

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR des sciences fondamentales et appliquées
Institut de chimie des milieux et matériaux de Poitiers - IC2MP
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Sciences pour l'environnement - Gay Lussac (La Rochelle)
Secteur de recherche : Chimie organique, minérale et industrielle

Présentée par :
Anne-Juliette Trouiller

Préparation de nanobiosenseurs à base d'aptamères

Directeur(s) de Thèse :
Philippe Bertrand, Teko W. Napporn

Soutenue le 25 novembre 2016 devant le jury

Jury :

Président	Jean-Claude Florent	Directeur de recherche CNRS, Institut Curie, Paris
Rapporteur	Souhir Boujday	Maître de conférences, Université P. et M. Curie, Paris
Rapporteur	Mona Tréguer-Delapierre	Maître de conférences, ICMCB, Université de Bordeaux
Membre	Philippe Bertrand	Maître de conférences, IC2MP, Université de Poitiers
Membre	Teko W. Napporn	Chargé de recherche CNRS, IC2MP, Université de Poitiers
Membre	Joëlle Roche	Professeur, Université de Poitiers
Membre	Vincent Sol	Professeur, Université de Limoges
Membre	Gérard Simonneaux	Directeur de recherche CNRS, Université de Rennes

Pour citer cette thèse :

Anne-Juliette Trouiller. *Préparation de nanobiosenseurs à base d'aptamères* [En ligne]. Thèse Chimie organique, minérale et industrielle. Poitiers : Université de Poitiers, 2016. Disponible sur Internet
<<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS
(Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées)
(Diplôme National – Arrêté du 7 Août 2006)

Ecole Doctorale : Sciences pour l'environnement – Gay-Lussac
Secteur de recherche : Chimie Organique, Minérale et Industrielle

Présentée par :

Anne-Juliette Trouiller

Préparation de nanobiosenseurs à base d'aptamères

Directeurs de Thèse :

Dr. Philippe BERTRAND, Maitre de conférences, Université de Poitiers

Dr. Teko NAPPORN, Chargé de Recherche, CNRS, Université de Poitiers

Soutenue le 25 Novembre 2016

Devant la Commission d'Examen

JURY

Dr. Souhir BOUJDAY	Maitre de conférence, HDR Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Dr. Mona TREGUER DELAPIERRE	Maitre de conférence, HDR Université de Bordeaux	Rapporteur
Dr. Jean-Claude FLORENT	Directeur de Recherche CNRS Institut Curie, Paris	Examineur
Pr. Joelle ROCHE	Professeur, Université de Poitiers	Examineur
Pr. Vincent SOL	Professeur, Université de Limoges	Examineur
Dr. Gérard SIMONNEAUX	Directeur de Recherche CNRS Université de Rennes	Examineur
Dr. Philippe BERTRAND	Maitre de conférences, HDR Université de Poitiers	Directeur de thèse
Dr. Teko NAPPORN	Chargé de Recherche, HDR Université de Poitiers	Directeur de thèse

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	7
Introduction	11
Chapitre I : Reconnaissance moléculaire immunologique de cibles biologiques	15
I-1 Généralités	15
I-2 Les différents formats de tests immunologiques	17
I-2-1 Essais immuno-radiologiques ou RIA	18
I-2-2 Essais fluoro-immunologiques (FIA) et immuno-fluorimétriques (IFMA)	19
I-2-3 Essais immuno-enzymatiques ou EIA.....	24
Chapitre II : Émergence des aptamères.....	31
II-1 Structures tridimensionnelles de l'ADN : La base des aptamères.....	31
II-2 Obtention et modification chimique des aptamères	39
II-2-1 Méthode in-vitro SELEX	39
II-2-2 Amélioration de la méthode SELEX.....	40
II-3 Mécanisme d'action et applications au biosensing.....	43
II-3-1 Modification conformationnelle : Étude de l'aptamère fixant la thrombine.....	43
II-3-2 Stratégies de construction d'un système aptasenseur.....	47
II-3-2-1 Modification conformationnelle induite par la cible	47
II-3-2-2 Détection par méthode sandwich	51
II-3-2-3 Détection par dissociation de duplex	52
II-3-2-4 Détection par fixation compétitive.....	54
II-3-2-5 Aptakiss/Aptaswitch	56
II-4 Conclusion : Comparaison Anticorps/Aptamères.....	57
Chapitre III : Les nanoparticules d'or au service du biosensing	59
III-1 Généralités	59
III-2 Synthèse des nanoparticules d'or	60
III-2-1 Stratégie « bottom-up ».....	60
III-2-1-1 Synthèse « bottom-up » directe.....	60
III-2-1-1-1 Synthèse des AuNPs par la méthode de Turkevich	60
III-2-1-1-2 Synthèse de Turkevich : Considérations mécanistiques	61
III-2-1-1-3 Amélioration de la méthode de Turkevich	68
III-2-1-1-4 Synthèse des AuNPs stabilisées par des ligands soufrés : Méthode de Brust et Schiffrin.....	70
III-2-1-2 Synthèse « bottom up » par croissance de germes	71
III-2-2 Autres stratégies de synthèse et de stabilisation des AuNPs	74
III-3 Stabilisation du colloïde, surfactant et monocouche auto-assemblée	75
III-3-1 Stabilité du colloïde et surfactant : Quelques notions générales	75
III-3-2 La monocouche : Une structure organisée	78
III-4 Fonctionnalisation des AuNPs.....	80
III-5 Propriétés optiques et électroniques des nanoparticules d'or	83
III-6 Applications des nanoparticules d'or au biosensing	86
III-7 Conclusion.....	90

Chapitre IV : Application à l'épigénétique	93
IV-1 Qu'est-ce que l'épigénétique	93
IV-2 Les différents niveaux d'expression épigénétique chez les eucaryotes	94
IV-2-1 La transcription de l'ADN en ARNm	94
IV-2-2 La méthylation de l'ADN	95
IV-2-3 Les modifications post-traductionnelles des histones	97
IV-2-3-1 Condensation de l'ADN et rôle des histones	97
IV-2-3-2 Les modifications post-traductionnelles des histones	100
IV-2-3-3... Et leurs conséquences : Les pathologies cancéreuses, un exemple ...	102
Résultats et Discussion	105
Chapitre I : Présentation du sujet de thèse et de ses problématiques	107
Chapitre II : Synthèse et fonctionnalisation du ligand	111
II-1 Etude du ligand en série PEG ₄	111
II-1-1 Hétérofonctionnalisation du ligand	111
II-1-2 Déprotection du ligand et stratégie de fonctionnalisation.....	114
II-1-2-1 Déprotection du groupement thioacétate	115
II-1-2-2 Déprotection du groupement thiotrityle	116
II-1-3 Fonctionnalisation des bras espaceurs avec une structure disulfure	117
II-2 Élongation du bras espaceur	119
II-2-1 Élongation du bras espaceur via des ponts éthers	120
II-2-2 Élongation du bras espaceur via des ponts triazoles	127
II-3 Conclusion	133
Chapitre III : Vers une nouvelle voie de synthèse des nanoparticules d'or	135
III-1 Synthèse classique des nanoparticules d'or.....	135
III-2 Synthèse des AuNPs et déprotection in-situ en présence de triéthylsilane Et ₃ SiH.....	139
III-3 Synthèse des AuNPs en présence de PEG ₄	141
III-3-1 Une observation inattendue	141
III-3-2 Étude des facteurs influençant la synthèse des AuNPs.....	142
III-3-2-1 Influence du ratio PEG ₄ /H ₂ O	142
III-3-2-2 Influence de l'ordre d'introduction des réactifs.....	146
III-3-2-3 Constatations préliminaires.....	151
III-3-3 Étude détaillée de la méthode 3B.....	153
III-3-3-1 Relation entre le ratio PEG ₄ /H ₂ O et la valeur de λ _{max}	153
III-3-3-2 Caractérisation des NP3B-1	155
III-3-3-3 Avantages techniques de la synthèse au PEG ₄	157
III-3-3-4 Étude de l'influence de la température	158
III-3-3-5 Considérations mécanistiques.....	159
III-3-3-6 Analyse quantitative.....	161
III-3-3-7 AuNPs et interactions cellulaires.....	163
III-4 Conclusion.....	164
Chapitre IV : Fonctionnalisation des AuNPs	165
IV-1 Étude préliminaire : L'acide lipoiq, un modèle expérimental.....	165
IV-1-1 Mise au point des conditions expérimentales	165
IV-1-2 Caractérisation des AuNPs fonctionnalisées	182
IV-2 Fonctionnalisation des AuNPs avec les bras espaceurs pegylés	186
IV-2-1 Étude préliminaire : Fonctionnalisation avec le ligand L2	190
IV-2-2 Application aux autres ligands (L3 à L8).....	194
IV-2-3 Caractérisation des AuNPs fonctionnalisées	197
IV-3 Diversification de la fonctionnalisation du ligand	202
IV-4 Conclusion	204

Chapitre V : Application aux aptamères.....	207
V-1 Détection de la thrombine :Présentation du système.....	207
V-2 Étude de l'influence de la longueur du bras espaceur sur le quenching de fluorescence	210
V-2-1 Mise au point des conditions expérimentales.....	210
V-2-2 Étude de l'influence de la longueur du ligand.....	213
V-2-3 Application à l'aptamère fixant la thrombine	217
V-2-4 Conclusion	220
V-3 Détection de H4K16 : Présentation du système.....	222
V-4 Conclusion.....	227
 Chapitre VI : Conclusion générale et perspectives	229
 Section expérimentale	233
 Chapitre I : Matériels et caractérisation	235
I-1 Ligands organiques	235
I-1-1 Matériels et réactifs	235
I-1-2 Caractérisation.....	236
I-2 Nanoparticules d'or.....	236
I-2-1 Matériels et réactifs	236
I-2-2 Caractérisation.....	237
 Chapitre II : Synthèse du ligand	239
II-1 Synthèse et fonctionnalisation du bras espaceur pégylé en série PEG ₄	239
II-2 Élongation du ligand via des ponts éthers.....	249
II-2-1 Condensation des unités PEG deux à deux : Procédure générale	250
II-2-2 Déprotection du groupement O-Benzyl : Procédure générale	252
II-2-3 Monotosylation régiosélective : Procédure générale	253
II-2-4 Azidation du bras pégylé: Procédure générale	254
II-3 Élongation du bras espaceur via des ponts triazoles.....	255
II-3-1 Click-Chemistry des bras espaceurs: Procédure générale	255
II-3-2 Propargylation des bras espaceurs tosylés: Procédure générale	257
II-3-3 Azidation des bras espaceurs tosylés: Procédure générale.....	259
II-3-4 Hydrolyse du groupement protecteur: Procédure générale.....	260
II-4 Couplage du bras espaceur avec l'acide lipoïque	262
II-4-1 Couplage des bras pégylés avec l'acide lipoïque: Procédure générale	263
II-4-2 Couplage des ligands avec un fluorophore	266
II-4-2-1 Procédure générale	266
II-4-2-2 Synthèse des ligands.....	267
II-4-3 Diversification de la fonctionnalisation terminale du ligand.....	269
 Chapitre III : Synthèse des nanoparticules d'or.....	273
III-1 Synthèse classique au citrate NP1	273
III-2 Synthèse des nanoparticules avec du triéthylsilane.....	274
Procédure NP2A	274
Procédure NP2B	274
Procédure NP2C.....	275
III-3 Synthèse des nanoparticules avec du tétraéthylène glycol	275
Procédure NP3A	275
Procédure NP3B	275
Procédure NP4	276
Procédure NP5	276
Procédure NP6	276

Chapitre IV : Fonctionnalisation des nanoparticules d'or	277
IV-1 Fonctionnalisation avec l'acide lipoiqye L1.....	277
Procédure NP7	277
Procédure NP8	278
Procédure NP9	278
IV-2 Fonctionnalisation avec le 2-{2-[2-(2- mercaptoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethanol L1ter	279
IV-3 Fonctionnalisation avec le 2-{2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy}ethyl 5- (1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L2.....	279
Procédure NP11A-1 à NP11A-15	279
Procédure NP11B-1 à NP11B-15	280
Procédure NP11C-1 à NP11C-15.....	280
IV-4 Fonctionnalisation avec les ligands L3 à L8	282
IV-4-1 Procédure générale.....	282
IV-4-2 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP12.....	282
IV-4-3 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP13.....	283
IV-4-4 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP14.....	283
IV-4-5 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP15.....	284
IV-4-6 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP16.....	284
IV-4-7 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP17	285
IV-5 Fonctionnalisation avec la lysine : NP18	285
IV-6 Chimie click avec la propargylglycine NP19	286
IV-7 Chimie click avec la cyclooctyne : NP20 à NP26.....	287
IV-8 Couplage avec la rhodamine : NP27 et NP30	287
IV-9 Fonctionnalisation avec les ligands L13 à L19	288
IV-9-1 Procédure générale.....	288
IV-9-2 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP34.....	289
IV-9-3 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP35.....	289
IV-9-4 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP36.....	290
IV-9-5 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP37.....	290
IV-9-6 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP38.....	291
IV-9-7 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP39.....	291
IV-9-8 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP40.....	292
IV-10 Fonctionnalisation avec les aptamères.....	292
 Références Bibliographiques	 295

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac : Anticorps
AcOH/AcO⁻ : Acide acétique/Acétate
AcOEt : Acétate d'éthyle
ADN : Acide désoxyribonucléique
AFP : α -foetoprotein, protéine α -foétale
Ag : Antigène
AgNPs : Nanoparticules d'argent
Ag₂O : Oxyde d'argent (I)
Apt : Aptamère
APTS : Acide paratoluène sulfonique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARNt : Acide ribonucléique de transfert
ATP : Adénosine triphosphate
AuNPs : Nanoparticules d'or
AuNRs : Nanobâtonnets d'or
BnBr : Bromure de benzyle
BSA : Bovine serum albumine, albumine sérique bovine
CCM : Chromatographie sur couche mince
CELISA : Cascade enzyme linked immunosorbent assay
CE-SELEX : Capillary electrophoresis-systematic evolution of ligands by exponential enrichment
CH₃CN : Acétonitrile
ChIP : Chromatin immunoprecipitation, immunoprécipitation de la chromatine
CLHP : Chromatographie liquide haute performance
CMC : Concentration micellaire critique
CrO₃ : Oxyde de chrome (VI)
CTAB : Bromure d'hexadecyltriméthylammonium
CuOAc : Acétate de cuivre (I)
Cu (OAc)₂ : Acétate de cuivre (II)
CuBr : Bromure de cuivre (I)
CuI : Iodure de cuivre (I)
CuSO₄ : Sulfate de cuivre (II)
DCC : Dicyclohexylcarbodiimide
DCM : Dichlorométhane
DEDL : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DLVO : Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek
DMAP : 4-diméthylaminopyridine
DMF : N,N-diméthylformamide
DMSO : Diméthylsulfoxyde
EDC : 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
ELISA : Enzyme linked immunosorbent assay
EMIT : Enzyme multiplied immunoassay technique
EP : Ether de pétrole
Et₃N : Triéthylamine
Et₃SiH : Triéthylsilane
Fc : Ferrocène
FIA : Fluoroimmunoassay

FRET : Förster resonance energy transfert, transfert d'énergie de fluorescence/Förster par résonance
G : Guanine
GP : Groupement protecteur
GTP : Guanosine triphosphate
HAT : Histone acétyltransférase
HAuCl₄ : Acide tétrachloroaurique
HCl : Acide chlorhydrique
HDAC : Désacétylase d'histone
HMT : Méthyltransférase d'histone
HNO₃ : Acide nitrique
H₂SO₄ : Acide sulfurique
Hz : Hertz
IFMA: Immunofluorimetric assay
Ig : Immunoglobuline
IR : Infra-rouge
K₂CO₃ : Carbonate de potassium
K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanide de potassium
K₄Fe(CN)₆ : Ferrocyanide de potassium
KOH : Hydroxyde de potassium, potasse
MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Fly, Désorption/ionisation laser assistée par matrice-temps de vol
MB : Methylene blue, bleu de méthylène
MeOH : Méthanol
Me₂S : Diméthylthioéther
MET : Microscopie électronique à transmission
MgSO₄ : Sulfate de magnésium
MPT : Modification post-traductionnelle
NaBH₄ : Borohydrure de sodium
Na₃Citrate : Citrate trisodique
NaH : Hydrure de sodium
NaHCO₃ : Carbonate de sodium
NHS : N-hydroxysuccinimide
NaN₃ : Azoture de sodium
NaOH : Hydroxyde de sodium, soude
Na₂S₂O₃ : Thiosulfate de sodium
OBn : O-benzyle
OTBDMS : O-tertbutyldiméthylsilyl éther
OTHP : O-tétrahydropyrane
PCR : Polymerase chain reaction
Pd : Palladium
Pd/C : Palladium adsorbé sur charbon
PEG : Polyéthylène glycol
PMDTA : N,N,N',N'', N'''-pentaméthyl-diéthylène-triamine
PPh₃ : Triphénylphosphine
PrPC : Protéine prion cellulaire
PSA : Prostate-specific antigen
pTsOH : Acide paratoluène sulfonique
PVP ; Polyvinylpyrrolidone

Rdt : Rendement
RIA : Radioimmunoassay
RMN : Résonance magnétique nucléaire
rpm : rotation par minute
RT : Room temperature
SALDI-MS : Surface-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry, spectrométrie de masse par désorption-ionisation de surface assistée par laser
SAM : S-Adénosylméthionine
SELEX : Systematic evolution of ligands by exponential enrichment
SN : Substitution nucléophile
T : Thymine
TA : Température ambiante
TBA : Thrombin binding aptamer, aptamère fixant la thrombine
TBAC : Brin complémentaire de l'aptamère fixant la thrombine
TBAF : Fluorure de tétrabutylammonium
tBuOH : Tertbutanol
TFA : Acide trifluoroacétique
THF : Tétrahydrofurane
THP : Tétrahydropyrane
TOAB : Bromure de tétraoctylammonium
Tr : Trityle
Ts : Tosyle
TsCl : Chlorure de tosyle
UV : Ultra-violet
VEGF : Vascular endothelial growth factor, facteur de croissance endothélial vasculaire
XPS : X-ray photoelectron spectrometry, spectrométrie photoélectronique X

INTRODUCTION

L'optimisation de la prise en charge globalisée des patients atteints d'affections graves s'articule autour de deux axes. Le premier axe repose sur l'élaboration d'agents thérapeutiques efficaces. Le second concerne le perfectionnement des techniques de diagnostic. Les progrès effectués dans ces deux domaines permettent d'obtenir une meilleure efficacité thérapeutique ainsi que l'amélioration du pronostic et de la qualité de vie des patients.

Cette assertion est particulièrement vérifiée dans le contexte de la prise en charge des pathologies cancéreuses⁽¹⁾. En effet, l'efficacité actuelle des agents thérapeutiques est limitée par leur manque de spécificité vis à vis des cellules cancéreuses. Cela entraîne de nombreux effets indésirables qui résultent de l'activité cytotoxique des molécules thérapeutiques sur les cellules saines.

Au décours de la prolifération tumorale, les cellules pathogènes sur-expriment différents composés moléculaires qui sont ensuite libérés dans la circulation sanguine. Ces composés sont donc normalement absents chez le sujet sain. La concentration de ces marqueurs est corrélée au stade de développement de la pathologie cancéreuse. Il est donc important d'utiliser des systèmes de détection présentant une grande sensibilité associée à une limite de détection basse.

Ces marqueurs peuvent être des :

- protéines : phosphatase alcaline placentaire, créatine kinase, acide lactique déshydrogénase, acide prostatique phosphatase, ...
- nucléotides : microARN, ARN non codant, ADN tumoral circulant, oncogène, ...
- glycoprotéines : α -protéine fœtale, l'antigène carcino-embryonnaire, l'antigène spécifique de la prostate, ...
- hormones : calcitonine, thyroglobuline, hormone antidiurétique, ...

Cependant, ces marqueurs ne sont pas spécifiques d'une pathologie cancéreuse donnée. De même, une pathologie proliférative va être associée à une surexpression de différents marqueurs.

De plus, de nombreux cancers ne sont diagnostiqués qu'en phase de métastases ce qui rend leur prise en charge beaucoup plus compliquée. Ainsi l'identification de marqueurs précoces de ces pathologies ainsi que le développement de systèmes permettant leur détection constituent des champs de recherche largement investigués afin de permettre une optimisation de la prise en charge du patient.

Un système de détection efficace doit donc répondre à de nombreux critères, les plus importants d'entre eux étant la sensibilité et la spécificité. En effet, ce dispositif de reconnaissance doit être capable de détecter des biomarqueurs spécifiques présents en très faible quantité au sein de milieux biologiques complexes.

Le principe général des méthodes de détection repose sur la reconnaissance spécifique et sélective d'un analyte d'intérêt par une entité moléculaire suivie d'une traduction de cette interaction en un signal directement mesurable. Ce dispositif de détection est donc constitué d'une entité moléculaire de reconnaissance ou senseur et d'une seconde unité fonctionnelle appelée détecteur ou encore transducteur ou reporteur. Ce dernier va convertir l'interaction moléculaire entre le senseur et sa cible en un signal optique ou électrique facilement détectable et mesurable. Dans le cas où le senseur est un élément biologique tel qu'une enzyme, une protéine, un acide nucléique, une cellule ou encore un micro-organisme, on parle alors de techniques de biodétection ou biosensing.

Les deux premiers chapitres de cette introduction présenteront les principaux systèmes de reconnaissances moléculaires ainsi que leurs applications aux techniques de biosensing.

Le troisième et dernier chapitre sera dédié à la description des nanoparticules d'or (AuNPs) et détaillera leur potentiel comme outil de transduction du signal de reconnaissance entre un ligand et sa cible.

Chapitre I : RECONNAISSANCE MOLÉCULAIRE IMMUNOLOGIQUE DE CIBLES BIOLOGIQUES

I-1 GÉNÉRALITÉS

La méthode de détection moléculaire la plus répandue est la méthode immunologique qui utilise les propriétés de reconnaissance entre un anticorps (Ac) et un antigène (Ag). Les anticorps sont les éléments clefs de la réponse immunitaire. Ils sont produits par les cellules lymphocytaires différenciées en plasmocytes en réponse à une exposition de l'organisme à un composé exogène appelé antigène. Ce sont des structures glycoprotéiques appartenant à la classe des immunoglobulines (Ig) et constituées de quatre chaînes polypeptidiques appariées deux à deux et s'organisant en trois régions globulaires de taille équivalente. Ces régions sont reliées entre elles par une attache souple et flexible et dont la forme générale évoque la lettre Y (figure1).

