et l'absorption des GNR (accepteur).

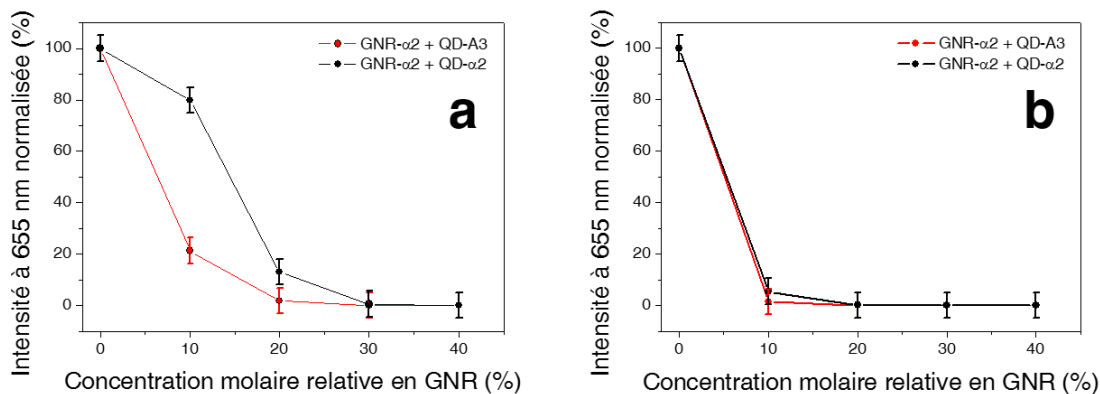


Figure 39. Évolution de la fluorescence normalisée des QD à 655 nm pour différentes concentrations relatives en GNR dans des mélanges de GNR et de QD complémentaires ou non avec des GNR₇₃₀ (a) ou des GNR₆₉₅ (b). Les spectres bruts sont regroupés dans l'Annexe III.

Ici, des nouvelles séries de mélanges entre des QD et des GNR sont réalisées avec des suspensions en nanoparticules à 23 nM (voir le détail des mélanges effectués en partie expérimentale). Le suivi de l'intensité de fluorescence des QD-A3 révèle une extinction progressive à mesure que la concentration relative en GNR-α2 augmente (Figure 39a et b, courbes rouges). Cette diminution de l'intensité de fluorescence ne correspond pas à la simple dilution des QD-A3 causée par l'ajout des GNR-α2. L'utilisation de GNR-A3 non spécifiques (Figure 39a et b, courbes noires) montre une extinction de fluorescence moins rapide qui démontre le caractère spécifique de l'interaction entre GNR-α2 et QD-A3.

D'autre part, le recouvrement spectral entre émetteur et accepteur a une forte influence sur l'extinction de fluorescence des QD-A3. Quand les GNR₆₉₅ sont ajoutés à la suspension de QD-α2 (Figure 39b), la luminescence de ces derniers est très rapidement éteinte dans son intégralité. En revanche, l'assemblage de QD-A3 avec des GNR₇₃₀ (Figure 39a) laisse apparaître une extinction de fluorescence plus progressive.

Les mesures effectuées ne montrent pas d'augmentation de l'intensité d'émission de QD-A3 au contact des GNR-α2, ce qui correspondrait au phénomène de fluorescence exaltée par le métal (MEF). L'exaltation de la fluorescence des QD en présence de GNR a été rapporté à travers différents travaux^[33,34]. Dans notre étude, les positions relatives des bandes plasmons des GNR et de la bande de fluorescence de QD ne permettent pas un tel

phénomène. Pour parvenir à cette exaltation, il faudrait utiliser des QD dont l'émission correspond à une énergie plus faible que l'énergie correspondant à la résonance plasmon des GNR. Ici, le recouvrement spectral donne lieu à de l'extinction spécifique de fluorescence. Ce phénomène est en accord avec la littérature et témoigne d'interactions exciton—plasmon très fortes^[35-37]. Les assemblages hybrides entre GNR et QD résultent, induisent par excitation directe des QD des transferts d'énergie des QD vers les GNR et une augmentation des recombinaisons non radiatives^[38]. Ces transferts d'énergie s'opèrent à faible distance par des interactions coulombiennes et proviennent du couplage entre l'exciton des nanoparticules semi-conductrices et le plasmon des nanoparticules métalliques. Ici, l'auto-assemblage entre QD et GNR impose une faible distance bien définie d entre QD et GNR. Le transfert d'énergie s'opérant entre QD et GNR pourrait, dans ce cas, correspondre au phénomène décrit par Kotov *et al.* dans leur étude théorique^[39] Ils indiquent que dans le cas d'une faible interdistance, le transfert d'énergie est proportionnel à $1/d^4$ ce qui s'approche d'une loi de transfert dipôle-surface. Pour les GNR- $\alpha 2$ et des QD- $\alpha 2$ non assemblés, si la distance moyenne d entre GNR et QD est plus grande Kotov *et al.* expliquent que les transferts d'énergie de l'exciton vers la particule métallique sont proportionnels à $1/d^6$.

B.2 QD—AuNP

De la même façon, nous cherchons à étudier les interactions exciton—plasmon au sein des assemblages AuNP—QD que nous avons eu l'occasion de présenter dans la Partie III.B. Pour cette étude, nous utilisons les 3 séries de mélanges qui ont permis de caractériser la morphologie des assemblages. Des mélanges spécifiques entre QD-A3 et AuNP- $\alpha 2$ ainsi que des mélanges non spécifiques entre QD-A3 et AuNP-A3 ont été caractérisés par spectroscopie de fluorescence. En parallèle, nous avons caractérisé également des mélanges de compétition composés de QD-A3 et AuNP- $\alpha 2$ en présence de $\alpha 2$ libre. La spectroscopie de fluorescence permet de suivre l'évolution de l'émission des QD-A3 dans ces différentes conditions (Figure 40).

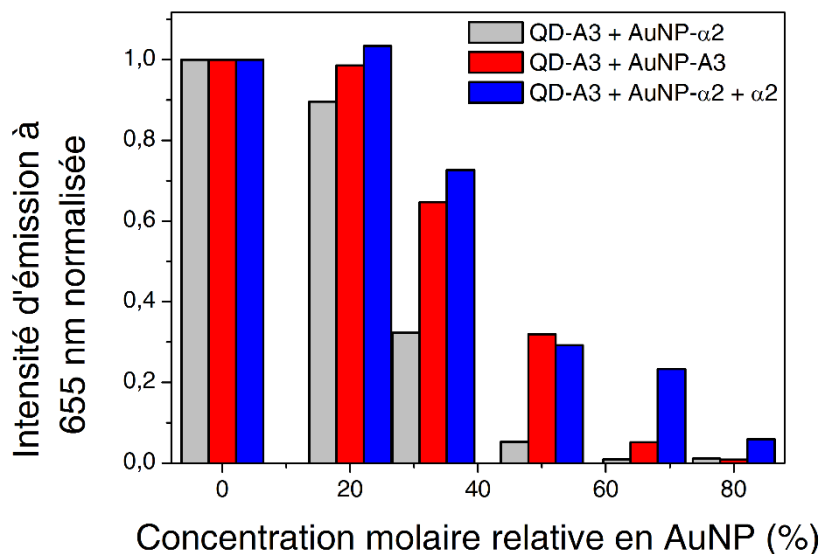


Figure 40. Histogrammes montrant l'évolution de la fluorescence de QD-A3 en présence de AuNP dans des conditions non spécifiques, spécifiques ou de compétition. Les spectres bruts sont regroupés dans l'Annexe III.

Ces résultats montrent que l'auto-assemblage dirigé par les protéines joue sur les interactions exciton—plasmon au sein des nanostructures hybrides formées. D'abord, il apparaît que le mélange des AuNP-A3 et des QD-A3 induit une diminution progressive de l'intensité d'émission des QD par simple dilution des QD-A3 (Figure 40, barres rouges). Au-delà de 60 % de AuNP, un effet supplémentaire induit une plus grande baisse de la fluorescence. Cette dernière observation peut être attribuée à la dimérisation de A3 qui assemble quelques NP entre elles lorsque l'on atteint les plus grandes concentrations en AuNP-A3. Quand les AuNP sont fonctionnalisées avec α 2, les interactions spécifiques α 2•A3 induisent une extinction plus rapide (pour des pourcentages plus faibles en AuNP) de la luminescence des QD-A3 (Figure 40, barres grises). Pour ces mélanges, les 100 % d'extinction sont atteints avec un mélange équimolaire dans lequel l'ensemble des QD et des AuNP sont potentiellement assemblés. Ici, l'interdistance entre QD et AuNP de l'ordre de 4 nm imposée par le couple de protéines favorise à la fois un transfert d'énergie des QD (donneurs) vers les AuNP (accepteurs) et une augmentation des recombinaisons non radiatives. Le mauvais recouvrement spectral entre la bande plasmon des AuNP et la bande d'émission des QD ne permet pas l'exaltation de leur fluorescence par MEF. Enfin, lorsque l'assemblage de NP est réalisé en présence d'un excès important de protéines α 2 libres, une compétition a lieu dans l'appariement entre α 2 et A3. La petite protéine α 2 libre est sensée s'associer plus facilement aux QD-A3 que des AuNP- α 2, ce qui donnera un mélange dans

lequel des complexes QD-A3•a2 coexistent avec les AuNP- α 2. Ces deux complexes NP-protéines ont ensemble des interactions exciton—plasmon minimales. La fluorescence d'un tel mélange (Figure 40, barres bleues) est en effet égale ou supérieure à l'intensité de fluorescence du mélange non spécifique. Lorsque la concentration relative en AuNP est élevée, la formation des complexes QD-A3• α 2 semble limiter les interactions entre QD-A3 (dues à la dimérisation de A3). Dans ce cas, l'évolution de la fluorescence des QD-A3 s'approche d'une diminution linéaire que l'on attendrait par la simple dilution de ces QD.

Pour comprendre l'extinction de fluorescence au sein des assemblages QD—AuNP, il est intéressant de la comparer à celle obtenue au sein des assemblages QD—QD. Comme nous l'avons montré dans la sous-partie V.A., l'auto-assemblage entre QD induit une diminution de 30 % de la valeur initiale de l'intensité d'émission des QD-A3 purs (Figure 38) et elle augmente à nouveau dès que les QD- α 2 sont en excès. La forte réduction de la fluorescence QD observée dans le cas des assemblages hybrides QD—AuNP ne peut donc pas être attribuée au procédé d'assemblage ou à la modification des propriétés de diffusion par une augmentation effective de la constante diélectrique locale mais est directement liée aux recombinaisons non radiatives induites par le plasmon des AuNP.

Partie VI. Cas particulier de dimères de QD

A. Observations

A.1 Morphologie

Lors de la mise au point des auto-assemblages de nanoparticules, il a été observé fortuitement que la bioconjugaison des QD-SH-PEG-COOH (150 nM) avec la protéine A3 (100 équivalents, 15 μ M) induit la formation de dimères observés par TEM (Figure 41 et Figure 42). Ce phénomène est observé pour un échantillon laissé au repos pendant 15 jours après sa purification. Plusieurs aspects de ce phénomène sont notables. D'abord, la fréquence du phénomène de dimérisation observé est élevée puisque l'analyse statistique des clichés TEM obtenus indique que sur 1000 particules, 58 % des QD observés sont impliqués dans des dimères contre seulement 17 % de QD laissés à l'état de particules uniques. D'autre part, ce phénomène semble très spécifique car très peu de structures organisées autres que les dimères (telles que des trimères ou des oligomères plus massifs) peuvent être observées. Dans le but d'observer plus précisément l'organisation et l'interface entre ces QD dimérisés,

des observations par HRTEM ont été réalisées sur la plateforme THEMIS (Université de Rennes 1) avec l'assistance technique de V. Dorcet et L. Rault (Figure 42). En plus de mettre en lumière la géométrie quasi-tétraédrique des QD utilisés (Qdot 655 ITK, Thermo Fisher Scientific), ces images de microscopie de haute résolution mettent en évidence une interdistance bien définie de $1,9 \pm 0,13$ nm entre les bases des deux tétraèdres positionnés l'un contre l'autre.

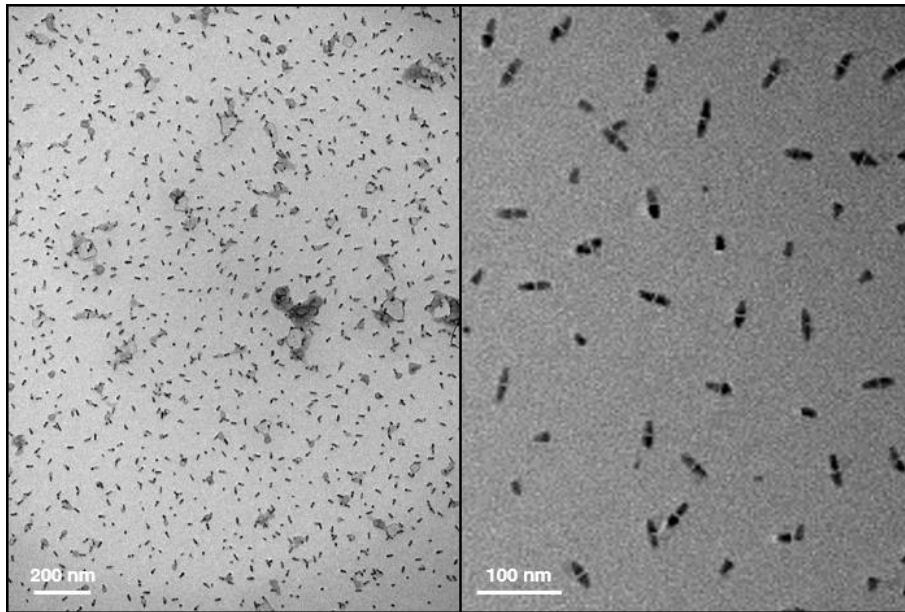


Figure 41. Images TEM d'un échantillon de QD-A3 présentant des dimères de QD en proportions importantes.

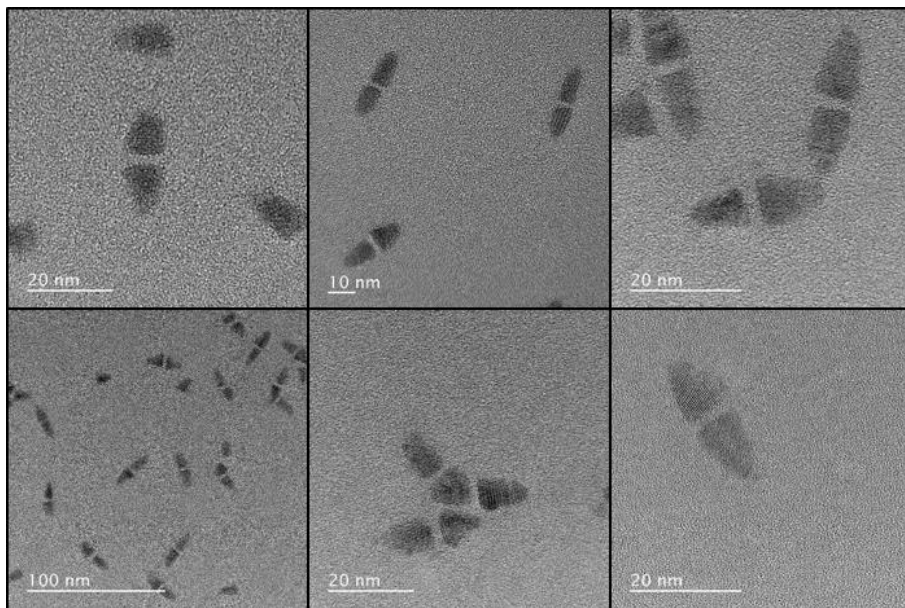


Figure 42. Images HRTEM des dimères de QD-A3.

A.2 Taille hydrodynamique et fluorescence

En complément de ces observations par microscopie électronique, la caractérisation de cet échantillon particulier est effectuée par DLS et par spectroscopie de fluorescence (Figure 43).

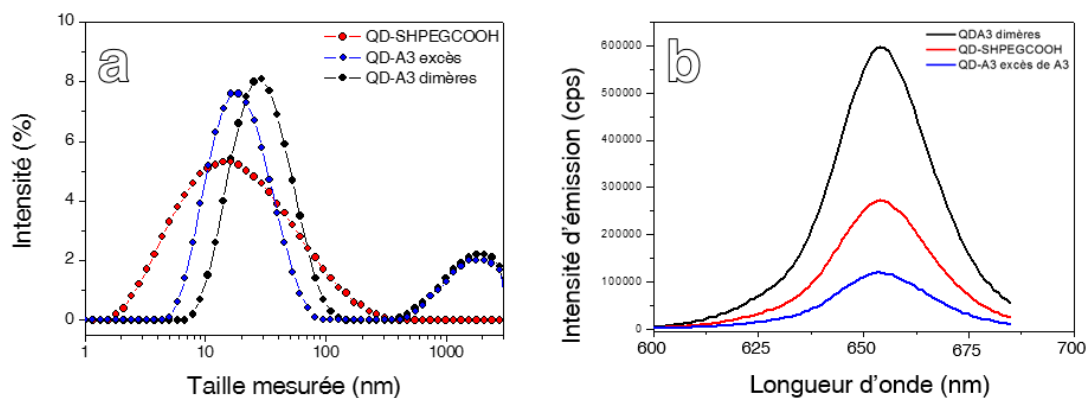


Figure 43. (a) Mesure par DLS du diamètre hydrodynamique des QD avant et après dimérisation et (b) évolution du spectre d'émission de fluorescence des QD avant et après leur dimérisation ($\lambda_{exc} = 350$ nm).

La mesure du diamètre hydrodynamique des QD et de leur intensité d'émission de fluorescence sont effectuées sur les QD-SH-PEG-COOH, QD-A3 et QD-A3 dimère (vus par TEM). Les QD-SH-PEG-COOH présentent une intensité de fluorescence élevée comme attendu pour des QD stabilisés par ce ligand monothiol (dont la structure est détaillée dans le Tableau 1 du Chapitre II). D'autre part, ces QD hydrophiles présentent une distribution de leur diamètre hydrodynamique centrée sur 15 nm et assez large, qui témoigne de leur stabilité moins satisfaisante que celle de QD fonctionnalisés avec les ligands peptidiques possédant un encrage tricysteine (comme le C5PEG4 et le C3E6D). Les mêmes mesures sont effectuées sur des QD-A3 incubés pendant 24 heures avec un excès de protéines A3 (100 équivalents molaires) sans purification. La DLS indique une augmentation du diamètre hydrodynamique moyen qui est désormais de 19 nm ce qui est en accord avec le greffage des protéines A3 sur la surface des particules. La mesure du spectre d'émission de fluorescence de ces « QD-A3 en excès » indique une perte de 56 % de l'intensité de fluorescence émise à 655 nm, ce qui est un résultat attendu pour un encrage polyvalent sur la surface des QD. Finalement, la caractérisation de la taille des particules de l'échantillon comportant les dimères de QD indique un diamètre hydrodynamique (33 nm) supérieur à celui des QD en présence de l'excès de A3, ce qui est en accord avec le diamètre hydrodynamique d'un dimère composé de deux QD. De plus, l'intensité de fluorescence à

655 nm des QD contenus dans cet échantillon se révèle être 4,9 fois supérieure à celle des mêmes QD avant leur purification (Figure 43). Le phénomène de dimérisation observé par TEM et par DLS semble ainsi causer l'exaltation de la fluorescence des QD-A3.

B. Discussion

B.1 Structure cristalline, morphologie des QD et ligand utilisé

Le phénomène de dimérisation observé au sein de ces échantillons de QD-A3, est spécifique à cet échantillon et à sa préparation. Tout d'abord, comme il peut être très clairement déduit des clichés HRTEM montrés en Figure 42, les QD utilisés ne sont pas sphériques. Au contraire, ces particules présentent en microscopie une silhouette triangulaire qui correspond à la structure tétraédrique. Il a été montré dans la littérature que l'anisotropie de telles particules peut induire des interactions sélectives entre faces cristallines. Comme l'ont montré Chen *et al.*, le contrôle des conditions de l'assemblage par séchage de QD CdSe/CdS tétraédriques a permis de mettre au point différentes superstructures constituées de particules tétraédriques^[40,41] (Figure 44). Ce phénomène d'assemblage est attribué aux attractions de type Force de Van der Waals entre les faces cristallines entre les faces $\{10\bar{1}1\}$ et entre les faces $\{0002\}$ des QD tétraédriques (Figure 44d). La base du tétraèdre $\{0002\}$ n'a pas la même nature cristalline que les trois autres faces $\{10\bar{1}1\}$.

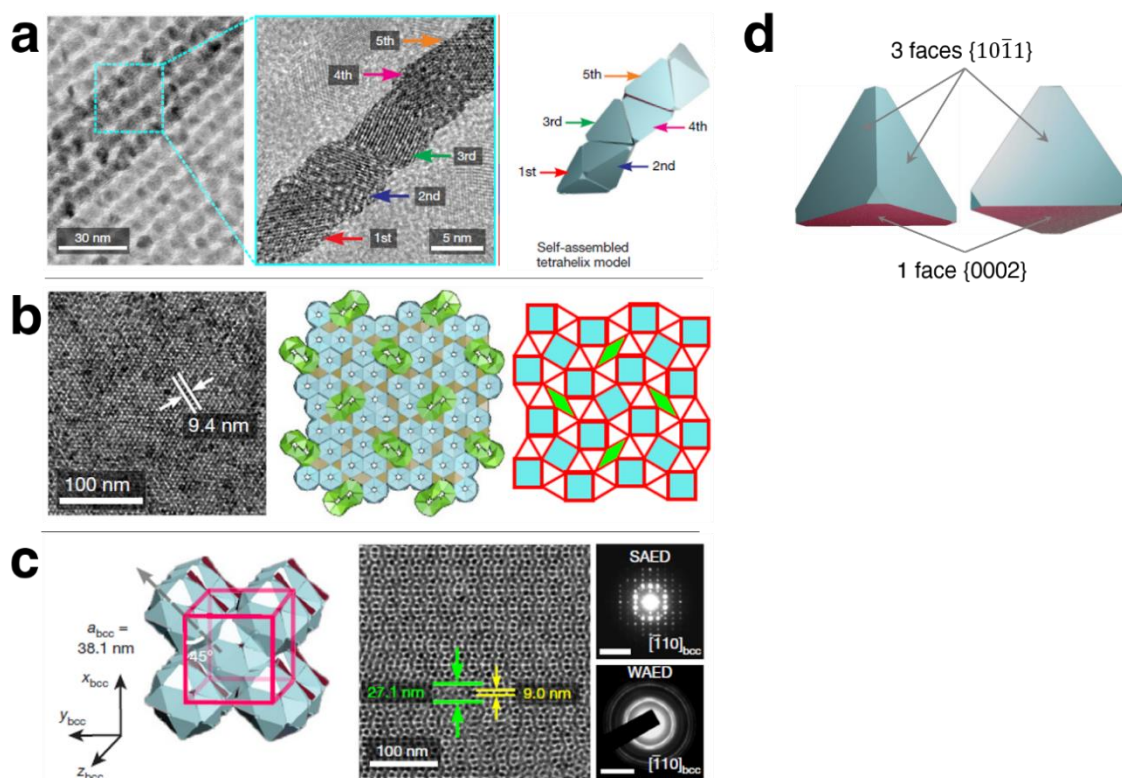


Figure 44. QD tétraédriques assemblés (a) en chaîne de Boerdijk-Coxeter, (b) en super réseau ou (c) en super cristaux. (D) représentation schématique d'un QD tétraédrique présentant les faces cristallines caractéristiques. Images tirées de [40].

D'autre part, les observations par microscopie électronique des QD-SHPEGCOOH purifiés de l'excès de ligands révèle la formation de dimères semblables à ceux observés dans l'échantillon de QD-A3. Ceci n'a jamais été observé sur les QD avec les ligands dérivés de l'encrage tricystéine. Cette tendance est attribuée au fait que le ligand n'a pas une affinité aussi forte que l'encrage tricystéine et donc les interactions entre face restent encore suffisamment importantes pour induire la formation de dimères de QD.

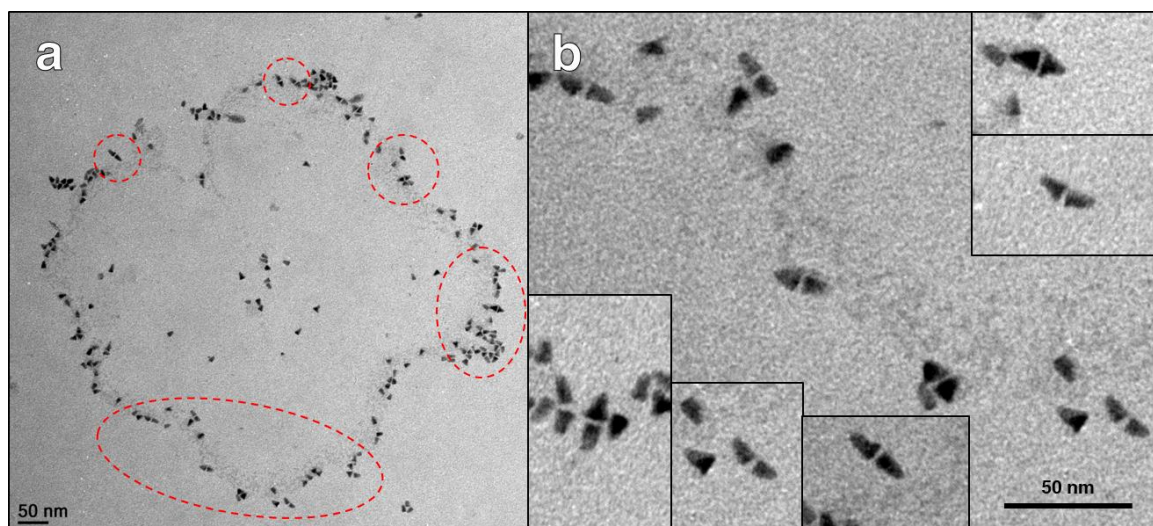


Figure 45. Images TEM de QD-SHPEGCOOH 48 heures après leur purification. (a) Vue générale (les zones encadrées présentent des dimères de QD) et (b) compilation de gros plans montrant les dimères observés dans l'échantillon de QD-SHPEGCOOH (la barre d'échelle est la même pour tous les plans).

L'analyse statistique des clichés obtenus révèle que la dimérisation reste mineure. On trouve en effet, sur 937 QD comptés, 134 QD sont impliqués dans des dimères soit 14 %. Cette proportion de QD dimérisés est nettement inférieure à celle trouvée avec les QD-A3 qui est, pour rappel, de 58 % soit presque 4 fois plus importante. Cette différence statistique montre qu'il existe une autre force motrice dans le cas des QD-A3.

B.2 Le dimère A3•A3

Dans ce contexte, la présence de protéines A3 greffées à la surface des QD est naturellement envisagée comme cofacteur favorisant la dimérisation très fréquente des QD-A3. Cette dimérisation a été observée lorsque l'excès de protéine A3 est purifié. Il est connu que les protéines A3 ont tendance à former un dimère avec une constante de dissociation de l'ordre du 37 ± 6 nM^[42]. En défaut de protéine libre, les protéines A3 immobilisées à la surface des QD peuvent former un dimère entre elles. Comme les contraintes géométriques sont trop grande pour former un dimère « intra » (à la surface d'un même QD), la formation du dimère « inter » (entre deux QD) devient plus favorable avec une cinétique lente. L'échantillon de dimères a été obtenu 15 jours après l'élimination des protéines A3 en excès. Comme les faces de type $\{0002\}$ ont une affinité inhérente à leur cristallinité, la formation possible d'un dimère de A3 peut contribuer à favoriser et stabiliser cet état de QD dimérisés. Ce phénomène paraît être une explication raisonnable de ce cas particulier.

L'analyse de l'interdistance définie au sein d'un dimère de QD donne une valeur de $1,9 \pm 0,1$ nm (Figure 46a), ce qui correspond à la largeur du dimère A3•A3 mesurée à l'aide du logiciel PyMOL (environ 1,9 nm) (Figure 46b). L'hypothèse qui semble raisonnable peut être alors modélisée par un dimère A3•A3 dans l'espace séparant les deux particules (Figure 46c).

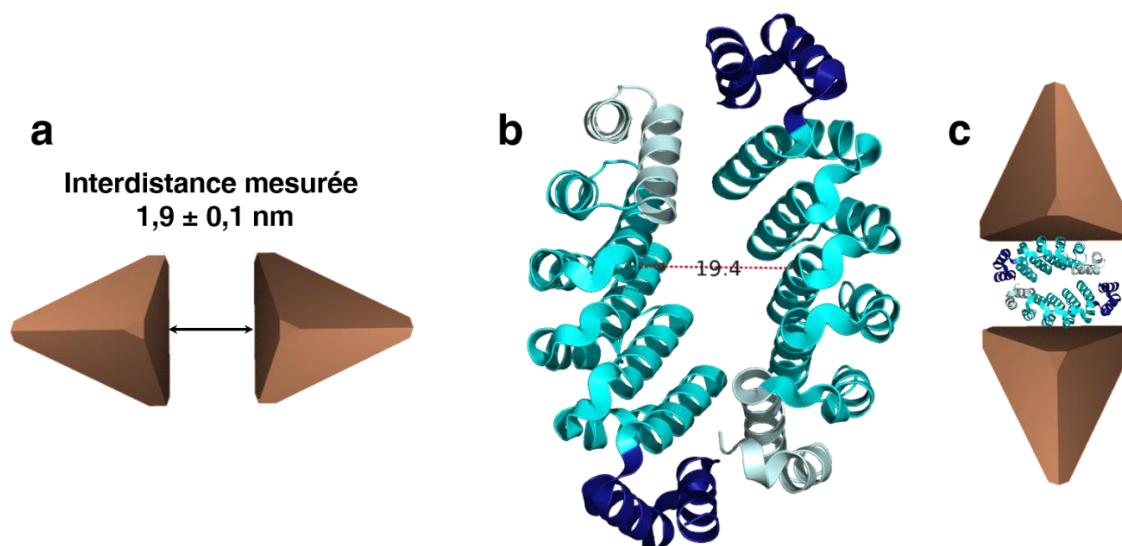


Figure 46. (a) Représentation schématique de l'interdistance entre deux QD assemblés en dimère, (b) mesure de la largeur du dimère A3•A3 (en angström) effectuée avec PyMOL et (c) représentation schématique d'un dimère de QD-A3 formé par l'appariement de deux protéines A3.

Afin de montrer le rôle de la protéine A3 dans cet assemblage nous avons tenté de dissocier ces dimères en présence de la protéine compétitrice $\alpha 2$ (Figure 47a). Mais ici l'ajout de 100 équivalents molaires de $\alpha 2$ ne résulte pas en la dissociation des QD. Les observations TEM révèlent, après 24 h d'incubation, des agrégats massifs de dimères (Figure 47b). Il semble donc qu'il reste des protéines libres A3 susceptible d'interagir avec $\alpha 2$ qui permet de lier les dimères entre eux. Ce scénario ne peut s'effectuer qu'à deux conditions. Tout d'abord, les protéines $\alpha 2$ injectées peuvent se greffer directement sur la surface des QD-A3 ce qui n'est pas exclu puisque A3 est en déplétion. D'autre part, ces protéines $\alpha 2$ greffées peuvent se complexer avec des protéines A3 libres sur la surface d'autres QD. Si ces deux conditions sont respectées alors la construction schématique (Figure 47c) est un mécanisme d'assemblage cohérent des dimères de QD-A3.

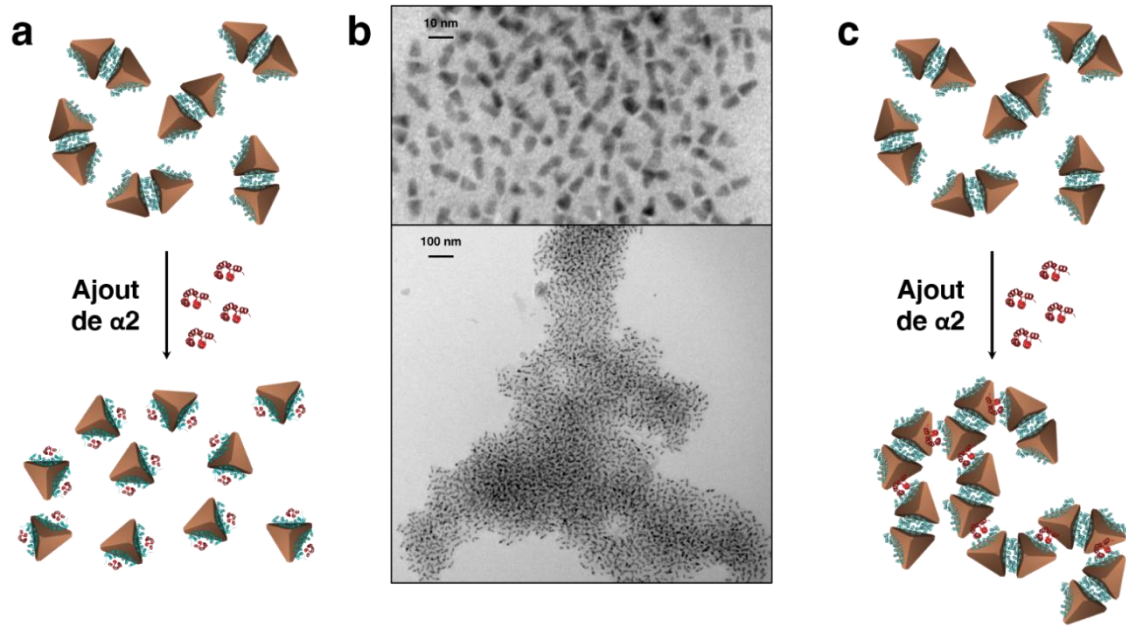


Figure 47. (a) Synoptique de la dissociation des dimères de QD-A3 par ajout de $\alpha 2$ libre. (b) Images TEM de QD-A3 incubés pendant 24 h avec 100 équivalents molaires de $\alpha 2$ libre. (c) Synoptique de la formation d'assemblages de dimères reliés par des complexes $\alpha 2 \cdot A3$.

C. Conclusion sur la formation des dimères de QD

Le mécanisme de formation de ces dimères de QD-A3 semble être le fruit d'un ensemble de facteurs, à savoir leur forme, le ligand utilisé et le dimère de A3. Ce phénomène de dimérisation semble être d'une part dû aux interactions sélectives entre faces cristallines favorisées par un ligand monothiol qui ne stabilisent pas les QD de façon pérenne. De plus, la formation du dimère de protéines A3 stabilise cet état de dimère et permet d'obtenir la haute fréquence de dimérisation observée (58 %). Malgré les très belles images obtenues par TEM et HRTEM, nous n'avons pas réussi à rendre reproductible l'obtention de ces dimères. Cet état semble résulter d'un difficile concours de circonstances qui malheureusement ne sont pas maîtrisées.

Partie VII. Vers des auto-assemblages orthogonaux

Dans le cadre des auto-assemblages de NP dirigé par les protéines α -Repeat, un projet a été développé pour la mise au point de nanostructures orthogonales. Selon cette approche, au moins deux sites de reconnaissance sont utilisés pour diriger l'auto-assemblage de NP. Ces deux positions sont indépendantes et permettent d'assembler plusieurs entités selon différentes voies possibles. Pour de telles structures, l'utilisation de constructions protéiques multi-domaines est une voie intéressante pour le contrôle de l'interdistance. Ici, nos travaux ont pour objectif de mettre à profit une protéine bi-domaine artificielle basée sur la structure α -Repeat.

A. Une protéine α -Repeat bi-domaine

En reprenant la structure de protéines α -Repeat bien établies, l'équipe de P. Minard a développé des protéines de fusion au caractère divalent. En effet, ces biomolécules chimères conservent l'activité de reconnaissance de chaque protéine de départ^[42]. Une protéine α -Repeat bi-domaine a été présentée, basée sur la protéine A3^[27] (que nous avons déjà présenté dans ce manuscrit) et une protéine mise au point pour reconnaître la *green fluorescent protein*^[43] (GFP) surnommée bGFP^[44]. Ces deux protéines sont connectées par un linker flexible SGGGG^[45] comme le montre la construction génétique en Figure 48. Il est intéressant de remarquer que la structure de cette protéine de fusion contient un Histag à l'extrémité N-terminale de la protéine A3, qui peut servir de point d'encrage pour le bi-domaine sur une surface inorganique de type CdSe ou ZnS.

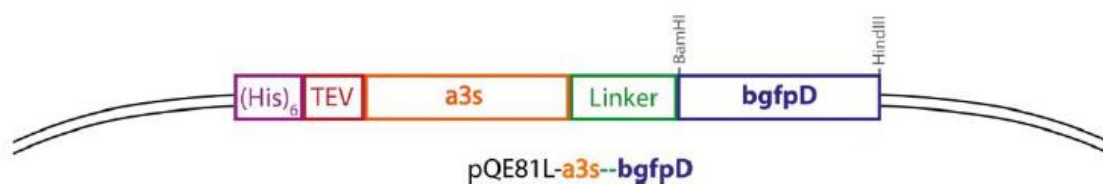


Figure 48. Construction génétique du bi-domaine A3_bGFP (extraite de ^[42]).

L'étude des propriétés structurales et fonctionnelles de cette protéine de fusion montrent qu'elle adopte une conformation fermée en coquille bivalve en absence de ligands (Figure 49).

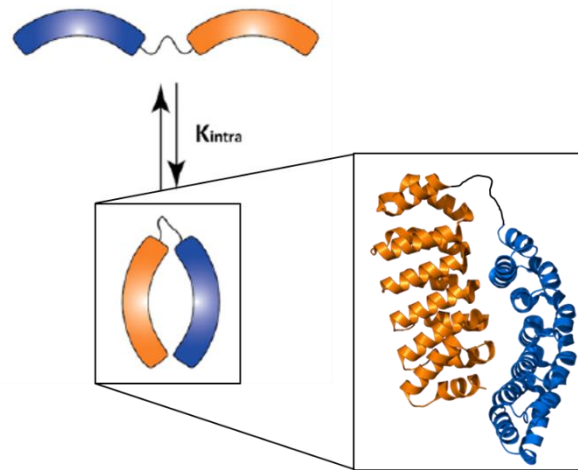


Figure 49. Phénomène de repliement et d'ouverture de la protéine bi-domaine A3_bGFP ainsi que sa représentation ruban sans linker SGGGG. Le domaine A3 est en orange tandis que le domaine bGFP est en bleu.

La force de cette protéine chimère est qu'un changement de conformation s'opère lors de la fixation d'un premier ligand ($\alpha 2$ ou GFP) et l'ouverture du bi-domaine a un effet coopératif pour la fixation du second partenaire moléculaire^[42]. Dans le cadre de nos travaux, l'idée est de montrer que cette construction protéique peut être utilisée pour la mise au point de nanostructures orthogonales.

B. bGFP sur QD

Dans un premier temps, nous travaillons avec le domaine bGFP seul dans le but de vérifier s'il est possible de conserver son affinité pour la GFP (dont K_D initial est de 5 ± 2 nM^[42]) après son greffage sur la surface de QD. Le complexe bGFP•GFP est présenté en Figure 50a.

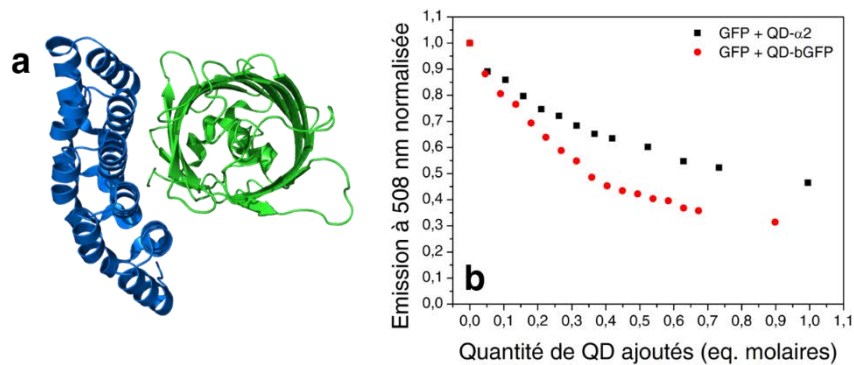


Figure 50. (a) Représentation ruban du complexe entre le bGFP (en bleu) et la GFP (en vert). (b) Évolution de la fluorescence de la GFP ($\lambda_{em} = 488$ nm) au cours de l'ajout de QD spécifique ou non.

La fonctionnalisation de QD de 9 nm de diamètre ($\lambda_{em} = 655 \text{ nm}$) avec le bGFP est effectuée à l'aide d'un Cystag présent à l'extrémité C-terminale et selon les méthodes présentées précédemment. La conservation de l'interaction bGFP•GFP est étudiée à travers le suivi de la fluorescence d'une solution de GFP dans laquelle sont ajoutés des QD (Figure 50b). Lorsque les QD injectés sont bioconjugués avec une protéine non spécifique, l'intensité d'émission de fluorescence de la GFP décroît progressivement jusqu'à environ 50 % de sa valeur initiale pour 1 équivalent molaire de QD ajoutés. Cette extinction s'explique par effet diélectrique des QD ajoutés qui favorisent les recombinaisons non radiatives. Toutefois, une extinction de fluorescence plus prononcée est observée lorsque des QD-bGFP. La faible taille du complexe bGFP•GFP induit une faible distance QD—GFP propice à un transfert d'énergie entre GFP et QD de type FRET. Ces résultats confirment donc la conservation de l'interaction spécifique entre bGFP et GFP après greffage sur des QD.

C. Assemblage orthogonal hybride AuNP—QD

À partir du bi-domaine A3_bGFP, nous envisageons une construction orthogonale hybrides QD—AuNP dans laquelle la GFP pour être ajoutée afin de former des assemblages GFP•QD•AuNP (Figure 51). Le caractère orthogonal de cette construction permet de réaliser l'assemblage dans un autre sens que celui présenté en Figure 51, c'est-à-dire que les molécules de GFP peuvent être d'abord assemblées autour des QD, suivies des AuNP.

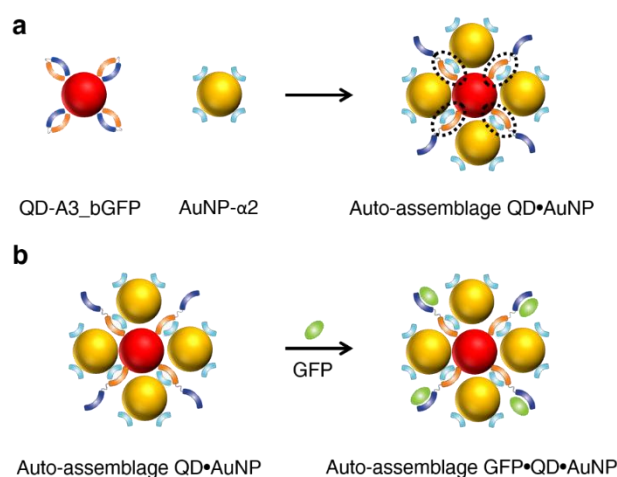


Figure 51. Principe de la construction orthogonale envisagée. (a) Dans un premier temps, l'auto-assemblage entre des QD et des AuNP est assuré par la formation du complexe $\alpha 2 \cdot A3$ qui ouvre le bi-domaine. Les cercles noirs pointillés indiquent les complexes $\alpha 2 \cdot A3$ formés. (b) La reconnaissance orthogonale de la GFP par bGFP permet de former un complexe auto-assemblage orthogonal GFP•QD•AuNP.

Dans le but de mettre au point cette construction orthogonale, le greffage de la protéine bi-domaine A3_bGFP sur les QD est caractérisé par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 52). La migration électrophorétique des QD est progressivement ralentie à mesure que la quantité de A3_bGFP ajoutée augmente, ce qui confirme le greffage de cette protéine sur les NP à l'aide de son Histag. La quantité importante de protéine nécessaire à la saturation des QD (autour de 300 équivalents molaires) indique une probable bicouche de A3_bGFP autour des NP du fait de la dimérisation bGFP_A3•A3_bGFP qui peut être opérée par ce bi-domaine^[42].

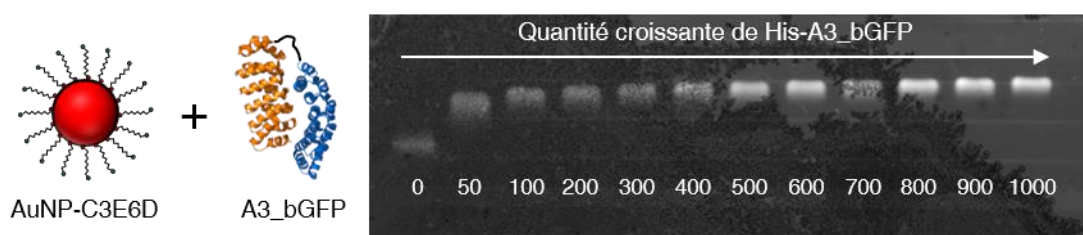


Figure 52. Photographies de fluorescence de migrations électrophorétiques sur gel d'agarose de QD de 9 nm de diamètre fonctionnalisés par du C3E6D et incubés 12 h avec des quantités croissantes de A3_bGFP. Les valeurs représentent le nombre d'équivalents de QD en protéines et $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm.

Par la suite, un mélange 1:1 de QD-A3_bGFP et de AuNP- $\alpha 2$ montre une migration électrophorétique intermédiaire à celles des NP séparées (Figure 53, puits iv, v et vi). Il est intéressant de remarquer que le même phénomène se présente avec des AuNP-A3_bGFP et des QD-A3 (Figure 53, puits i, ii et iii). L'absence de Cystag dans la structure de la protéine bi-domaine indique que son greffage sur les AuNP est non spécifique.

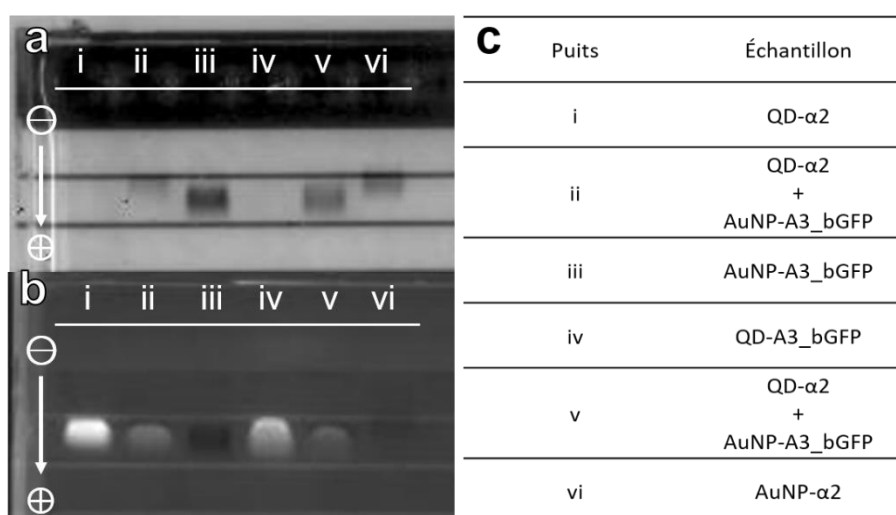


Figure 53. Photographies (a) en lumière visible et (b) en fluorescence de la migration électrophorétique de mélanges QD + AuNP. (c) Détail des mélanges et des NP-protéine seules.

L'auto-assemblage spécifique entre AuNP et QD dirigé par $\alpha 2$ et la fonction A3 de la protéine di-domaine est suivi par spectroscopie de fluorescence (Figure 54).

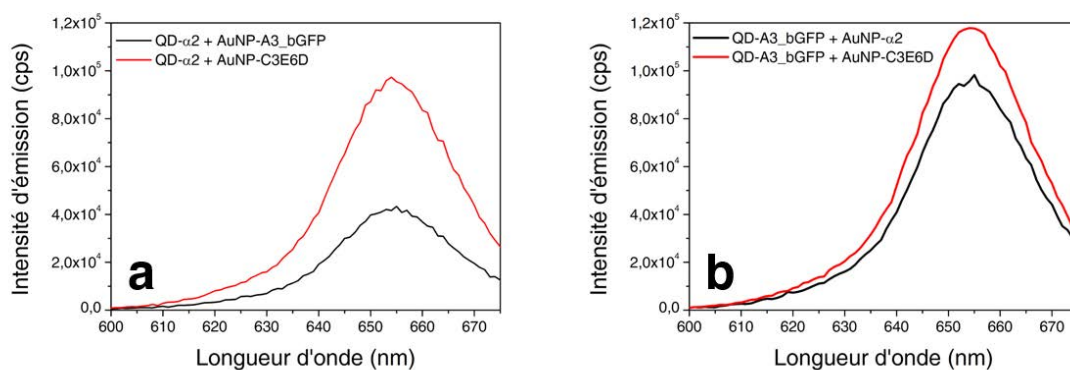


Figure 54. Spectres d'émission de mélanges QD + AuNP (a) avec QD- $\alpha 2$ et AuNP-A3_bGFP et (b) avec QD-A3_bGFP et AuNP- $\alpha 2$ et leurs contrôles préparés avec des AuNP-C3E6D. Les rapports de concentration QD:AuNP sont de 1,25:1 pour (a) et 2,4:1 pour (b).

Il apparaît que la fluorescence des QD est plus éteinte lorsqu'ils sont mélangés avec les AuNP complémentaires qu'avec des AuNP-C3E6D non complémentaires. Selon le même raisonnement que celui développée pour la caractérisation des propriétés optiques des auto-assemblages de QD et AuNP dirigé par le complexe $\alpha 2 \cdot A3$, le phénomène d'extinction de fluorescence observé ici correspond à des interactions exciton-plasmon permises par la faible distance séparant QD et AuNP auto-assemblés. Pour ces assemblages obtenus avec le bi-domaine positionnée sur les QD ou sur les AuNP, la distance attendue entre les deux particules est la même que celle mesurée pour le complexe $\alpha 2 \cdot A3$ (Partie IV.).

Finalement, la reconnaissance orthogonale de la GFP par la fonction bGFP de la protéine bi-domaine est étudiée à travers le suivi de la fluorescence de la GFP au sein des assemblages de QD et de AuNP (Figure 55a). Il est attendu qu'après auto-assemblage entre ces deux NP, la partie bGFP de la protéine bi-domaine soit disponible pour la reconnaissance de sa cible protéique. De plus, les travaux de l'équipe de P. Minard ont montré que la reconnaissance du premier partenaire favorise la reconnaissance du second^[42].