Ces anticorps sont constitués de deux types de chaînes peptidiques :

- Deux chaînes légères ou chaînes L de 25 kDa
- Deux chaînes lourdes ou chaînes H de 50 kDa

Ces chaînes H et L s'apparient deux à deux et forment les bras du Y qui constituent la partie dite variable ou région V de l'Ig. Cette région variable diffère d'une Ig à l'autre et est impliquée dans la reconnaissance spécifique de l'antigène. La tige du Y est formée par les parties restantes des deux chaînes lourdes et constitue la région constante ou région C de l'Ig qui interagit avec les récepteurs cellulaires⁽²⁾.

Cette structure est stabilisée par des ponts disulfures S-S entre les chaînes H et L appariées ainsi qu'entre les régions C des chaînes lourdes. Des interactions faibles (Van der Waals, hydrophobes, hydrogènes) entre les chaînes associées deux à deux participent également à la stabilisation de la structure tridimensionnelle de l'anticorps.

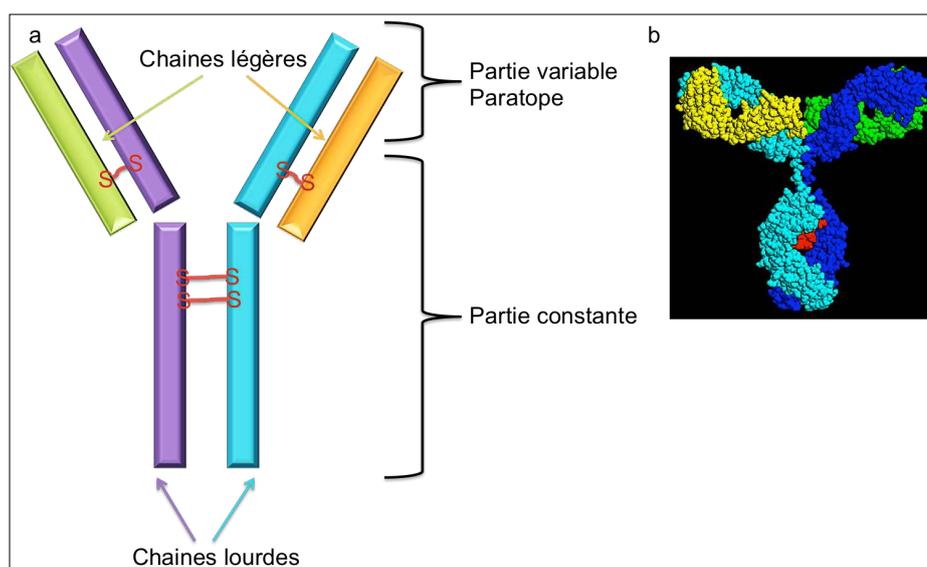


Figure 1 : a) Représentation schématique de la structure d'un anticorps de type IgG montrant les quatre chaînes polypeptidiques appariées deux à deux et définissant ainsi les régions variable et constante ; b) Représentation moléculaire en 3D d'un anticorps, illustration issue de la référence (3).

La reconnaissance et la fixation de l'antigène sur l'anticorps impliquent une interaction entre le paratope (région variable) de l'anticorps et l'épitope de l'antigène. Cette structure complexe est stabilisée par des liaisons non covalentes telles que des interactions de Van der Waals ou hydrophobes, des interactions électrostatiques ou encore des liaisons hydrogènes. L'absence de liaisons covalentes implique un caractère réversible à la formation du complexe Ag/Ac.

Les anticorps utilisés dans les tests immunologiques sont de deux types : polyclonaux ou monoclonaux. Ces Ac sont obtenus après exposition d'un animal à des agents exogènes immunogènes. Cette étape d'immunisation intensive va permettre la production par les plasmocytes de différentes populations d'anticorps. Chaque plasmocyte produit une population d'anticorps dirigés spécifiquement contre un épitope donné. Après immunisation, l'obtention d'anticorps polyclonaux est effectuée par récupération du sérum de l'animal. En revanche, la production des Ac monoclonaux est plus longue et complexe. Elle nécessite une étape de fusion entre ces plasmocytes et des cellules tumorales immortalisées afin de former des hybridomes. Ces derniers sont ensuite séparés en fonction de leur lignée cellulaire plasmocytaire puis clonés afin de permettre la génération de populations homogènes d'anticorps distinctes les unes des autres (schéma 1).

Dans le cas où l'analyte d'intérêt n'est pas suffisamment immunogène, il peut être associé à une structure protéique afin de favoriser la réponse immunitaire. L'analyte est alors appelé haptène et la protéine jouant le rôle de molécule chaperonne sert de transporteur.

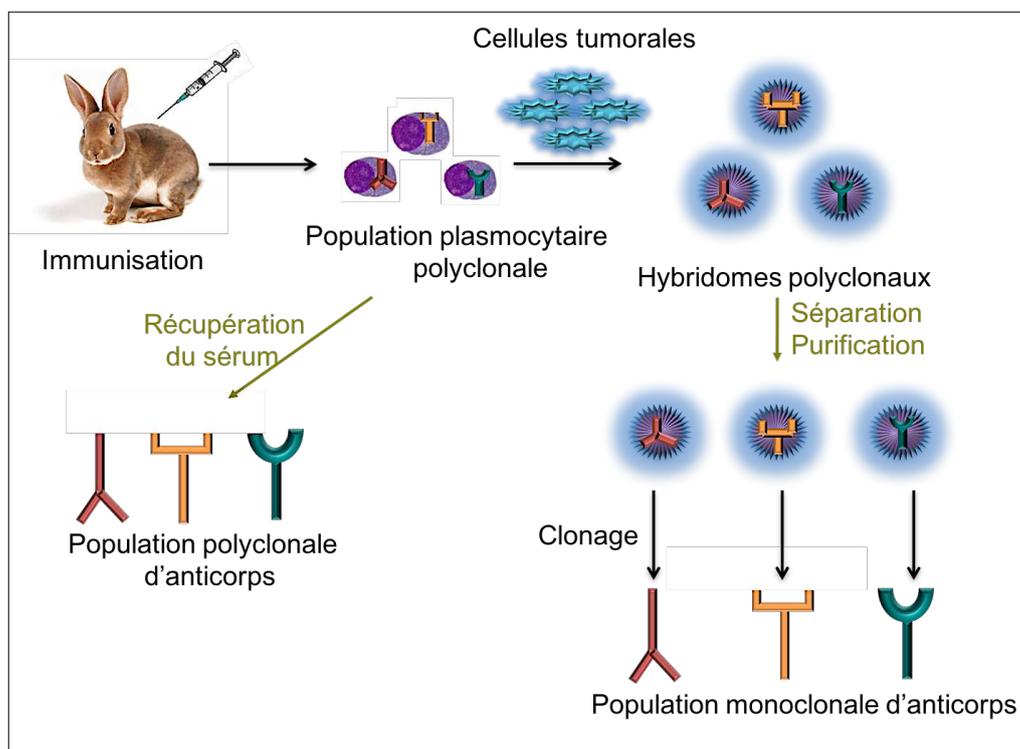


Schéma 1 : Représentation simplifiée du processus de production des Ac monoclonaux et polyclonaux.

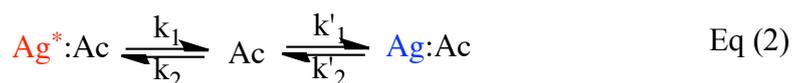
I-2 LES DIFFÉRENTS FORMATS DE TESTS IMMUNOLOGIQUES

Bien que de nombreux tests immunologiques ait été développés ces quatre dernières décennies, le principe général demeure identique d'un essai à l'autre et repose sur la reconnaissance spécifique de la partie variable de l'anticorps vis à vis d'un antigène cible. Cette interaction obéit à la loi d'action de masse et aboutit à la formation d'un complexe immun Ag/Ac dont les propriétés diffèrent de celles des deux composants pris individuellement (équation 1).



De plus, l'un des deux composants de ce complexe doit être associée à un système permettant de transcrire la survenue de cette interaction en un signal facilement mesurable. Ce système constitue l'élément reporteur et il peut s'agir d'un radioisotope, d'un fluorophore ou encore d'une enzyme. A partir de ce principe de base, différents formats de tests immunologiques ont été élaborés :

- Il peut s'agir d'une réaction de fixation compétitive entre un analyte marqué et son analogue non marqué pour un nombre limité de sites de liaison présents sur la molécule de reconnaissance (équation 2).



- Des méthodes non compétitives de fixation ont également été mises au point. L'analyte étudié est incubé en présence d'un large excès de ligands associés à un reporteur. Lorsque l'état d'équilibre est atteint, une étape de séparation permet d'isoler la fraction liée et la mesure de l'expression du reporteur est alors réalisée.

Cependant, quelle que soit la stratégie employée, la formation de ces complexes immuns est objectivée par la disparition ou l'apparition d'un signal dont l'intensité est corrélée à la quantité de complexes formés et/ou à la quantité de ligands marqués non liés à l'anticorps. La génération de ce signal est assurée par le marquage présent sur l'anticorps ou l'antigène⁽⁴⁾.

Les différents tests immunologiques peuvent être classifiés en fonction :

- De l'entité introduite en excès et/ou couplée avec le reporteur : Ac ou Ag
- Du mode de fixation de l'Ag à l'Ac : compétitif ou non compétitif
- De la nécessité d'une étape de séparation entre la fraction libre et la fraction liée (complexe immun) avant l'expression du reporteur : essai homogène ou hétérogène
- De la nature du reporteur utilisé pour ce test immunologique : radioisotope, enzyme, fluorophore, agent électrochimique, ...

Différents tests immunologiques vont être présentés en fonction de la nature du reporteur employé pour traduire la formation du complexe Ag/Ac en un signal mesurable.

I-2-1 ESSAIS IMMUNO-RADIOLOGIQUES OU RIA

La première technique de biosensing utilisant les propriétés de reconnaissance Ag/Ac fut élaborée par Yalow et Berson⁽⁵⁾ en 1959 pour la détection et le dosage de l'insuline. Elle mettait en œuvre une expérience de fixation compétitive de deux types d'insuline pour un nombre restreint d'anticorps spécifiquement dirigés contre l'insuline (schéma 2). Dans cet essai, le rôle de biosenseur est assuré par l'anticorps dont la quantité est connue, l'antigène correspond à l'insuline présente en quantité inconnue dans l'échantillon à analyser et la présence d'insuline radiomarquée en quantité connue constitue le reporteur. Cette technique de détection a donc été qualifiée de radioimmunoassay ou RIA.

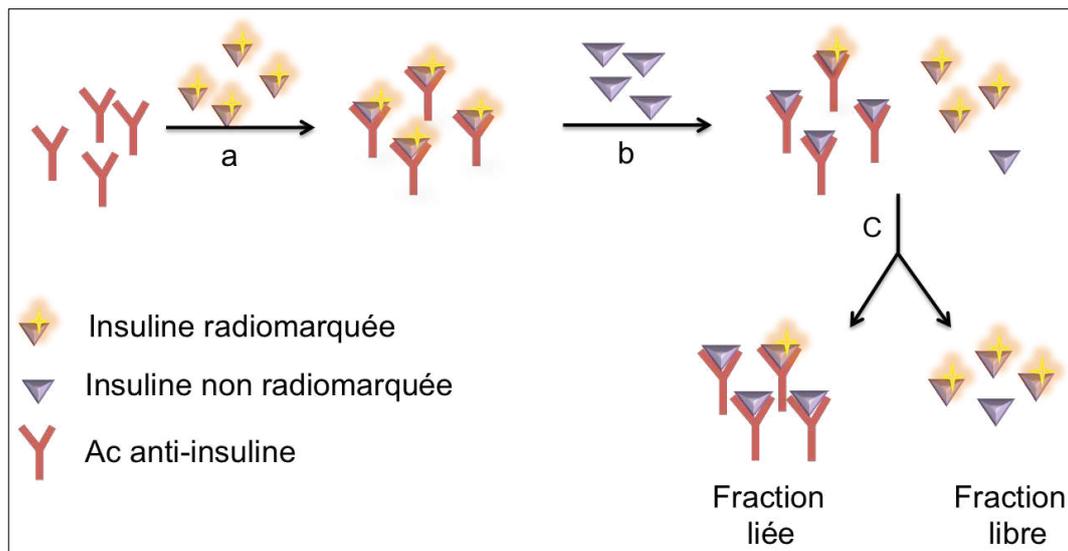


Schéma 2 : Principe d'un essai radio-immunologique : a) Incubation d'une quantité connue d'Ac anti-insuline avec une quantité connue d'insuline radiomarquée et formation du complexe immunitaire Ag/Ac ; b) Ajout d'une quantité inconnue d'insuline non radiomarquée et compétition entre les deux Ag pour la fixation à l'Ac, formation de deux complexes immunitaires différents et présence d'insuline non liée en solution ; c) Etape de séparation de l'insuline radiomarquée libre en solution de celle liée à l'Ac et mesure de la radioactivité dans chaque fraction de mélange.

Différents radio-isotopes peuvent être utilisés : ^3H , ^{14}C , ^{125}I ou ^{131}I . Les deux premiers sont des émetteurs β alors que les isotopes de l'iode sont des émetteurs γ . La préférence pour l'un ou l'autre de ces marqueurs doit prendre en compte leur temps de demi-vie, leur abondance isotopique, leur activité spécifique ainsi que les techniques à mettre en œuvre pour leur détection.

Ces techniques radio-immunologiques ont été largement utilisées pour étudier les hormones protéiques et peptidiques telles que l'hormone de croissance, les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes. Puis, sous l'impulsion d'Oliver⁽⁶⁾ en 1968, leur application s'est étendue au domaine de la pharmacocinétique via la détection et le dosage des taux circulants de nombreux agents thérapeutiques tels que la digitoxine, la digoxine, le méthotrexate, la phénytoïne, la morphine.

Des techniques radio-immunologiques ont notamment été mises en œuvre par Bast⁽⁷⁾ et son équipe afin de réaliser le suivi thérapeutique de patientes atteintes de carcinomes ovariens. Cette procédure mettait en œuvre l'utilisation de l'anticorps monoclonal OC125 dirigé contre l'antigène CA125. Plus précisément, il s'agissait d'une double incubation de CA125 en présence d'Ac OC125 fixé sur des billes de polystyrène et d'Ac OC125 radiomarqué avec de l'iode 125 (¹²⁵I) non immobilisés. Cette double incubation était rendue possible par l'existence de plusieurs sites de reconnaissance de OC125 sur chaque molécule d'AC125. Ces sites étaient individualisés et suffisamment distants les uns des autres pour permettre la liaison de deux molécules d'OC125 sur une même molécule d'Ag CA125 sans chevauchement ni gêne stérique. Les échantillons sériques utilisés au décours de ce suivi étaient issus de patientes atteintes de carcinomes ovariens, de patients atteints de pathologies non cancéreuses et de patients sains. Seul 1% et 6% des patients respectivement sains et non cancéreux ont présentés un taux de CA125 significativement élevé contre 82% des patientes atteintes de carcinomes ovariens.

Cependant, l'utilisation d'un radio-isotope comme reporteur n'est pas sans conséquences. En effet, ces radio-isotopes sont des émetteurs de radiations β ou γ et représentent un risque pour la santé ce qui nécessite des conditions particulières de stockage, la formation d'un personnel qualifié et la manipulation précautionneuse de ces réactifs. De plus, la durée de conservation des ligands radiomarqués est déterminée par la demi-vie des radio-isotopes. Enfin, la mesure de la radioactivité nécessite une étape de séparation ainsi qu'un équipement spécialisé et coûteux et est relativement chronophage. Ces différentes limitations ont rendu nécessaire le développement de techniques alternatives utilisant des reporteurs de nature différente.

I-2-2 ESSAIS FLUORO-IMMUNOLOGIQUES (FIA) ET IMMUNO-FLUORIMÉTRIQUES (IFMA)

En réponse à cette problématique, il a été proposé de substituer le marquage isotopique du ligand par l'utilisation d'un fluorophore⁽⁸⁾. Bien que le marquage des Ac par des sondes fluorescentes ait été utilisé dès 1941 par Coons⁽⁹⁾, cette technique était circonscrite au domaine de l'immunohistochimie et de l'immunocytochimie. Ce n'est qu'au début des années 60 que les travaux de Dandliker et Feiger⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾ sur la pénicilline fluoro-marquée ont permis de démontrer que la formation d'un complexe immun Ag/Ac entraînait une modification de la polarisation de fluorescence qui pouvait être mesurée. De cette découverte a émergé le concept de fluoroimmunoassay ou FIA.

Une molécule est dite fluorescente si elle est capable d'absorber de l'énergie et de la réémettre sous forme de photons. En effet, cette absorption d'énergie va entraîner l'excitation des électrons de la molécule. Certains de ces électrons vont alors passer d'un état énergétique fondamental singulet (S_0 sur la figure 2) à un état singulet excité (S_1 , S_2 sur la figure 2) correspondant à un niveau énergétique supérieur.

Le retour à l'état fondamental peut se faire par conversion interne mais il peut également être effectué par une transition énergétique associée à l'émission d'un rayonnement de photons. Si cette transition énergétique permet le retour direct à l'état fondamental, le rayonnement émis est alors qualifié de rayonnement de fluorescence. En revanche, si ce retour passe par un état intermédiaire triplet (niveau T_1) via une conversion inter-système, le rayonnement émis est alors considéré comme de la phosphorescence (figure 2).

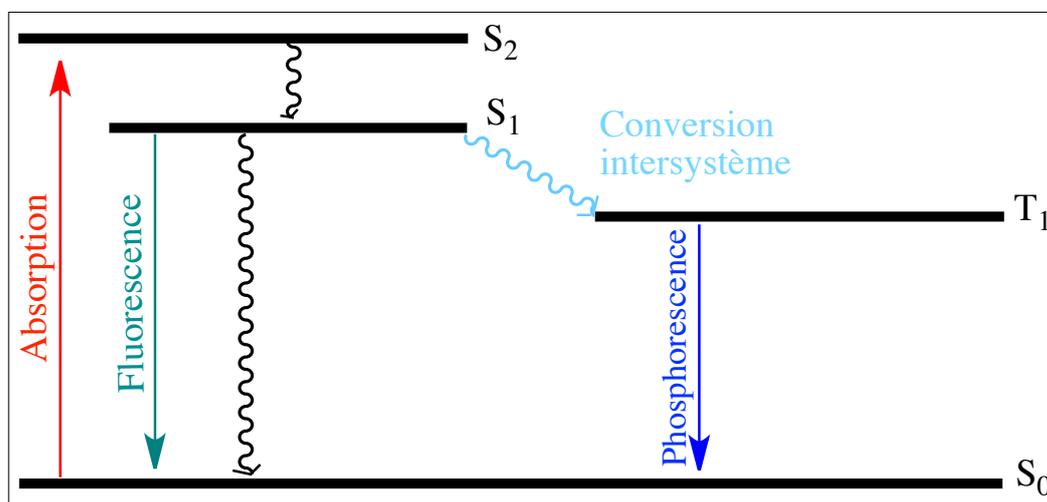


Figure 2 : Représentation des niveaux énergétiques des électrons au sein d'une molécule luminescente ainsi que les différentes transitions électroniques possibles après absorption d'un rayonnement énergétique. Les flèches en trait plein indiquent les conversions énergétiques avec émission de rayonnement et les flèches en vague représentent les conversions non radiatives.

De nombreuses structures, organiques ou inorganiques, peuvent être utilisées comme sondes fluorescentes⁽¹²⁾. Ces sondes fluorescentes peuvent être des molécules organiques telles que les dérivés de la fluorescéine, de la rhodamine ou de la coumarine (figure 3).

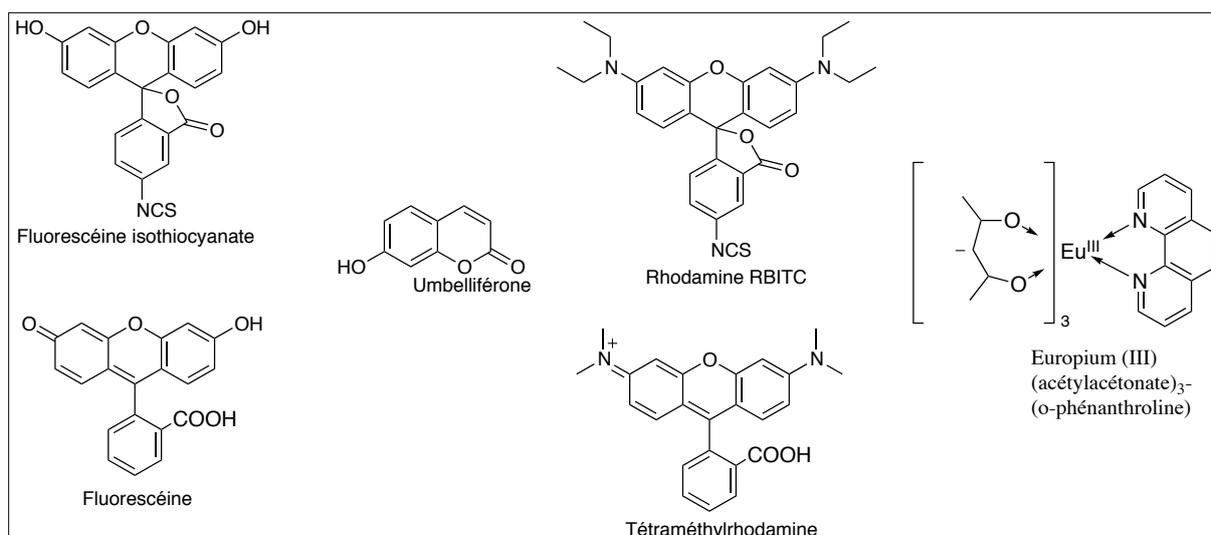


Figure 3 : Structures chimiques d'un chélate d'euporium et des principales molécules organiques utilisées comme sonde fluorescentes.

Néanmoins, il peut également s'agir de chélates de métaux et plus particulièrement de chélates de terres rares de la famille des lanthanides. L'utilisation de ces lanthanides, tels que l'euprium ou le terbium, est particulièrement intéressante car ces chélates permettent de mettre en œuvre une fluorescence retardée via une conversion énergétique inter-système impliquant les électrons du ligand et ceux du métal⁽¹³⁾ (figure 4).