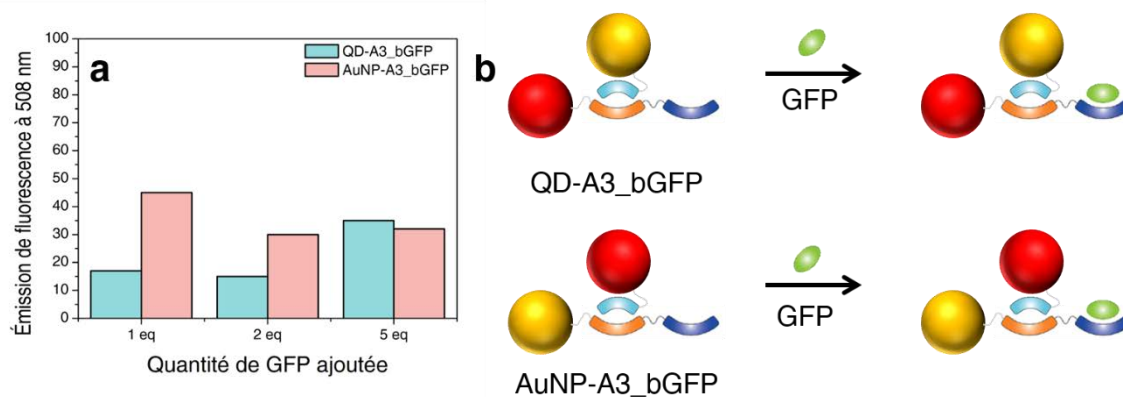


Figure 55. (a) Histogrammes montrant l'évolution de différentes quantités de GFP injectées dans un mélange QD- $\alpha 2$ + AuNP-A3_bGFP ou dans un mélange QD-A3_bGFP + AuNP- $\alpha 2$ par rapport à la GFP seule sans QD ni AuNP ($\lambda_{exc} = 400$ nm). (b) Synoptiques de la reconnaissance orthogonale de la GFP par des assemblages QD—AuNP : la GFP est plus éloignée des AuNP lorsque le bi-domaine est immobilisé sur les AuNP.

Ici, nous observons que la fluorescence de la GFP s'éteint au contact des assemblages composés de QD et d'AuNP. Toutefois, pour de faibles quantités de GFP injectées, l'extinction de sa fluorescence est plus forte lorsque la protéine bi-domaine est immobilisée sur les QD. La fluorescence de la GFP ne subit pas la même extinction du fait de la distance entre AuNP et GFP potentiellement plus grande lorsque la protéine bi-domaine est greffée sur les AuNP (Figure 55b)

Conclusion

Ce chapitre avait pour objectif de rendre compte de l'auto-assemblage de NP semi-conductrices et de NP métalliques à travers l'interaction spécifique entre protéines artificielles α -Repeat. Aussi, l'objectif était de présenter l'analyse structurale et optique des nanostructures auto-assemblées formées.

Dans un premier temps, l'auto-assemblage de nanoparticules semi-conductrices a été étudié. Nous avons montré par électrophorèse et par microscopie électronique l'auto-assemblage de QD. La formation du complexe protéique $\alpha 2/A3$ permet d'induire avec un contrôle précis de l'interdistance dont l'analyse par SAXS révèle une valeur inférieure à 10 nm. Cette observation prouve que ces protéines peuvent être utilisées en tant qu'espaceur rigide permettant de fixer une interdistance entre NP auto-assemblées. Pour les auto-assemblages de QD, la modification de la stœchiométrie protéine/NP permet une modulation assez limitée de la morphologie des structures formées. D'autre part, l'auto-assemblage de QR dirigé par la reconnaissance protéique est réalisé avec un contrôle moins important et aboutit sur des assemblages désorganisés.

Par la suite, nous avons abordé l'auto-assemble hybride entre des nanoparticules métalliques et des nanoparticules semi-conductrices. Une première partie de ce travail montre l'assemblage de AuNP et de QD en des nanostructures qui ont été caractérisée par microscopie électronique. Leur morphologie de ces assemblages peut être contrôlée en fonction de la stœchiométrie protéine/NP. De cette façon, nous pouvons former des nanostructures hybrides AuNP—QD allant de plusieurs dizaines de particules à des trimères. De plus, la comparaison de leurs propriétés optiques avec celles des assemblages de QD révèlent les fortes interactions exciton—plasmon produites par l'interdistance inférieure à 10 nm qu'induit le couple de protéines $\alpha 2/A3$. En parallèle, l'utilisation de nanoparticules anisotropes (QR ou GNR) permet de réaliser d'autres nanostructures hybrides métal—semi-conducteur QR—AuNP et QD—GNR. Ces derniers assemblages montrent également une extinction spécifique de la fluorescence des QD générée par la reconnaissance des protéines α -Repeat.

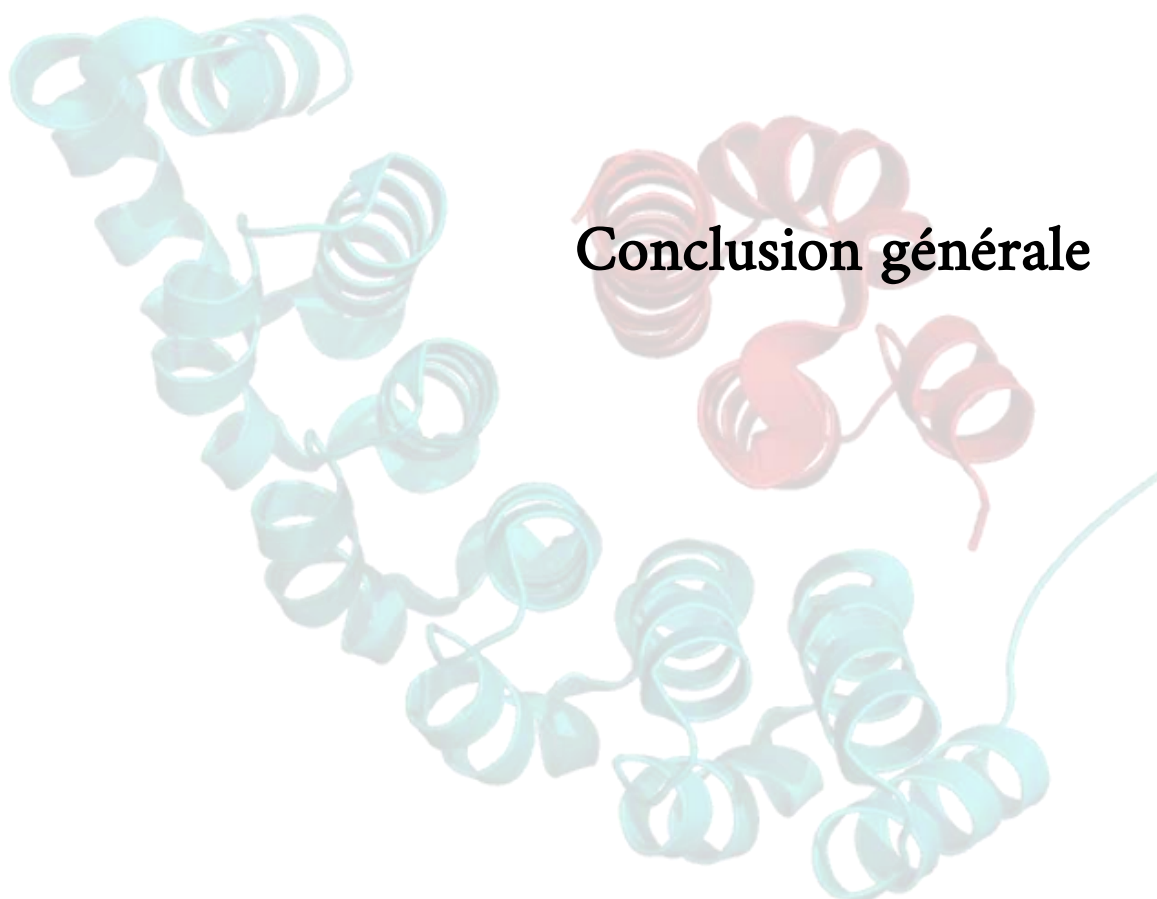
Finalement, nous avons présenté des travaux ayant pour objectif d'élargir l'utilisation des protéines α -Repeat à la formation de nanostructures auto-assemblées orthogonales. En

reprenant le système QD—AuNP que nous maîtrisons, nous parvenons au greffage d'une protéine bi-domaine sur la surface de QD. L'électrophorèse prouve que l'auto-assemblage entre ces QD et des AuNP peut être généré en utilisant cette protéine de fusion. Ensuite, la spectroscopie de fluorescence montre que le second domaine de reconnaissance peut être utilisé pour un assemblage orthogonal mettant en jeu des AuNP, des QD et une molécule cible modèle qui est la GFP.

Références

- [1] W. W. Yu, L. Qu, W. Guo, X. Peng, *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 2854–2860.
- [2] R. D. Deegan, O. Bakajin, T. F. Dupont, G. Huber, S. R. Nagel, T. A. Witten, *Nature* **1997**, *389*, 827–829.
- [3] B. Michen, C. Geers, D. Vanhecke, C. Endes, B. Rothen-Rutishauser, S. Balog, A. Petri-Fink, *Scientific Reports* **2015**, *5*, 9793.
- [4] A. Dif, E. Henry, F. Artzner, M. Baudy-Floc'h, M. Schmutz, M. Dahan, V. Marchi-Artzner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8289–8296.
- [5] E. Henry, A. Dif, M. Schmutz, L. Legoff, F. Amblard, V. Marchi-Artzner, F. Artzner, *Nano Lett.* **2011**, *11*, 5443–5448.
- [6] C. Hamon, M. Postic, E. Mazari, T. Bizien, C. Dupuis, P. Even-Hernandez, A. Jimenez, L. Courbin, C. Gosse, F. Artzner, et al., *ACS Nano* **2012**, *6*, 4137–4146.
- [7] T. Bizien, P. Even-Hernandez, M. Postic, E. Mazari, S. Chevance, A. Bondon, C. Hamon, D. Troadec, L. Largeau, C. Dupuis, et al., *Small* **2014**, *10*, 3707–3716.
- [8] T. Bizien, J.-C. Ameline, K. G. Yager, V. Marchi, F. Artzner, *Langmuir* **2015**, *31*, 12148–12154.
- [9] C. Hamon, T. Bizien, F. Artzner, P. Even-Hernandez, V. Marchi, *Journal of Colloid and Interface Science* **2014**, *424*, 90–97.
- [10] K. L. Gurunatha, A. C. Fournier, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, V. Marchi, P. Minard, E. Dujardin, *ACS Nano* **2016**, *10*, 3176–3185.
- [11] C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic, J. J. Storhoff, *Nature* **1996**, *382*, 607–609.
- [12] A. P. Alivisatos, K. P. Johnsson, X. Peng, T. E. Wilson, C. J. Loweth, M. P. Bruchez, P. G. Schultz, *Nature* **1996**, *382*, 609–611.
- [13] S. A. Claridge, H. W. Liang, S. R. Basu, J. M. J. Fréchet, A. P. Alivisatos, *Nano Lett.* **2008**, *8*, 1202–1206.
- [14] X. Ye, C. Zheng, J. Chen, Y. Gao, C. B. Murray, *Nano Letters* **2013**, *13*, 765–771.
- [15] Y. Luo, R. Zhao, J. B. Pendry, *PNAS* **2014**, *111*, 18422–18427.
- [16] T. Li, A. J. Senesi, B. Lee, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 11128–11180.
- [17] H. Brumberger, *Modern Aspects of Small-Angle Scattering*, Springer Science & Business Media, **2013**.
- [18] S.-J. Park, A. A. Lazarides, J. J. Storhoff, L. Pesce, C. A. Mirkin, *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 12375–12380.
- [19] Y. Ofir, B. Samanta, V. M. Rotello, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1814–1825.
- [20] F. Zhang, M. W. A. Skoda, R. M. J. Jacobs, S. Zorn, R. A. Martin, C. M. Martin, G. F. Clark, G. Goerigk, F. Schreiber, *J. Phys. Chem. A* **2007**, *111*, 12229–12237.
- [21] M. Ohnuma, K. Hono, E. Abe, H. Onodera, S. Mitani, H. Fujimori, *Journal of Applied Physics* **1997**, *82*, 5646–5652.
- [22] N. Allec, M. Choi, N. Yesupriya, B. Szychowski, M. R. White, M. G. Kann, E. D. Garcin, M.-C. Daniel, A. Badano, *Scientific Reports* **2015**, *5*, 12085.
- [23] A. Guinier, *Ann. Phys.* **1939**, *11*, 161–237.
- [24] C. E. Blanchet, D. I. Svergun, *Annual Review of Physical Chemistry* **2013**, *64*, 37–54.
- [25] P. Debye, P. Scherrer, *Phys. Z* **1916**, *17*, 277.

- [26] D. Sun, O. Gang, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5252–5254.
- [27] A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, A. Urvoas, A. Chevrel, M. Graille, Z. Fourati-Kammoun, M. Desmadril, H. van Tilbeurgh, P. Minard, *PLOS ONE* **2013**, *8*, e71512.
- [28] C. R. Kagan, C. B. Murray, M. Nirmal, M. G. Bawendi, *Phys. Rev. Lett.* **1996**, *76*, 1517–1520.
- [29] S. A. Crooker, J. A. Hollingsworth, S. Tretiak, V. I. Klimov, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, *89*, 186802.
- [30] R. Koole, P. Liljeroth, C. de Mello Donegá, D. Vanmaekelbergh, A. Meijerink, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 10436–10441.
- [31] Y. Zhang, L. Mi, P.-N. Wang, J. Ma, J.-Y. Chen, *Journal of Luminescence* **2008**, *128*, 1948–1951.
- [32] M. Noh, T. Kim, H. Lee, C.-K. Kim, S.-W. Joo, K. Lee, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2010**, *359*, 39–44.
- [33] A. O. Muravitskaya, L. L. Trotsiuk, O. S. Kulakovich, L. I. Gurinovich, S. V. Gaponenko, A. V. Antanovich, *Int. J. Nanosci.* **2019**, *18*, 1940003.
- [34] X. Li, F.-J. Kao, C.-C. Chuang, S. He, *Opt. Express, OE* **2010**, *18*, 11335–11346.
- [35] S. Link, M. B. Mohamed, M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 3073–3077.
- [36] X. Li, J. Qian, L. Jiang, S. He, *Appl. Phys. Lett.* **2009**, *94*, 063111.
- [37] E. J. Kim, E. B. Kim, S. W. Lee, S. A. Cheon, H.-J. Kim, J. Lee, M.-K. Lee, S. Ko, T. J. Park, *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *87*, 150–156.
- [38] A. O. Govorov, G. W. Bryant, W. Zhang, T. Skeini, J. Lee, N. A. Kotov, J. M. Slocik, R. R. Naik, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 984–994.
- [39] B. N. J. Persson, N. D. Lang, *Phys. Rev. B* **1982**, *26*, 5409–5415.
- [40] Y. Nagaoka, R. Tan, R. Li, H. Zhu, D. Eggert, Y. A. Wu, Y. Liu, Z. Wang, O. Chen, *Nature* **2018**, *561*, 378–382.
- [41] R. Tan, Y. Yuan, Y. Nagaoka, D. Eggert, X. Wang, S. Thota, P. Guo, H. Yang, J. Zhao, O. Chen, *Chem. Mater.* **2017**, *29*, 4097–4108.
- [42] C. Léger, T. D. Meo, M. Aumont-Nicaise, C. Velours, D. Durand, I. L. de la Sierra-Gallay, H. van Tilbeurgh, N. Hildebrandt, M. Desmadril, A. Urvoas, et al., *Scientific Reports* **2019**, *9*, 1178.
- [43] R. Y. Tsien, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, *67*, 509–544.
- [44] A. Chevrel, A. Urvoas, I. L. de la Sierra-Gallay, M. Aumont-Nicaise, S. Moutel, M. Desmadril, F. Perez, A. Gautreau, H. van Tilbeurgh, P. Minard, et al., *Bioscience Reports* **2015**, *35*, e00223–e00223.
- [45] Y. L. Boersma, A. Plückthun, *Current Opinion in Biotechnology* **2011**, *22*, 849–857.



Conclusion générale

Dans l'optique de fabriquer des auto-assemblages de nanoparticules semi-conductrices et métalliques dirigé par les protéines α -Repeat, différents types de nanoparticules semi-conductrices (quantum dots, quantum rods) et de nanoparticules métalliques (sphères et bâtonnets d'or) ont été sélectionnés et synthétisés avec succès.

La première étape de ce travail a consisté à choisir des nanoparticules semi-conductrices et métalliques. Les quantum dots et les quantum rods présentent des propriétés de fluorescence remarquables. Les systèmes cœur/coquille CdSe/ZnS et CdSe/CdS ont été choisis et les synthèses ont été réalisées au laboratoire. Ces nanoparticules fluorescentes présentent une résistance au photoblanchiment, des rendements quantiques élevés et leur longueur d'onde d'émission peut être facilement choisie en fonction de leur diamètre. D'autre part, des nanoparticules d'or ont été synthétisées au laboratoire. Des sphères et des nanobâtonnets d'or de différentes tailles ont été obtenus et présentent des propriétés plasmoniques, qui elles aussi peuvent être aisément ajustées en fonction des paramètres de taille des nanoparticules. Une série de ligand hydrophiles peptidiques et PEGylés ont été ensuite utilisés pour la fonctionnalisation de ces deux types de nanoparticules. Cette méthode permet de leur conférer une très bonne stabilité colloïdale dans l'eau et en présence de sels tout en conservant leurs propriétés optiques.

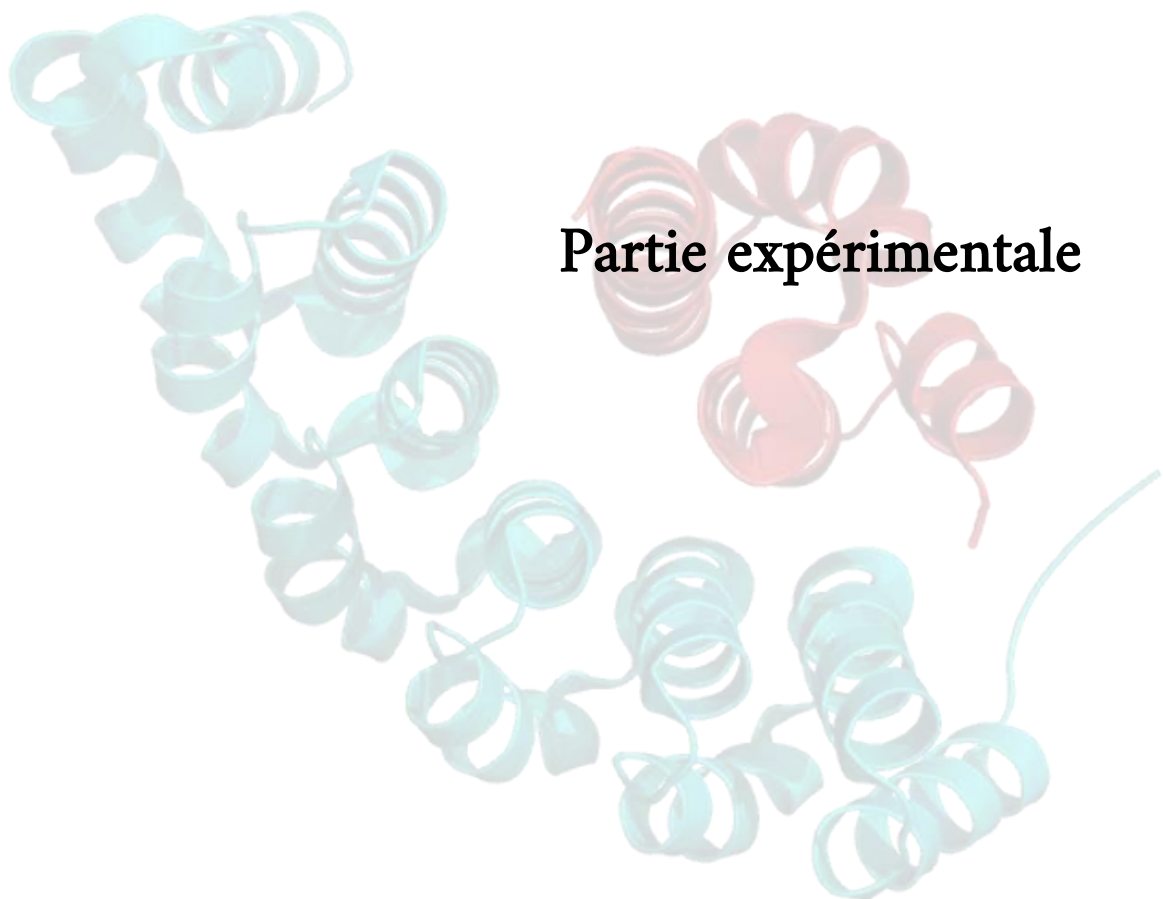
Ensuite, le greffage des protéines α -Repeat sur la surface de ces différentes nanoparticules a été réalisé. L'augmentation de la taille hydrodynamique, la variation de la charge et les propriétés optiques des nanoparticules ont démontré la bioconjugaison. Une stratégie de fonctionnalisation des nanoparticules à l'aide d'étiquettes d'affinité (Cystag SCGCGCGS et Histag HHHHHH) a été adoptée et il a été montré qu'elle permet le bon greffage des protéines sur les surface d'or ou les surfaces semi-conductrices (ZnS et CdS). Il a pu être mis en évidence qu'il est possible de contrôler, dans une certaine mesure, le nombre de protéines par particule. À ce titre, il a été déterminé qu'un nombre moyen de 80 protéines A3 par nanoparticules d'or est obtenu lorsque la surface de ces nanoparticules est saturée. Aussi, les propriétés physico-chimiques de ces complexes nanoparticules—protéine ont été étudiées et cela a permis de montrer qu'une saturation de la surface des nanoparticules en protéines a tendance à les déstabiliser. Toutefois, des quantités de protéines intermédiaires permettent d'obtenir une stœchiométrie protéine/particule variable tout en conservant de bonnes propriétés colloïdales. La caractérisation optique des nanoparticules fonctionnalisées montre que le greffage des protéines altère peu les propriétés plasmoniques ou fluorescentes

des nanoparticules. Finalement, l'analyse SPR a confirmé la conservation des propriétés de reconnaissance des protéines une fois greffées sur les quantum dots. L'étude des interactions protéine—protéine après leur greffage montrent qu'à faible degré de saturation de la surface des nanoparticules, les protéines conservent une affinité de reconnaissance très forte, et présentent une constante d'affinité de l'ordre de 10 nM. En revanche, lorsque la surface des nanoparticules est saturée par les protéines, les interactions sont plus complexes.

La mise à profit de ces protéines artificielles pour la formation de nanomatériaux auto-assemblés a été envisagée sous deux angles : d'un côté pour la formation d'auto-assemblage de nanoparticules fluorescentes et d'un autre côté pour le développement de nanostructures hybrides métal—semi-conducteur. L'auto-assemblage de quantum dots CdSe/ZnS dirigé par la paire de protéines utilisée permet d'élaborer des agrégats de taille limitée. La caractérisation de ces structures de quantum dots par diffusion des rayons X a mis en évidence une interdistance moyenne bien définie d'une valeur de $8,3 \pm 1,4$ nm confirmée par l'analyse détaillée des images obtenues en microscopie électronique à transmission. D'autre part, une stratégie identique a été testée pour l'auto-assemblage de quantum rods CdSe/CdS mais elle aboutit, dans ce cas, à des structures désorganisées. Dans le cadre de l'auto-assemblage hybride entre nanoparticules semi-conductrices et nanoparticules métalliques, des nanostructures auto-assemblées composées de quantum dots et de nanoparticules d'or sphériques ont été mises au point. L'utilisation de nanoparticules fonctionnalisées avec différentes quantités de protéines ont permis de contrôler de façon satisfaisante la morphologie des agrégats métal—semi-conducteur. De cette façon, des structures composées de plusieurs dizaines de nanoparticules peuvent être formées, aussi bien que des structures de nature oligomérique aussi petites que des trimères. Aussi, des nanoparticules anisotropes tels que des nanobâtonnets d'or ont pu être couplés à des quantum dots. La caractérisation des structures hybrides développées a montré que les protéines artificielles sont capables de rapprocher les nanoparticules à des distances propices à des transferts d'énergie non radiatifs. Finalement, des résultats prometteurs ont été obtenus dans l'utilisation d'une protéine bi-domaine pour l'élaboration de nanostructures orthogonales.

Les perspectives de ce travail portent sur le développement de nouvelles nanostructures auto-assemblées en faisant varier les propriétés optiques des nanoparticules plasmoniques et fluorescentes. Ici, l'auto-assemblage hybride entre des sphères d'or de 10 nm de diamètre

et des quantum dots rouge a révélé des transferts d'énergie de type FRET. Toutefois, l'utilisation de quantum dots avec une longueur d'onde dans le vert—jaune permettrait un recouvrement spectral avec la bande plasmon des sphères d'or beaucoup plus important. Un tel couple émetteur—accepteur aurait ainsi les propriétés optiques adéquates pour générer de l'exaltation de fluorescence par le métal. Aussi, l'utilisation de bâtonnets semi-conducteurs plus longs serait intéressant pour obtenir des assemblages de quantum rods avec meilleur degré d'organisation. Ces particules présentent en effet des interactions latérales très fortes qu'il serait intéressant d'exploiter. De plus, l'utilisation d'autres types de nanoparticules, telles que des quantum dots sans cadmium de composition $\text{CuInS}_2/\text{ZnS}$ ou des nanoclusters d'or fluorescents permettrait d'ouvrir la voie vers des nanomatériaux auto-assemblés pour des applications biologiques. Finalement, l'approche prometteuse des protéines bi-domaines pourrait être généralisée à l'auto-assemblage orthogonal d'au moins trois types de nanoparticules.