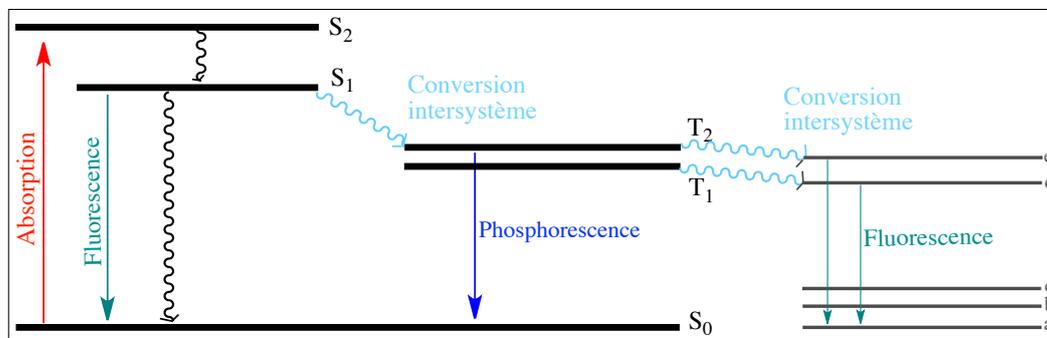


Figure 4 : Représentation des niveaux énergétiques (S_0 , S_1 , S_2 , T_1 et T_2) des électrons au sein d'une molécule fluorescente et représentation des niveaux de résonance électronique (a, b, c, d et e) au sein d'un chélate de lanthanide ainsi que les différentes transitions et conversions électroniques possibles après absorption d'un rayonnement énergétique.

L'utilisation de sondes fluorescentes comme système reporteur pour la détection d'analytes par des techniques immunologiques peut être mise en œuvre de différentes manières :

- L'antigène est marqué par un fluorophore, on parle d'essai fluoro-immunologique.
- L'anticorps est marqué par un fluorophore, on parle alors d'essai immuno-fluorimétrique.

La détection de l'analyte d'intérêt peut être réalisée en mesurant la variation du quenching de fluorescence induite par l'incubation d'une quantité limitée d'anticorps en présence d'un mélange d'antigènes marqués (détecteurs, notés Ag^*) et non marqués (analytes, notés Ag). La formation du complexe immunitaire Ag^*/Ac provoque une neutralisation de la fluorescence du reporteur et donc une diminution de l'intensité de fluorescence⁽¹⁴⁾. A l'état d'équilibre, la compétition entre les deux types d' Ag pour un même site de fixation sur l' Ac aboutit à deux espèces de complexes immunitaires : Ag^*/Ac et Ag/Ac ainsi qu'à la présence de deux formes d'antigènes non liés : Ag et Ag^* . La fraction non liée Ag^* va voir sa fluorescence restaurée. L'intensité de fluorescence mesurée est donc proportionnelle à la quantité d'analyte (schéma 3A).

Cependant, ce quenching de fluorescence n'est pas toujours effectif. Lorsque l' Ag est une protéine, l'encombrement stérique de cette structure entraîne un éloignement entre le fluorophore et l' Ac . Cette distance est suffisante pour restaurer la fluorescence. C'est pourquoi des techniques de neutralisation indirecte ont été mises au point⁽¹⁴⁾.

Les anticorps (notés Ac_1) sont incubés en présence des deux antigènes (Ag et Ag^*) puis lorsque l'état d'équilibre est atteint, un second Ac (noté Ac_2) spécifiquement dirigé contre le fluorophore est ajouté en excès. Cet Ac va se lier à la fraction libre Ag^* et inhiber la fluorescence mais est incapable de se lier à l' Ag^* impliqué dans le complexe immun Ag^*/Ac_1 . L'intensité de fluorescence est donc inversement proportionnelle à la quantité d'analyte (schéma 3B).

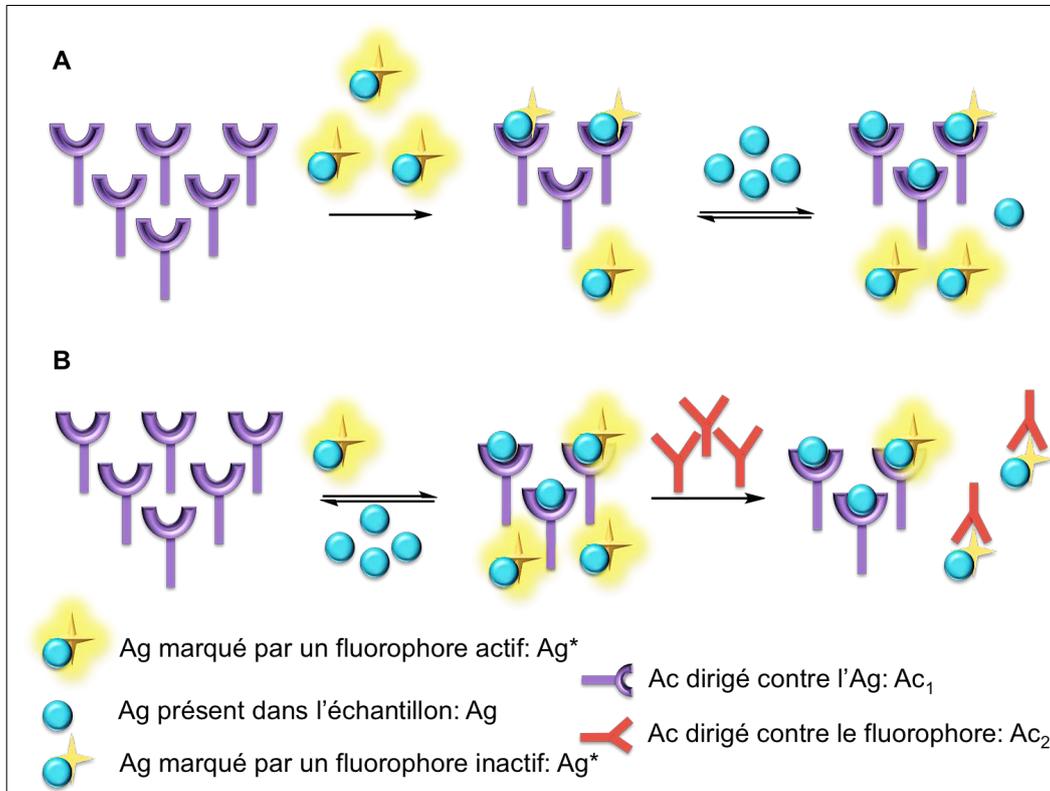


Schéma 3 : A) Représentation du principe d'inhibition directe de fluorescence consécutive à la formation du complexe Ag^*/Ac_1 en compétition avec le complexe Ag/Ac_1 ; B) Représentation du principe d'inhibition indirecte de la fluorescence induite par la formation du complexe Ag^*/Ac_2 impliquant uniquement la fraction Ag^* libre.

En plus de l'inhibition de fluorescence induite par l'encombrement stérique engendré par la formation du complexe Ag^*/Ac , cette extinction peut également être provoquée par la proximité immédiate de deux fluorophores selon le processus de transfert d'excitation de fluorescence⁽⁸⁾. L'un des fluorophores agit comme un donneur d'énergie et l'autre comme un accepteur, c'est le cas notamment de l'association Fluorescéine/Rhodamine où la rhodamine (en rouge sur le schéma) constitue l'accepteur car son domaine d'absorbance chevauche le domaine d'émission de la fluorescéine (en vert sur le schéma). Dans ce format de test immunologique, les deux entités impliquées dans la formation du complexe Ag/Ac doivent être conjuguées avec un fluorophore différent puis mis en présence de l'antigène présent dans l'échantillon à analyser (schéma 4).

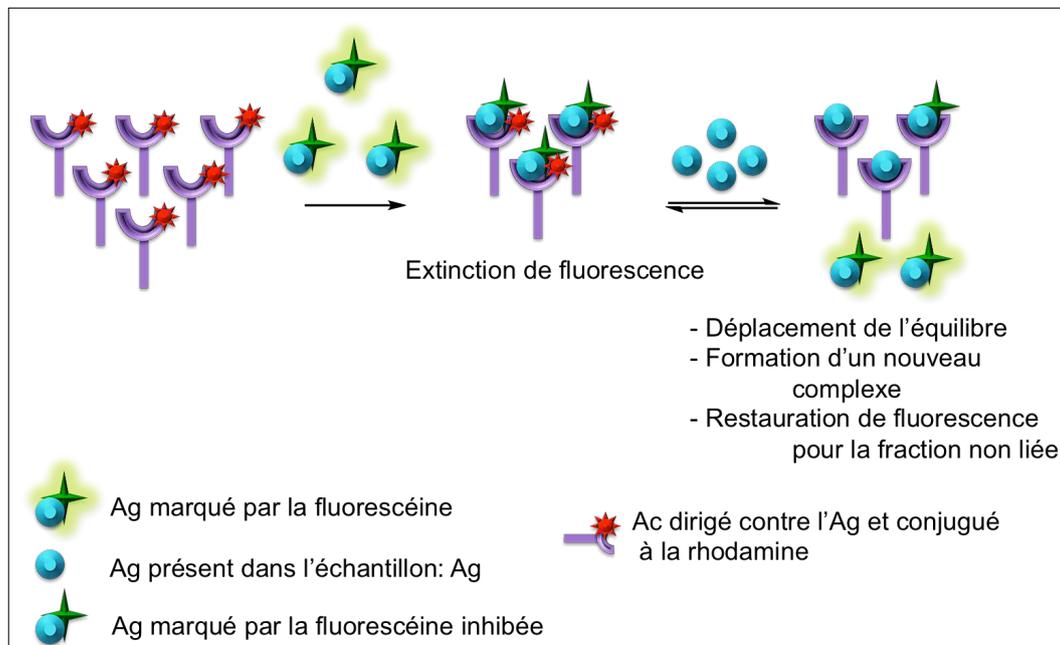


Schéma 4 : Représentation de l'extinction de fluorescence induite par la présence d'un couple de fluorophores donneur/accepteur et de son application à la détection d'analytes.

La formation d'un complexe Ag/Ac peut également être objectivée par la mesure de l'anisotropie de polarisation de fluorescence induite par le mouvement de rotation brownien de la molécule fluorescente. En effet, toute molécule en solution est animée d'un mouvement aléatoire. Si la molécule présente des capacités de fluorescence, cette rotation va avoir des répercussions sur l'émission de fluorescence. Après une excitation par un rayonnement polarisé, le faisceau émis sera également polarisé et cette polarisation sera dépendante de l'amplitude du mouvement brownien. Cette amplitude est corrélée à la taille de la molécule : plus le composé est petit, plus la rotation est importante et plus le signal sera faible. En conséquence, une molécule de petite taille conjuguée à un fluorophore exhibera une polarisation de fluorescence différente de celle émise par la même molécule lorsqu'elle est liée à un anticorps⁽⁸⁾.

Xie et Wang⁽¹⁵⁾ ont décrit un essai fluoro-immunologique afin de détecter simultanément la fraction libre ainsi que la fraction totale de l'antigène spécifique de la prostate (PSA). Cet Ag PSA est une glycoprotéine présente dans la circulation sous deux formes : une forme libre et une forme liée à des protéines comme l' α 1-antichymotrypsine ou l' α 2-macroglobuline. Cet essai mettait en œuvre différents Ac monoclonaux murins anti-PSA. Les Ac 5G6 et 8A6 étaient utilisés pour la capture et l'Ac 5A6 pour la détection. L'Ac anti-PSA 8A6 était dirigé contre la fraction libre de l'Ag alors que les Ac 5G6 et 5A6 étaient tous deux capables de reconnaître l'Ag PSA qu'il soit libre ou complexé à une protéine. Un couplage chimique de type peptidique avait été réalisé à la surface de microsphères Luminex® afin d'immobiliser les Ac de capture 5G6 et 8A6. Après incubation avec le sérum du patient, la formation du complexe Ag/Ac était détectée par l'ajout de l'Ac 5A6 couplé à un reporteur fluorescent émettant dans le vert, la phycoérythrine.

Néanmoins, l'utilisation de fluorophore comme transducteur des réactions Ag/Ac est sujette à certaines complications liées à leur emploi au sein de milieux biologiques complexes⁽¹²⁾⁽¹⁴⁾. L'une d'entre elles découle du phénomène de diffusion de la lumière et résulte de la présence de suspensions colloïdales de molécules ou de petites particules ce qui peut diminuer l'absorption du rayonnement énergétique incident par le fluorophore.

A ce processus de diffusion de la lumière incident doit également s'ajouter la fluorescence intrinsèque présentée par certains composés fréquemment retrouvés dans les fluides biologiques ce qui entraîne une augmentation du bruit de fond et une diminution de la résolution. De plus, certains constituants peuvent également absorber une partie de l'énergie du faisceau incident, c'est l'effet de filtre interne. Enfin, le phénomène de quenching de fluorescence doit être pris en compte. Cette neutralisation de la fluorescence peut être provoquée par une modification de l'environnement de la sonde comme par exemple une augmentation de la température ou une modification du pH. De même, cette disparition de la fluorescence peut être induite par la proximité du fluorophore avec des entités acceptrices d'énergie via le principe de transfert d'énergie par résonance.

Afin de permettre une détection optimale, ces sondes doivent présenter une haute intensité de fluorescence corrélée à un coefficient d'absorptivité molaire élevé. De plus, le signal de fluorescence doit être différentiable du bruit de fond. Idéalement, l'énergie des photons excitateurs ainsi que celle des photons de fluorescence doivent se situer dans des domaines de longueur d'onde qui n'interfèrent pas avec les composés biologiques présents dans l'échantillon. Enfin la fixation du fluorophore sur la bio-entité (Ac ou Ag) ne doit perturber ni ses propriétés d'émission, ni les capacités de reconnaissance et de fixation du ligand ainsi marqué.

I-2-3 ESSAIS IMMUNO-ENZYMATIQUES OU EIA

Dans ce type d'essai, le reporteur n'est plus un radioisotope ou un fluorophore mais un composé présentant une activité enzymatique. Le principe de détection repose sur la capacité de l'enzyme à convertir un substrat en un produit présentant des caractéristiques optiques ou électroniques facilement mesurables.

La formation d'un complexe immun Ag/Ac va entraîner une modification de l'environnement de proximité de l'enzyme ce qui peut engendrer une modulation de son activité et permettre la détection et le dosage de l'analyte d'intérêt. Ce principe a notamment été mis à profit dans l'essai immuno-enzymatique homogène de Rubinstein *et al.*⁽¹⁶⁾ pour le dosage de la morphine. Dans ce protocole de détection un dérivé de la morphine a été conjugué à une molécule de lysozyme. Cette assemblage supramoléculaire ne perturbe pas l'activité enzymatique du lysozyme vis à vis du peptidoglycane bactérien et aboutit à l'hydrolyse de la liaison glycosidique β -1,4 reliant les unités N-acétylmuramique (en violet sur le schéma) et N-acétylglucosamine (en bleu sur le schéma).

Cependant, en présence d'Ac dirigé contre ce système Morphine/Lysozyme, l'activité lytique a été inhibée à 98%. Cette variation de l'activité enzymatique a été objectivée par turbidimétrie (schéma 5).

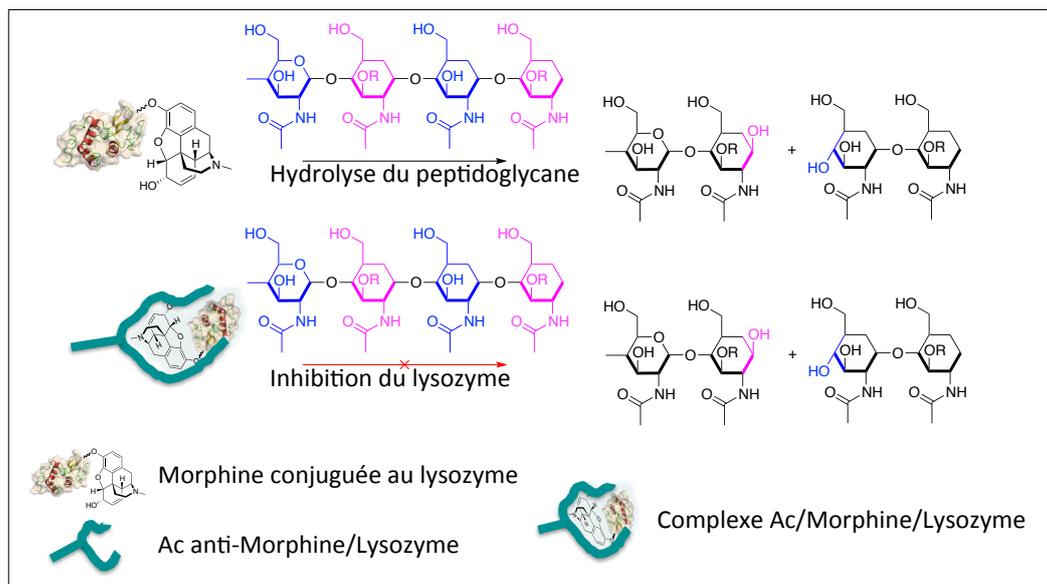


Schéma 5 : Représentation de la méthode de détection de la morphine couplée au lysozyme par inhibition de l'activité enzymatique consécutive à la formation du complexe immunitaire.

L'hypothèse la plus fréquemment avancée pour expliquer ce phénomène d'inhibition enzymatique est l'existence d'un encombrement stérique provoqué par la fixation de l'Ac qui rend moins accessible le site actif catalytique de l'enzyme.

La découverte de cette inhibition de l'activité enzymatique a permis le développement de la technique EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique) dans laquelle une molécule haptène est couplée à une protéine dotée d'une activité catalytique. Il s'agit d'une méthode de fixation par compétition. Un nombre limité d'Ac est exposé à une quantité connue d'un système conjugué haptène/protéine. A l'état d'équilibre, il y a formation d'un complexe Ac/Haptène/Protéine. L'encombrement stérique ainsi généré provoque l'inhibition de l'enzyme. A ce milieu est alors ajouté l'analyte à doser qui va se lier à l'Ac et former un complexe Ac/Haptène. Après ce nouvel état d'équilibre, une fraction libre du système Haptène/Enzyme est obtenue, la contrainte stérique est levée et l'activité enzymatique est restaurée. Cette activité est donc proportionnelle à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon⁽¹⁷⁾.

Un autre protocole de détection homogène utilise également ce principe d'inhibition stérique de l'activité enzymatique. Cette méthode, proposée par Burd *et al.*⁽¹⁸⁾ en 1977, consiste à conjuguer un haptène non pas à l'enzyme mais à son substrat (schéma 6). Dans cette procédure, la gentamycine est conjuguée à un dérivé inactif de l'ombelliférone : l'ombelliférone- β -galactoside qui n'émet pas de fluorescence. Ce dérivé inactif peut être converti en ombelliférone fluorescente par l'action de la β -galactosidase.

Cependant, lorsque ce système conjugué se fixe sur l'Ac dirigé contre l'haptène « gentamicine », l'encombrement stérique devient trop important et rend inaccessible le substrat. L'ajout de la gentamicine présente dans l'échantillon à analyser provoque un déplacement des équilibres de fixation et libère une fraction libre du fluorophore inactif. La contrainte disparaît, le substrat peut alors être hydrolysé par la β -galactosidase. L'ombelliférone est libérée et un rayonnement de fluorescence est émis.

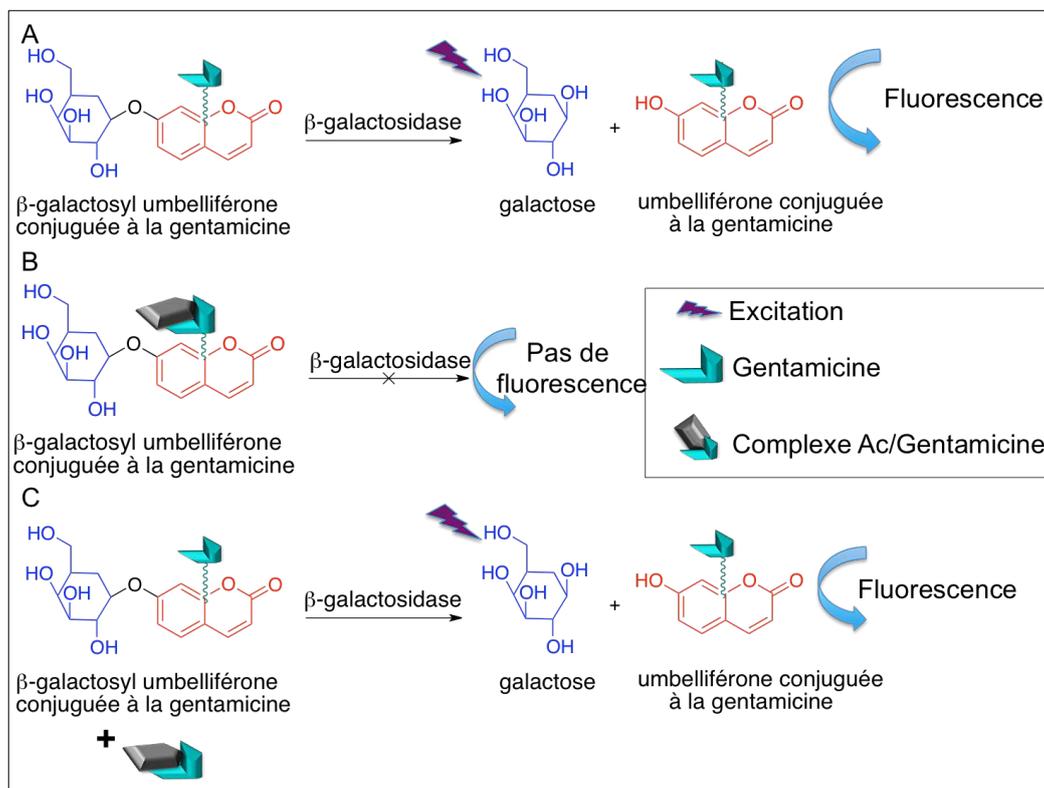


Schéma 6 : Principe de fonctionnement d'un test de détection homogène utilisant la méthode EMIT. A) Le couplage du dérivé inactif de l'ombelliférone à la gentamicine ne perturbe pas l'activité enzymatique. L'ombelliférone ainsi libérée va pouvoir émettre une fluorescence après une excitation énergétique adéquate ; B) En présence de l'Ac dirigé contre la gentamicine, l'encombrement stérique dû à la formation du complexe rend inaccessible le substrat et la fluorescence est inhibée ; C) Le déplacement des équilibres de fixation consécutif à l'ajout de gentamicine permet de libérer une fraction libre du système Haptène/Substrat qui redevient alors disponible pour l'enzyme. La fluorescence est restaurée.

D'autres tests immuno-enzymatiques ont été élaborés selon un mode hétérogène, c'est à dire avec une étape de séparation intermédiaire. En effet, dans ce type de test, l'activité de l'enzyme n'est pas perturbée par la formation du complexe Ag/Ac. Il est donc nécessaire d'isoler la fraction enzymatique libre de celle liée sous forme de complexe immun Ag/Ac.

Cette étape de discrimination est favorisée par l'immobilisation d'une des entités impliquées dans la réaction sur un support solide. La fixation sur support solide peut concerner indifféremment l'Ag ou l'Ac. Cet ancrage peut être réalisé via une liaison covalente sur des matériaux tels que le polyacrylamide, la cellulose ou encore l'agarose. Il peut également être réalisé par adsorption passive sur une phase solide (tube, bille, puit de microplaque) via un agent transporteur.

Cet agent ou chaperon peut être un polymère (polyvinyle, polypropylène, polycarbonate), mais le verre ou le caoutchouc de silicone peuvent aussi être employés.

Le plus célèbre de ces tests immuno-enzymatiques hétérogènes et le plus largement utilisé est le test ELISA, acronyme d'Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay. Ce test, publié par Peter Perlmann et Eva Engvall en 1971, est maintenant devenu le standard de référence des méthodes de détection par reconnaissance moléculaire⁽¹⁷⁾.

Il peut être mis en œuvre selon un mode compétitif par incubation d'antigènes couplés à une enzyme et d'antigènes non marqués provenant de l'échantillon à analyser en présence d'une quantité restreinte d'Ac spécifiquement dirigés contre l'Ag d'intérêt et adsorbés sur un support solide. Il y a donc compétition de fixation entre les deux espèces d'Ag vis à vis de l'Ac. La fraction liée de l'Ag couplé à l'enzyme sera donc inversement proportionnelle à la quantité d'analyte présent dans l'échantillon. L'activité enzymatique de la fraction liée sera mesurée après une ultime étape d'ajout du substrat (schéma 7).

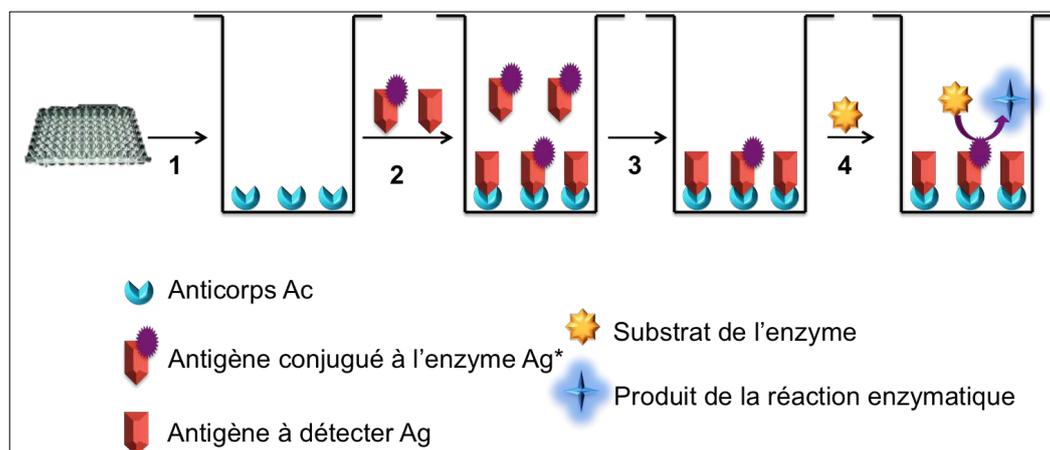


Schéma 7 : Illustration du principe de fonctionnement d'un test hétérogène ELISA compétitif. 1) L'Ac est adsorbé sur le support solide constitué par le fond du puits de la plaque de microtitration ; 2) Incubation en présence d'Ag et d'Ag* et formation des complexes immuns Ag/Ac et Ag*/Ac ; 3) Lavage afin d'éliminer la fraction non liée à l'Ac ; 4) Ajout du substrat de l'enzyme et conversion en un produit présentant des propriétés optiques ou électroniques.

Une méthode alternative non compétitive permet également la détection d'un Ag cible présent au sein d'un milieu biologique complexe. Elle repose sur l'utilisation de deux Ac spécifiquement dirigés contre des épitopes différents de l'Ag, on parle de technique sandwich⁽¹⁷⁾. Comme précédemment un anticorps (Ac1) est immobilisé sur un support solide, en revanche il est introduit en très large excès. Une étape de lavage permet d'éliminer les Ac1 non adsorbés. L'échantillon contenant l'analyte à étudier est alors ajouté. Il se forme un complexe immun entre Ac1 et l'un des épitopes antigéniques (Ag1). Un deuxième lavage permet d'éliminer l'antigène non lié à Ac1. Ensuite, un second anticorps Ac2, reconnaissant un domaine épitope antigénique différent (Ag2) est ajouté. Il se forme alors un complexe immun Ac1/Ag/Ac2. Une dernière étape de lavage permet d'éliminer l'Ac2 qui n'a pas réagi avec Ag2. Ce second anticorps est couplé à une enzyme, ainsi une ultime étape d'addition du substrat va permettre de mesurer la quantité d'analyte.

Le premier anticorps Ac1 agit comme un système de capture et permet de maintenir l'Ag sur le support solide alors que Ac2 est assimilé à un système de reconnaissance et de détection (schéma 8).

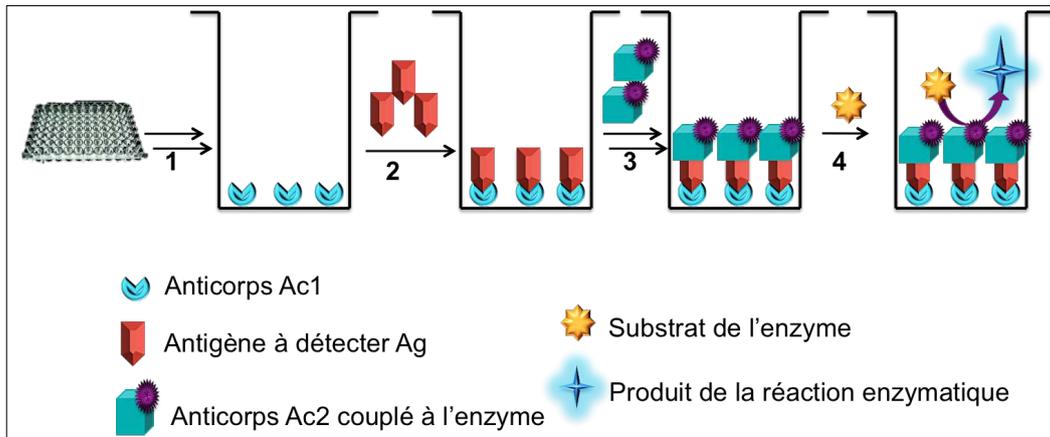


Schéma 8 : Illustration du principe de fonctionnement d'un test hétérogène ELISA non compétitif sandwich. 1) Adsorption de Ac1 sur le support solide et lavage afin d'éliminer les Ac1 non fixés ; 2) Ajout de l'échantillon contenant l'Ag d'intérêt qui est capturé par Ac1 ; 3) Ajout de l'anticorps de reconnaissance et de détection Ac2 et formation d'un supra-complexe immunitaire, l'excès d'Ac2 est retiré par lavage ; 4) Ajout du substrat de l'enzyme et conversion en un produit présentant des propriétés optiques ou électroniques.

Une méthode ELISA, qualifiée de méthode indirecte, a été mise au point et ne diffère de la procédure non compétitive sandwich que par la nature de l'entité immobilisée sur le support solide⁽¹⁷⁾. En effet, dans la technique ELISA indirecte c'est l'antigène qui est adsorbé et sert d'élément de capture. L'analyte à détecter est l'anticorps Ac1 présent dans l'échantillon. La formation du complexe Ag/Ac va être mise en évidence par l'ajout d'un anticorps secondaire Ac2 obtenu à partir d'une espèce animale différente de celle utilisée pour la génération de Ac1. Cet anticorps Ac2 est dirigé contre les immunoglobulines IgG de l'animal avec lequel a été produit l'anticorps primaire Ac1. Cet Ac est couplé à une enzyme dont l'ajout du substrat après une étape de lavage permet de quantifier la formation du complexe Ag/Ac1/Ac2 ainsi formé (schéma 9).

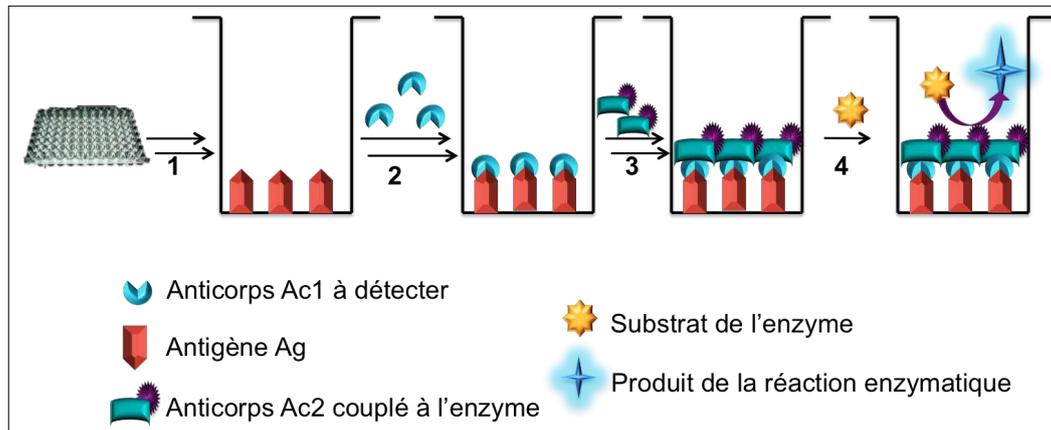


Schéma 9 : Illustration du principe de fonctionnement d'un test hétérogène ELISA non compétitif sandwich pour la détection d'un anticorps Ac1 présent dans le sérum. 1) Adsorption de l'antigène cible de Ac1 sur le support solide et lavage afin éliminer les Ag non fixés ; 2) Ajout de l'échantillon contenant l'Ac d'intérêt qui réagit et forme un complexe avec Ag puis lavage pour éliminer les Ac non impliqués dans le complexe Ag/Ac1 ; 3) Ajout de l'anticorps de reconnaissance et de détection Ac2 et formation d'un supra-complexe immun, l'excès d'Ac2 est retiré par lavage ; 4) Ajout du substrat de l'enzyme et conversion en un produit présentant des propriétés optiques ou électroniques.

Différents tests immunologiques de type ELISA sandwich ont été proposés pour la détection colorimétrique de marqueurs tumoraux. La mise en œuvre d'une cascade de réactions enzymatiques permet d'amplifier le signal et d'améliorer la limite de détection. Ainsi, Lee⁽¹⁹⁾ et son équipe ont décrit un système de détection CELISA pour l'antigène spécifique de la prostate (PSA) et pour l' α -protéine fœtale (AFP). Ce test ELISA en cascade permet d'abaisser la limite de détection à 100 fM pour le PSA et à 10 pM pour l'AFP.

Dai⁽²⁰⁾ et son équipe ont proposé un test immuno-enzymatique compétitif associé à une détection électrochimique permettant la détection de l'antigène carbohydrate CA125. Ce test repose sur la variation de transfert d'électron à la surface d'une électrode lors de la formation du complexe Ag/Ac. Ce transfert d'électron est induit par la conversion de Fe^{3+} en Fe^{2+} sous l'action de la horseradish peroxydase (ou peroxydase du raifort). Cette méthode permet d'obtenir un domaine de linéarité s'étendant de 2 à 14 U/mL et une limite de détection de 1,29 U/mL.

Différentes enzymes peuvent être utilisées pour la mise en œuvre de ces techniques immuno-enzymatiques. Le tableau suivant présente les principales enzymes employées ainsi que leur substrat et le moyen de détection appliqué pour traduire l'interaction et la formation du complexe Ag/Ac (Tableau 1).

Enzyme	Substrat	Détection
Lysozyme	Liaison glycosidique β -1,4 des peptidoglycanes bactériens	Turbidimétrie
Glucose-6-phosphate déshydrogénase	Glucose-6-phosphate	
Phosphatase alcaline	Para-nitrophenyl phosphate NADP ⁺	Colorimétrie Electrochimie
Horseradish peroxidase	Diaminobenzidine et dérivés Acide 5-aminosalicylique Luminal	Colorimétrie Electrochimie Chimiluminescence
Glucose oxidase	Glucose	Electrochimie
β -D-galactosidase	4-méthylumbelliféryl- β -D-galactose	Fluorimétrie

Tableau 1 : Principales enzymes et substrats utilisés lors de tests immuno-enzymatiques ainsi que le système de détection associé.

Le principal inconvénient de ces techniques immuno-enzymatiques est qu'elles nécessitent le couplage d'une enzyme sur un anticorps ou un antigène. Cette étape de conjugaison peut être problématique notamment si la cible qui doit être associée à l'enzyme est de petite taille. En effet, la fixation de l'enzyme ne doit pas perturber la fixation de l'antigène sur l'anticorps. Or le fort encombrement stérique induit par la protéine peut diminuer l'accessibilité au site de liaison.

Ce problème d'encombrement stérique limite également l'application des techniques « sandwich » aux molécules de grande taille présentant deux sites de fixation distincts et suffisamment éloignés l'un de l'autre afin de permettre la fixation de l'élément de reconnaissance.

De plus, cet encombrement stérique est inhérent à la nature même des anticorps et des enzymes. En effet, ces biocomposés présentent une masse moléculaire élevée. Ce paramètre peut entraîner une limitation du nombre d'anticorps immobilisés sur un même support solide ce qui peut engendrer une diminution de la sensibilité et restreint les possibilités de détection simultanée de cibles différentes.

Ainsi, la recherche et le développement de systèmes de détection utilisant des structures de reconnaissance moléculaire plus petites tels que les aptamères constituent un axe de recherche extrêmement prometteur.

Chapitre II : ÉMERGENCE DES APTAMÈRES

II-1 STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES DE L'ADN : LA BASE DES APTAMÈRES

Au début des années 50, la structure chimique des différents constituants de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et de l'acide ribonucléique (ARN) était connue, de même que la disposition des liaisons covalentes au sein d'un polymère d'acide nucléique (figure 5). Cependant, la structure tridimensionnelle de l'ADN restait à élucider.

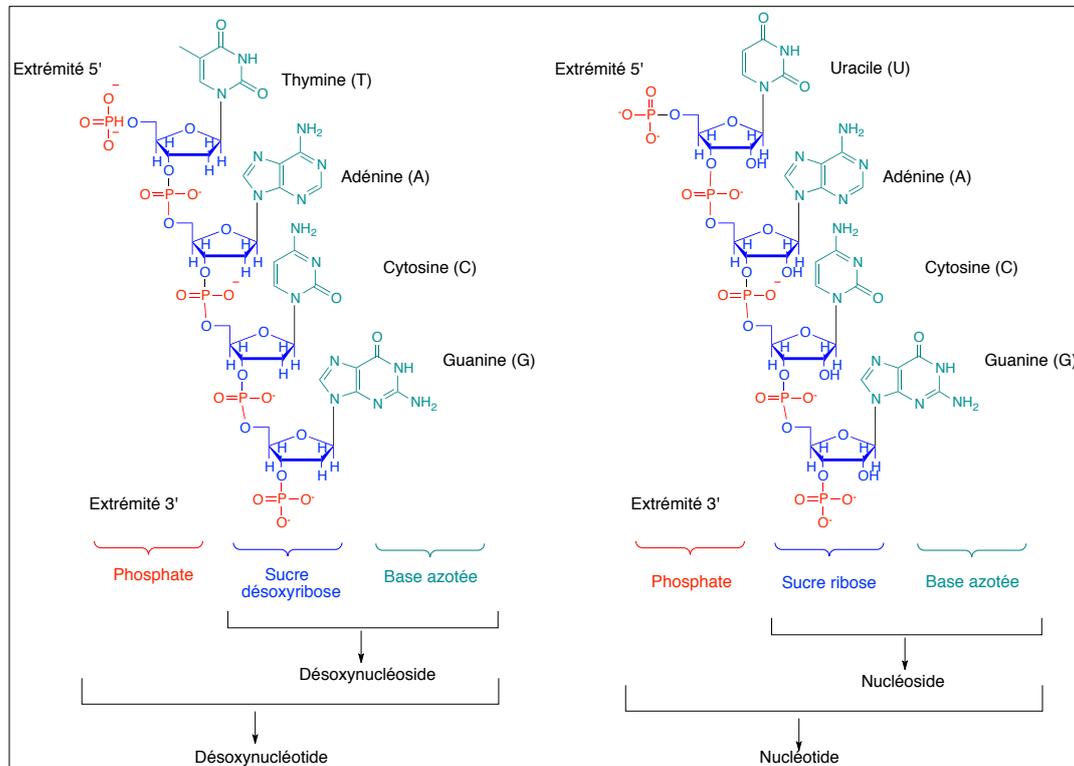


Figure 5 : Structure chimique des quatre bases constitutives de l'ADN (à gauche) et de l'ARN (à droite) ainsi que la liaison N-glycosidique reliant les bases à l'unité sucre et les liaisons phosphodiester reliant les nucléosides entre eux afin de former le brin d'ADN ou d'ARN.

En avril 1953, Watson et Crick⁽²¹⁾ se sont inspirés des travaux de diffraction des rayons X de Rosalind Franklin et ont proposé un modèle en double hélice pour représenter la structure tridimensionnelle de la molécule d'ADN (figure 6).

La stabilité de cette structure est assurée par l'orientation des acides nucléiques vis à vis de leur environnement. En effet, les bases constitutives de l'ADN sont hydrophobes et doivent donc être orientées vers l'intérieur de la double hélice afin de réduire les interactions avec le milieu aqueux. Au contraire, l'orientation vers l'extérieur du squelette sucre/phosphate, chargé négativement au pH physiologique, permet de réduire les répulsions électroniques et d'assurer la solubilité de la molécule d'ADN. Ces deux paramètres expliquent la disposition antiparallèle des brins d'ADN l'un par rapport à l'autre.

La stabilité de la double hélice est également assurée par l'appariement deux à deux de bases dites complémentaires. Cet appariement des bases n'est pas aléatoire et est conditionné par la possibilité de création de liaisons hydrogènes inter-caténares. En conséquence, la base complémentaire de l'adénine est la thymine et la base complémentaire de la guanine est la cytosine, et réciproquement.

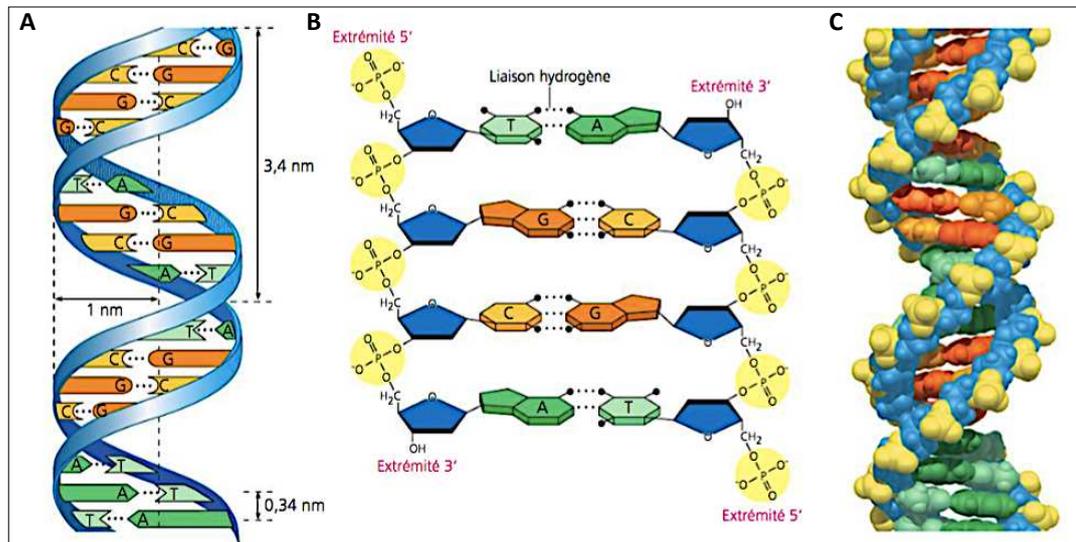


Figure 6 : A) Représentation schématique de la double hélice dextrogyre de l'ADN avec en bleu sous forme de ruban le squelette désoxyribose/phosphate du brin d'ADN et en pointillé les liaisons hydrogènes inter-bases nécessaires à la stabilisation de la structure ; B) Représentation simplifiée des liaisons hydrogènes s'établissant entre les bases complémentaires. Elles sont au nombre de deux entre l'adénine et la thymine et au nombre de trois entre la guanine et la cytosine ; C) Représentation informatisée de l'ADN sous forme compacte permettant de visualiser l'appariement des bases ainsi que le grand et le petit sillon. Illustrations issues de la référence (22).

Cet appariement par complémentarité des bases aboutit à la formation d'un complexe moléculaire bicaténaire stable ou duplex. Cette découverte a permis l'utilisation des séquences nucléotidiques comme outil de reconnaissance moléculaire et a grandement participé à l'amélioration des connaissances dans le domaine de la génomique et du génie génétique. Les applications les plus célèbres de ce phénomène d'appariement par complémentarité de bases sont la PCR (Polymerase Chain Reaction ou amplification en chaîne par polymérase) et la technique de Southern Blot.

La méthode PCR repose sur la répétition de cycle de dénaturation/hybridation/élongation. Cette technique permet de synthétiser une séquence spécifique d'ADN de façon exponentielle (schéma 10). La première étape consiste à dénaturer l'ADN cible double brin en deux molécules d'ADN simple brin par un traitement thermique. Chaque brin ainsi généré va pouvoir s'hybrider avec une courte séquence nucléotidique complémentaire appelée amorce. Cette structure bicaténaire va être reconnue par une enzyme ADN polymérase thermostable qui va permettre l'élongation de la chaîne depuis l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'. La longueur de la séquence à amplifier est déterminée par les séquences des amorces qui délimitent la zone d'action de la polymérase.