Partie expérimentale

Table des matières

Partie I. Synthèse des nanoparticules.....	265
<i>A. Synthèse de nanoparticules métalliques.....</i>	<i>265</i>
A.1 Synthèse de nanoparticules d'or sphérique	265
A.2 Synthèses de nanobâtonnets d'or	265
A.2.i. Méthode « one pot ».....	265
A.2.ii. Méthode par germination et croissance	266
A.3 Synthèse de nanoclusters d'or	267
<i>B. Synthèse de nanoparticules semi-conductrices.....</i>	<i>267</i>
B.1 Synthèse de QD CdSe/ZnS	267
B.1.i. Synthèse des cœurs de CdSe	267
B.1.ii. Dépôt de la coquille de ZnS.....	268
B.2 Synthèse de QR CdSe/CdS.....	269
B.2.i. Synthèse des cœurs de CdSe	269
B.2.ii. Dépôt de la coquille anisotrope de CdS	270
B.3 Synthèse de QD CuInS ₂ /ZnS	270
B.3.i. Synthèse des cœurs de CuInS ₂	270
B.3.ii. Dépôt de la coquille de ZnS.....	271
Partie II. Fonctionnalisation des nanoparticules	271
<i>A. Fonctionnalisation des AuNP.....</i>	<i>271</i>
<i>B. Fonctionnalisation des GNR.....</i>	<i>271</i>
<i>C. Fonctionnalisation – hydrophilisation de QD CdSe/ZnS et de QR CdSe/CdS....</i>	<i>271</i>
<i>D. Fonctionnalisation des nanoparticules avec les protéines α-Repeat</i>	<i>272</i>
<i>E. Fonctionnalisation de QR avec de la biotine.....</i>	<i>272</i>
Partie III. Détermination de la stoechiométrie A3/AuNP	273
Partie IV. Mesures SPR d'interaction protéine-protéine sur appareil Biacore.....	273
Partie V. Mélange de nanoparticules pour les auto-assemblages	274
<i>A. Auto-assemblages massifs et limités de QR</i>	<i>274</i>
<i>B. Auto-assemblage de QD.....</i>	<i>275</i>

C.	<i>Auto-assemblage de QR et AuNP</i>	276
D.	<i>Auto-assemblage de QD et AuNP</i>	276
E.	<i>Auto-assemblage de GNR et QD</i>	276
Partie VI.	Caractérisation	277
A.	<i>Spectroscopie UV—visible</i>	277
B.	<i>Spectroscopie de fluorescence</i>	277
C.	<i>Électrophorèse sur gel d'agarose</i>	277
D.	<i>Microscopie électronique en transmission</i>	278
E.	<i>Diffusion dynamique de la lumière</i>	278
F.	<i>Potentiel zéta</i>	278
G.	<i>SAXS</i>	278
Partie VII.	Méthodes de détermination des concentrations en nanoparticules	279
A.	<i>Détermination de la concentration en AuNP</i>	279
B.	<i>Détermination de la concentration GNR</i>	279
C.	<i>Détermination de la concentration AuNC</i>	280
D.	<i>Détermination de la concentration QD</i>	280
E.	<i>Détermination de la concentration QR</i>	281
F.	<i>Détermination de la concentration des QD CuInS₂/ZnS</i>	282
Partie VIII.	Composition des tampons	283
A.	<i>Tampon NaP</i>	283
B.	<i>Tampon borate</i>	283

Partie I. Synthèse des nanoparticules

A. Synthèse de nanoparticules métalliques

En accord avec les pratiques recommandées dans la littérature, l'intégralité de la verrerie utilisée pour la synthèse des nanoparticules d'or est préalablement lavée à l'eau régale. Il s'agit d'acide chlorhydrique HCl et d'acide nitrique HNO₃ mélangés aux proportions volumiques de 3:1 (HCl:HNO₃). Cette étape est critique pour la synthèse de ces objets dont les étapes de nucléation peuvent être grandement affectées par la présence d'impuretés.

A.1 Synthèse de nanoparticules d'or sphérique

La synthèse de nanoparticules sphériques est réalisée selon la méthode de G. Frens^[1]. La procédure de synthèse commence par le chauffage de 50 mL d'une solution aqueuse de sels d'or HAuCl₄ à 10⁻² % en masse (soit 100 mg/L ou 0,29 mM) portée à reflux et sous agitation mécanique forte dans un ballon tricol. Ensuite, un volume variable d'une solution aqueuse de citrate de sodium à 1 % en masse (soit 10 g/L ou 39 mM) est rapidement injecté dans le tricol. Le reflux et l'agitation forte sont maintenues et après environ une minute la solution devient bleue, à cause du processus de nucléation, avant de devenir rouge rubis après environ 2 min. Le reflux, le chauffage et l'agitation sont conservés pendant 10 min supplémentaires pour compléter la réaction.

Pour 1 mL de citrate injecté, la suspension colloïdale présente des sphères d'environ 15 nm de diamètre. Leur concentration est calculée sur la base de leur spectre d'absorption selon la méthode de Huo^[2]. Pour des nanoparticules d'or de 10 nm, on calcule un $\epsilon_{520 \text{ nm}} = 1,0 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

A.2 Synthèses de nanobâtonnets d'or

A.2.i Méthode « one pot »

La synthèse de nanobâtonnets d'or en une seule étape est effectuée selon la méthode de Jana^[3]. Dans un erlenmeyer de 100 mL, une solution de CTAB à 0,25 M (32 mL) est portée à 30 °C sous agitation douce afin de dissoudre le surfactant sans produire de mousse. Successivement, 4 mL de AgNO₃ (10 mM) et 4 mL de HAuCl₄ (30 mM) sont ajoutés à la solution dont la couleur vire au rouge foncé. Après 2 min, 480 µL d'acide ascorbique (0,4 M) sont ajoutés à la solution qui est placée sous agitation moyenne. La solution se décolore, témoignant ainsi de la réduction des ions Au³⁺ en ions Au¹⁺. Après une nouvelle

attente de 2 min, 64 μL d'une solution aqueuse et glacée de NaBH_4 sont injectées sous agitation maximale. Progressivement, sous agitation moyenne, la croissance des nanobâtonnets change la couleur de la solution en un violet très foncé. La réaction est complète après 20 à 30 min d'attente.

Pour les lavages et la purification des GNR ainsi synthétisés, des cycles de centrifugation/redispersion sont réalisés dans une centrifugeuse thermostatée à 30 °C pour éviter la cristallisation du CTAB. Tout d'abord, les 50 mL de suspension de nanobâtonnets sont séparés dans 2 tubes qui sont centrifugés à 6000 tr/min pendant 20 min afin d'éliminer les sphères produites par la synthèse. Le surnageant contenant les GNR est ensuite réparti dans 24 microtubes qui sont centrifugés deux fois à 15 000 tr/min pendant 20 min. Le surnageant est prélevé à chaque fois et le culot de GNR est redispersé dans H_2O . Finalement, l'ensemble des culots de GNR sont redispersés dans 1 mL d'une solution aqueuse de CTAB à 0,5 mM.

A.2.ii. Méthode par germination et croissance

Cette autre voie de synthèse est effectuée en suivant la méthode de Murray^[4]. Pour des GNR présentant une bande de résonance plasmon longitudinale vers 720 nm, une solution de croissance est préparée avec 2,8 g de CTAB et 0,494 g d'oléate de sodium (NaOL) qui sont dissouts dans 100 mL de H_2O à 50 °C et sous agitation douce. Quand la dissolution totale des deux composés est obtenue, la température est abaissée à 30 °C et AgNO_3 (7,2 mL à 4 mM) est introduit dans le mélange. Celui-ci est laissé à reposer sans agitation pendant 15 min avant d'ajouter 100 mL d'une solution aqueuse de sels d'or HAuCl_4 (1 mM). La solution est agitée à 700 tr/min pendant 90 min et devient progressivement incolore. Ensuite, 600 μL de HCl 37 % sont ajoutés avant d'attendre à nouveau 15 min durant lesquelles le mélange est agité à 400 tr/min. Finalement, 500 μL d'acide ascorbique à 0,064 mM et 160 μL de solution de germes sont rapidement injectés sous agitation très forte (1000 tr/min) pendant 30 secondes après leur injection respective. La solution est ensuite à 30 °C sans agitation pendant une nuit.

En parallèle, la solution de germes est préparée en dissolvant du CTAB (0,2 M) dans 5 mL de H_2O à 30°C. 5 mL de HAuCl_4 à 0,5 mM sont ensuite ajoutés sous agitation douce. Séparément, 600 μL d'une solution glacée de NaBH_4 à 0.01 M sont ajoutés à 400 μL d'eau glacée. Ces 1 mL de NaBH_4 sont ensuite ajoutés très rapidement à la solution de HAuCl_4 et

de CTAB sous agitation maximale (1200 tr/min). Cette solution de germes est laissée à 30 °C pendant 30 minutes afin de les laisser vieillir.

Les GNR synthétisés sont purifiés et lavés par des centrifugations successives. Un premier cycle est réalisé à 6000 tr/min pendant 15 min et un second à 5300 tr/min pendant 10 min. Entre ces deux centrifugations, le surnageant est prélevé à la pipette Pasteur et le culot de GNR est redispersé dans une solution aqueuse de CTAB à 0,5 mM.

A.3 Synthèse de nanoclusters d'or

Des nanoclusters d'or fluorescents et stabilisés par le glutathion sont préparés selon la méthode de Xie^[5]. Pour leur préparation, 0,5 mL de H_{AuCl}₄ à 20 mM sont ajoutés à 4,35 mL de H₂O et le mélange est chauffé à 70 °C. Une fois cette température atteinte, 0,15 mL de glutathion à 100 mM sont introduits et le mélange est agité mécaniquement à 500 tr/min pendant 24 heures. Une suspension de nanoclusters fluorescents et de couleur dorée est alors obtenue.

B. Synthèse de nanoparticules semi-conductrices

L'ensemble des synthèses de nanoparticules semi-conductrices décrites ici sont réalisés au sein d'un montage composé d'un tricol de 100 mL fermé par deux septums et surmonté d'un réfrigérant. Ce dernier est doté d'une vanne « trois voies » qui permet de réaliser les purges et la mise sous atmosphère inerte du milieu réactionnel. Le système est chauffé à l'aide d'un chauffe-ballon haute température (Electrothermal, Bibby Scientific) disposant également d'un système d'agitation magnétique. La température est contrôlée à l'aide d'une sonde de température reliée à une plaque chauffante (IKA).

B.1 Synthèse de QD CdSe/ZnS

B.1.i Synthèse des cœurs de CdSe

13 mg (0,1 mmol) de CdO et 61 mg (0,22 mmol) de TDPA, sont introduits dans le tricol en présence des solvants à haut point d'ébullition : 927 mg de TOPO 99 % et 482 mg de HDA. Le système est fermé puis 4 purges sont réalisées afin de le placer sous argon. Le chauffage est réglé sur 80 % (afin d'atteindre 320 °C) et l'agitation sur 250 tr/min. Lorsque la fusion du mélange de réactifs est atteinte, 3 nouvelles purges sont réalisées avant que la température ne dépasse 100 °C. La sonde de température est alors introduite à travers un

des septums avant qu'un brouillard de solvant ne se forme vers 150 °C. En parallèle, la solution de Se + TOP est préparée dans un tube Schlenk en dissolvant 79 mg de Se dans 2 mL de TOP et l'ensemble est dégazé puis placé sous argon. Une agitation maximale est utilisée pour faciliter la dissolution du sélénium dans la TOP.

Lorsque la température du milieu atteint 320 °C, le milieu réactionnel doit être presque incolore (mais une légère coloration jeune peut subsister). Le chauffe-ballon est alors éloigné du tricol en abaissant l'élévateur et la valeur du chauffage est réglée sur 65 %. Lorsque la température du milieu réactionnel atteint 270 °C la solution Se + TOP est brusquement injectée dans le tricol à l'aide d'une seringue purgée à l'argon. Immédiatement, le chauffe-ballon est remis en contact avec le tricol. La trempe thermique provoquée par l'ajout abaisse la température jusqu'à environ 200 °C mais celle-ci remonte progressivement. La nucléation des cœurs s'effectue à partir de 220 °C, température à partir de laquelle il est nécessaire de contrôler la longueur d'onde d'émission de cœurs toutes les 30 secondes. Pour ce faire, un petit volume de milieu réactionnel est prélevé à l'aide d'une seringue et est dilué dans 1-2 mL de toluène. Lorsque la valeur souhaitée est atteinte, le chauffe-ballon est enlevé et le fond du tricol est immergé dans un cristalliseur d'eau chaude (~ 60 °C). A 70 °C, 4 mL de CHCl₃ sont injectés pour éviter la prise en masse du mélange.

Finalement, les cœurs refroidis sont lavés. Les 7 mL de mélange sont séparés dans 2 tubes à centrifuger de 50 mL. Ensuite, 10 mL de méthanol sont ajoutés et les tubes sont centrifugés à 4 000 g pendant 10 min. Le surnageant, contenant éventuellement les plus petits cœurs bleus, est éliminé et le culot est resuspendu dans 10 mL de pentane avant une seconde centrifugation à 4 000 g pendant 10 min. Les cœurs solubilisés dans le surnageant sont récupérés dans un ballon de 25 mL afin d'évaporer les 20 mL de pentane. Les cœurs sont alors redispersés dans 4 mL de pentane et leur concentration est déterminée par spectroscopie UV—Visible. Le volume de pentane est alors ajusté pour obtenir une concentration en cœurs de CdSe à 60 μM.

B.1.ii. Dépôt de la coquille de ZnS

Un mélange de 278 mg de TOPO 90 % (2,4 mmol) et de 428 mg de HDA 95 % (2 mmol) est chargé dans le tricol. Le chauffage est réglé sur 150 °C à l'aide du chauffe-ballon et le mélange est maintenu sous pression réduite pendant au moins 30 minutes afin d'éliminer les traces d'eau. Après mise sous atmosphère d'argon, le mélange est refroidi à 50 °C et 4,0 mL de cœurs dans le pentane concentré à 60 μM sont injectés, suivis de 200

μL de TOP (0,6 mmol). Le pentane est évaporé sous vide puis le milieu réactionnel est remis sous argon avant de le chauffer à 160 °C. En parallèle, une solution de précurseurs de zinc et de soufre est préparée dans un tube Schlenk sous argon. 3,0 mL de TOP 90 % (8,96 mmol) et 0,4 mL de diéthylzinc à 1 M dans le décane (0,4 mmol) sont ajoutés puis le décane est éliminé sous vide avant d'injecter 100 μL de 1,1,1,3,3,3-héxaméthyltrisilathiane (0,51 mmol). L'intégralité de la solution est placée dans une seringue de 5 mL qui est disposée sur un pousse-seringue et qui est reliée à une canule perforant un septum du tricol est dont l'extrémité est proche du milieu réactionnel. Le débit du dispositif est réglé sur 2 mL/h et la réaction de la croissance de la coquille de ZnS sur les cœurs CdSe est suivi par le contrôle de l'intensité de fluorescence à concentration constante. Environ 10 minutes de réaction permettent d'obtenir un maximum d'intensité. Finalement, le chauffage est retiré, et 4 mL de chloroforme sont introduits dans le tricol qui sa température est redescendue à 70 °C. Les QD cœur—coquille ainsi obtenus sont stockés à l'abri de la lumière dans un flacon étanche.

B.2 Synthèse de QR CdSe/CdS

La synthèse de QR CdSe/CdS est réalisée selon la méthode de Manna.^[6]

B.2.i Synthèse des cœurs de CdSe

1,5 g de TOPO, 140 mg de OPDA et 30 mg de CdO sont introduits dans le tricol. Le mélange est chauffé et lorsque les réactifs sont sous forme liquide, celui-ci est agité mécaniquement (250 tr/min) et est maintenu sous vide pendant à 150 °C pendant une heure. En parallèle, la solution Se + TOP est préparée dans un tube Schlenk en dissolvant 116 mg de Se dans 870 μL de TOP et l'ensemble est dégazé puis placé sous argon. Une agitation maximale est utilisée pour faciliter la dissolution du sélénium dans la TOP. Après une heure de purge du mélange réactionnel, celui-ci est placé sous flux d'argon et porté à 320 °C pour la décomposition du CdO. Celle-ci est totale lorsque le mélange devient incolore. Les précurseurs décomposés sont ensuite dilués grâce à l'injection de 870 μL de TOP et l'ensemble est chauffé à 380 °C. Une fois cette température atteinte, le mélange Se + TOP est rapidement injecté. Le chauffe-ballon est immédiatement retiré pour obtenir des cœurs de petite taille et le fond du tricol est immergé dans un cristalliseur d'eau chaude (~ 60 °C) afin d'arrêter la réaction.

Les lavages sont effectués en répartissant la suspension de CdSe dans des microtubes de 1,5 mL en diluant 750 μL de suspension avec 750 μL de méthanol. Les microtubes sont alors centrifugés à 23 000 g pendant 1 min. Les dépôts de couleur jaune ainsi obtenus sont resuspendus avec 750 μL de toluène et sont précipités avec 750 μL supplémentaires de méthanol avant de les centrifuger à 23 000 g pendant 1 min. Ce cycle de redispersion/précipitation est effectué en tout 3 fois. Finalement, les cœurs de CdSe sont redispersés dans la TOP avec une concentration finale de 400 μM .

B.2.ii. Dépôt de la coquille anisotrope de CdS

Sous un flux d'argon et dans un tube Schlenk, 70 à 120 mg de soufre natif sont dissous dans 1,80 mL de TOP par une forte agitation magnétique. En parallèle, 86 mg de CdO sont mélangés avec 80 mg de HPA, 290 mg de ODPa et 3,0 g de TOPO 99 % dans le tricol qui est porté à 150 °C sous vide pendant une heure. Ensuite, le milieu est maintenu sous flux d'argon tout en le chauffant à 350 °C. La décomposition des précurseurs est indiquée par la décoloration du mélange auquel on ajoute alors 1,80 mL de TOP. En chauffant le mélange à 350 °C, la solution de S + TOP est rapidement injectée dans le tricol et la réaction est maintenue pendant 8 min. Finalement, une trempe thermique et des lavages sont réalisés dans les mêmes conditions que pour les cœurs de CdSe. Les QR CdSe/CdS obtenus sont conservés à l'abri de la lumière dans quelques mL de toluène.

B.3 Synthèse de QD CuInS₂/ZnS

B.3.i. Synthèse des cœurs de CuInS₂

La synthèse des QD sans cadmium CuInS₂ est réalisée selon la méthode de Klimov^[7] et légèrement modifiée par Critchley^[8]. Pour la synthèse de ces cœurs, 73 mg de In(OAc)₃ et 47 mg de CuI sont mélangés dans 4 mL de DDT dans le tricol à température ambiante. Plusieurs purges à l'argon sont réalisées pendant 30 minutes. La température du mélange est ensuite portée à 120 °C en 10 min (avec une montée en température de 20 min obtenue en réglant 30 % sur le chauffe-ballon). Une fois le mélange entièrement liquide, l'agitation mécanique est réglée sur 500 tr/min pour homogénéiser l'ensemble tout en chauffant à 230 °C (chauffe-ballon réglé sur 75 %). Un temps de réaction de 15 min est décompté à partir du moment où la température de 230 °C est atteinte. Une trempe thermique est finalement réalisée en immergeant le fond du tricol dans un cristalliseur d'eau chaude

($\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Les cœurs de CuInS_2 ainsi obtenus sont caractérisés par spectroscopie d'absorption UV—Visible et par spectroscopie de fluorescence en les diluant dans du toluène.

B.3.ii. Dépôt de la coquille de ZnS

Le dépôt de la coquille de ZnS sur les cœurs de CuInS_2 commence par la dissolution de 158 mg de stéarate de zinc dans 4 mL d'ODE. La dissolution est favorisée en utilisant un décapeur thermique jusqu'à ce que la solution devienne parfaitement lipide. Sans aucune étape de lavage des cœurs, cette solution est alors ajoutée à la suspension du CuInS_2 dans le DDT qui est alors portée à $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 35 min. La réaction est ensuite arrêtée en refroidissant le tricol dans un cristalliseur d'eau chaude ($\sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Partie II. Fonctionnalisation des nanoparticules

A. Fonctionnalisation des AuNP

5 mL d'une solution de AuNP à 11 nM synthétisées au laboratoire selon la méthode de Frens^[1] sont incubés avec 2500 équivalents molaire d'une solution aqueuse de C3E6D ($7\text{ }\mu\text{L}$, 20 mM). Le mélange est laissé au repos à température ambiante pendant au moins 2 h avant d'être lavé, centrifugé et concentré à l'aide de filtres à centrifugation Amicon Ultra 0,5 mL 100 kDa. Plusieurs cycles de 2 min à 3800 g sont réalisés en utilisant du tampon NaP 20 mM pH 7,4. Typiquement, $230\text{ }\mu\text{L}$ de AuNP-C3E6D à 180 nM sont ainsi obtenus.

B. Fonctionnalisation des GNR

À partir d'une suspension de GNR à 0,5 mM en CTAB, l'échange de ligands sur les GNR est effectué en ajoutant un excès de 50 000 équivalents de ligands peptiques ou de glutathion et le mélange est laissé à incuber le temps d'une nuit. Le lendemain, les mélanges GNR + ligands sont purifiés par filtration centrifuge à l'aide de filtre Amicon 100 kDa 2 mL et de tampon NaP pH 7,4.

C. Fonctionnalisation – hydrophilisation de QD CdSe/ZnS et de QR CdSe/CdS

Les QD sont dans un premier temps précipités à partir de 1 mL d'une suspension à $1\text{ }\mu\text{M}$ dans le décane qui est séparée dans 5 microtubes ($200\text{ }\mu\text{L}$). $800\text{ }\mu\text{L}$ d'un mélange 75/25 (en volume) de méthanol/propanol sont ajoutés puis les 5 microtubes sont centrifugés

pendant 5 min à 660 g. Le décane est prélevé puis les microtubes sont séchés afin d'enlever les dernières traces de ce solvant. Les 5 culots de QD sont alors redispersés dans 1 mL de chloroforme. Une solution aqueuse de C3E6D (70 μL à 20 mM) ainsi qu'une solution aqueuse de TMAOH (12 μL à 25 % en masse) sont ajoutées afin d'induire le transfert de phase qui s'opère après une agitation forte. Le chloroforme est prélevé puis une étape de séchage sous cloche (60 mbar, 20 min) permet d'enlever les traces de solvant organique. L'excès de ligand C3E6D est finalement enlevé à l'aide d'une colonne de chromatographie d'exclusion stérique (colonne Sephadex G25 NAP-5) équilibrée avec du tampon NaP 20 mM à pH 7,4. La suspension aqueuse de QD ainsi obtenue présente une concentration de l'ordre de 500 nM.

Un protocole identique est suivi pour la fonctionnalisation des QR CdSe/CdS avec le ligand C5PEG4.

D. Fonctionnalisation des nanoparticules avec les protéines α -Repeat

Typiquement, 100 μL de protéines (à des concentrations entre 100 et 400 μM) sont incubés avec 400 μL de DTT à 100 mM pendant au moins 2 h à 6 °C afin de réduire les ponts disulfures. L'excès de DTT est alors supprimé par élution centrifuge à l'aide colonnes de désalage (Zeba Spin Desalting Columns, 7 kDa MWCO) équilibrées avec du tampon NaP à pH 7,4. Ensuite, les NP stabilisées par un ligand peptidique sont bioconjuguées en ajoutant un nombre d'équivalents molaires variable. Après incubation, les mélanges NP + protéine sont purifiés à l'aide de filtres Amicon Ultra 0,5 mL et du tampon NaP 20 mM à pH 7,4 à travers au moins 3 cycles de centrifugation/redispersion.

E. Fonctionnalisation de QR avec de la biotine

200 μL d'une suspension de QR dans le toluène sont mélangés avec 200 μL de méthanol et lavés à l'aide de 3 cycles de centrifugation à 6000 g pendant 5 min. Le culot de QR est redispersé dans chloroforme pour obtenir une suspension à 20 mg/mL. Pour l'échange de ligands, une solution de peptides à 20 mM est préparée avec 98 % de peptide positif C3E6D et 2 % de peptide neutre KC5NH₂. 200 μL de cette solution sont ajoutés dans 100 μL de suspension de QR à 20 mg/mL suivis de 10 μL de TMAOH. Après vortex et transfert de phase total, la suspension aqueuse de QR est purifiée avec une colonne d'exclusion stérique (NAP-5).

Pour la biotinylation des QR, une solution de biotine-NHS est préparée par dissolution de 2 mg de biotine-NHS dans 4 mL de H₂O et 20 μ L de DMSO. Pour le couplage, 200 μ L de QR à 400 nM sont incubés avec 2 mL de biotine-NHS (1,4 mM) pendant une nuit sous agitation mécanique. Les QR sont ensuite à nouveau purifiés sur colonne NAP-5.

Pour la fixation des QR biotinylés sur des billes d'agarose streptavidinées (Pierce, Thermo Fisher) 12,5 μ L de billes sont mélangés avec 37,5 μ L de NaCl 150 mM. Une première centrifugation (4000 g – 30 s) permet d'enlever le surnageant et d'ajouter 200 μ L de NaCl 150 mM. Deux nouvelles centrifugations (idem) espacée du prélèvement du surnageant permettent de redisperser les billes dans 20 μ L de NaCl 150 mM. Les billes sont incubées avec 80 μ L de QR biotinylés à 32 nM à température ambiante ; sans agitation et pendant 1 h. Pour éliminer les QR ne s'étant pas fixés sur les billes, une centrifugation est effectuée (idem). Le surnageant est redispersé dans 200 μ L de tampon borate à pH 9,0 avant une dernière centrifugation (idem). Après pipetage du surnageant, les billes—QR sont redispersés dans 20 μ L de NaCl 150 mM.