L'élongation de la chaîne est réalisée par appariement complémentaire des bases selon les règles de Watson et Crick en utilisant le brin parent comme brin matrice. Ce brin matrice peut être une molécule d'ADN, l'enzyme de réplication utilisée est une ADN polymérase ADN dépendante. Mais il peut également s'agir d'une molécule d'ARN. Dans ce cas, le processus est plus complexe et fait appel à une ADN polymérase ARN dépendante qui permet de réaliser l'étape de transcription inverse et d'obtenir la molécule d'ADN qui servira de matrice à l'ADN polymérase ADN dépendante⁽²³⁾. Cette méthode de synthèse et d'amplification de l'ADN permet notamment d'introduire des nucléotides chimiquement modifiés au sein de la séquence complémentaire. Ces modifications peuvent correspondre à un radio-marquage ou à un couplage des acides nucléiques avec un fluorophore. L'incorporation de ces nucléotides modifiés permettra la détection des molécules d'ADN.

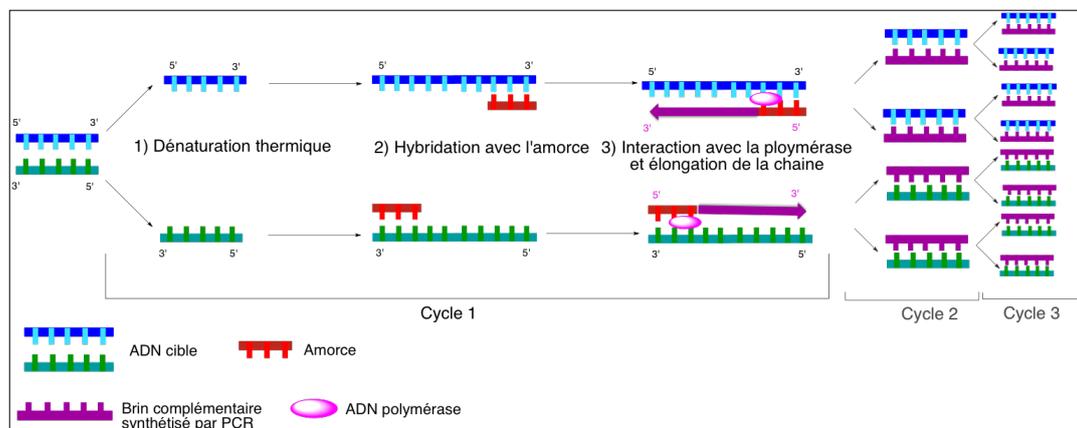


Schéma 10 : Représentation des principales étapes mises en jeu lors de l'amplification d'une séquence spécifique d'ADN par la méthode PCR. A partir d'une molécule d'ADN double brin, deux molécules sont obtenues après le premier cycle PCR, quatre après le second et huit après le troisième cycle PCR, l'amplification est donc bien exponentielle.

La technique de Southern-Blot a été décrite par le biologiste britannique Edwin Southern⁽²⁴⁾ en 1975. Cette technique permet de rechercher un fragment d'ADN spécifique après digestion enzymatique du brin source et migration électrophorétique de ses différents fragments fils. La migration électrophorétique va permettre une séparation des fragments de restriction en fonction de leur taille. L'étape suivante consiste au transfert de ces fragments depuis le gel d'électrophorèse vers une membrane en nylon. Cette membrane est alors incubée en présence de la séquence complémentaire du fragment d'intérêt qui va venir s'hybrider sur le fragment cible. Le marquage de la séquence complémentaire permet la détection du fragment d'intérêt.

La découverte de la structure en double hélice de l'ADN a permis l'utilisation de séquences complémentaires comme sondes en les associant à un reporteur qui permet de convertir la formation du duplex en un signal facilement mesurable. Ces reporteurs peuvent être de différentes natures et sont très similaires à ceux utilisés au cours des tests immunologiques de détection⁽²⁵⁾. Ce reporteur peut être un radioisotope tel que ^{32}P , ^3H , ^{14}C ou encore ^{125}I par modification de la cytosine en position 5. Il peut également s'agir d'un acide nucléique biotinylé mais dans ce cas la biotine n'est qu'un marqueur intermédiaire. Il est nécessaire de lui associer une molécule d'avidine ou de

streptavidine conjuguée à une enzyme, un fluorophore ou à un composé luminescent. La séquence nucléotidique sonde peut également être directement couplée à une enzyme ou à un fluorophore.

Les enzymes les plus fréquemment utilisées sont la phosphatase alcaline et la peroxydase du raifort (horseradish peroxydase) qui sont deux enzymes catalysant la conversion d'un substrat chromogène en un produit pouvant être détecté par colorimétrie. Les fluorophores régulièrement employés sont des couples donneur/accepteur comme la rhodamine/fluorescéine ou le DABCYL/EDANS (figure 7). Ce marquage fluorescent repose sur le principe de quenching de fluorescence⁽²⁶⁾.

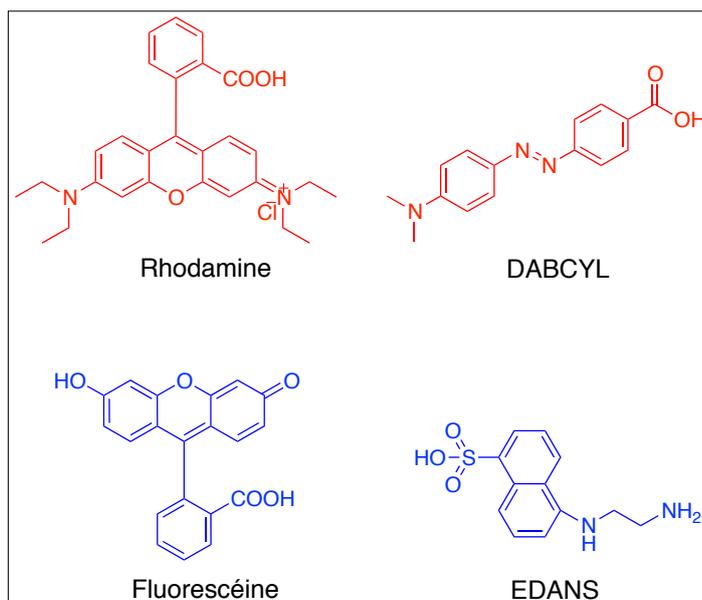


Figure 7 : Structure chimique de quelques fluorophores utilisés comme couple donneur (en bleu)/accepteur (en rouge).

La principale limitation à l'utilisation de séquences d'ADN comme outil de reconnaissance moléculaire était la nécessité que la cible soit un composé nucléotidique dont la séquence était parfaitement connue afin de permettre la reconnaissance et l'appariement par complémentarité des bases.

Cependant l'élargissement du champ d'application des nucléotides comme outil de reconnaissance a été rendu possible grâce à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation et l'expression du génome. Ceux-ci ont montré que les molécules d'ADN et/ou d'ARN étaient capables d'interagir avec des protéines afin de former des complexes supramoléculaires fonctionnels stabilisés par des liaisons faibles. En effet, l'expression ainsi que la transmission de l'information génétique sont sous la dépendance de nombreuses enzymes⁽²²⁾. Afin d'illustrer ce propos, nous nous proposons de présenter sommairement les processus de réplication de l'ADN et de traduction de l'ARN.

Des dizaines d'enzymes et de protéines interviennent dans les mécanismes de réplication de l'ADN et permettent l'ouverture, le déroulement de la double hélice ainsi que la synthèse d'un nouveau brin d'ADN. On parle de complexe de réplication (figure 8). La première étape de la réplication de l'ADN est la reconnaissance d'une séquence spécifique appelée origine de réplication. Des hélicases rompent les liaisons hydrogènes inter-brin et déroulent la double hélice afin d'individualiser les deux brins d'ADN qui serviront de brins matrices. Cette structure localement désenroulée est stabilisée par des protéines fixatrices d'ADN monocaténaire. Une primase synthétise une amorce d'ARN complémentaire au brin matrice et enfin l'élongation de la chaîne est réalisée par une ADN polymérase. Cependant, le désenroulement local de la double hélice d'ADN engendre un surenroulement en amont du complexe de réplication ce qui peut gêner sa progression. Des ADN gyrases réalisent des coupures monobrins et font pivoter le brin d'ADN ce qui permet d'atténuer la contrainte induite par la torsion.

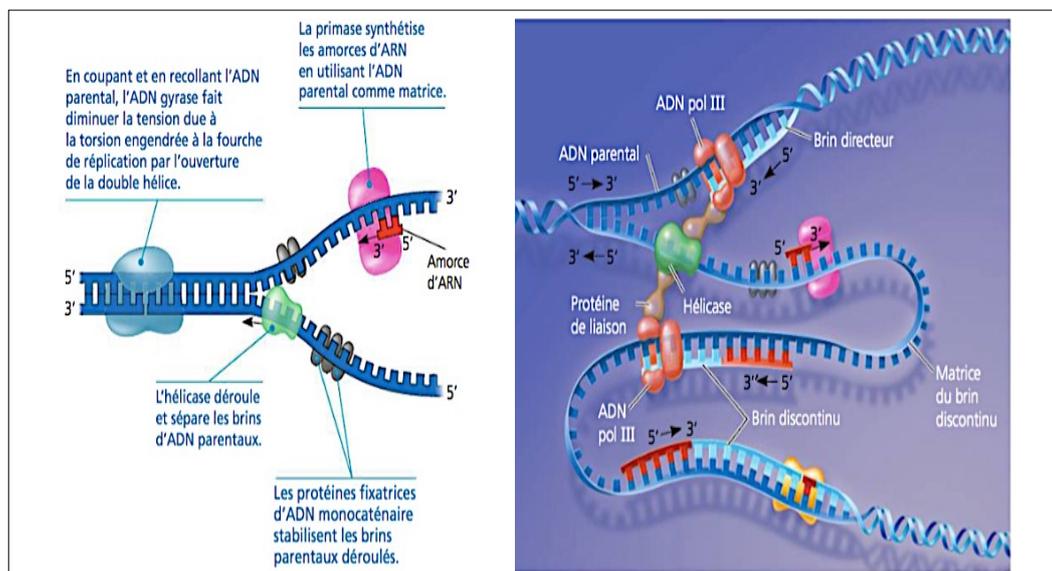


Figure 8 : Illustrations simplifiées des interactions entre les enzymes du complexe de réplication et l'ADN. Illustrations issues de la référence (22).

L'interaction protéines/acides nucléiques ne se limite pas à l'ADN mais est également présente au niveau de l'ARN. En effet, l'expression des gènes nécessite une étape de traduction des ARN messagers (ARNm) en protéines. Ce processus de traduction met en œuvre un complexe ribonucléoprotéique appelé ribosome, un ARN de transfert (ARNt) ainsi qu'une protéine enzymatique dotée d'une activité acyl-transférase (figure 9).

La finalité de la traduction est la synthèse d'un polypeptide à partir de l'information génétique portée par l'ARNm par lecture du code génétique. Le rôle de l'ARNt est de lire le codon et de lui associer l'acide aminé correspondant. La structure de l'ARNt doit donc permettre une double reconnaissance :

- le codon porté par l'ARNm
- l'acide aminé correspondant

Cette double reconnaissance est assurée par le repliement de la molécule d'ARNt consécutif à l'appariement complémentaire des bases. Ce repliement en duplex fait apparaître des zones monocaténaire qualifiées de boucles. Cette structure classique des ARNt est parfois qualifiée de structure en épingle à cheveux. C'est au niveau d'une de ces boucles, la boucle anti-codon, que va s'effectuer la reconnaissance avec le codon complémentaire de l'ARNm. La reconnaissance de l'acide aminé est réalisée au niveau du triplet CCA terminal de l'ARNt. Le transfert de l'acide aminé correspondant sur l'ARNt est catalysé par aminoacyl-ARNt synthétase. La correspondance entre le codon de l'ARNm et l'acide aminé est assurée par cette enzyme qui reconnaît spécifiquement la combinaison ARNt/Acide aminé. Ces acides aminés sont ensuite couplés les uns aux autres par des liaisons peptidiques au sein du ribosome⁽²²⁾.

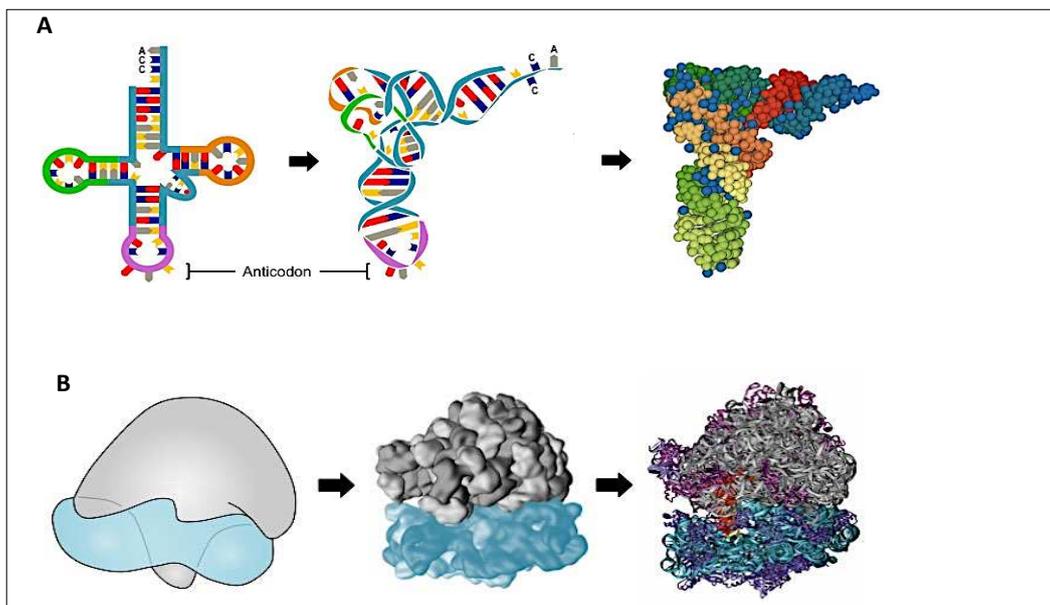


Figure 9 : A) De gauche à droite : Représentation de la structure bidimensionnelle de l'ARN de transfert qui génère un repliement de la molécule et l'apparition de boucles monocaténaire ; Représentation de la structure tridimensionnelle de ce même ARNt ; Représentation moléculaire informatisée. B) De gauche à droite : Représentation schématique du ribosome constitué de ses deux sous-unités ; Représentation moléculaire informatisée ; Structure du ribosome obtenue par cristallisation et diffraction des rayons X.

L'étude des mécanismes de réplication, de transcription, de traduction et de réparation du génome a montré que les composés nucléotidiques étaient capables de se lier à des molécules protéiques. De plus, cette interaction est associée au repliement de la molécule nucléotidique et montre une structure tridimensionnelle non intégralement hélicoïdale avec des motifs en épingle à cheveux.

Toutefois, l'existence d'interactions entre la molécule d'ADN et des protéines ne se limite pas aux mécanismes de réplication, de transcription et de traduction mais sont également révélées par l'étude des différents degrés de condensation de l'ADN aboutissant à la formation du chromosome.

Ces structures en épingle à cheveux ne sont pas les seules conformations spatiales non « duplex-hélicoïdale » que peuvent adopter les oligonucléotides. Les télomères sont des régions chromosomiques situées aux extrémités du chromosome.

Leur étude structurale a montré qu'ils étaient constitués par la répétition d'une séquence de quelques nucléotides. Ce motif est répété plus de 1000 fois et est majoritairement composé de guanine. Ces séquences riches en guanine se replient spontanément en une structure tridimensionnelle à quatre brins. Ce tétraplex résulte d'un appariement intramoléculaire qui n'obéit pas aux règles de Watson et Crick car il n'implique que des bases guanines, on parle alors de G-Quadruplex (figure 10). La stabilité de ce complexe est assurée par des liaisons hydrogènes entre les fonctions amines, les fonctions cétones et les atomes d'azote intracycliques des quatre guanines.

De plus, la superposition des quadruplex les uns avec les autres est rendue possible par des interactions de types π -stacking entre les noyaux aromatiques des bases guanines⁽²⁷⁾.

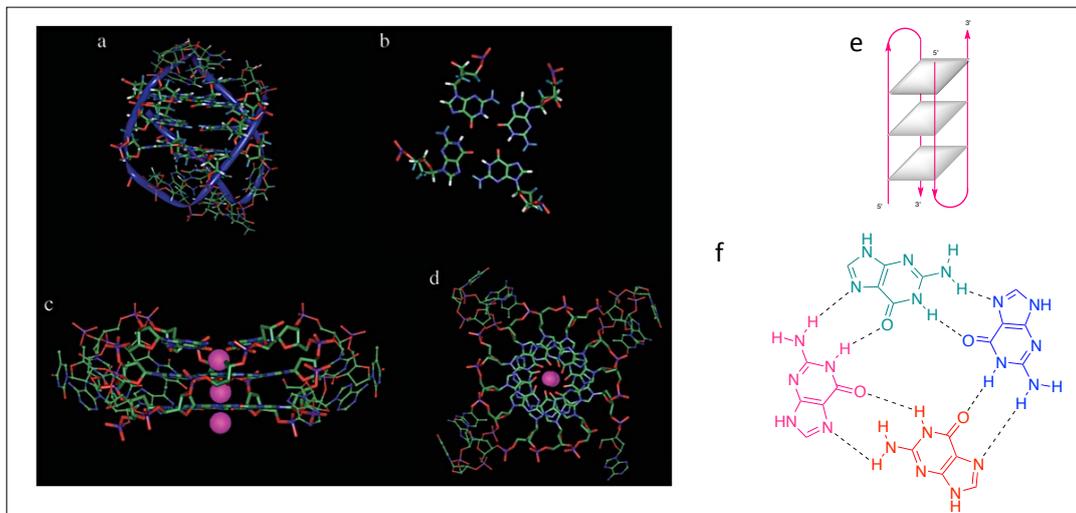


Figure 10 : a) Structure cristallographique d'un G-Quadruplex antiparallèle retrouvé au niveau des télomères ; b) Vue détaillée de cette même structure ; c) Structure cristallographique d'un G-Quadruplex parallèle ; d) G-Quadruplex vu du dessus ; e) Représentation schématique de la superposition des guanines par π -stacking aboutissant à la structure tridimensionnelle G-Quadruplex faisant apparaître des boucles monocaténaire ; f) Représentation des liaisons hydrogènes entre les guanines assurant la stabilité du tétraplex.

Les structures tridimensionnelles de l'ADN et de l'ARN sont étroitement corrélées à leur capacité à fixer des ligands de nature diverse. Ainsi la structure classique en double hélice peut interagir avec des agents moléculaires qui s'insèrent au sein de la double hélice et provoquent une déformation localisée de la structure duplex. Cette altération de la structure peut notamment empêcher la progression des enzymes du complexe de réplication⁽²⁸⁾. De nombreuses molécules aromatiques peuvent se comporter comme des agents intercalants. Beaucoup d'entre elles sont potentiellement cancérogènes ou mutagènes comme le bromure d'éthidium ou le benzène et ses dérivés. Pourtant, cette capacité à perturber les mécanismes d'expression des gènes peut être mise à profit pour l'élaboration de composés anti-cancéreux tels que la mitoxantrone ou la doxorubicine (figure 11).

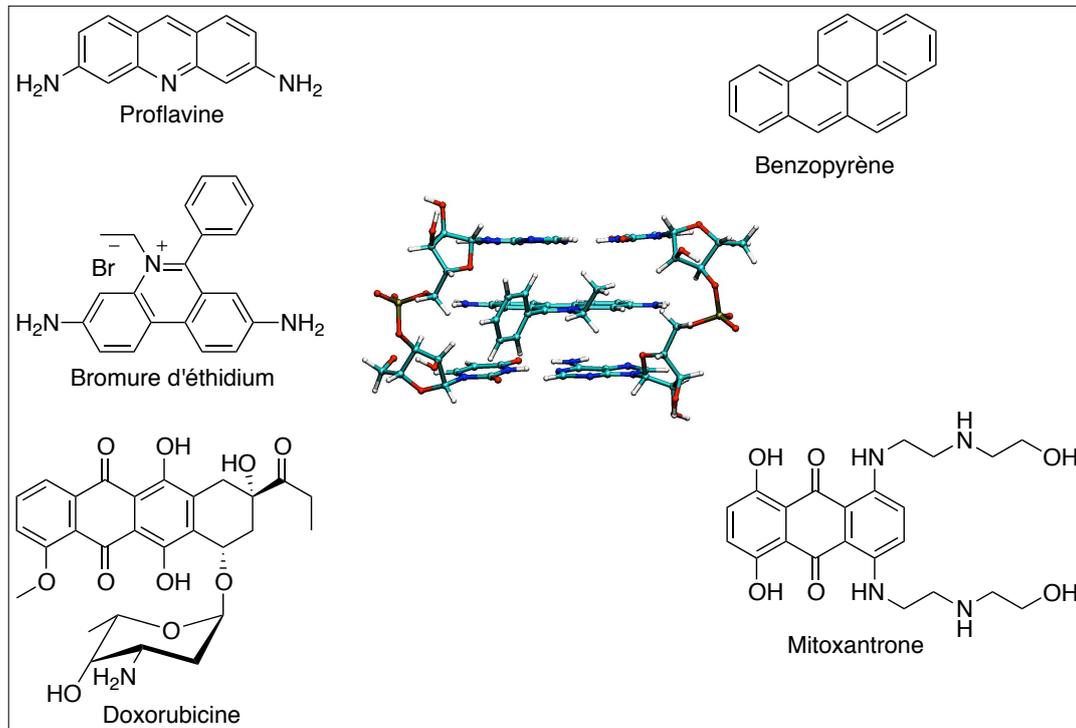


Figure 11 : Structure chimique de quelques composés pouvant s'intercaler au sein de la double hélice d'ADN et structure cristallographique du bromure d'éthidium au sein de la structure bicaténaire.

Les structures tertiaires formées par le repliement des molécules nucléotidiques aboutissent à la formation de domaines en épingle à cheveux ou de G-Quadruplex ainsi que de boucles. Ces structures conformationnelles permettent une exposition préférentielle de séquences nucléotidiques qui sont alors plus disponibles pour interagir avec des ligands⁽²⁹⁾.

Cette capacité de l'ADN et de l'ARN à adopter des structures tertiaires variées afin d'interagir avec des sites réactifs présent au sein de molécules va être mise à profit pour élaborer des séquences oligo-nucléotidiques artificielles spécifiques d'une cible. De même, la profonde modification de la conformation tridimensionnelle de ces oligomères lors de la fixation de la cible va permettre de détecter la formation de ce complexe supramoléculaire ADN (ou ARN)/Cible. De telles séquences sont appelées aptamères et sont capables de se lier avec une très forte affinité et une excellente spécificité à une large gamme de cibles moléculaires telles que des médicaments, des protéines, des molécules inorganiques, des acides aminés, des peptides, des vitamines et même des cellules entières.

II-2 OBTENTION ET MODIFICATION CHIMIQUE DES APTAMÈRES

II-2-1 MÉTHODE IN-VITRO SELEX

Il peut être considéré que l'utilisation des aptamères comme outils de détection débute de façon effective en 1990 grâce aux travaux de Tuerk et Gold⁽³⁰⁾ d'une part et d'Ellington et Szostak⁽³¹⁾ d'autre part. En effet, ces équipes ont élaboré une technique générant l'identification et l'amplification d'une séquence oligo-nucléotidique capable de se lier avec une très haute affinité vis à vis d'une cible spécifique. Tuerk et Gold ont permis la génération d'un fragment d'ARN reconnaissant la protéine gp43 ADN-polymérase retrouvée chez le bactériophage T4. Ellington et Szostak ont produit des ARN capables d'interagir avec des sondes organiques mimant des cofacteurs enzymatiques.

Cette technique est appelée SELEX, acronyme de Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment. C'est une méthode de criblage d'un immense pool d'oligonucléotides par un processus itératif de sélection in-vitro suivie d'une étape d'amplification. Elle aboutit à l'identification d'une séquence nucléotidique unique. Cette séquence se fixe spécifiquement et avec une grande affinité sur une molécule cible (schéma 11).

L'aptamère d'intérêt est isolé à partir d'une très large librairie d'oligonucléotides générés artificiellement et de manière aléatoire. Cette librairie peut contenir jusqu'à 10^{15} séquences oligo-nucléotidiques. Cette bibliothèque est élaborée par synthèse chimique combinatoire de l'ADN ou de l'ARN en phase solide. Chaque séquence n'est présente qu'en un seul exemplaire sous forme d'un oligomère linéaire de 30 à 50 nucléotides⁽³²⁾.

La première étape correspond à l'incubation de l'oligothèque avec la cible. Seule une faible fraction des oligonucléotides va interagir avec la cible et former un complexe Aptamère/Cible. Une étape d'éluion permet d'éliminer les aptamères qui présentent l'affinité la plus faible ou aucune affinité vis à vis de la cible. Classiquement, la cible est immobilisée sur un support solide afin de former une matrice d'affinité. Les aptamères non liés sont donc facilement éliminés par lavage⁽³³⁾.

Seuls les aptamères modérément ou fortement liés au ligand sont conservés. Ces complexes aptamères/cibles sont alors dissociés et les séquences sont éluées puis isolées afin de permettre leur amplification via la technologie PCR. La cible est alors de nouveau incubée en présence des différents aptamères sélectionnés et qui servent de librairie pour le prochain cycle de sélection in-vitro. Chaque cycle de SELEX est donc réalisé à partir d'une bibliothèque contenant des aptamères de plus en plus affins pour la cible.

Après plusieurs cycles de sélection/amplification, l'affinité des aptamères vis à vis de leur cible est considérée comme maximale. Les aptamères ainsi obtenus sont isolés, clonés et séquencés. Lorsque la séquence est identifiée, l'aptamère est alors produit par synthèse chimique.

Le temps nécessaire à la sélection, l'identification et la production d'aptamères de haute affinité est de deux à trois mois. C'est un processus qui demeure long mais qui est cependant beaucoup plus rapide que celui mis en œuvre pour la production d'anticorps monoclonaux.

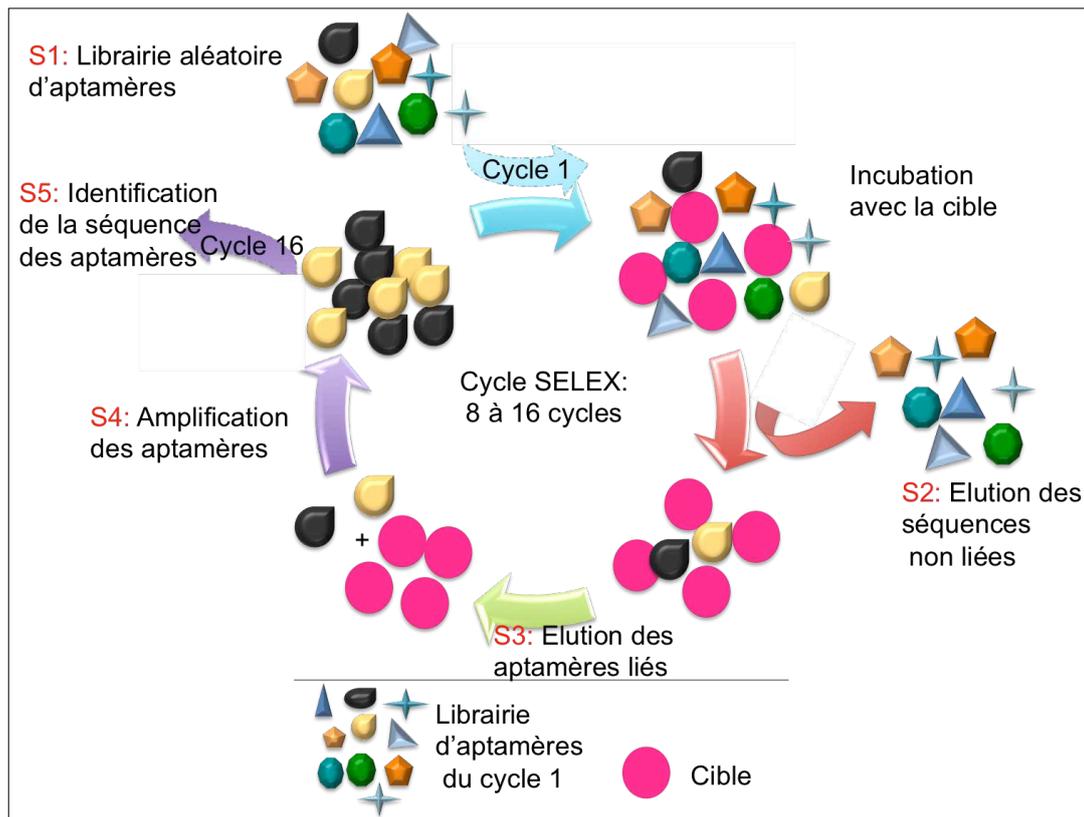


Schéma 11 : Représentation simplifiée des principales étapes mises en jeu lors du processus SELEX. Les aptamères isolés après le premier cycle serviront de bibliothèque pour le cycle suivant et ainsi de suite. Après une dizaine de cycles, les aptamères restant vont être isolés les uns des autres, clonés par PCR puis séquencés afin de permettre leur synthèse chimique.

II-2-2 AMÉLIORATION DE LA MÉTHODE SELEX

La répétition de ces cycles SELEX permet de ne conserver que les séquences d'aptamères qui présentent la plus haute affinité pour le ligand cible. L'efficacité de l'enrichissement en ligands de haute affinité repose à la fois sur la taille et la diversité de la bibliothèque de départ mais est également fonction des conditions physico-chimiques mises en œuvre lors des étapes d'éluion des aptamères non ou faiblement liés à la cible ainsi que sur la nature de la cible.

Cette technique in-vitro permet d'obtenir des aptamères présentant une excellente spécificité pour leur cible. Ils sont capables de discriminer deux ligands qui ne diffèrent l'un de l'autre que par une modification structurale minimale comme la présence ou non d'un substituant méthyle ou d'un groupement hydroxyle. Ce paramètre de spécificité s'étend également aux configurations spatiales avec la reconnaissance stéréospécifique d'un seul énantiomère d'une cible chirale. Cette spécificité peut être améliorée par la technique du contre-SELEX. Cette procédure consiste à incuber les aptamères présélectionnés en présence de ligands présentant une très forte homologie structurale avec la cible. Les aptamères capables d'interagir avec ces composés sont alors éliminés. A contrario, dans le cadre d'applications diagnostiques, il peut être nécessaire de détecter à la fois la cible d'intérêt mais aussi ses variants structuraux. Dans ce cas, le même principe de contre-SELEX peut être appliqué pour discriminer les aptamères incapables de reconnaître ces analogues⁽³²⁾.

Bien que la méthode SELEX permette de synthétiser des aptamères plus rapidement que le temps nécessaire pour produire des anticorps monoclonaux, cette procédure demeure longue. Plusieurs stratégies ont été proposées pour réduire ce délai. L'une d'entre elles consistait à effectuer deux cycles SELEX successifs sans réaliser l'étape d'amplification des aptamères sélectionnés (étape S4 sur le schéma 11). Cette technique a été mise en œuvre pour la sélection d'aptamères ARN capables de reconnaître les protéines UBLCP1 et CHK2. Six cycles SELEX et trois étapes d'amplification ont été réalisés. Cette procédure a permis de réduire le temps d'expérience de 355 à 84 heures. De plus, les résultats obtenus avec cette technique sont similaires avec ceux obtenus par la méthode traditionnelle. Cette technique est appelée RAPID SELEX⁽³⁴⁾.

D'autres équipes de recherche ont cherché à réduire le temps de SELEX en améliorant les techniques de séparation des aptamères liés et non liés. Le couplage de la méthode SELEX à la séparation par électrophorèse capillaire, appelée CE-SELEX permet de séparer efficacement et rapidement les aptamères liés à leur cible des aptamères sous forme libre en fonction de leurs mobilités électrophorétiques respectives. Cependant, cette technique nécessite que ces mobilités électrophorétiques soient significativement différentes ce qui peut être problématique lorsque la cible considérée est une molécule de petite taille. De plus, les conditions de force ionique et de pH mise en œuvre lors du processus de sélection ne sont pas toujours optimales pour la migration par électrophorèse capillaire⁽³⁵⁾.

Stoltenburg *et al.*⁽³⁶⁾ a proposé la technique de Capture-SELEX pour favoriser la séparation des aptamères libres des aptamères impliqués dans un complexe avec la cible (Figure 12). Contrairement à la technique de SELEX classique où la cible est immobilisée, dans la procédure Capture-SELEX, l'immobilisation concerne les aptamères de l'oligothèque. En effet, les aptamères sont modifiés par insertion d'une région d'ancrage située entre deux séquences nucléotidiques de taille différente. Cette région d'ancrage exhibe une séquence nucléotidique complémentaire à celle présente sur un élément de capture. Cet élément de capture est couplé à la biotine. Des billes

paramagnétiques sont recouvertes de streptavidine. La forte affinité de la biotine pour la streptavidine va permettre l'interaction entre l'élément de capture et les billes magnétiques.

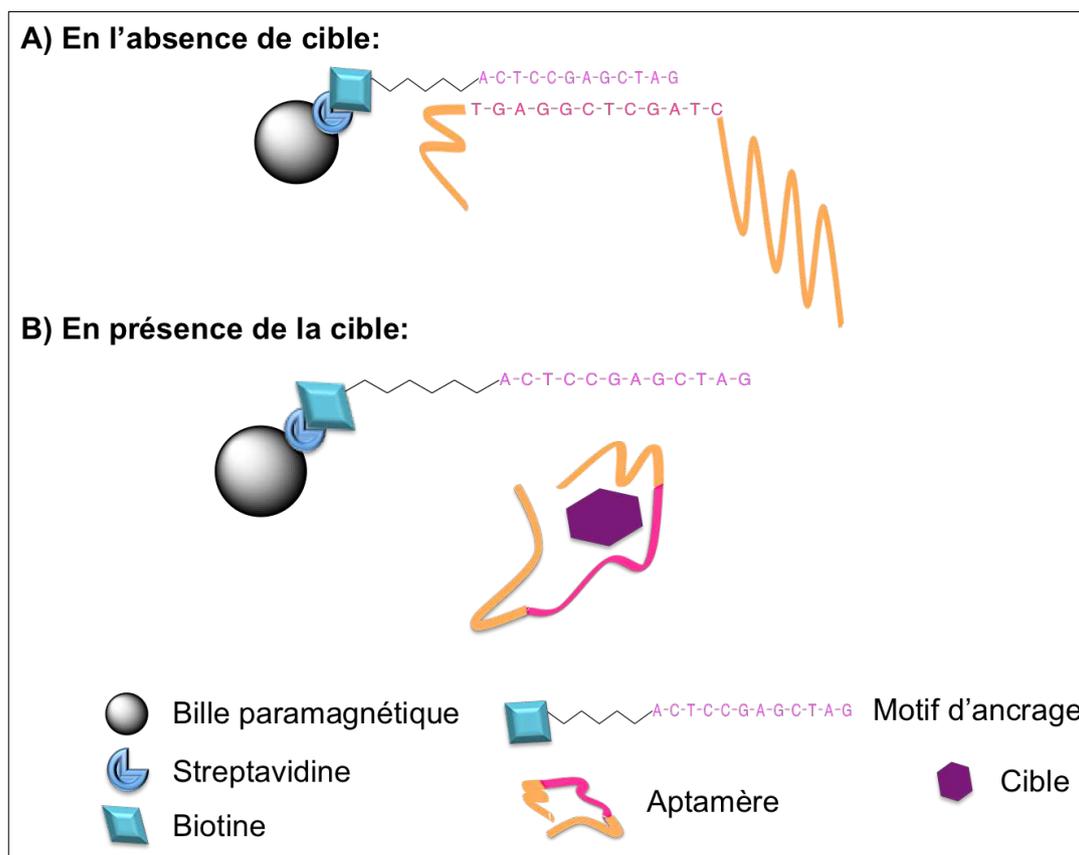


Figure 12 : Représentation du principe de Capture-SELEX : A) En l'absence de cible l'aptamère se retrouve immobilisé à la surface d'une bille paramagnétique via un appariement par complémentarité de base avec un élément d'ancrage (séquence en violet sur la figure). Ce motif de capture est lui-même fixé à la surface de la bille par la formation d'un complexe Streptavidine/Biotine de grande affinité. B) En présence de la cible, l'aptamère subit un profond changement conformationnel et acquiert une nouvelle structure tridimensionnelle qui ne lui permet plus d'interagir avec l'élément de capture.

En l'absence de cible, la région d'ancrage des aptamères va être immobilisée à la surface des billes magnétiques par appariement complémentaire avec l'élément de capture. En revanche, en présence de la cible, l'aptamère va subir une modification de sa configuration et rompre le duplex formé entre la région d'ancrage et le motif de capture. Le complexe Aptamère/Cible est donc en solution. En conséquence, l'application d'un champ magnétique permet de séparer la fraction libre immobilisée de la fraction liée en solution. Cette technique de Capture-SELEX est particulièrement intéressante pour les cibles de petite taille qui peuvent difficilement être immobilisées sur un support solide⁽³⁶⁾.

La méthode SELEX est un processus intégralement réalisé in-vitro. Cette caractéristique lui permet d'être facilement automatisable via des puces microfluidiques ou l'utilisation de plaques 96 puits afin d'effectuer plusieurs réactions de SELEX simultanément⁽³³⁾⁽³⁴⁾.

II-3 MÉCANISME D'ACTION ET APPLICATIONS AU BIOSENSING

L'utilisation d'aptamères comme outil de détection repose sur leur capacité à se fixer de manière spécifique et avec une forte affinité sur une cible déterminée. Leur aptitude à former des motifs tridimensionnels de forme variable comme des structures en épingle ou en G-Quadruplex est également mise à profit. En effet, la reconnaissance moléculaire entre l'aptamère et sa cible induit une profonde modification conformationnelle de l'aptamère. C'est ce changement qui va servir de reporteur à la formation du complexe Aptamère/Cible.

Parmi les nombreux aptamères déjà isolés par la méthode SELEX, l'aptamère fixant la thrombine (TBA) ainsi que les mécanismes moléculaires intervenant dans les processus de reconnaissance et de fixation avec la thrombine ont été largement étudiés. C'est pourquoi le complexe TBA/Thrombine sert souvent de preuve de concept lors de l'élaboration d'un système de biosensing.

II-3-1 MODIFICATION CONFORMATIONNELLE : ÉTUDE DE L'APTAMÈRE FIXANT LA THROMBINE

Les expériences SELEX ont permis d'isoler deux séquences oligo-nucléotidiques capables de fixer la thrombine. Ces deux aptamères sont des fragments d'ADN simple brin dont les séquences respectives sont les suivantes⁽³⁷⁾ :

- 5'-GGTTGGTGTGGTTGG-3', noté HD1 ou 15-mer TBA
- 5'-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3', noté HD22 ou 29-mer TBA

L'aptamère HD1 se lie à la thrombine au niveau du site de fixation du fibrinogène, également connu sous le nom d'exosite I. En revanche, l'aptamère HD22 interagit avec le site de fixation de l'héparine ou exosite II (figure 13).

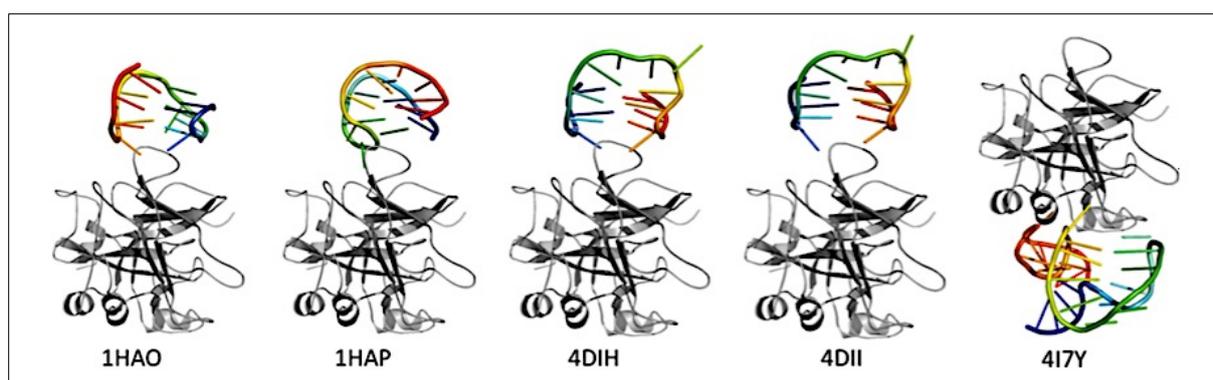


Figure 13 : Structures cristallographiques des complexes TBA/Thrombine. 1HAO et 1HAP sont les structures cristallographiques obtenues en basse résolution du 15-mer TBA alors que 4DIH et 4DII sont obtenues en haute résolution. Le complexe 4I7Y correspond à la structure cristallographique du complexe 29-mer TBA/Thrombine obtenue en basse résolution. La thrombine est représentée en gris et les TBA sont les structures colorées. Illustrations issues de la référence (37).

De nombreuses études ont été réalisées pour élucider l'interaction moléculaire permettant la formation du complexe entre la thrombine et ses aptamères. Cependant, l'aptamère HD1 a été beaucoup plus investigué que l'aptamère HD22.

Des expériences de spectrométrie RMN 2D ont permis de montrer que le 15-mer TBA pouvait se replier sur lui-même et acquérir une structure tridimensionnelle laissant apparaître un motif constitué de deux conformations G-Quadruplex superposées. Ces quadruplex sont reliés entre eux par deux boucles de deux nucléotides et une boucle de trois nucléotides (figure 14). Chaque G-Quadruplex est composé de quatre résidus guanines présentant une orientation anti-syn-anti-syn. Cette double structure quadruplex orientée laisse apparaître un sillon étroit et un sillon plus large. Les deux boucles à deux nucléotides impliquent les résidus thymines T3 et T4 d'une part et T12 et T13 d'autre part. Ces deux boucles traversent le sillon étroit. La boucle à trois nucléotides implique les résidus thymines T7 et T9 ainsi que le résidu guanine G8. Elle traverse le grand sillon. Cet assemblage moléculaire est stabilisé par des interactions de type π -stacking entre les noyaux aromatiques des guanines du quadruplex mais également par l'appariement des bases T4 et T13 via des liaisons hydrogènes qui s'établissent entre les atomes d'oxygène O2 et O4 du carbonyle et le proton de la fonction amine N3 de chaque base⁽³⁸⁾⁽³⁹⁾.

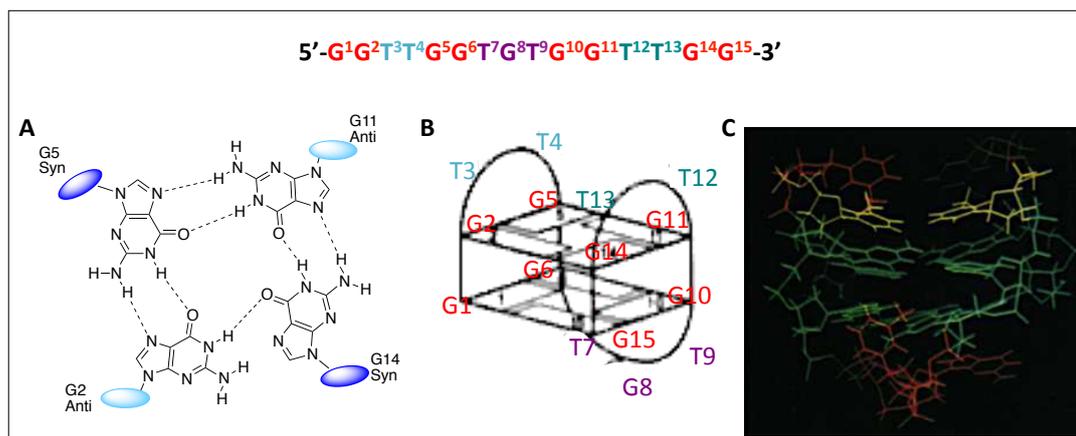


Figure 14 : Représentation de la séquence nucléotidique du 15-mer TBA avec une couleur attribuée à chaque nucléotide en fonction de son appartenance à l'un ou l'autre motif constitutif de la structure tridimensionnelle repliée du TBA. A) Structure chimique des guanines composant le G-Quadruplex ainsi que leur agencement anti/syn les unes par rapport aux autres ; B) Représentation schématique de la structure repliée du TBA ; C) Représentation de cette structure après modélisation moléculaire informatisée.