Partie III. Détermination de la stoechiométrie A3/AuNP

La stoechiométrie A3/AuNP est déterminée par spectroscopie de fluorescence après la dissolution de AuNP-A3 avec KCN. Les AuNP-A3 saturées sont préparées comme décrit ci-dessus. Pour la dissolution, 32 μ L de AuNP-A3 à 90 nM sont mélangés avec 16 μ L d'une solution de KCN saturée. Après 1 h, 72 μ L de tampon NaP 20 mM à pH 7,4 sont ajoutés pour diluer l'échantillon avant de mesurer son spectre d'émission de fluorescence. En parallèle, une courbe étalon est établie à partir de solutions stocks de A3 préparées dans du tampon NaP 20 mM à pH 7,4 à des concentrations de 0,33 ; 0,66 ; 1,30 ; 2,60 et 4,60 μ M.

Partie IV. Mesures SPR d'interaction protéine-protéine sur appareil Biacore

L'appareil SPR utilisé est la machine Biacore de la plateforme de l'Institut de biologie Paris-Seine, en collaboration avec T. Bouceba (Equipe Interactions moléculaires) à l'université Pierre-et-Marie-Curie. Les protéines α -Repeat et la BSA sont immobilisées sur une puce CM5 (carboxyméthyl-dextrane) par couplage covalent. Pour l'étape d'immobilisation, les solutions de $\alpha 2$ et A3 (200 nM) et une solution de BSA à 50 μ g.ml⁻¹

sont utilisées. Ces solutions sont préparées dans du tampon acétate de sodium à 10 mM dont le pH est ajusté en fonction du pI de la protéine (pH 5,0 pour A3, pH 4,5 pour la BSA et pH 5,5 pour $\alpha 2$) et elles sont injectées à un débit de 10 mL.min⁻¹. Un temps de contact de 7 min est utilisé pour obtenir une immobilisation importante (3990 Ru pour A3, 11 600 RU pour la BSA et 1500 RU pour $\alpha 2$). Une piste est laissée vide afin de l'utiliser comme référence pour les interactions non spécifiques et pour suivre les variations d'indice de réfraction. L'étape d'immobilisation est suivie de l'injection d'une solution d'éthanolamine/HCl à pH 8,4 pour saturer les groupements amines libres.

Les mesures d'affinité et les mesures de cinétique sont réalisées à 25 °C et chaque mesure est réalisée en triple exemplaire. Pour les mesures d'affinité, une solution de ligand (QD-protéine ou protéine libre) est injectée sur les différentes pistes à 5 μ L.min⁻¹ pendant 5 min. Les mesures de cinétique sont réalisées en injectant plusieurs concentrations de ligand (QD-protéine ou protéine libre) sur la surface complémentaire à un débit de 5 μ L.min⁻¹ avec une phase d'association de 5 min et une phase de dissociation de 8 min qui correspond à l'injection du tampon. Après chaque mesure, la surface de la puce est régénérée avec une seule injection de glycine/HCl à pH 1,5 à 30 μ L.min⁻¹ ou deux injections de glycine/HCl à pH 2,0 à 30 μ L.min⁻¹ pendant 30 s.

Partie V. Mélange de nanoparticules pour les auto-assemblages

A. Auto-assemblages massifs et limités de QR

Tableau 1. Détails des mélanges de QR- $\alpha 2$ et de QR-A3 fonctionnalisés à saturation en protéines.

Ratio molaire (QR-A3:QD- $\alpha 2$)	Volume QR-A3 (μ L)	Volume QR- $\alpha 2$ (μ L)	[QR-A3] (nM)	[QR- $\alpha 2$] (nM)
5:1	25	5	62,5	12,5
2:1	20	10	50	25
1:1	15	15	37,5	37,5
1:2	10	20	25	50
1:5	5	25	12,5	62,5

Tableau 2. Détails des mélanges de QR- α 2 et de QR-A3 fonctionnalisés avec une quantité réduite de protéines.

Ratio molaire (QR-A3:QD- α 2)	Volume QR-A3 (μ L)	Volume QR- α 2 (μ L)	[QR-A3] (nM)	[QR- α 2] (nM)
5:1	12,5	2,5	64,2	12,8
2:1	10	5	51,3	25,6
1:1	7,5	7,5	38,5	38,5
1:2	5	10	25,6	51,3
1:5	2,5	12,5	12,8	64,2

B. Auto-assemblage de QD**Tableau 3. Détails des mélanges de QD aux ratios QD-A3:QD- α 2 variables.**

Ratio (QD-A3:QD- α 2)	Volume QD-A3 (μ L)	Volume QD- α 2 (μ L)	[QD-A3] (nM)	[QD- α 2] (nM)
5:1	25	5	83	17
2:1	20	10	66	33
1:1	15	15	50	50
1:2	10	20	33	66
1:5	5	25	17	83

Tableau 4. Analyse statistique des assemblages de QD réalisés avec 5 ou 100 équivalents molaires de protéine sur les QD.

équivalents molaires utilisés	monomères (%)	dimères (%)	petits assemblages (3-5)	grands assemblages (>5)
5 eq	9,0	5,0	23	63
100 eq	4,0	2,0	14	80

N_{total} pour 5 eq = 663 et N_{total} pour 100 eq = 1873

C. Auto-assemblage de QR et AuNP

Tableau 5. Détails des mélanges de AuNP-A3 et de QR- α 2 avec ratios AuNP-A3:QR- α 2 variables.

Ratio molaire (AuNP-A3:QR- α 2)	Volume AuNP-A3 (μ L)	Volume QD- QR- α 2 (μ L)	[AuNP-A3] (nM)	[QR- α 2] (nM)
2:1	14	7	50	25
1:1	10	10	37,5	37,5
1:2	7	14	25	50

D. Auto-assemblage de QD et AuNP

Tableau 6. Détails des mélanges de QD et AuNP aux ratios QD-A3:AuNP- α 2 variables.

Ratio (QD-A3:AuNP- α 2)	Volume QD-A3 (μ L)	Volume AuNP- α 2 (μ L)	[QD-A3] (nM)	[AuNP- α 2] (nM)
1:1	6	6	48	48
1:2	4	8	32	64
1:5	2	10	16	80

E. Auto-assemblage de GNR et QD

Tableau 7. Mélanges de GNR- α 2 et de QD-A3 utilisés avec les ratios GNR- α 2:QD-A3 variables réalisés avec des GNR₇₃₀.

Ratio molaire (GNR- α 2:QD-A3)	Volume GNR- α 2 (μ L)	Volume QD- A3 (μ L)	[GNR- α 2] (nM)	[QD-A3] (nM)
9:1	18	2	20,7	2,3
1:1	10	10	11,5	11,5
1:9	2	18	2,3	20,7

Tableau 8. Détails des mélanges de GNR- α 2 et de QD-A3 avec ratios GNR- α 2:QD-A3 variables réalisés avec des GNR₇₃₀ et des GNR₆₉₅ pour la caractérisation optique des auto-assemblages.

Ratio molaire (GNR- α 2:QD-A3)	Volume GNR- α 2 (μ L)	Volume QD-A3 (μ L)	[GNR- α 2] (nM)	[QD-A3] (nM)
1:9	2	18	2,3	20,7
2:8	4	16	4,6	18,4
3:7	6	14	6,9	16,1
4:6	8	12	9,2	13,8

Partie VI. Caractérisation

A. Spectroscopie UV—visible

Les spectres d'absorption sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UV—visible double faisceau (Cary 100 SCAN UV-Visible Spectrophotometer, Varian, Australie), piloté par le logiciel Scan. Les jeux de cuves utilisés sont des cuves de précision SUPRASIL® en quartz de 120 μ L (105.250-QS, Hellma®, France). La ligne de base est réalisée en présence des deux cuves remplies du solvant. Pendant la mesure de l'échantillon, la cuve de référence contenant le solvant permet de retrancher la ligne de base à l'absorbance mesurée au niveau de la cuve de l'échantillon. Les mesures sont réalisées dans une gamme de 0,1 à 1 unité d'absorbance, dans le domaine d'application de la loi de Beer-Lambert.

B. Spectroscopie de fluorescence

Le fluorimètre utilisé est le modèle Fluorolog-3™ (FL3-22, Horiba Jobin Yvon, Japon), piloté par le logiciel fluorescence™. La source utilisée est une lampe Xénon de 450W et l'intensité est collectée à un angle de 90° par rapport à la source. Les largeurs des fentes sont réglées en excitation et en émission à 2 nm (valeurs variant de 1 à 5 nm).

C. Électrophorèse sur gel d'agarose

Les migrations électrophorétiques sont réalisées à l'aide d'un système d'électrophorèse horizontal Gel XL Ultra V-2 de chez Labnet International. Le gel d'agarose est préparé à partir de 500 mg d'agarose introduits dans 100 mL de tampon borate 20 mM à pH 9 et mélangé à 90 °C jusqu'à la dissolution totale de l'agarose. La solution d'agarose est ensuite versée dans 4 moules de 53 mm x 53 mm ou dans 2 moules de 130 mm x 59 mm avant

d'ajouter les peignes. Pour la migration électrophorétique, le gel est immergé dans du tampon 20 mM à pH, les échantillons (contenant 3 % en volume de glycérol) sont introduits dans le gel et sont exposés à une tension de 50 V pendant 20 à 45 minutes. L'observation des gels est réalisée sous lumière UV (avec $\lambda_{em} = 365$ nm) ou visible.

D. Microscopie électronique en transmission

Pour chaque échantillon, une grille Formvar/C Ni ou Cu 300 mesh est placée pendant 1 à 2 min sur une goutte de l'échantillon puis du papier est utilisé pour sécher la grille. Typiquement, une concentration d'environ 10 nM en nanoparticules est utilisée.

La microscopie TEM est effectuée à l'aide d'un JEOL 1400 sous une tension d'accélération de 120 kV et muni d'une caméra GATAN Orius 1000. La microscopie HRTEM est effectuée avec un JEOL 2100 à pointe LaB₆ sous une tension d'accélération entre 80 et 200 kV et muni des caméras Orius 200D et UltraScan 1000.

E. Diffusion dynamique de la lumière

La diffusion dynamique de la lumière est mesurée à l'aide un Zetasizer Nano-ZS ZEN3600 (Malvern Instruments, Royaume Uni). Un laser ($\lambda = 633$ nm) illumine la solution, les photons diffusés sont collectés à 173° par un photomultiplicateur. Les mesures sont réalisées dans des microcuves jetables en PMMA de volume minimal 40 μ L, à 25°C. Les échantillons sont préalablement filtrés sur filtres Millipore jetables de 0,2 μ m (Millex GV, Sigma-Aldrich, France). Trois mesures de 10 scans, de 10 secondes chacune (durée d'un scan) sont réalisées pour chaque échantillon pour vérifier la reproductibilité des mesures.

F. Potentiel zêta

Le potentiel zêta des particules est mesuré dans des cellules zêta à capillaire replié (DTS 1070). Les échantillons sont insérés à l'aide de seringues jetables (Braun injekt 1 mL). De plus, la force ionique des échantillons est fixée entre 1 mM et 10 mM à l'aide de tampon NaP ou d'une solution de NaCl.

G. SAXS

Les expériences ont été effectuées à Rennes en collaboration avec l'Institut de Physique de Rennes (F. Artzner, C. Meriadec UMR CNRS 6251). Les profils de diffusion aux petits angles sont collectés à l'aide d'un détecteur Pilatus 330k (dectris) montés sur une set-up Guinir maison basé sur une microsource CuK α ($\lambda = 1.541$ Å) de chez Xenocs. La distance

entre échantillon est le détecteur est de 277 mm et est calibrée à l'aide de bécénate d'argent. Les patterns de rayons X sont alors enregistrés dans une gamme de l'espace réciproque $q = 4\pi\sin\theta/\lambda$ entre 0,01 et 1,75 Å⁻¹ où θ est l'angle de diffraction. Le temps d'acquisition est de 1 h. Les intensités de diffusion en fonction du vecteur d'onde radiale ont été déterminées par intégration circulaire.

Partie VII. Méthodes de détermination des concentrations en nanoparticules

A. Détermination de la concentration en AuNP

Connaître la concentration en nanoparticules d'une suspension représente une donnée cruciale pour mener à bien les travaux de fonctionnalisation et d'auto-assemblage qui seront décrits dans les parties suivantes de ce manuscrit. Pour le cas des nanoparticules d'or, il est possible de déterminer leur concentration par le biais d'une méthode développée par El-Sayed^[9] et approfondie par Huo^[10]. Elle repose sur une relation empirique permettant de relier D , la taille des nanoparticules en nm, à ε , leur coefficient d'extinction molaire en M⁻¹.cm⁻¹ :

$$\ln \varepsilon = 3,32111 \cdot \ln D + 10,80505 \quad \text{Eq. 1}$$

Ensuite, la loi de Beer-Lambert permet de déterminer C , la concentration molaire en nanoparticules en mol.L⁻¹ :

$$C = \frac{Abs}{\varepsilon \cdot l} \quad \text{Eq. 2}$$

Avec Abs l'intensité d'absorption de la bande plasmon et l le trajet optique en cm. Typiquement, les synthèses selon le protocole de G. Frens aboutissent à des suspensions de concentration en nanoparticules d'or de l'ordre de 10 nmol.L⁻¹.

B. Détermination de la concentration GNR

La concentration en GNR est déterminée selon la méthode de C.J. Murphy^[11]. Le coefficient d'extinction molaire des GNR, ε , a été relié à la position de leur bande plasmon longitudinale. Par une simple règle de trois, nous sommes en mesure d'obtenir le coefficient

d'extinction molaire de GNR fraîchement synthétisés. La concentration de la suspension peut être ensuite déterminée à l'aide de la loi de Beer-Lambert.

C. Détermination de la concentration AuNC

Il existe à notre connaissance peu de tentatives de détermination du coefficient d'absorption molaire des nanoclusters d'or. Toutefois, les travaux de quelques groupes nous ont permis d'observer que le coefficient des nanoclusters de tailles très inférieures se situe en général autour de $10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [12-16].

Dans le cas présent, une stratégie citée dans la littérature a été suivie. Elle consiste, dans un premier temps, à déterminer la concentration en or dans une suspension de nanoclusters par spectrométrie d'émission atomique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) en collaboration avec B. Lefeuvre (ISCR, université de Rennes 1). L'échantillon est préparé à l'aide de lavages par filtration centrifuge qui permettent d'éliminer les atomes d'or potentiellement non consommés lors de la synthèse, suivis par la dissolution des clusters d'or en milieu hautement acide. Cette méthode repose sur la mesure de l'émission des atomes d'or ionisés par l'injection de la suspension dans un plasma d'argon. La comparaison de son intensité d'émission avec celles d'échantillons de concentrations en or connues (une gamme étalon) indique alors la concentration totale en or de la suspension en nanoclusters.

Par ailleurs, à partir des mesures de la taille moyenne des nanoclusters déterminée par HRTEM et de la densité de l'or, la masse d'or moyenne d'un nanocluster est calculée. Le nombre de nanoclusters contenus dans la suspension de départ est ensuite déduit. À titre d'exemple, les synthèses réalisées aboutissent à des suspensions concentrées à environ $5 \mu\text{M}$ en nanoclusters d'or.

D. Détermination de la concentration QD

De la même façon que pour les nanoparticules métalliques, la concentration des QD peut être déterminée par spectroscopie UV-Visible. Peng *et al.*[10] ont établi une méthode reposant sur la relation entre taille des nanocristaux et la position du pic excitonique λ_{1s} de la première transition énergétique (E_{1s}) entre bande de valence et bande de conduction du semi-conducteur. Ainsi, après la simple acquisition du spectre d'absorption UV-Visible des particules, leur diamètre peut être déterminé à l'aide de l'Eq. 3 :

$$D = (1,6122 \times 10^{-9})\lambda_{1s}^4 - (2,6575 \cdot 10^{-6})\lambda_{1s}^3 + (1,6242 \cdot 10^{-3})\lambda_{1s}^2 - (0,4277)\lambda_{1s} + 41,57 \quad \text{Eq. 3}$$

Où D est le diamètre des nanoparticules en nm et λ_{1s} la longueur d'onde du pic excitonique en nm. Ce diamètre est alors utilisé avec l'Eq. 4 pour obtenir le coefficient d'extinction molaire ε_{1s} (en $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à la longueur d'onde λ_{1s} :

$$\varepsilon_{1s} = (1,38 \times 10^{26}) \times \left(\frac{D}{2}\right)^3 \quad \text{Eq. 4}$$

Finalement, la loi de Beer-Lambert^[17] donne la concentration molaire en nanoparticules C_{QD} en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (avec $DO_{\lambda_{1s}}$ l'absorbance mesurée à λ_{1s} et la longueur de la cuve utilisée, l , en cm) :

$$C_{QD} = \frac{DO_{\lambda_{1s}}}{\varepsilon_{1s} \times l} \quad \text{Eq. 5}$$

Toutefois, des travaux postérieurs mené par Jasieniak *et al.*^[18] ont mis en lumière des différences entre la relation qui lie taille de QD et ε_{1s} et celle qui lie λ_{1s} et ε_{1s} . Partant de ce constat, une révision a été apportée à la méthode de Peng : en utilisant λ_{1s} on obtient directement ε_{1s} à l'aide de l'Eq. 6 :

$$\varepsilon_{1s} = 155\,507 + (6,67054 \times 10^{13}) \times \exp\left(-\frac{E_{1s}}{0,10551}\right) \quad \text{Eq. 6}$$

Avec E_{1s} en eV^1 et qui permet alors d'appliquer la loi de Beer-Lambert corrigée en Eq. 7 :

$$C_{QD} = \frac{DO_{\lambda_{1s}}}{\varepsilon_{1s} \times l} \times \frac{\Delta E_{1s, \text{HWHM}}}{0,06} \quad \text{Eq. 7}$$

Cette correction utilise la moitié de la largeur à mi-hauteur du pic excitonique ($\Delta E_{1s, \text{HWHM}}$ en eV) et un facteur de normalisation moyen empirique de 0,06 afin de prendre en compte la distribution en tailles de l'échantillon concerné.

E. Détermination de la concentration QR

La concentration molaire en QR est déterminée à partir de la mesure de leur spectre d'absorption UV-Visible. On utilise alors une suspension en QR raisonnablement diluée

¹ $E_{1s} = hc/\lambda_{1s}$

(légèrement colorée) et A_{350} , son absorbance à 350 nm, est utilisée pour calculer sa concentration C :

$$C = \frac{A_{350}}{\epsilon_{350} \cdot l} \quad \text{Eq. 8}$$

Où ϵ_{350} est le coefficient d'absorption molaire des QR en $M^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, qui est donné par la formule suivante :

$$\epsilon_{350} = (0,38 \cdot 10^{26}) \times V \quad \text{Eq. 9}$$

V est le volume d'un *quantum rod* exprimé en cm^3 . En considérant un bâtonnet comme un cylindre de longueur h auquel on ajoute deux demi-sphères de rayon R à ses extrémités, son volume est :

$$V = (\pi R^2 \cdot h) + \left(\frac{4\pi \cdot R^3}{3} \right) \quad \text{Eq. 10}$$

F. Détermination de la concentration des QD CuInS₂/ZnS

De même que pour les QD CdSe/ZnS, la spectroscopie d'absorption UV—Visible permet de déterminer la concentration des QD CuInS₂/ZnS. Des travaux menés par Critchley *et al.*^[19] ont établi la relation suivante entre d , le diamètre des nanocristaux en nm, et λ_{EM} , leur longueur d'onde d'émission en nm :

$$d = 68,952 - 0,2136 \cdot \lambda_{PL} + 1,717 \cdot 10^{-4} \cdot \lambda_{PL} \quad \text{Eq. 11}$$

Ce diamètre théorique est ensuite utilisé dans le calcul du coefficient d'absorption molaire des nanocristaux ϵ :

$$\epsilon = 830 \times d^{3,7} \quad \text{Eq. 12}$$

Comme précédemment, ϵ est intégré dans la loi de Beer-Lambert pour parvenir à la concentration molaire en QD CuInS₂/ZnS.

Partie VIII. Composition des tampons

A. Tampon NaP

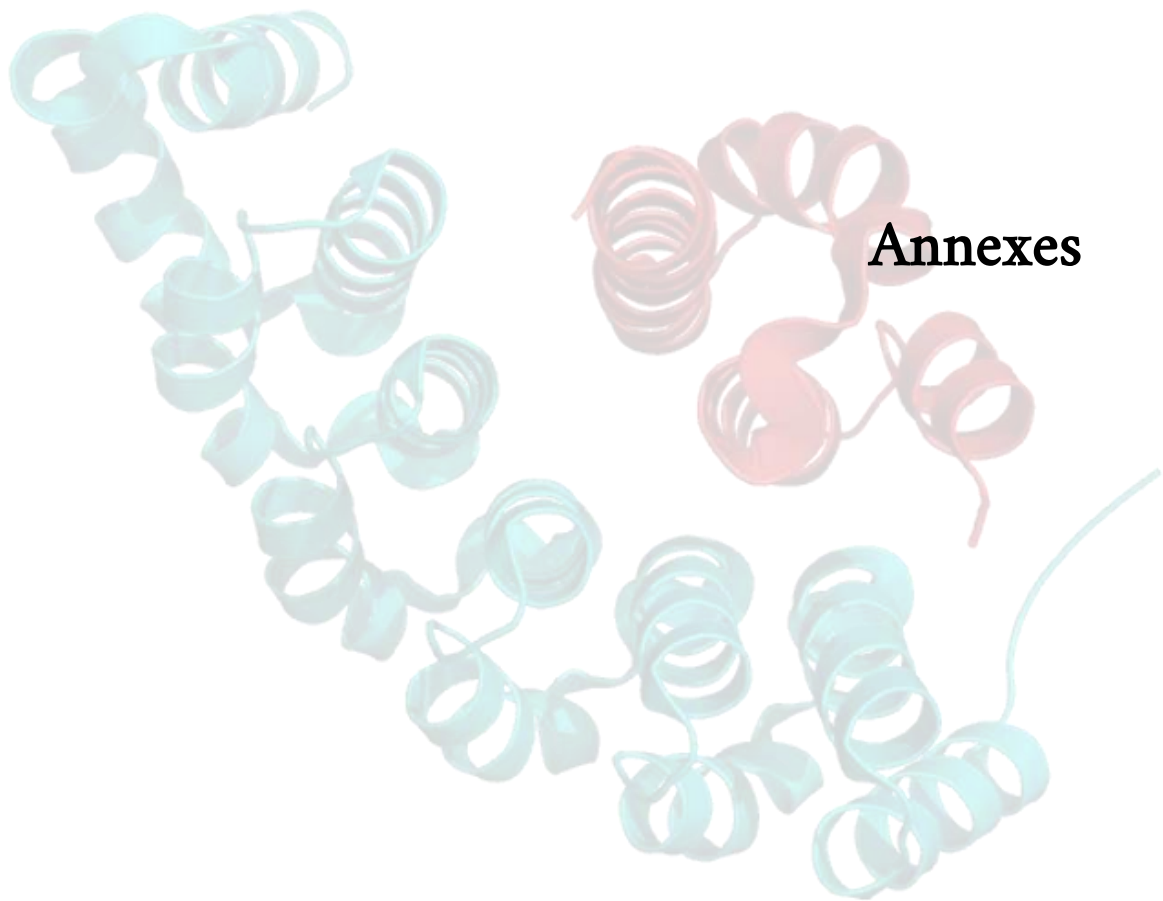
Le tampon NaP 50 mM à pH 7,4 est préparé (pour 1 L) avec 1,6 g de H_2NaPO_4 , 10,4 g de HNa_2PO_4 et 8,75 g de NaCl.

B. Tampon borate

Le tampon borate (10X) à pH 9,0 est préparé avec (pour 500 mL) avec 4 g de NaOH, 7,45 g de KCl, 6,1 g de H_3BO_3 et 29 mg de NaCl.

Bibliographie

- [1] G. Frens, *Nature Physical Science* **1973**, *241*, 20–22.
- [2] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, Q. Huo, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2007**, *58*, 3–7.
- [3] N. R. Jana, *Small* **2005**, *1*, 875–882.
- [4] X. Ye, C. Zheng, J. Chen, Y. Gao, C. B. Murray, *Nano Letters* **2013**, *13*, 765–771.
- [5] Z. Luo, X. Yuan, Y. Yu, Q. Zhang, D. T. Leong, J. Y. Lee, J. Xie, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 16662–16670.
- [6] L. Carbone, C. Nobile, M. De Giorgi, F. D. Sala, G. Morello, P. Pompa, M. Hytch, E. Snoeck, A. Fiore, I. R. Franchini, et al., *Nano Letters* **2007**, *7*, 2942–2950.
- [7] L. Li, A. Pandey, D. J. Werder, B. P. Khanal, J. M. Pietryga, V. I. Klimov, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 1176–1179.
- [8] M. Booth, A. P. Brown, S. D. Evans, K. Critchley, *Chemistry of Materials* **2012**, *24*, 2064–2070.