Des expériences de transfert de fluorescence par résonance énergétique ont été mises en œuvre pour étudier la transition entre les conformations G-Quadruplex et duplex de l'aptamère fixant la thrombine lorsque celui-ci est en présence de son brin complémentaire et d'ions potassium K^{+} ⁽⁴⁰⁾. La structure tertiaire G-Quadruplex du TBA induit une forte proximité entre les résidus guanines G1 et G15 alors que ces nucléotides sont situés aux extrémités de la structure primaire de cet aptamère (figure 14). C'est pourquoi les extrémités 5' et 3' vont être conjuguées avec respectivement la fluorescéine et la tétraméthylrhodamine.

Ces deux fluorophores forment un couple donneur/accepteur d'énergie lorsqu'ils sont suffisamment proches l'un de l'autre. Il en résulte un quenching de fluorescence : l'énergie d'excitation à 480 nm est absorbée par la fluorescéine puis transférée au dérivé tétraméthylrhodamine qui émet une fluorescence à 581 nm. Lorsque ces deux fluorophores s'éloignent l'un de l'autre, le quenching de fluorescence est annulé et la fluorescéine émet une émission de fluorescence à 517 nm⁽⁴¹⁾(schéma 12). Cette étude a montré que la structure du TBA en solution correspondait majoritairement à la conformation quadruplex et que celui-ci était favorisé et stabilisé par la présence d'ions potassium. En revanche, en présence du brin complémentaire, la structure principalement observée est celle du duplex formé par appariement des bases selon les règles de Watson et Crick.

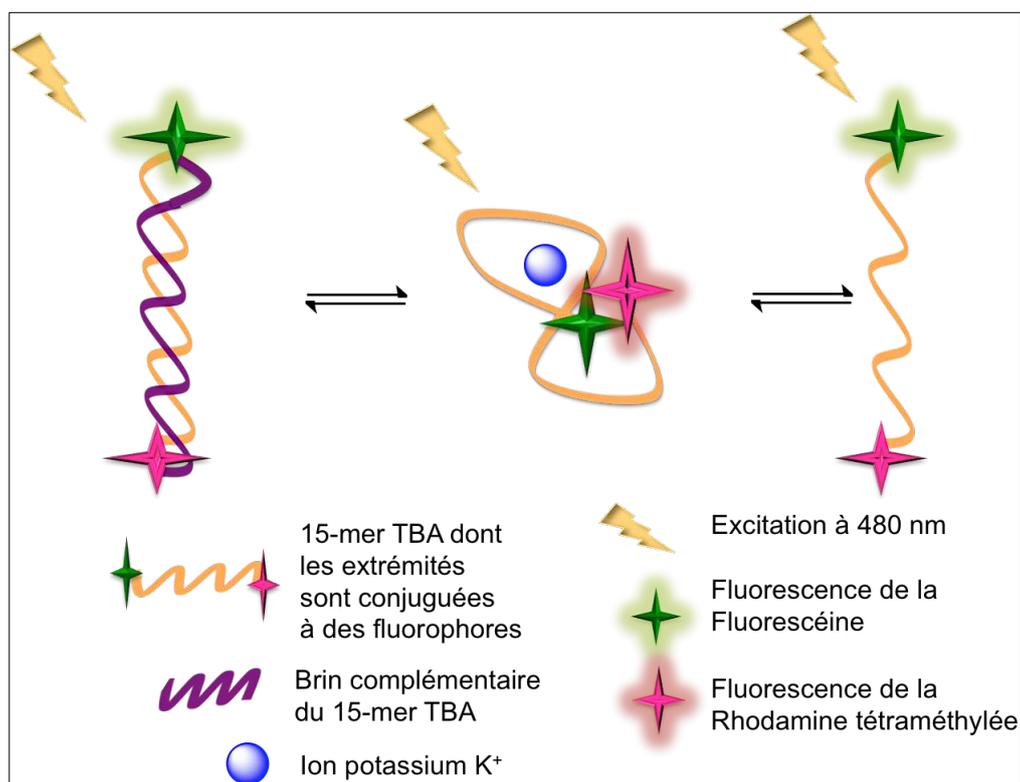


Schéma 12 : Représentation des équilibres entre les différentes structures tridimensionnelles du TBA. Les différentes longueurs d'onde d'émission de fluorescence permettent de discriminer les conformations tridimensionnelles du TBA. La fluorescence de la rhodamine est corrélée à la structure G-Quadruplex alors que la fluorescence de la fluorescéine traduit la présence du duplex entre le TBA et son brin complémentaire.

Ces études ont montré que l'aptamère fixant la thrombine pouvait acquérir une structure tridimensionnelle G-Quadruplex. De nouvelles investigations ont alors été mises en œuvre afin de déterminer les mécanismes moléculaires de reconnaissance et de fixation de la thrombine sur son aptamère.

Des études de spectrométrie d'impédance électrochimique à la surface d'électrodes modifiées par des aptamères TBA ont mis en évidence que l'ajout de la thrombine cible entraînait une variation de l'impédance. Ce phénomène est corrélé à la modification de la conformation du TBA en présence de thrombine (schéma 13). Le TBA adopte une structure tertiaire en G-Quadruplex qui diminue le flux de transfert

d'électrons à la surface de l'électrode. Ce motif occupe un volume stérique plus important que le TBA sous forme linéaire ce qui rend la surface de l'électrode moins accessible aux électrons issus de la réaction d'oxydoréduction du couple d'électrolytes ferrocyanide $K_4Fe(CN)_6$ /ferricyanide $K_3Fe(CN)_6$. La formation du complexe TBA/Thrombine sous forme de G-Quadruplex induit une résistance au transfert des électrons à l'interface électrode/électrolytes et cette résistance augmente proportionnellement à la quantité de thrombine ajoutée⁽⁴²⁾.

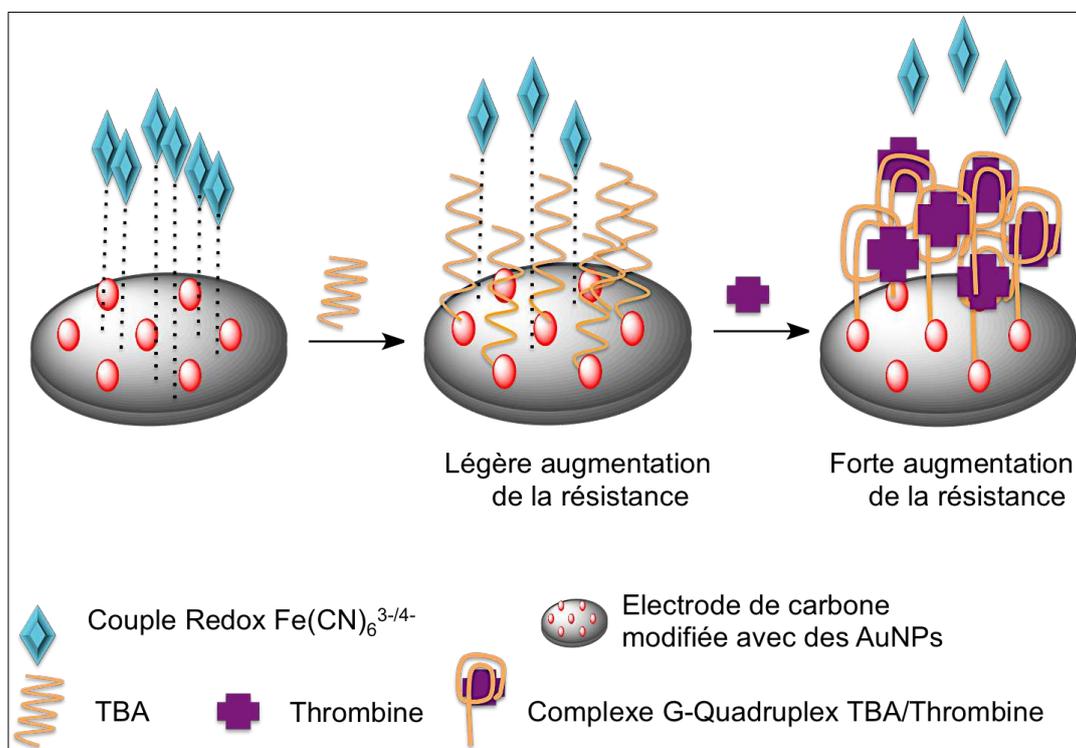


Schéma 13 : Corrélation entre la formation du G-Quadruplex consécutif à l'ajout de thrombine et l'augmentation de la résistance au transfert des électrons à l'interphase électrode/électrolytes.

Des études de docking et de dynamique moléculaire à partir de la structure cristallographique de la thrombine ont permis d'identifier les résidus nucléotidiques impliqués dans la liaison à la thrombine⁽³⁷⁾⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾. Ces acides nucléiques sont essentiellement localisés au niveau des boucles (T3T4, T7G8T9 et T12T13).

Les résidus lysine et arginine de la thrombine interagissent avec le squelette phosphate et les bases azotées des nucléotides présents au sein des différentes boucles via des liaisons hydrogènes. Les résidus arginine en position 75 et 77 interagissent via des liaisons hydrogènes avec les atomes d'oxygène des fonctions carbonyles en position 2 ou 4 des nucléotides T4 et T13.

Des liaisons hydrogènes s'établissent également entre les groupements phosphates des nucléotides T4 et T13 et certains acides aminés tels que l'arginine 67 ou l'asparagine 78.

Les bases pyrimidiques T3 et T12 s'insèrent dans une poche hydrophobe de la thrombine impliquant les tyrosines en position 76 et 117, le résidu histidine 71 ainsi que les isoleucines en position 24 et 79.

La chaîne latérale de la lysine 236 forme une paire ionique avec le groupement phosphate de la guanine G5. De même, les chaînes latérales de la lysine 240 et de l'arginine 93 forment des paires ioniques avec les phosphates des résidus T7 et T3 respectivement.

La conformation G-Quadruplex adoptée par le TBA en présence de thrombine permet de former des boucles monocaténares qui exposent les nucléotides impliqués dans la reconnaissance et la liaison avec les acides aminés constitutifs de la thrombine au niveau du site de fixation.

II-3-2 STRATÉGIES DE CONSTRUCTION D'UN SYSTEME APTASENSEUR

Le développement de la technologie SELEX a permis d'isoler des séquences oligonucléotidiques monocaténares capables de reconnaître et de se lier spécifiquement et avec une grande affinité à un grand nombre de cibles. Cette reconnaissance s'accompagne d'une modification profonde de la conformation tridimensionnelle de l'aptamère. A cette flexibilité structurale s'ajoute l'aptitude des aptamères à s'hybrider avec une séquence nucléotidique par appariement complémentaire des bases selon les règles de Watson et Crick. Ces propriétés vont être mises à profit pour l'élaboration de procédés de détection d'analytes présents au sein d'environnement biologiques complexes.

Ces systèmes de détection peuvent être classifiés en cinq catégories en fonction de leur mode de fonctionnement⁽⁴⁶⁾:

- Modification conformationnelle induite par la cible
- Technique sandwich
- Dissociation induite par la cible
- Remplacement compétitif
- Système Aptakiss/Aptaswitch

II-3-2-1 MODIFICATION CONFORMATIONNELLE INDUITE PAR LA CIBLE

Ce type de biosenseur utilise le changement conformationnel consécutif au repliement de l'aptamère lorsque celui-ci se lie à sa cible. Cet aptamère est conjugué à un système reporteur comme un fluorophore ou une molécule électrochimique active. Le repliement de l'aptamère va entraîner une modification de la localisation spatiale du reporteur qui va alors émettre un signal, on parle de système de détection « signal-on ». Cependant, cette modification peut également entraîner la suppression d'un signal préexistant, on parle alors d'un mode de détection « signal-off ».

Ce reporteur peut être une molécule électrochimique active comme le bleu de méthylène (MB) ou le ferrocène (Fc). Les structures chimiques de ces composés sont représentées sur la figure ci-dessous (figure 15).

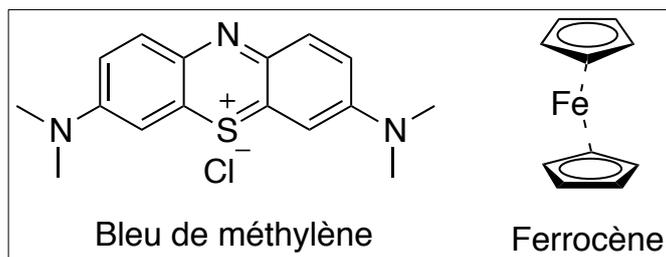


Figure 15 : Structure chimique des deux principaux reporteurs électrochimiques employés dans les tests de détection utilisant des aptamères.

L'aptamère est immobilisé à la surface d'une électrode par l'une de ses extrémités et l'autre est couplée au reporteur. En l'absence de cible, l'aptamère adopte une conformation tridimensionnelle simple brin dépliée et flexible. Lorsque la cible est présente dans le milieu, l'aptamère se replie et acquiert une conformation rigide afin de se lier à son ligand. La distance entre le reporteur et la surface de l'électrode est modifiée lors de la formation du complexe.

En fonction de la variation de la position de l'espèce électrochimique par rapport à l'électrode, un système « signal-off » ou « signal-on » pourra être obtenu. Si le changement de conformation induit un éloignement du reporteur, le transfert d'électrons sera interrompu, c'est un mode « signal-off », et inversement (schéma 14).

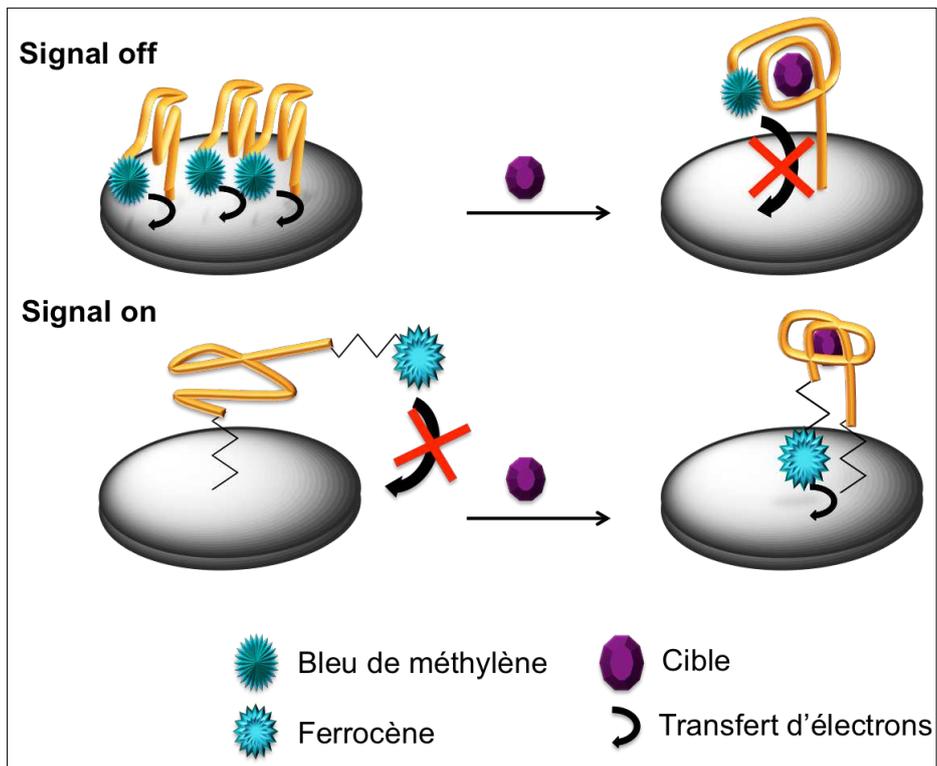


Schéma 14 : Représentation d'un système de détection utilisant le changement conformationnel d'un aptamère couplé à une espèce redox qui sert de transducteur. Le flux d'électrons mesurable à la surface de l'électrode est fonction de la proximité du reporteur.

Zhao et Lai⁽⁴⁷⁾ ont décrit un système permettant la détection et le dosage du facteur de croissance endothélial vasculaire (ou VEGF). Ils ont utilisé un aptamère de 28 nucléotides ciblant spécifiquement le VEGF. Cet aptamère a été modifié en 5' et en 3' par respectivement un espaceur hexane-thiol ainsi qu'un espaceur hexane couplé au bleu de méthylène. Le groupement thiol permet l'immobilisation de l'aptamère marqué au bleu de méthylène à la surface d'une électrode d'or. En l'absence de cible, l'aptamère présente une conformation partiellement dépliée qui éloigne l'extrémité 3' (bleu de méthylène) de la surface de l'électrode. Cependant, en présence de VEGF, l'aptamère adopte une nouvelle conformation spatiale en épingle à cheveux. Ce nouveau repliement rapproche l'extrémité 3' de la surface de l'électrode. La proximité entre l'espèce électrochimique active et l'électrode permet de générer un courant mesurable consécutif au transfert d'électrons, il s'agit donc d'un mode « signal on ». Cette technique, comparée à la méthode ELISA de référence, est beaucoup plus rapide (20 minutes contre 3 heures). De plus, elle affiche une limite de détection de l'ordre du picomolaire ce qui correspond aux concentrations physiologiques observées chez un individu sain.

A l'inverse, Chen⁽⁴⁸⁾ et son équipe ont immobilisé des aptamères avec des séquences nucléotidiques riches en guanine à la surface d'une électrode d'or via une liaison covalente Au-S. Cette électrode a été immergée dans une solution tampon contenant le couple redox $\text{Na}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$. Dans cet état basal, l'aptamère est sous forme déplié et un courant électrique est mesuré. En revanche, l'ajout d'ions potassium K^+ provoque un repliement des aptamères sous forme de G-Quadruplex. Ces nouvelles conformations entraînent un encombrement stérique ainsi qu'une

augmentation de la densité de charge ce qui perturbe le transfert des électrons, diminue le courant et augmente la résistance enregistrée à la surface de l'électrode, il s'agit donc d'un mode « signal off ». L'augmentation de la résistance est corrélée à la quantité d'ions K^+ introduite dans le système électrochimique. Cette construction permet de doser spécifiquement le potassium avec une limite de détection de 0,1 nM. De plus, aucune altération du signal n'est enregistrée en présence d'ions Ca^{2+} , Mg^{2+} , Li^+ , Al^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} ou encore Ni^{2+} .

Ce type de stratégie peut également être mise en œuvre avec des fluorophores comme système de traduction de l'interaction de l'aptamère avec sa cible. En effet, la capacité d'une molécule à émettre un rayonnement de fluorescence peut être modulée par son environnement immédiat. Ce phénomène est largement mis à profit dans les réactions fluoro-immunologiques. En effet, la fluorescence d'une molécule 1 peut être inhibée par la proximité avec un composé 2 si les domaines d'absorbance et d'émission des deux entités se chevauchent. Dans le cas des systèmes de reconnaissance utilisant des aptamères, cette proximité va être dépendante de la structure tertiaire tridimensionnelle de l'aptamère. L'introduction de la cible induit une modification de la conformation de l'aptamère. Il en résulte une variation de la distance entre le fluorophore et l'inhibiteur. L'apparition ou la disparition de la fluorescence reflète la liaison de l'aptamère sur sa cible (schéma 15).

Ce quenching de fluorescence peut être provoqué par la proximité d'un couple de fluorophores donneur/accepteur (schéma 15 A et B-1) comme la fluorescéine et le DABCYL. De même, certains dérivés carboxyliques de la rhodamine voient leur fluorescence inhibée lors qu'ils sont spatialement proches de résidus guanines⁽⁴⁹⁾ (schéma 15 B-2).

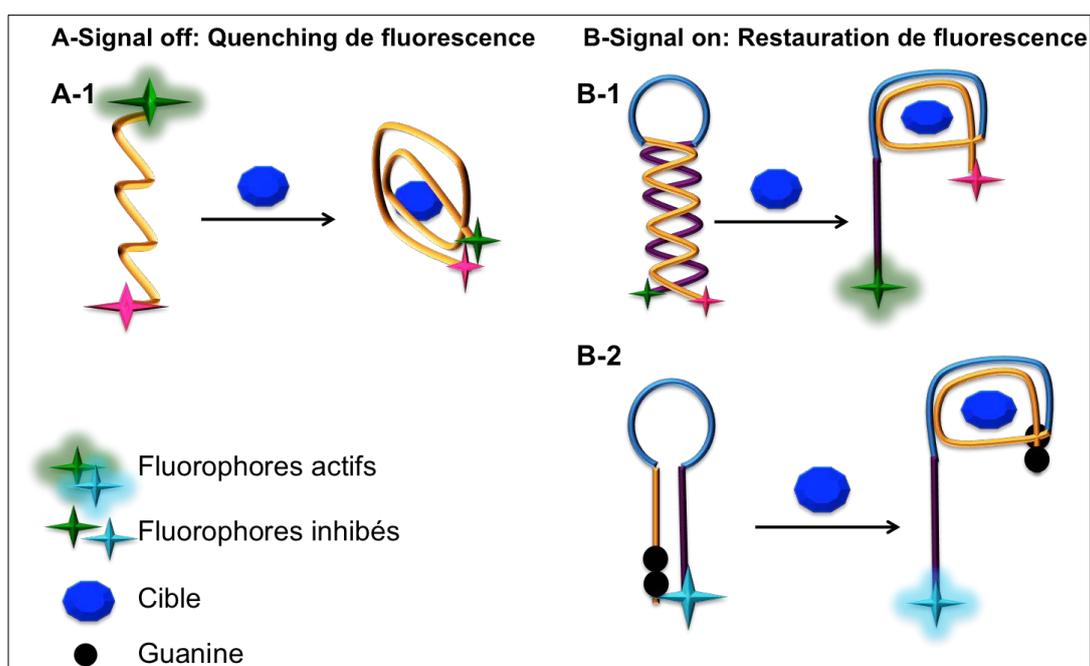


Schéma 15 : Représentation de différentes stratégies de détection d'une cible spécifique utilisant le mécanisme de quenching/restauration de fluorescence consécutif au repliement tridimensionnel de l'aptamère.

Le quenching de fluorescence induit par la proximité de bases guanines a été mis à profit par Xiao⁽⁵⁰⁾ et ses collaborateurs afin d'élaborer un système permettant la détection d'une protéine prion cellulaire (PrPC) avec une limite de détection de 0,3 mg/L. Le processus SELEX a permis d'isoler un aptamère capable de reconnaître spécifiquement cette protéine. Cette séquence nucléotidique a été modifiée pour introduire un espaceur avec trois résidus guanines consécutifs à l'extrémité 3'. De plus, l'extrémité 5' s'est également vue adjoindre un espaceur présentant une complémentarité avec l'extrémité 3' et couplé à un fluorophore dérivé de la rhodamine. Ces bras espaceurs complémentaires présents à chaque extrémité permettent à l'aptamère d'adopter une conformation en épingle à cheveux en l'absence de la cible. Avec cette structure tertiaire, les extrémités 3' et 5' sont proches l'une de l'autre ce qui provoque la neutralisation de fluorescence. En revanche, en présence de la cible PrPC, cette structure boucle est détruite, les extrémités 5' et 3' s'éloignent l'une de l'autre et la fluorescence est restaurée.