Annexes

Table des matières

Annexe I. Introduction à la diffusion dynamique de la lumière appliquée aux particules.....	
289	
Annexe II. Méthode SPR : principe	291
Annexe III. Caractérisation des propriétés optiques des assemblages de nanoparticules.....	
.....	293
<i>A. Assemblages de GNR et de QD.....</i>	<i>293</i>
<i>B. Assemblages de AuNP et QD.....</i>	<i>294</i>
Annexe IV. Publication	295

Annexe I. Introduction à la diffusion dynamique de la lumière appliquée aux particules

Pour caractériser la bioconjugaison des nanoparticules, la mesure de leur taille à l'aide de mesures de diffusion dynamique de la lumière (plus connue sous l'acronyme anglais DLS : *dynamic light scattering*) est faite avant et après greffage des protéines α -Repeat. Cette technique repose sur la mesure du coefficient de diffusion de nanoparticules en suspension en utilisant leur mouvement brownien comme « signature » de leur taille. Le diamètre hydrodynamique \varnothing_H des nanoparticules, qui correspond au diamètre de la nanoparticule et sa couche d'hydratation (voir Figure 1a), peut être ensuite calculé à l'aide de l'équation de Stokes-Einstein :

$$\varnothing_H = \frac{kT}{3\pi\mu D} \quad \text{Eq. 1}$$

Dans l'Eq. 1, μ est la viscosité du solvant, T est la température du solvant, k est la constante de Boltzmann et D est le coefficient de diffusion translationnel. Ainsi, comme montré en Figure 1b, un laser polarisé est utilisé comme source d'excitation à 633 nm sur la suspension de nanoparticules : la lumière diffusée par les nano-objets est alors collectée à un angle fixe (173°). Un photodétecteur mesure l'intensité de la lumière diffusée en fonction du temps sur des fenêtres de temps adaptées aux temps caractéristiques de la diffusion des objets. Les fluctuations de l'intensité moyenne dues au mouvement Brownien des nanoparticules sont ensuite traitées pour générer la fonction d'autocorrélation en intensité qui permet de retrouver d'évaluer le coefficient de diffusion translationnel des particules. Finalement, grâce à un algorithme d'inversion (méthode des cumulants) on peut déterminer le diamètre hydrodynamique \varnothing_H moyen pour des échantillons comprenant une taille moyenne majoritaire.

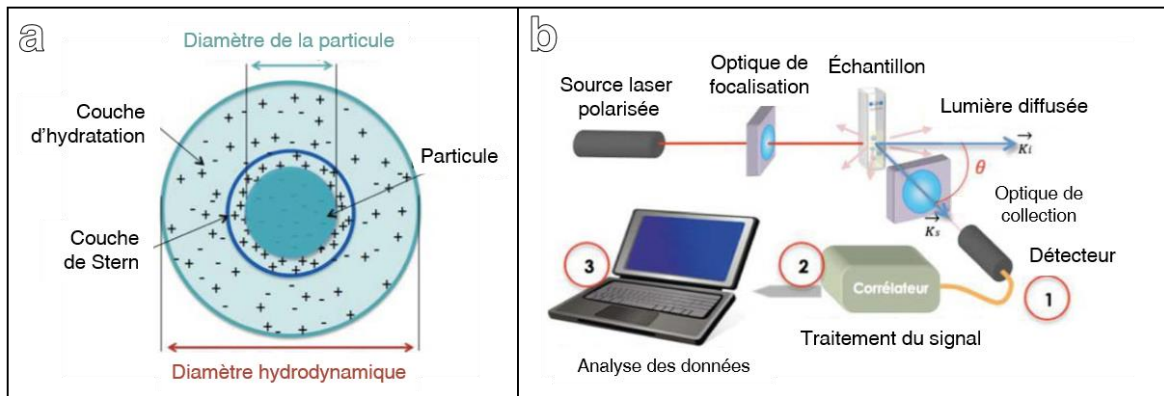


Figure 1. (a) schéma d'une nanoparticule et de sa couche d'hydratation qui constituent son diamètre hydrodynamique. (b) schéma du montage et du principe de la dls. extraits de [1].

Les limites d'application de la DLS ont particules reste la polydispersité de tailles. En effet si l'échantillon possède des particules de tailles très différentes, il est délicat de déterminer une taille moyenne. En revanche la DLS est un outil très sensible pour détecter la présence d'agrégats qui diffusent beaucoup plus que les petites particules. En effet, l'intensité diffusée par une particule dépend du rayon de cette dernière à la puissance 6 ($\text{signal} \propto R^6$) et la présence des objets les plus grands peut altérer la détection des particules aux diamètres les plus petits. Nous avons exploité très largement cet aspect de la DLS dans le cadre de ce travail pour optimiser la fonctionnalisation des nanoparticules.

Annexe II. Méthode SPR : principe

La méthode SPR repose sur l'excitation et la mesure des propriétés du plasmon de surface de l'or. Pour ce faire, une puce est constituée d'une fine couche de ce métal (50 nm dans le cas de l'appareil commercial Biacore) placée à l'interface entre une couche de verre et la solution de l'échantillon qui s'écoule dans la puce. Il s'agit de deux milieux aux indices de réfraction différents (Figure 2). Un faisceau de lumière monochromatique polarisée dans le plan du capteur illumine l'interface avec un angle d'incidence requis pour parvenir à la réflexion interne totale. Ce phénomène permet de coupler la lumière incidente à la résonance du plasmon de surface de l'or^[2,3]. Ainsi, la méthode SPR consiste à mesurer les variations de l'angle de résonance qui caractérise la résonance entre les plasmons de l'or et l'onde évanescente générée par la lumière incidente. La valeur de cet angle est amenée à évoluer lors d'un changement de l'indice de réfraction du milieu environnant de la couche d'or qui peut être causé par la formation et la dissociation de complexes moléculaires (Figure 2). La mesure en continu des variations de cet angle est assurée par un micro-réfractomètre qui traduit l'évolution du signal mesuré en fonction du temps dans un diagramme d'affinité appelé sensorgramme (Figure 3) dans lequel le signal est exprimé en RU (*resonance units*, 1 RU correspond à un décalage de 0,0001°).

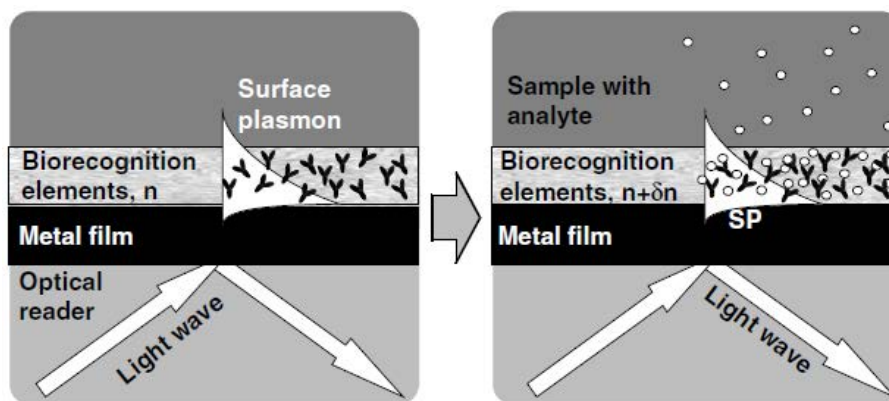


Figure 2. Représentation schématique du principe de la méthode SPR. Extrait de [3].

Expérimentalement, l'utilisation d'un montage SPR requiert un protocole composé en trois étapes. Tout d'abord, l'immobilisation de la protéine « ligand » consiste à fixer sur la puce l'un des deux partenaires qui composent le complexe moléculaire à étudier. Cette étape peut être effectuée par voie chimique, avec notamment des couplages à l'EDC/NHS qui permettent de fixer les biomolécules en condensant une de ses fonctions NH_2 avec une fonction COOH provenant d'une couche de dextran recouvrant la couche d'or de la puce^[4]. Il existe également

des stratégies plus sophistiquées utilisant des molécules biotinylées (protéines, anticorps et oligonucléotides) reconnues par la streptavidine pré-immobilisée sur la puce^[5]. Des méthodes d'immobilisation par voies physiques existent aussi et reposent sur la physisorption des biomolécules chargées négativement sur la surface chargée positivement^[6]. L'immobilisation du ligand permet d'enregistrer la ligne de base qui servira de référence pour l'utilisation de cette surface.

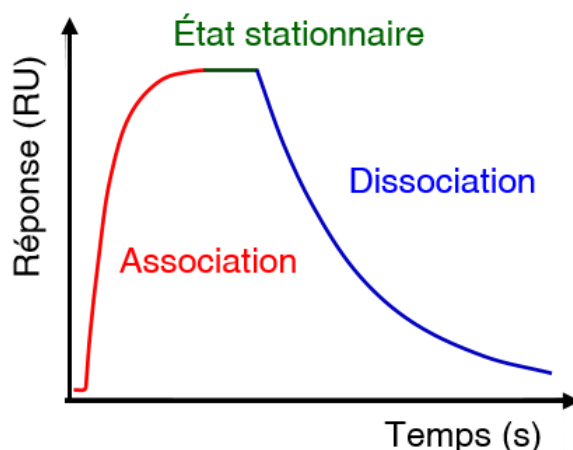


Figure 3. Allure typique d'un sensorgramme obtenu par SPR et les trois phases qui le composent.

Une fois l'étape d'immobilisation terminée, l'injection de l'analyte (c'est-à-dire le partenaire moléculaire du ligand immobilisé) est effectuée et induit une augmentation du signal mesuré selon une allure exponentielle. Il s'agit de la phase d'association, durant laquelle la constante d'association k_a du complexe moléculaire peut être déterminé par ajustement de courbe. Cette méthode utilise un modèle d'interaction de Langmuir de type 1:1 qui décrit le comportement de molécules libres dans un gaz ou un liquide s'adsorbant sur une surface^[7,8]. Cette phase se poursuit jusqu'à atteindre l'état stationnaire durant lequel la concentration en complexes ligand—analyte ne varie plus. La phase de dissociation, elle, démarre lorsque l'échantillon s'écoulant sur la surface de la puce est remplacé par de la solution tampon, causant ainsi la dissociation des complexes moléculaires et donc la diminution du signal mesuré. De cette phase peut être calculé la constante de dissociation k_d du complexe. Finalement, une étape de régénération permet de dissocier le ligand immobilisé de la surface par voie chimique ou physique.

Annexe III. Caractérisation des propriétés optiques des assemblages de nanoparticules

A. Assemblages de GNR et de QD

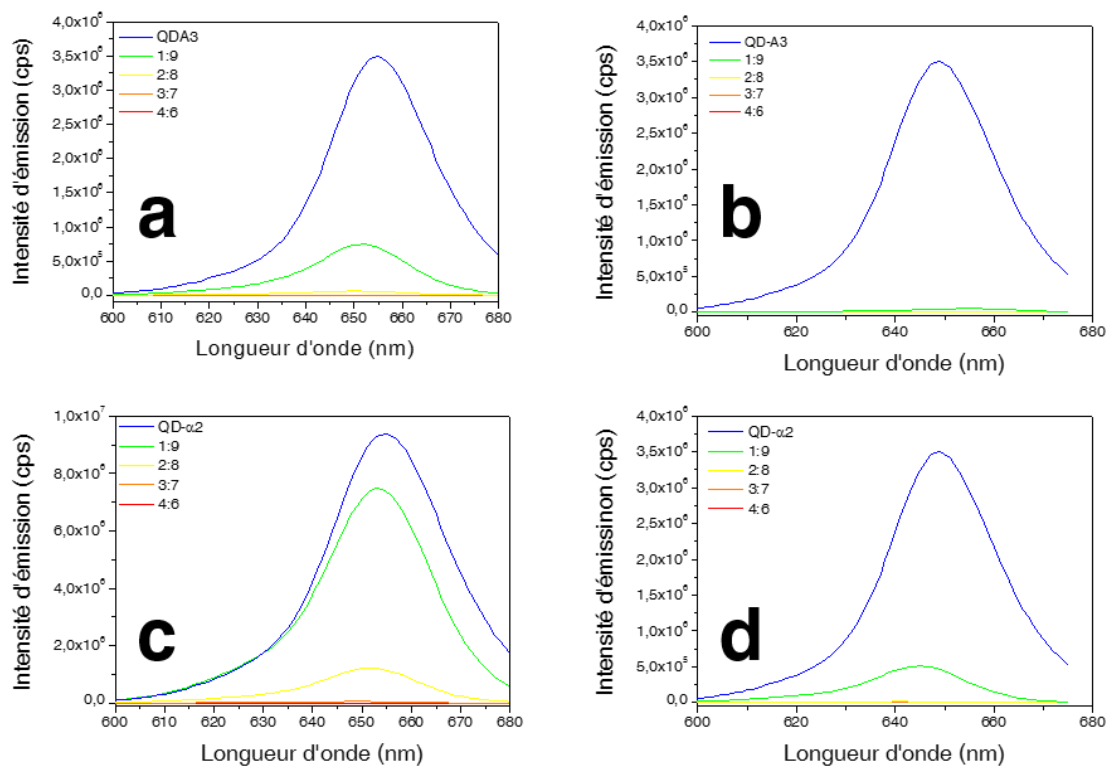


Figure 4. Spectres d'émission de fluorescence des QD-A3 mélangés à différentes concentrations avec des GNR- α 2 complémentaires GNR₇₃₀ (a) ou GNR₆₉₅ (b). Spectres d'émission de fluorescence des QD- α 2 mélangés à différentes concentrations avec des GNR- α 2 complémentaires GNR₇₃₀ (a) ou GNR₆₉₅ (b). λ_{exc} = 350 nm.

B. Assemblages de AuNP et QD

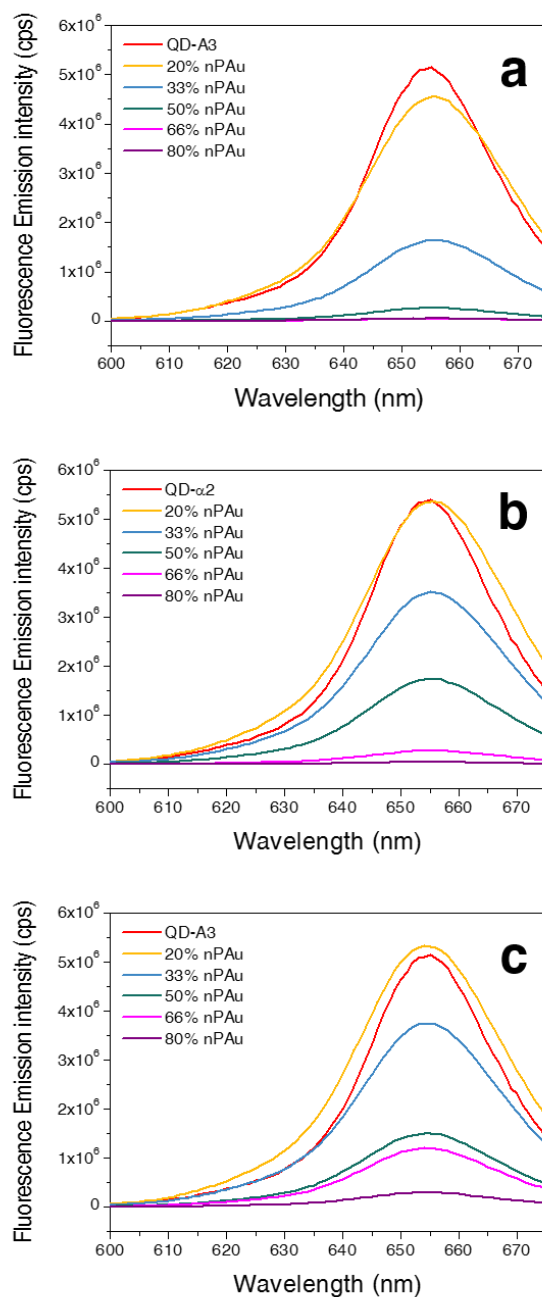
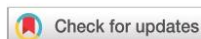


Figure 5. Spectres d'émission de fluorescence de mélanges (a) de QD-A3 et de AuNP- $\alpha 2$, (b) de QD-A3 et de AuNP-A3 et (c) de QD-A3 et de AuNP- $\alpha 2$ en présence d'un excès de $\alpha 2$ libre. $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm.

Annexe IV. Publication

“Hybrid gold nanoparticle-quantum dot self-assembled nanostructures driven by complementary artificial proteins”

Maxence Fernandez, Agathe Urvoas, Pascale Even-Hernandez, Agnès Burel, Cristelle Mériadec, Franck Artzner, Tahar Bouceba, Philippe Minard, Erik Dujardin and Valérie Marchi, (**soumis à Nanoscale**).



Cite this: DOI: 10.1039/c9nr09987e

Hybrid gold nanoparticle–quantum dot self-assembled nanostructures driven by complementary artificial proteins†

Maxence Fernandez,^a Agathe Urvoas,^b Pascale Even-Hernandez,^a
Agnès Burel,^c Cristelle Mériadec,^d Franck Artzner,^d Tahar Bouceba,^e
Philippe Minard,^{*b} Erik Dujardin^f and Valérie Marchi^{ib,*a}

Hybrid nanostructures are constructed by the direct coupling of fluorescent quantum dots and plasmonic gold nanoparticles. Self-assembly is directed by the strong affinity between two artificial α -repeat proteins that are introduced in the capping layers of the nanoparticles at a controlled surface density. The proteins have been engineered to exhibit a high mutual affinity, corresponding to a dissociation constant in the nanomolar range, towards the protein-functionalized quantum dots and gold nanoparticles. Protein-mediated self-assembly is evidenced by surface plasmon resonance and gel electrophoresis. The size and the structure of colloidal superstructures of complementary nanoparticles are analyzed by transmission electron microscopy and small angle X-ray scattering. The size of the superstructures is determined by the number of proteins per nanoparticle. The well-defined geometry of the rigid protein complex sets a highly uniform interparticle distance of 8 nm that affects the emission properties of the quantum dots in the hybrid ensembles. Our results open the route to the design of hybrid emitter–plasmon colloidal assemblies with controlled near-field coupling and better optical response.

Received 23rd November 2019,
Accepted 29th January 2020

DOI: 10.1039/c9nr09987e

rsc.li/nanoscale

Introduction

Tailoring the properties of light down to the nanometer scale has recently benefited from two major advances: the engineering of collective oscillations of free electrons in noble metals, surface plasmons, and the quantum confinement of noble metals and semiconductors leading to robust and efficient fluorophores. Efforts to couple the field enhancement and confinement near metal nanoparticles and the highly designable fluorescence of quantum dots (QD) within hybrid nanostructures has opened new horizons for nanophotonics^{1,2} with

promising applications in biomedical diagnosis (imaging and sensing)^{3,4} and therapy (optical hyperthermia),^{5,6} energy saving (reduced heat production in electronic chips)⁷ and green production (enhanced photovoltaics).⁸ However, the way leading to these objectives is still facing two major challenges: the preparation of optically activated metallic and semiconductor nanoparticles (NP) of controlled size, crystallinity and morphology and their organization into 2D and 3D higher-order architectures of well-controlled topology for functional devices.

The optoelectronic properties of these self-assembled hybrid QD–metal nanoparticle structures derive from a range of near-field mechanisms including energy transfer (e.g. Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) and field enhancement (e.g. Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS and Metal-Enhanced Fluorescence, MEF) that are directly affected by the structural and electrostatic parameters of self-assembly such as interparticle Coulomb interactions, dielectric constant of the material, topology and morphology of the assembly and its constituents. Among these parameters, the interparticle distance has a tremendous effect on the optical coupling of QDs with neighbouring nanoparticles within higher-order self-assembled architectures. In particular, the photoluminescence intensity of QDs is enhanced,⁹ diminished¹⁰ or shifted⁹ due to the exciton coupling between identi-

^aUniversity Rennes 1, Institute of Chemical Sciences, UMR 6226 CNRS, Campus Beaulieu, F-35042 Rennes, France. E-mail: valerie.marchi@univ-rennes1.fr

^bInstitute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

^cUniversity Rennes 1, Microscopy Rennes Imaging Center, UMS3480 BIOSIT, Campus Villejean, Rennes, France

^dUniversity Rennes 1, Institut de Physique de Rennes, UMR 6251 CNRS, Campus Beaulieu, F-35042 Rennes, France

^eSorbonne Université, CNRS, Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), Protein engineering platform, Molecular Interaction Service, F-75005 Paris, France

^fGroupe NanoSciences-CEMES, CNRS UPR 8011, 29 rue J. Marvig, B.P. 94347, F-31055 Toulouse, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c9nr09987e

cal proximal QDs or channelled towards other QDs if the emission band of one type overlaps the absorption band of the other.¹¹ When QDs are coupled to metal plasmonic nanoparticles, the exciton-plasmon coupling strongly depends on the interparticle distance in the NP assemblies and the energy overlap between plasmon and exciton bands.^{9,12,13} The QD photoluminescence intensity can be either enhanced or attenuated due to the competition between non-radiative energy transfer to plasmonic NPs and the local electric field enhancement.^{2,12,13} QD-metal hybrid nanostructures have been prepared using DNA strands,^{13,14} antibodies¹⁵ and proteins such as BSA^{16,17} or streptavidin^{15,18–20} which offer new opportunities to tailor the interparticle distance or the self-assembly structure.

In this article, we induce specific assembly by using one representative of highly specific artificial protein pairs that is created by choosing one specific protein and selecting the pair-forming partner by directed evolution.^{21,22} The family of artificial repeat proteins named α Reps are efficiently produced as recombinant proteins with a very stable folded structure and can be easily tailored to be grafted onto metallic surfaces using metal-binding cysteine tags. Furthermore, a very large library of α Reps with a variable surface was built and this allows the identification of new proteins binding tightly and specifically to any target protein of interest²³ using directed evolution methods.^{21,22} A specific pair of α Reps named A3/ α 2 obtained previously was chosen here for its small and compact complex prone to generate 3–10 nm interparticle gaps and for its facile grafting onto metallic and semiconductor surfaces in order to drive the QD-QD and QD-metallic gold nanoparticle (AuNP) self-organization. We have recently demonstrated the principle of colloidal self-assembly driven by pairs of α Rep proteins for homogeneous ensembles of protein-capped gold nanoparticles (AuNPs).²⁴ On the other hand, we have shown how to prepare stable bioactivated QDs with high affinity hydrophilic ligands,²⁵ that are being transposed here to A3 and α 2 proteins. Each complementary protein is tagged with a tri-cysteine tag motif at its C-terminal end and prepared at the milligram scale from small scale *E. coli* bacterial cultures.²¹ Next, the proteins are grafted onto peptide-stabilized CdSe@ZnS core-shell QDs by ligand exchange. The efficiency of protein grafting on the QD surface is demonstrated by the induction of the self-assembly of complementary α Rep protein-grafted QDs driven by the A3- α 2 protein affinity. Finally, our method is successfully applied to the self-assembly of hybrid QD-AuNPs from mixtures of complementary α Rep protein-grafted AuNPs and QDs. The extent and size of the superstructures depend on the molar ratio between the proteins and the nanoparticles used in the ligand exchange step. SAXS and TEM analysis of both QD-QD and QD-AuNP self-assembled ensembles reveal a highly uniform interparticle distance which is a crucial parameter to reduce the inhomogeneous dispersion of the optical behaviour of the hybrid superstructures. Finally their optical properties suggest that protein pairing affects the exciton or plasmon-exciton coupling within these nanostructures.

Experiment

Materials

Hydrogen tetrachloroaurate(III) trihydrate (HAuCl₄) and tetramethylammonium hydroxide, 25% w/w aqueous solution (TMAOH), were purchased from Alfa Aesar; tri-sodium citrate dihydrate and chloroform were purchased from Carlo Erba Reagents; DL-dithiothreitol, gold nanoparticles (10 nm diameter, OD 1, stabilized suspension in 0.1 mM PBS, reactant free), agarose, sodium phosphate monobasic (NaH₂PO₄), sodium chloride (NaCl) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Sigma-Aldrich. Boric acid was purchased from Honeywell Fluka and Cys-Cys-Cys-11-aminoundecanoyl-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl was purchased from PolyPeptide Laboratories or Agentide Inc. Proteins were stored at -80 °C in pH 7.4 phosphate buffer saline. Ultrapure Millipore water (18.2 M Ω) was used. Formvar/carbon film 300 mesh nickel grids were purchased from Oxford Instruments. All glassware was washed with aqua regia and rinsed with ultrapure water and ethanol. UV/Vis spectroscopic measurements were carried out on a Cary-100 UV-vis NIR spectrophotometer using Carry UV Win (version 3.00) software. Emission spectra were recorded on a Fluorolog-3 fluorimeter (Horiba Jobin-Yvon) using FluorEssence (version 2.0.9.0).

Peptide grafting for the stabilization of AuNPs and QDs

Gold nanoparticle preparation. 5 mL of 11 nM commercial suspension of 10 nm Au nanoparticles or 16 nm homemade citrate-capped nanoparticles²⁶ were incubated with an aqueous solution of Cys-Cys-Cys-11-aminoundecanoyl-15-amino-4,7,10,13-tetraoxapentadecanoyl (C5PEG4, 7 μ L, 20 mM). The mixture was allowed to stand for 2 h and is then washed, filtered and concentrated using Amicon® Ultra – 0.5 mL 100 K centrifugation filters and 20 mM NaP pH 7.4 buffer through multiple centrifugation cycles (3800g, 2 min). Typically, 230 μ L of 180 nM AuNP-peptide suspension was obtained.

Quantum dot preparation. The QDs used in this study were commercial CdSe@ZnS core@shell nanoprisms (Qdot™ 655 ITK™ organic quantum dots, Thermo Fisher Scientific) when no indication is given. Otherwise nanospheres (Qdot™ 545 ITK™, Thermo Fisher Scientific) were also used for comparison. Water solubilization and stabilization of quantum dots were achieved according to a previously described method.²⁷ First, 1 mL of 1 μ M commercial suspension of red quantum dots in decane was flocculated by centrifugation to transfer the nanocrystals from decane to chloroform. For this purpose, 1 mL of the quantum dot suspension was separated into 5 microtubes with 800 μ L of a 75/25 methanol/isopropanol mixture and was then centrifuged (660g, 5 minutes). The solvent was removed and the flocculated nanocrystals were redispersed in 1 mL of chloroform. This organic suspension was mixed successively with 70 μ L of 20 mM aqueous C5PEG4 solution and 12 μ L of TMAOH at 25% (w/w) in water. These additions induced the transfer of the nanocrystals from the organic solvent to the aqueous phase. Chloroform was

removed after 15 min of incubation and the mixture was evaporated (60 mbar, 20 min, room temperature) to remove the organic solvent traces. The excess peptide molecules were removed by size exclusion chromatography using Sephadex G-25 columns (NAP-5 from GE Healthcare) equilibrated and eluted with 20 mM NaP pH 7.4 buffer. The obtained aqueous suspension of QDs had a concentration of 500 nM.

Protein conjugation on AuNPs and QDs

First, cysteine-tagged α Rep proteins were incubated at 12 °C for 2 h in 100 mM DTT in order to reduce their intra- and inter-protein disulfide bonds. The excess DTT was removed by centrifugal elution through desalting columns (Zeba Spin Desalting Columns, 7 K MWCO) with 20 mM NaP pH 7.4 buffer. Next, peptide-stabilized nanoparticles were functionalized by incubating them (overnight, 12 °C) with 100 and 30 molar equivalents of proteins (α 2 or A3) for QDs and AuNPs, respectively. After incubation, the excess protein was removed by using an ultrafiltration unit Amicon® Ultra – 0.5 mL with a 30 000 molecular weight cutoff (MWCO) at 7200 rpm for 2 min and by washing 5 times with 20 mM NaP pH 7.4 buffer. The purified QD–protein and AuNP–protein conjugates were finally redispersed in 20 mM NaP pH 7.4 buffer.

Agarose gel electrophoresis

Agarose gel electrophoresis was used to monitor the charge and size variations in semiconductor and gold nanoparticles using a Gel XL Ultra V-2 (Labnet International, Inc., USA) horizontal electrophoresis system. The agarose gel was prepared by dissolving agarose (500 mg) in 20 mM borate pH 8 buffer (100 mL) at 90 °C. This solution was then poured into four 53 mm \times 53 mm gel trays or two 130 mm \times 59 mm trays within a gel caster. The gel was run in 20 mM borate pH 8 buffer for 20 to 45 minutes at a voltage of 9 V per 1 cm of gel and observed under UV light (365 nm).

A3/AuNP and A3/QD stoichiometry determination

AuNP-A3 and QD-A3 were prepared and purified from the excess A3 protein according to the methods described above. The concentrations of Au NPs and QDs were then determined by ICP-MS measurements. The A3/AuNP and A3/QD stoichiometries were determined by fluorescence emission measurements after dissolving the inorganic core of the nanoparticles while preserving the proteins as follows. The dissolution of the AuNPs was realized by incubating 32 μ L AuNP-A3 (90 nM) with 16 μ L saturated KCN for 1 hour. The dissolution of QD-A3 was realized by incubation with acidic HCl solution for 12 hours according to the literature.²⁸ Standard A3 solutions at different concentrations from a stock solution (concentration 37 μ M) were prepared in Na phosphate buffer (pH 7.4) and the fluorescence intensity *vs.* concentration was measured. According to the standard curve, the A3 concentration was determined by measuring the fluorescence intensities of the solution resulting from the dissolution of AuNP-A3 or QD-A3.

Transmission electron microscopy (TEM)

The 300 mesh carbon coated nickel grids were placed for 1 min on top of a 40 μ L sample droplet and dried up with paper. Examination was performed using a JEOL 1400 transmission electron microscope operated at 120 kV and supplied with a GATAN Orius 1000 camera. Particle sizes and interparticle distances were determined from TEM micrographs using the ImageJ Software.

Surface plasmon resonance (SPR)

Binding experiments and kinetic assays were carried out at 25 °C using a BIACORE 3000 (GE Healthcare) of the Platform of Molecular Interactions of the Institute of Biology Paris Seine (IBPS, Sorbonne University). α Rep proteins and BSA were immobilized on the CM5 sensor-chip (carboxymethylated dextran) through covalent amidation to the primary amine groups. For the immobilization step, the solutions of α 2 and A3 (200 nM) and a solution of 50 μ g mL⁻¹ of BSA, prepared in 10 mM sodium acetate buffer adjusted to a pH adapted to the pI of each protein (pH 5.0 for A3, pH 4.5 for BSA and pH 5.5 for α 2), were injected at 10 mL min⁻¹. A contact time of 7 min was used to obtain a high level of immobilization quantified as follows: 3900 RU (Resonance Units), 11 600 RU and 1500 RU for A3 on flow cell two (FC2), BSA on FC3 and α 2 on FC4 respectively. FC1 was left blank as a reference surface for non-specific binding and refractive index variations. This immobilization step was followed by the injection of 1 M ethanolamine HCl pH 8.4 to saturate the free residual amine groups. For binding experiments, a 2.3 nM solution of QD- α 2 in HBS-EP buffer (GE Healthcare, 10 mM pH 7.4 HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, and 0.005% P20) was flown over FC1 for the blank, FC2 for A3, FC3 for BSA and FC4 for α 2 at 5 μ L min⁻¹ for 5 min. Kinetic measurements were performed by injecting several concentrations of α 2 (between 0 and 2.4 nM) over the A3 surface at a flow rate of 5 μ L min⁻¹ with a 5 min association phase and an 8 min dissociation phase corresponding to the injection of the buffer solution. After each assay, the sensor-chip was regenerated by performing one injection of glycine-HCl buffer (pH 1.5) at 30 μ L min⁻¹ for 30 seconds or two injections of glycine-HCl buffer (pH 2.0) at 30 μ L min⁻¹ for 30 seconds. All experiments were performed in triplicate.

Preparation of nanoparticle mixtures

For the preparation of QD-QD or hybrid QD-AuNP self-assembled nanostructures, suspensions of freshly prepared QD–protein or AuNP–protein conjugates were used at the same concentration: 96 nM for QD-AuNPs or 100 nM for QD-QDs. Mixtures of these complementary populations were prepared with a final volume of 12 μ L for QD-AuNPs or 30 μ L for QD-QDs, adjusting volumes of each suspension to obtain particle- α 2 : particle-A3 volume ratios of 5 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2, and 1 : 5. The same procedure was applied to the preparation of QD- α 2/AuNP- α 2 non-specific mixtures and competition mixtures, where the QD-A3/AuNP- α 2 mixtures were incubated with an excess of free α 2 protein or free A3 protein (adding

100 molar equivalents) for a competition test. The mixtures were gently agitated before their incubation for 12 hours at 12 °C. Finally an excess of free protein was added after incubation on the QD-QD or hybrid QD-AuNP self-assembled nanostructures for a reversibility test.

Nanoparticle concentration determination

The concentrations of QDs in suspensions were calculated as described by Jasieniak *et al.*,²⁹ relying on the first absorption peak energy (E_{1S}) in order to calculate the QD absorption coefficient

$$\epsilon_{1S} = 155\,507 + 6.67054 \times 10^{13} \times e^{-E_{1S}/0.10551}$$

QD concentration was then determined by using the absorbance of the first absorption peak and its half-width-half-maximum, allowing a rescaling of the concentration from the nominal size distribution of the samples. The AuNP concentration was calculated from their absorption coefficient at 520 nm: $\ln \epsilon_{\lambda_{\text{LSP}}} = 3.32111 \times \ln D + 10.80505$, where D is the core diameter of the gold nanoparticles measured by TEM, according to Liu *et al.*³⁰

Small angle X-ray scattering (SAXS)

Small angle X-ray scattering images were obtained with the Pilatus 300k detector (dectris) mounted on a home-made Guinier setup equipped with a $\text{CuK}\alpha$ microsource ($\lambda = 1.541 \text{ \AA}$) from Xenocs. The sample to detector distance (277 mm) has been calibrated by using silver behenate. The X-ray patterns were therefore recorded for a range of reciprocal spacing $q = 4\pi \sin \theta / \lambda$ from 0.01 to 1.75 \AA^{-1} where θ is the diffraction angle. The acquisition time was 1 hour. The scattering intensities as a function of the radial wave vector were determined by circular integration.¹⁰

Results and discussion

QD-protein and AuNP-protein dispersions are prepared by a ligand exchange process in the presence of excess protein, as shown in Fig. 1a. The morphological and optical properties of the CdSe@ZnS core@shell quantum dots and the gold nanoparticles are summarized in Fig. S1 and S2, respectively.† The AuNPs and QDs have average diameters of $8.0 \pm 0.9 \text{ nm}$ and $8.9 \pm 1.4 \text{ nm}$ respectively. Their colloidal stability is maintained in buffered medium at pH 7.4 using an optimized tri-cysteine PEGylated ligand.^{27,31} The 8 nm diameter AuNPs exhibit a localized surface plasmon resonance (LSPR) at 520 nm (black curve) and the QDs exhibit an intense red emission band at 655 nm (red curve).

Upon protein grafting, the fluorescence efficiency of the water-soluble QD-C5PEG4 is reduced by 35% but the emission at 655 nm does not undergo any spectral shift. The AuNP absorption band at 520 nm is fully preserved (Fig. 1c).

The titration of QD-C5PEG4 with an increasing amount of protein has been monitored by agarose gel electrophoresis (Fig. 2). The grafting of proteins onto 9 nm or 2.5 nm QD and

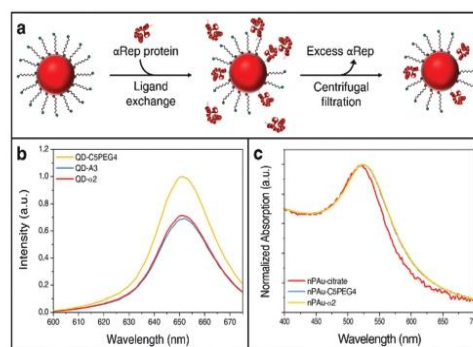


Fig. 1 (a) Schematic representation of protein grafting by ligand exchange at the surface of QD-C5PEG4. (b) Fluorescence emission spectra of peptide-stabilized QDs and protein-grafted QDs in PBS buffer for a 16 nM total QD concentration (excitation wavelength is 350 nm). (c) Normalized UV-visible spectra of the citrate-stabilized AuNPs in water, peptide-stabilized AuNPs and protein-grafted AuNPs in PBS buffer.

8 nm AuNPs is investigated through separate incubations with increasing amounts of proteins which are then compared after a 20 min migration time.³² The migration towards the positively charged electrode indicates that the net charges of peptide-stabilized and protein-grafted nanoparticles are negative. Interestingly, as proteins are gradually introduced into the peptide capping layer, the electrophoretic migration distance becomes shorter, which is consistent with the increase in the overall size of the functionalized particle and the reduction of the net negative charge at pH 8 since the proteins have pIs of 5.43 (A3), 7.07 ($\alpha 2$) and 4.7 for the peptide (C5PEG4). Moreover, the progressive decrease in the migration distance gives rise to a plateau that can be related to the saturation of the surface with a maximum number of α Rep proteins onto the nanoparticle surface leading to the maximum size and minimum net negative charge. In the case of $\alpha 2$ (Fig. 2, left panels), the migration distances are shorter than the corresponding ones for A3, which is attributed to the smaller size and net charge at pH 8 compared to A3.²⁴ Additionally, A3-grafted nanoparticles tend to form short trails in the agarose gel. This can be attributed to the propensity of A3 to dimerize at high concentrations,^{21,24} which favors interparticle interactions within the highly concentrated spot of particles deposited on the gel but can also alter the effective protein/particle stoichiometry if one grafted A3 dimerizes with one free A3.

As summed up in Table 1, the maximum number of proteins grafted onto the NP surface scales up with the surface area of the nanoparticles, A_{NP} .

The proteins can be approximated to two blocks ($2.8 \times 2.4 \times 4.3 \text{ nm}^3$) size for $\alpha 2$ and of ($3 \times 3 \times 6 \text{ nm}^3$) size for A3. As expected from their relative sizes, the corresponding area of each grafted protein, denoted by $A_{\text{prot}}^{\text{NP}}$, decreases with the size of the protein. The area of one grafted A3 protein is found to

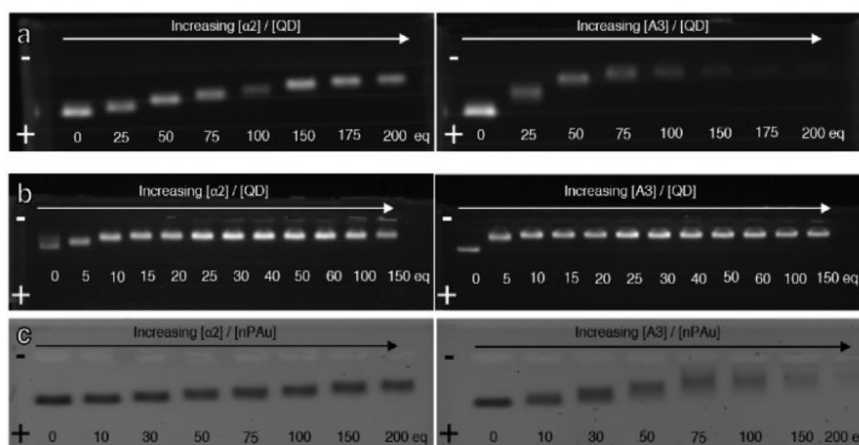


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of peptide-stabilized (a) 9 nm QD⁶⁵⁵, (b) 2.5 nm QD⁵⁴⁵ and (c) 8 nm AuNPs incubated with increasing amounts of $\alpha 2$ (left) or A3 (right). The buffer used is at pH 8.

be around 4 to 5 nm² which is significantly smaller than the expected A3 size (min area of 9 nm²) and therefore is hardly compatible with a compact monolayer of A3 proteins. This observation suggests that surface binding creates an effective high local concentration of A3 leading to the formation of a double layer of A3 as this protein is known to form A3-A3 dimers when concentrated. This does not prevent the subsequent A3- $\alpha 2$ pairing as the latter complex is much more stable.²³ To perform a more quantitative evaluation of the protein/particle stoichiometry, the amount of bound proteins was titrated after dissolution of the inorganic core of the NP-protein conjugates while preserving the proteins by using the intrinsic fluorescence intensity of the A3 protein. In the case of the A3 protein, AuNP-A3 conjugates and QD-A3 were first thoroughly cleared of excess free A3 proteins by multiple filtrations. The concentration of AuNP was first determined by inductively coupled plasma mass spectroscopy (ICP-MS). According to Dyer *et al.* the gold core of the purified AuNP-A3 was then dissolved in 3.7 M KCN, releasing A3 proteins. The concentration of A3 proteins initially bound to the AuNP was determined by fluorescence spectroscopy (Fig. S3†). We found that A3-saturated AuNPs, prepared with 100 molar equivalents of A3, contain an average of 80 A3 per AuNP (see Fig. S3†), which is in good agreement with the migration saturation estimate (Table 1). In the case of QD-A3, the CdSe@ZnS core shell QDs were dissolved in the presence of an acidic HCl solution according to Debayle *et al.* QD-A3 prepared from 100 molar equivalents of A3 were found to contain an average of 20 A3 per QD. This latter observation is in agreement with a smaller affinity of the A3 protein for the QD surface than for the Au surface (see Fig. S4†). Unfortunately, this method cannot be applied to $\alpha 2$ since its intrinsic fluorescence emission is too low to assess the concentration of $\alpha 2$ protein after NP dissolution.

Table 1 Summary of geometrical data of the NP-protein: A^{NP} designs the area of the NPs considered to be a cube, $N_{\alpha 2}^{sat}$ corresponds to the maximum number of proteins grafted onto the NP surface extracted from the electrophoresis gel when the plateau is reached. $A_{prot}^{NP} = A^{NP} / N_{prot}^{sat}$ is the corresponding area for one grafted protein

NP	A^{NP} (nm ²)	$N_{\alpha 2}^{sat}$	N_{A3}^{sat}	$A_{\alpha 2}^{NP}$ (nm ²)	A_{A3}^{NP} (nm ²)
8.9 nm QDs	475	$\geq 200 \pm 13$	100 ± 13	$\geq 2.4 \pm 0.2$	4.8 ± 0.6
2.5 nm QDs	38	15 ± 3	10 ± 3	2.5 ± 0.4	3.8 ± 0.9
8 nm AuNPs	384	$\geq 200 \pm 13$	75 ± 13	$\geq 1.9 \pm 0.2$	5.1 ± 0.7

To further assess the specific binding between QD-grafted proteins and complementary proteins, A3 proteins are immobilized on Surface Plasmon Resonance (SPR) sensor chips and subjected first to a high flux of QD- $\alpha 2$ and then to an influx of pure buffer. The SPR sensorgrams are shown in Fig. 3a. A strong positive association phase is observed in the case of the A3 coated surface. When the nanoparticles bound to the A3-coated surface are washed, a reduction in the SPR response is observed indicating that dissociation occurs leading to a new equilibrium state. No association is observed during control experiments performed either by immobilizing the identical $\alpha 2$ protein or Bovine Serum Albumin (BSA). These observations demonstrate the ability of QD- $\alpha 2$ to specifically bind to the A3 protein coated surface. To estimate the affinity constant K_D , the same experiment is performed with different QD- $\alpha 2$ concentrations, as shown in Fig. 3b. The data are fitted with a 1:1 single exponential interaction model (Fig. 3b, black lines) in both association and dissociation phases, suggesting a single binding mechanism of QD- $\alpha 2$ + A3 = QD- $\alpha 2$ -A3. The dissociation constant was extracted from three different approaches detailed in the experimental part and ESI (Fig. S5†). All the quantitative analyses consistently

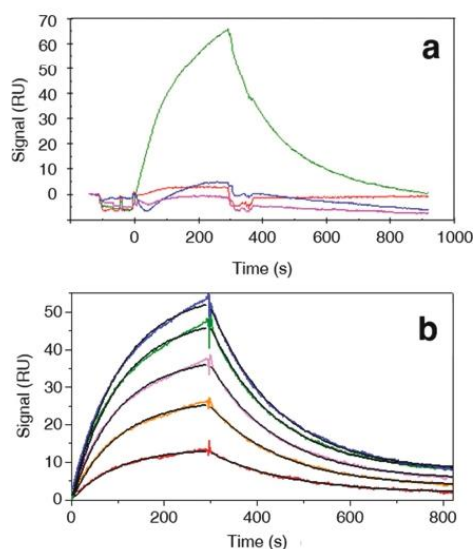


Fig. 3 QD- α 2 affinity for the A3 coated surface. (a) SPR sensorgrams during association and dissociation phases monitoring the interactions between QD- α 2 nanoparticles (2.3 nM) and immobilized protein surfaces: A3 (green curve), bovine serum albumin (blue curve), α 2 (pink curve) and a bare surface (red curve). (b) SPR sensorgrams during association and dissociation phases monitoring the interactions between the A3 immobilized surface and QD- α 2 nanoparticles at different concentrations: 0 nM; 0.4 nM; 0.8 nM; 1.2 nM; 1.6 nM; 2.0 nM and 2.4 nM (from bottom to top). Solid black lines are exponential fits to the association and dissociation phases.

yielded 5 nM dissociation constant similar to the one measured by ITC in free α 2/A3 protein pairs.²²

The protein pair affinity is high enough to drive the self-assembly of protein-grafted QD when the suspensions of QD- α 2 and QD-A3 are incubated together. The electrophoretic migrations of the complementary mixtures of QD- α 2 and QD-A3 (Fig. 4a, tracks iii–vii) are monotonously intermediate between those of pure protein-grafted QDs (Fig. 4a, tracks ii and viii) as the molar ratio between the two populations is varied. The migration distances were found to directly depend on the composition of the mixture. A brighter spot was seen on the same side of the excess partner (top side for tracks iii and iv where QD-A3 is in excess; bottom side for track vii where QD- α 2 is in excess) superimposed with a broader central trail which dominates tracks v and vi. The intermediate migrations observed for the complementary QD mixtures indicate a specific interaction that cannot be accounted for by simple superposition of non-interactive mixtures of the native suspensions. Zeta potential measurements confirm that protein grafting results in a decrease in the net surface charge of the NPs, which is in agreement with the isoelectric points of the proteins (Table S1†). The zeta potentials of the complementary QD mixtures cannot be determined due to the increased polydispersity of the mixtures. Indeed TEM obser-

vations reveal the formation of spatially limited assemblies giving oligomers of nanoparticles that cannot be found in the original QD- α 2 or QD-A3 populations (Fig. 4). The effect of the larger effective size of the complementary QDs appears to be screened by the intermediate net charge which acts as the dominant factor maybe because the electrophoresis is performed with low agarose percentage gel. The statistical analysis of the number of QDs per oligomer reveals the distribution of limited-size oligomers with 2 to 30 QDs per oligomer (see Fig. 4a), in agreement with the relatively low charge of the A3 protein bound to the surface of the QD (20 proteins/QD) estimated from fluorescence titration (see Fig. S6†). These observations confirm that the specific interaction between the complementary QDs results in new superstructures with intermediate net charge and larger effective size that can be maximized at QD-A3 : QD- α 2 molar ratios of 1 : 1 to 1 : 2.³³

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) experiments were performed to obtain more quantitative structural information about QD self-assemblies, which are summarized in Fig. 5. Pure QD-A3 and pure QD- α 2 suspensions produce similar featureless SAXS patterns (Fig. 5a, black curve). In contrast, the data of the equimolar QD-A3/QD- α 2 mixture show a marked peak at $q = 0.038 \text{ \AA}^{-1}$ (Fig. 5a, blue curve). After baseline subtraction, this broad scattering is well fitted by a Gaussian function centered at $q_0 = 0.0364 \text{ \AA}^{-1}$ (Fig. 5a, inset). In the Debye-Scherrer theory, this feature is characteristic of a small crystal with a center-to-center particle interdistance $d_{\text{RX}} = 17.2 \text{ nm}$. The full width of the peak Δq_0 of 0.0180 \AA^{-1} yields $N = q_0/\Delta q_0 \sim 2$ QD-proteins, which suggests that this broad scattering originates from a pair correlation function between two QDs and is attributed to the QD-A3- α 2-QD elementary pair.³⁴

The QD diameter determined from TEM images is $8.9 \pm 1.4 \text{ nm}$ (Fig. S2b†), and hence $d_{\text{RX}} = 17.2 \text{ nm}$ yields an interparticle distance of $8.3 \pm 1.4 \text{ nm}$, which is in good agreement with the value of $7.6 \pm 2.6 \text{ nm}$ obtained directly by TEM (Fig. S7†). The gap region between the two adjacent QDs matches precisely the expected size of the A3- α 2 protein complex (Fig. 5b). Hence both TEM and SAXS data strongly support the formation of QD-QD self-assemblies driven by the protein pair complexation. Interestingly, when competition experiments are run by adding an excess of free α 2 protein, the characteristic SAXS peak disappears (Fig. 5a, red curve), as expected from the entropic advantage of the free protein over the particle-bound protein in the binding event.^{23,24}

Beyond homogeneous QD-QD or AuNP-AuNP assemblies, our approach allows the formation of hybrid self-assembled nanostructures that associate QDs and AuNPs with a precise control of the interparticle distance. Both protein-grafted QD and AuNP samples were prepared following the procedure described in Fig. 1. The surface density of proteins is adjusted by using 100 or 30 molar equivalents of proteins during the ligand exchange step. Several mixtures of QD-A3 and AuNP- α 2 with different QD : AuNP molar ratios are produced at a fixed total nanoparticle concentration of 96 nM (see the Experiment section). In Fig. 6, TEM images reveal the formation of a protein-driven hybrid self-assembly where QDs and AuNPs

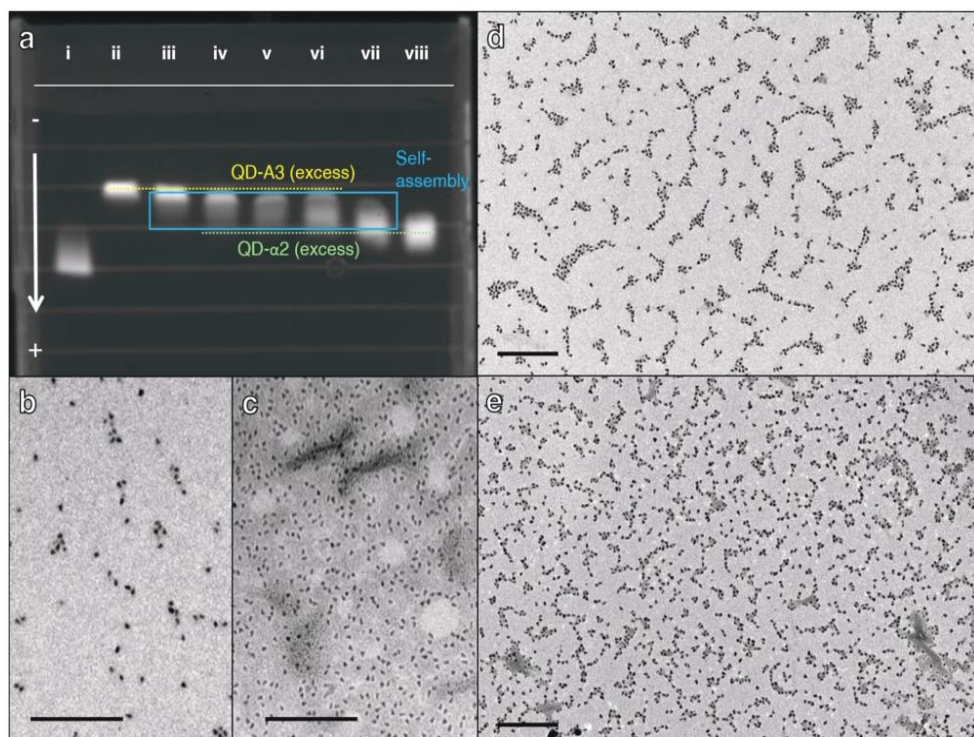


Fig. 4 (a) Fluorescence image of the agarose gel electrophoresis of pure QD-C5PEG4, QD-A3, mixtures of QD-A3 and QD- α 2 at 5 : 1, 2 : 1, 1 : 1, 1 : 2 and 1 : 5 molar ratios respectively and QD- α 2 in tracks i–viii respectively. TEM images of (b) pure QD-A3, (c) pure QD- α 2, (d) 1 : 1 QD- α 2 + QD-A3 mixture and (e) 1 : 5 QD- α 2 + QD-A3 mixture. Scale bars represent 100 nm.

coexist and systematically alternate. Indeed, assemblies of increasing dimensions are observed within the mixtures of complementary A3-grafted QDs and α 2-grafted AuNPs according to the nanoparticle : protein stoichiometry. Hybrid assemblies obtained from QDs and AuNPs with protein-saturated coating are very large (Fig. 6a, Fig. S8 and S9[†]) while mixtures produced from nanoparticles with more moderate surface density of proteins contain much smaller assemblies comprising a few tens of nanoparticles (Fig. 6b and g) down to trimers (Fig. 6c–e and Fig. S10[†]). A closer examination shows that >98% of QDs and >90% of AuNPs are engaged in a self-assembled pair (Table S2[†]), which qualitatively illustrates the high efficiency of the protein affinity driving force in this self-assembly. Control experiments using either a mixture of QD-A3, AuNP- α 2 and an excess of free α 2 proteins (Fig. S11[†]) or a mixture of non-complementary QD- α 2 and AuNP- α 2 (Fig. S12[†]) show dispersed AuNPs and QDs with no significant association.

Small Angle X-ray Scattering (SAXS) experiments performed using a (1 : 1) mixture of QD-A3 and AuNP- α 2 suspensions with protein-saturated coating exhibit a characteristic peak at $q = 0.0395 \text{ \AA}^{-1}$ (Fig. 7, blue curve). After baseline subtraction, this broad scattering is well fitted by a Lorentzian function cen-

tered at $q_0 = 0.0387 \text{ \AA}^{-1}$ (Fig. 7, inset). In the disordered crystal theory of Guinier, the Lorentzian shape indicates a disorder of second kind in a crystal which is liquid-like. This corresponds to the aggregate observed by TEM. The mean center-to-center particle interdistance $d_{RX}^{QD-AuNP} = 16.2 \text{ nm}$. In contrast, pure QD-A3 (black curve) and AuNP- α 2 (yellow curve) suspensions as well as the control competition (red curve) and reversibility (green curve) experiments with an equimolar QD-A3/AuNP- α 2 mixture produce featureless SAXS patterns (Fig. 7). A surface-to-surface interdistance of $7.75 \pm 1.15 \text{ nm}$ is estimated from the QD–Au center-to-center interdistance $d_{RX}^{QD-AuNP}$ and the NP diameters ($d_{TEM}^{Au} = 8 \text{ nm}$ and $d_{TEM}^{QD} = 8.9 \text{ nm}$) (see Fig. 7). Additional SAXS experiments performed with different sized QDs (see Fig. S13[†]) and the same AuNPs reveal the same behaviour and confirm a very well-defined interdistance. A surface-to-surface distance of $9 \pm 1 \text{ nm}$ for QD⁶⁰⁵ and $8.75 \pm 1 \text{ nm}$ for QD⁵⁴⁵ is estimated from the center-to-center distances found by SAXS for green and orange QDs (see Fig. S14[†]). As in the case of QD–QD superstructures, this value around 8 nm is in the range of the A3- α 2 protein complex size.

Both SAXS and TEM experiments confirm that complementary and available surface-tethered proteins are necessary to

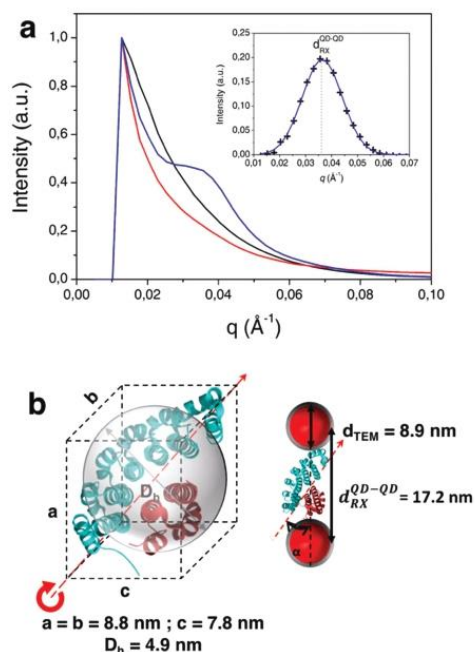


Fig. 5 (a) SAXS data of QD-A3 (black curve) showing the characteristic self-assembly signal when mixed with complementary QD- α 2 (blue curve) and competition experiment run with an excess of free α 2 protein (red curve). Inset: peaks of the QD-A3/QD- α 2 mixture and Gaussian fit (see the text). (b) (Left) Crystallographic data (a, b, c)²⁰ and the hydrodynamic diameter D_h of the A3- α 2 protein complex; (right) Schematic view of the complementary QD arrangement including the QD diameter measured by TEM (d_{TEM}) and the SAXS interdistance (d_{RX}).

induce the colloidal assembly. The mean surface-to-surface interdistance in the complementary mixtures found by SAXS is 8 nm, in agreement with the protein complex size.

In addition, the protein-driven assembly has a marked effect on the exciton-plasmon interaction inside the hybrid aggregates as illustrated in Fig. 8 and S15.† When a suspension of QD-A3 is mixed with increasing amounts of non-complementary AuNP-A3 (Fig. 8, grey bars), a gradual decrease in the intensity is observed, which can be almost entirely ascribed to the relative dilution and some A3 dimerization at a high AuNP-A3 molar fraction. When the AuNPs are functionalized with α 2 (Fig. 8, red bars), specific complementary interactions induce a much larger quenching of luminescence, which is essentially suppressed for an equimolar mixture, *i.e.* when all QDs and AuNPs are potentially engaged in hybrid superstructures. The sub-10 nm interparticle distance seems to favor the QD (donor) to AuNP (acceptor) energy transfer and non-radiative decay over metal-enhanced fluorescence.^{35,36} Interestingly, the effect due to the modification of the local dielectric constant in the self-assembled structure can be disregarded by comparing the emission of QD-A3- α 2-AuNP mix-

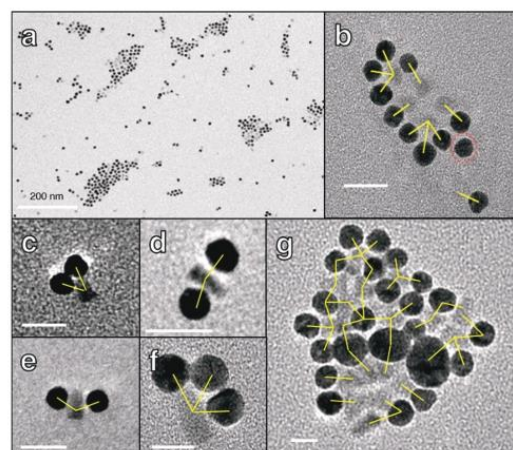


Fig. 6 TEM images of (a) large self-assemblies of QD-A3 and AuNP- α 2 and (b–g) spatially limited self-assemblies QD-A3 and AuNP- α 2. Scale bar is 20 nm for (b) and (d). Scale bar is 10 nm for (c). Yellow bars represent QD–AuNP pairs that are possibly linked by protein pairs. The red dotted circle indicates AuNPs with no obvious link to QDs.

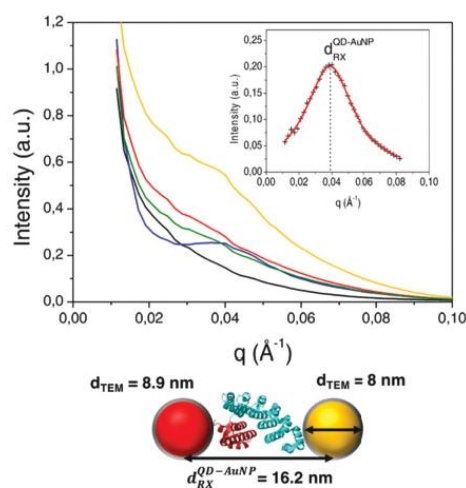


Fig. 7 SAXS data showing a characteristic self-assembly signal when QD-A3 and AuNP- α 2 are mixed together (blue curve). Inset: peaks of the QD-A3/AuNP- α 2 mixture and Lorentzian fit (see text). Pure QD-A3 (black curve) and AuNP- α 2 (yellow curve) as well as competition experiments run with an excess of free α 2 proteins (red curve) and reversibility control experiment performed by the addition of free α 2 proteins (green curve) show no sign of organization. Schematic view of the complementary QD/AuNP arrangement including QD and Au diameters measured by TEM and the center-to-center interdistance ($d_{RX}^{QD-AuNP}$).

tures to the equivalently specific but plasmon-free QD-A3- α 2-QD case (Fig. 8, black circles). In the latter case, the luminescence decreases moderately as QD- α 2 are introduced and

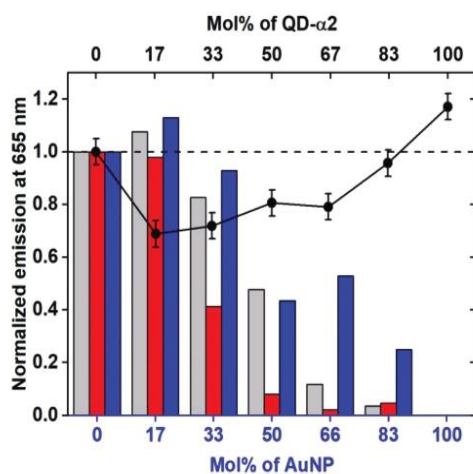


Fig. 8 Histograms showing the evolution of QD-A3 fluorescence ($\lambda_{em} = 655$ nm) in the presence of AuNPs under non-specific (AuNP-A3, grey), specific (AuNP- $\alpha 2$, red) and competitive (AuNP- $\alpha 2$ and excess $\alpha 2$, blue) conditions. Black circle data show the QD-A3 fluorescence ($\lambda_{em} = 655$ nm) in the presence of specific QD- $\alpha 2$ using the same A3- $\alpha 2$ protein pair. Fluorescence intensities are normalized to the value for pure QD-A3 (0 Mol% of AuNP or QD- $\alpha 2$) by taking into account the dilution factor. The dashed line corresponds to the expected normalized fluorescence intensity for QD-A3 corrected based on the dilution.

form larger aggregates but it remains higher than 70% of the intensity value for pure QD-A3 and it increased back as soon as QD- $\alpha 2$ is in excess. The reduction in QD fluorescence observed in the hybrid assembly cannot be solely ascribed to the assembly process or to the modification of the scattering properties by an effective increase in the local dielectric constant but might also be related to the plasmon-mediated non-radiative decay. Finally, when the protein-driven colloidal assembly is performed in the presence of a large excess of free $\alpha 2$ protein, a competition is set for the $\alpha 2$ -A3 protein pair. It is expected that the small $\alpha 2$ protein will preferentially bind to QD-A3 resulting in a mixture where QD-A3- $\alpha 2$ coexists with AuNP- $\alpha 2$ with minimal interaction. The fluorescence of the mixture under competitive conditions (Fig. 8, blue bars) is indeed equal or higher than the fluorescence of the non-specific mixture. In particular, when the AuNP molar fraction is high, the binding of free $\alpha 2$ to form QD-A3- $\alpha 2$ seems to further limit the non-specific binding (A3 dimerization), and the evolution of luminescence is closer to the linear decrease expected for simple dilution. The evolution of fluorescence in complementary interacting QD-A3 (with different emission wavelengths) and AuNP- $\alpha 2$ mixtures also exhibits a quenching as shown in Fig. S15.† However, there is no simple correlation between the spectral overlap of the emission band and the plasmon band that would permit the discrimination of the different contributions of the mechanisms (MET or FRET) involved in the observed coupling (see Fig. S16†).

Conclusion

To conclude, we have shown that high affinity pairs of artificial repeat proteins offer a unique platform to translate specific biomolecular interactions to functional colloidal self-assemblies. The main assets of our approach exploit (i) the very low (around 5 nM) dissociation constant, (ii) the pair specificity that makes it possible to develop, at will, orthogonal pairs for complex hybrid constructions and (iii) the rigid structures of the proteins and their complexes that enable a strategy for topologically determined 3D assemblies. In this work, we focus on creating and characterizing superstructures comprising protein-coated semi-conductor QDs only and their plasmonic hybrid extension by coupling to gold nanoparticles. Using gel electrophoresis and SPR measurements, we demonstrate a generic approach for grafting any alpha-repeat protein on the surface of quantum dots without altering the biorecognition. The self-assemblies have been structurally analysed by TEM and SAXS, which reveal that the surface-to-surface nanoparticle interdistance is around 8 nm which is in the range of the size of the protein pair. As the 3D structure of the A3- $\alpha 2$ complex is known, one can modulate the interdistance between anchored nanoparticles and thus their optical coupling by extending the proteins with additional motifs without destabilizing the binding interface with $\alpha 2$. Given their modular nature and the geometry of the $\alpha 2$ helix arrangement, alphaRep proteins could be engineered either by changing the number of motifs along a chosen protein, each motif resulting in an additional 1 nm distance. We also observe that the extent of the superstructures can be tuned by adjusting the surface density of grafted proteins. The higher the protein:nanoparticle stoichiometry, the larger is the size of the resulting self-assembled superstructure. Conversely, QD-QD or hybrid QD-Au oligomers form when the nanoparticles carry a few bound proteins, giving access to model systems such as QD-Au-QD trimers.³⁷ Finally, the luminescence of the QDs is quenched when they are bound to Au nanoparticles through the A3- $\alpha 2$ bridge. Hybrid superstructures with adjustable luminescence properties should be produced by tuning the spectral overlap between the excitonic and plasmonic resonances making our approach a versatile tool for biosensing applications.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

The Agence Nationale de la Recherche (ANR, contract no. ANR-16-CE09-0027-02 HYPNAP and ANR-14-CE08-0004 ARTEMIS) funded this work. We are indebted to the Region Bretagne for the financial support of the MF's PhD fellowship.

Notes and references

- S. Bidault, A. Devilez, V. Maillard, L. Lermusiaux, J.-M. Guigner, N. Bonod and J. Wenger, *ACS Nano*, 2016, **10**, 4806–4815.
- A. O. Govorov, G. W. Bryant, W. Zhang, T. Skeini, J. Lee, N. A. Kotov, J. M. Slocik and R. R. Naik, *Nano Lett.*, 2006, **6**, 984–994.
- P. D. Howes, S. Rana and M. M. Stevens, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 3835–3853.
- T. Sannomiya and J. Vörös, *Trends Biotechnol.*, 2011, **29**, 343–351.
- A. Klinkova, R. M. Choueiri and E. Kumacheva, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 3976–3991.
- N. S. Thakur, G. Patel, V. Kushwah, S. Jain and U. C. Banerjee, *ACS Appl. Bio Mater.*, 2019, **2**, 349–361.
- J. Liu, J. Mantell, N. D. Bartolo and M. R. Jones, *Small*, 2019, **15**, 1804267.
- N. Zhou, V. López-Puente, Q. Wang, L. Polavarapu, I. Pastoriza-Santos and Q.-H. Xu, *RSC Adv.*, 2015, **5**, 29076–29097.
- E. Henry, A. Dif, M. Schmutz, L. Legoff, F. Amblard, V. Marchi-Artzner and F. Artzner, *Nano Lett.*, 2011, **11**, 5443–5448.
- T. Bizien, J.-C. Ameline, K. G. Yager, V. Marchi and F. Artzner, *Langmuir*, 2015, **31**, 12148–12154.
- Z. Tang, N. A. Kotov and M. Giersig, *Science*, 2002, **297**, 237.
- G. C. des Francs, A. Bouhelier, E. Finot, J. C. Weeber, A. Dereux, C. Girard and E. Dujardin, *Opt. Express*, 2008, **16**, 17654–17666.
- D. Sun, Y. Tian, Y. Zhang, Z. Xu, M. Y. Sfeir, M. Cotlet and O. Gang, *ACS Nano*, 2015, **9**, 5657–5665.
- W.-W. Zhao, P.-P. Yu, Y. Shan, J. Wang, J.-J. Xu and H.-Y. Chen, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 5892–5897.
- J. M. Slocik, A. O. Govorov and R. R. Naik, *Supramol. Chem.*, 2006, **18**, 415–421.
- K. K. Haldar, T. Sen and A. Patra, *J. Phys. Chem. C*, 2010, **114**, 4869–4874.
- G. Mandal, M. Bardhan and T. Ganguly, *J. Phys. Chem. C*, 2011, **115**, 20840–20848.
- Y. Fu, J. Zhang and J. R. Lakowicz, *Chem. Commun.*, 2009, 313–315.
- J. Lee, T. Javed, T. Skeini, A. O. Govorov, G. W. Bryant and N. A. Kotov, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 4819–4823.
- E. Oh, M.-Y. Hong, D. Lee, S.-H. Nam, H. C. Yoon and H.-S. Kim, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 3270–3271.
- A. Urvoas, A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, M. Graille, D. Durand, D. C. Desravines, H. van Tilbeurgh, M. Desmadril and P. Minard, *J. Mol. Biol.*, 2010, **404**, 307–327.
- A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec and P. Minard, *Trends Biotechnol.*, 2012, **30**, 512–520.
- A. Guellouz, M. Valerio-Lepiniec, A. Urvoas, A. Chevrel, M. Graille, Z. Fourati-Kammoun, M. Desmadril, H. van Tilbeurgh and P. Minard, *PLoS One*, 2013, **8**, e71512.
- K. L. Gurunatha, A. C. Fournier, A. Urvoas, M. Valerio-Lepiniec, V. Marchi, P. Minard and E. Dujardin, *ACS Nano*, 2016, **10**, 3176–3185.
- A. Dif, E. Henry, F. Artzner, M. Baudy-Floc'h, M. Schmutz, M. Dahan and V. Marchi-Artzner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 8289–8296.
- G. Frens, *Nat. Phys. Sci.*, 1973, **241**, 20–22.
- T. Bizien, P. Even-Hernandez, M. Postic, E. Mazari, S. Chevance, A. Bondon, C. Hamon, D. Troadec, L. Largeau, C. Dupuis, C. Gosse, F. Artzner and V. Marchi, *Small*, 2014, **10**, 3707–3716.
- M. Debayle, E. Balloul, F. Dembele, X. Xu, M. Hanafi, F. Ribot, C. Monzel, M. Coppey, A. Fragola, M. Dahan, T. Pons and N. Lequeux, *Biomaterials*, 2019, **219**, 119357.
- J. Jasieniak, L. Smith, J. van Embden, P. Mulvaney and M. Califano, *J. Phys. Chem. C*, 2009, **113**, 19468–19474.
- X. Liu, M. Atwater, J. Wang and Q. Huo, *Colloids Surf., B*, 2007, **58**, 3–7.
- A. Dif, F. Boulmedais, M. Pinot, V. Roullier, M. Baudy-Floc'h, F. M. Coquelle, S. Clarke, P. Neveu, F. Vignaux, R. L. Borgne, M. Dahan, Z. Gueroui and V. Marchi-Artzner, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 14738–14746.
- V. Roullier, S. Clarke, C. You, F. Pinaud, G. Gouzer, D. Schaible, V. Marchi-Artzner, J. Piehler and M. Dahan, *Nano Lett.*, 2009, **9**, 1228–1234.
- R. L. Rich and D. G. Myszka, *J. Mol. Recognit.*, 2008, **21**, 355–400.
- C. Chi, F. Vargas-Lara, A. V. Tkachenko, F. W. Starr and O. Gang, *ACS Nano*, 2012, **6**, 6793–6802.
- K. Okamoto, M. Funato, Y. Kawakami and K. Tamada, *J. Photochem. Photobiol., C*, 2017, **32**, 58–77.
- O. Kulakovich, N. Strekal, A. Yaroshevich, S. Maskevich, S. Gaponenko, I. Nabiev, U. Woggon and M. Artemyev, *Nano Lett.*, 2002, **2**, 1449–1452.
- B. Rousseaux, D. Dzsotjan, G. Colas des Francs, H. R. Jauslin, C. Couteau and S. Guérin, *Phys. Rev. B*, 2016, **93**, 045422.

Bibliographie

- [1] M. Mainard, D. Jacob, *Photoniques* **2016**, 40–44.
- [2] H. Raether, in *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings* (Ed.: H. Raether), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **1988**, pp. 91–116.
- [3] M. Piliarik, H. Vaisocherová, J. Homola, in *Biosensors and Biodetection* (Eds.: A. Rasooly, K.E. Herold), Humana Press, Totowa, NJ, **2009**, pp. 65–88.
- [4] S. Löfås, B. Johnsson, Å. Edström, A. Hansson, G. Lindquist, R.-M. M. Hillgren, L. Stigh, *Biosensors and Bioelectronics* **1995**, *10*, 813–822.
- [5] H. Vaisocherová, A. Zítová, M. Lachmanová, J. Stěpánek, S. Králíková, R. Liboska, D. Rejman, I. Rosenberg, J. Homola, *Biopolymers* **2006**, *82*, 394–398.
- [6] H. Wang, S. Chen, L. Li, S. Jiang, *Langmuir* **2005**, *21*, 2633–2636.
- [7] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **1918**, *40*, 1361–1403.
- [8] I. Langmuir, *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38*, 2221–2295.

Titre : Auto-assemblage de nanoparticules métalliques et semi-conductrices dirigé par reconnaissance entre protéines artificielles

Mots clés : nanoparticules d'or, nanocristaux semi-conducteurs, auto-assemblage, protéines artificielles, interactions protéine-nanoparticule

Résumé : L'auto-assemblage de nanoparticules dirigé par des biomolécules constitue une approche prometteuse pour la mise au point de nanomatériaux structurés présentant des propriétés optiques collectives originales. L'objet de cette thèse concerne l'auto-assemblage de nanoparticules métalliques et semi-conductrices dirigé par des protéines artificielles appelées α -Repeat. Dans cette optique, des nanocristaux semi-conducteurs (CdSe/ZnS ou CdSe/CdS) et des nanoparticules d'or sphériques ou anisotropes ont été préparés. Ces nanoparticules ont été fonctionnalisées avec des ligands peptidiques PEGylés, qui leur confère une stabilité colloïdale satisfaisante tout en conservant leurs propriétés optiques. Une stratégie de fonctionnalisation basée sur des étiquettes d'affinité poly-cystéine et poly-histidine a permis de greffer les protéines sur la surface des nanoparticules inorganiques.

Les nanoparticules ainsi fonctionnalisées avec les protéines artificielles ont ensuite été utilisées pour l'auto-assemblage de nanoparticules semi-conductrices et l'auto-assemblage hybride entre des nanoparticules semi-conductrices et des nanoparticules métalliques. L'étude structurale des ensembles obtenus a montré, dans certains cas, une interdistance bien définie et inférieure à 10 nm. Finalement, l'étude des propriétés optiques a révélé des transferts d'énergie non radiatifs entre nanoparticules semi-conductrices et nanoparticules métalliques, qui témoignent d'interactions exciton—plasmon très fortes induites par l'auto-assemblage.

Title: Semiconductor and metal nanoparticles self-assembly driven by artificial proteins recognition

Keywords: gold nanoparticles, semiconductor nanocrystals, self-assembly, artificial proteins, protein-nanoparticle interactions

Abstract: Nanoparticles self-assembly driven by biomolecules is a promising approach for developing nanostructured materials with new optical properties. The purpose of this work is the self-assembly of metal and semiconductor nanoparticles directed by artificial proteins called α -Repeat. For this purpose, semiconductor nanocrystals (CdSe/ZnS or CdSe/CdS) and spherical or anisotropic gold nanoparticles have been prepared. These nanoparticles have been functionalized with PEGylated peptide ligands providing them adequate colloidal stability while maintaining their optical properties. A functionalization strategy based on poly-cysteine and poly-histidine tags has allowed the proteins to be grafted onto the surface of inorganic nanoparticles.

Nanoparticles functionalized with artificial proteins were then used for the self-assembly of semiconductor nanoparticles and hybrid self-assembly between semiconductor nanoparticles and metallic nanoparticles. The structure study of self-assembled nanostructures has shown, in some cases, a very well defined sub-10 nm interparticle distance. Finally, the study of optical properties revealed very strong exciton-plasmon interactions induced by self-assembly. This self-assembling process strongly affected the emission properties of the semiconductor nanoparticles in hybrid ensembles.