II-3-2-2 DÉTECTION PAR METHODE SANDWICH

Cette stratégie de reconnaissance moléculaire s'inspire directement de la technique immunologique ELISA. Elle fait appel à trois composants : un élément de capture immobilisé sur un support solide qui va reconnaître et fixer le deuxième élément, c'est à dire l'analyte d'intérêt. Enfin, un élément de reconnaissance et de transduction qui va se fixer sur l'analyte et générer un signal. Ce système de détection est très modulable de par la nature des éléments de reconnaissance employés. En effet, ces éléments de reconnaissance peuvent être deux aptamères ou un aptamère et un anticorps. De même, le transducteur du signal couplé au second motif de reconnaissance peut être une enzyme, un fluorophore ou une espèce électrochimique active (schéma 16).

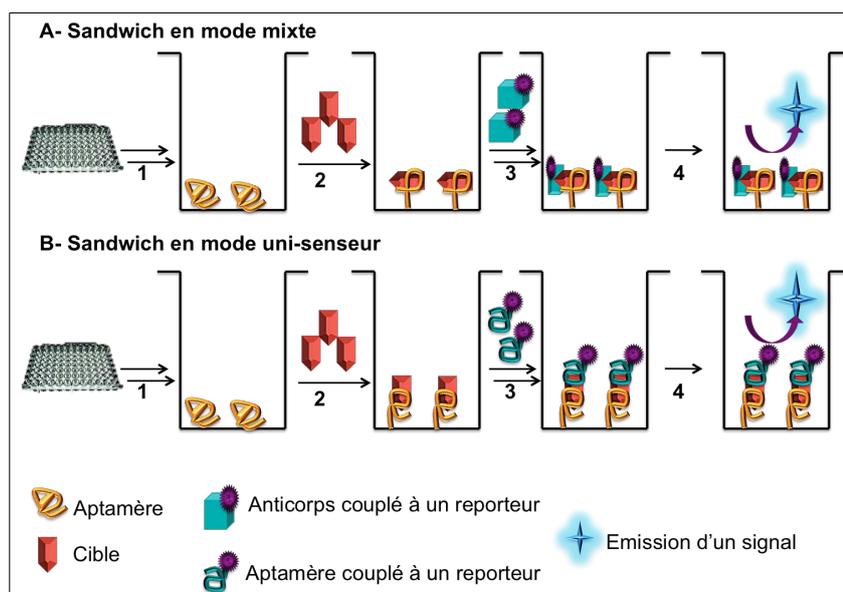


Schéma 16 : Représentation de deux systèmes de détection d'un analyte utilisant la technique sandwich. L'aptamère de capture (en jaune) est immobilisé sur un support et fixe la cible (en orange). Un second élément de reconnaissance (en bleu) vient se lier au complexe. Ce deuxième élément peut être : A) un anticorps ou B) un aptamère. Il est couplé à un reporteur qui va générer un signal mesurable.

Huang⁽⁵¹⁾ a proposé un système sandwich pour la détection de la thrombine en mettant à profit l'existence de deux aptamères capables de reconnaître spécifiquement cette protéine. La liaison de ces aptamères sur la thrombine fait intervenir des sites protéiques distincts ce qui permet une double reconnaissance simultanée sans chevauchement des aptamères. L'un des aptamères a été immobilisé sur un support solide et l'autre a été couplé à un complexe d'euporium. La thrombine a été incubée en présence de ces deux entités ce qui a abouti à la formation d'un super-complexe Aptamère/Thrombine/Aptamère. Le complexe d'euporium sert de transducteur par phénomène de fluorescence. La sélectivité de ce système a été investiguée et il a été démontré que la présence de fortes concentrations (2000 fois plus) d'immunoglobuline G et d'albumine bovine ne perturbaient pas la détection de la thrombine. La limite de détection a également été déterminée et est de l'ordre du nanomolaire.

II-3-2-3 DÉTECTION PAR DISSOCIATION DE DUPLEX

Ces techniques mettent en application la capacité des aptamères à former des duplex avec une séquence complémentaire par appariement de bases selon les règles de Watson et Crick⁽²¹⁾. Cependant la technologie SELEX permet d'obtenir des aptamères dont l'affinité pour leur cible est plus importante que pour la séquence complémentaire. En conséquence, l'introduction de la cible dans le milieu va provoquer la destruction de la structure duplex. Cette dissociation entraîne une modification du signal mesurable.

Kong⁽⁵²⁾ et ses collaborateurs ont proposé un système de détection de l'adénosine triphosphate (ATP) et de la thrombine par extinction de fluorescence consécutive à la dissociation d'un duplex aptamère/bras complémentaire. Pour chacune de ces cibles, deux brins d'ADN ont été synthétisés : l'aptamère spécifique de la thrombine ou de l'ATP ainsi que leurs séquences complémentaires respectives. Chaque aptamère a été hybridé avec son bras complémentaire afin de former un duplex stable. Ces duplex ont été incubés en présence de SYBR Green I qui est une sonde fluorescente présentant une forte spécificité pour l'ADN double brin. L'intercalation de cette molécule SYBR Green I au sein de la double hélice d'ADN provoque une émission de fluorescence à 520 nm après excitation à 495 nm. En présence de leurs cibles respectives, les duplex sont été dissociés et la fluorescence a été inhibée (schéma 17A).

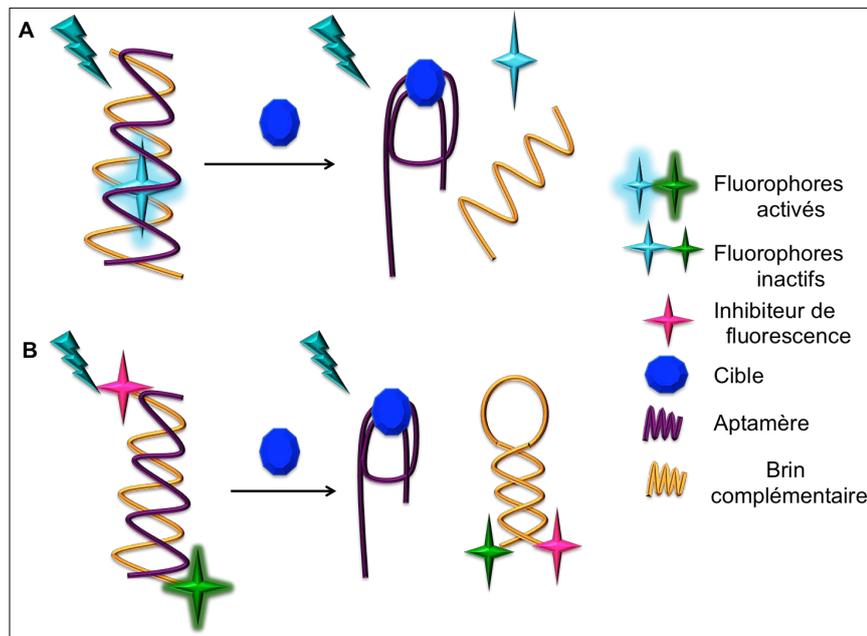


Schéma 17 : Représentation de deux systèmes « signal-off » de détection utilisant le principe de dissociation du duplex aptamère/brin complémentaire après addition de la cible. Cette destruction de la structure hélicoïdale provoque un quenching de fluorescence.

Li et Ho⁽⁵³⁾ ont élaboré un test de détection de l'ATP en mode « signal-off » qui repose sur un quenching de fluorescence induit par le repliement du bras complémentaire après dissociation de la structure duplex consécutive à l'introduction de la cible. La séquence complémentaire de l'aptamère fixant l'ATP est fonctionnalisée en 3' par un fluorophore dérivé de la fluorescéine et en 5' par un inhibiteur de fluorescence. Cet inhibiteur est qualifié de « black quencher » car il a la propriété d'absorber l'émission de fluorescence de la fluorescéine et de dissiper cette énergie sous forme de chaleur et non sous forme d'un rayonnement de fluorescence. Lors de la libération de la séquence complémentaire, celle-ci se replie sur elle-même par appariement de ses extrémités 3' et 5' qui sont complémentaires et acquiert une conformation en épingle à cheveux. Cette nouvelle structure tridimensionnelle rapproche le fluorophore de son inhibiteur. Il en résulte une extinction de fluorescence qui est corrélée à la quantité de cible ajoutée dans le milieu (schéma 17B).

Cette stratégie de dissociation de duplex a également été mise en application par Li⁽⁵⁴⁾ et son équipe pour la détection de l'ATP en utilisant le ferrocène comme système de transduction du signal. La séquence complémentaire de l'aptamère liant l'ATP sert de système d'ancrage à la surface d'une électrode et permet une immobilisation indirecte de l'aptamère après formation du duplex par appariement complémentaire des bases. L'introduction de l'ATP va détruire la structure hélicoïdale et libérer le complexe Aptamère/ATP. Une troisième séquence nucléotidique présentant une complémentarité de base avec le brin immobilisé est alors ajoutée au milieu. Cette séquence est couplée au ferrocène et vient s'hybrider sur le brin immobilisé à la surface de l'électrode. Ce nouveau duplex induit une proximité entre le ferrocène et la surface de l'électrode et génère un signal électrique mesurable par voltamétrie cyclique (schéma 18).

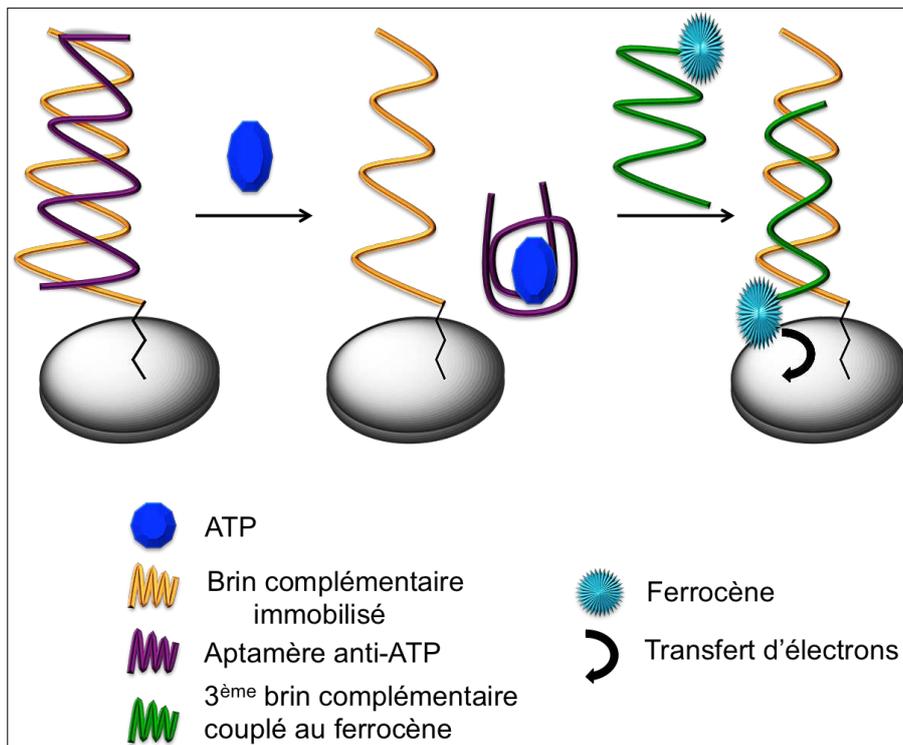


Schéma 18 : Illustration schématisée du système de détection pour la détection de l'ATP par voltamétrie cyclique en utilisant le ferrocène comme agent de transduction du signal.

II-3-2-4 DÉTECTION PAR FIXATION COMPÉTITIVE

Ce système met en œuvre la compétition entre un analyte modifié et son homologue natif pour un même et unique site de fixation sur l'aptamère. La quantité de l'analyte natif présent en concentration inconnue dans l'échantillon étudié est corrélée à la dissociation du complexe analyte modifié/aptamère⁽⁵⁵⁾. Cet analyte peut être modifié par un fluorophore, une enzyme ou une espèce électrochimique active. La mesure de la variation du signal entre l'état initial et l'état final permet de déterminer la quantité d'analyte présent dans l'échantillon d'étude.

Une équipe hispano-française⁽⁵⁶⁾ a utilisé ce concept pour la détection de l'ochratoxine A dans le vin. Deux stratégies ont été proposées :

- Une méthode de compétition directe : l'aptamère anti-ochratoxine A, dont l'une des extrémités est couplée à la biotine, est immobilisé sur un support fonctionnalisé par de l'avidine via l'interaction forte biotine/avidine. L'ochratoxine A associée à la peroxydase du raifort (horseradish peroxydase) est additionnée au milieu et se lie à l'aptamère. L'échantillon à analyser contenant de l'ochratoxine A native est alors ajouté. Il y a compétition entre les deux ochratoxines A pour la fixation sur l'aptamère. Après une étape de lavage pour éliminer la fraction non liée d'ochratoxine A, le substrat de l'enzyme est ajouté. Il s'agit d'un dérivé benzidine qui est oxydé sous l'action de la peroxydase. L'apparition de ce dérivé oxydé est mesurée par absorbance à 620 nm (schéma 19A).

- Une méthode de compétition indirecte : l'ochratoxine A couplée à l'albumine sérique bovine (BSA) s'adsorbe à la surface d'un support solide. L'aptamère anti-ochratoxine couplé à la peroxydase du raifort est alors ajouté et se lie sur l'ochratoxine modifiée. L'échantillon à analyser est additionné ce qui provoque le déplacement de l'aptamère depuis l'ochratoxine A immobilisée vers l'ochratoxine A native en solution. Une étape de lavage permet d'éliminer les complexes en solution, le substrat de l'enzyme est ajouté. L'intensité du signal est inversement proportionnelle à la quantité d'ochratoxine A dans l'échantillon (schéma 19B).

Ces méthodes ont permis la détection de l'ochratoxine A présente dans le vin avec une limite de détection de 1 ng/mL pour la procédure directe et de 10 ng/mL pour la procédure indirecte. Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que celles obtenues avec la technique ELISA classique.

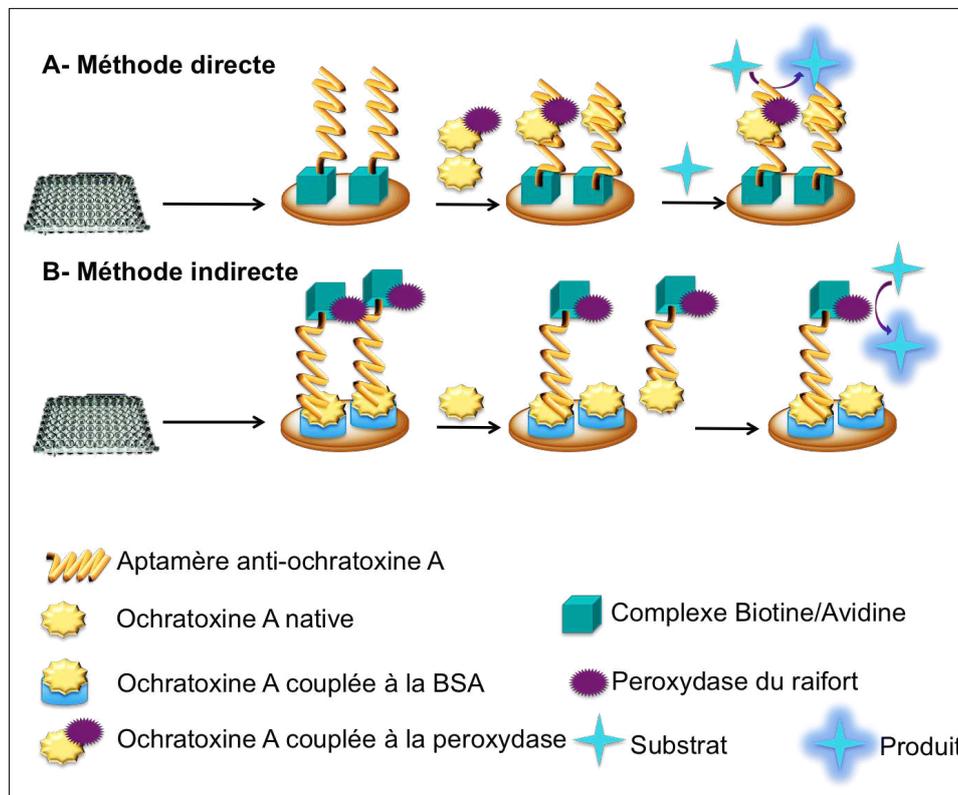


Schéma 19 : Détection de l'ochratoxine A dans le vin par méthode de fixation compétitive A) directe et B) indirecte.

II-3-2-5 APTAKISS/APTASWITCH

Cette stratégie de détection dérive de la méthode de modification conformationnelle de l'aptamère induite par sa liaison avec la cible d'intérêt. Un premier aptamère appelé « aptaswitch » est isolé après processus SELEX pour se fixer avec une haute affinité vis à vis d'un ligand spécifique. A l'état natif, l'aptaswitch exhibe une conformation dépliée mais la liaison de l'aptaswitch à sa cible induit une modification conformationnelle. L'aptaswitch impliqué dans le complexe avec le ligand arbore une structure tertiaire repliée en épingle à cheveux. Cette nouvelle conformation spatiale laisse apparaître une demi boucle en position apicale. La séquence nucléotidique constituant l'arc de la demi-boucle est alors reconnue par un deuxième aptamère, appelé « aptakiss » qui vient s'y hybrider par appariement complémentaire des bases. Ce complexe « aptaswitch/aptakiss » ne peut se former que si l'aptamère s'est préalablement fixé sur son ligand. Le marquage de l'aptakiss par un fluorophore va permettre la génération d'un signal mesurable (schéma 20) ^(57a).

Ce concept a été démontré en remplaçant la partie apicale des aptamères anti-GTP (guanosine triphosphate) et anti-adénosine avec la séquence d'une boucle impliquée dans la formation d'un complexe « switch/kiss » ARN/ARN^(57b).

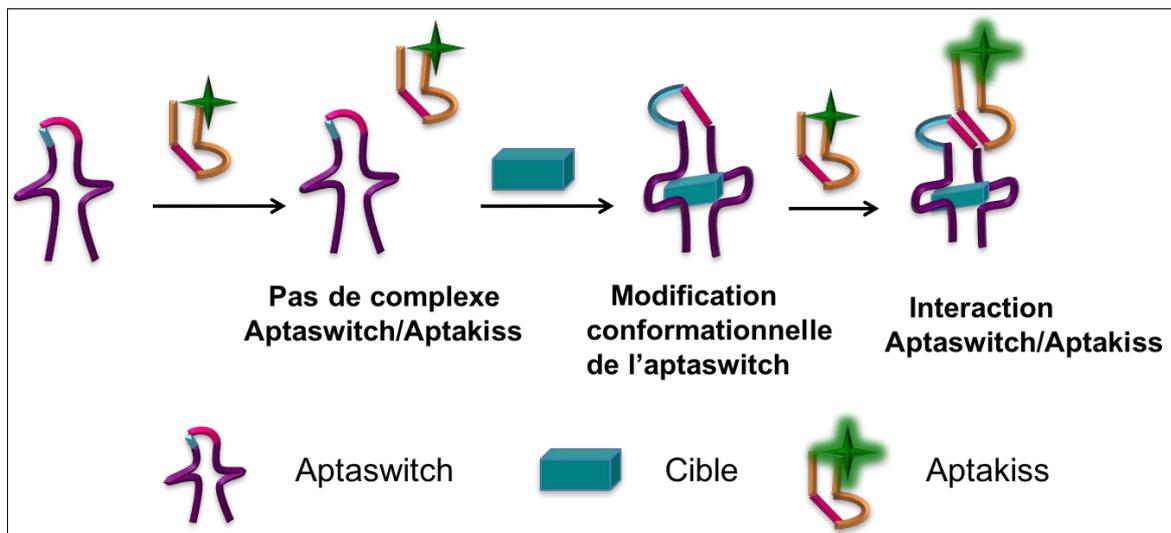


Schéma 20 : Représentation simplifiée des étapes de formation d'un complexe Aptaswitch/Aptakiss. La liaison aptaswitch/cible entraîne un repliement de ce dernier qui expose une boucle apicale incomplète. La séquence nucléotidique de cette boucle se retrouve exposée et peut s'hybrider avec la séquence complémentaire portée par un aptakiss.

Cette méthode Aptaswitch/Aptakiss constitue une excellente alternative à la méthode sandwich lorsque la cible d'intérêt est de trop petite taille pour posséder deux sites de reconnaissance pour des aptamères différents.

Cette stratégie de reconnaissance boucle/boucle a été notamment développée par les équipes de Jean-Jacques Toulmé et Eric Peyrin afin d'élaborer des systèmes de détection de petites molécules telles que l'adénosine ^(57c) ou la théophylline ^(57d).

II-4 CONCLUSION : COMPARAISON ANTICORPS/ APTAMÈRES

L'utilisation des anticorps et des aptamères comme outils de détection repose sur le principe de reconnaissance moléculaire entre ces composés et une cible qui leur est spécifique. L'interaction entre le ligand et sa cible aboutit à la formation d'un complexe dont la stabilité est assurée par des liaisons faibles : hydrogènes, Van der Waals, hydrophobes, ioniques, électrostatiques.

De plus, l'application des anticorps et des aptamères à la détection de bio-entités d'intérêt nécessite la présence d'un système reporteur permettant de transcrire l'interaction ligand/cible en un signal optique ou électrochimique facilement mesurable.

Cependant, de nombreuses différences existent entre les aptamères et les anticorps. Ces différences résultent essentiellement du mode de production des anticorps et des aptamères.

En effet, la production des Ac monoclonaux nécessite une étape d'inoculation d'un antigène à un animal afin de déclencher une réponse immunitaire générant les Ac au sein des plasmocytes. Ces plasmocytes sont ensuite isolés et fusionnés avec des cellules immortelles sous forme d'hybridomes. Cette étape in-vivo peut être particulièrement problématique pour des substances toxiques ou peu immunogènes. De même, la croissance cellulaire de certains hybridomes peut se révéler délicate.

En revanche, la production des aptamères repose sur le processus SELEX et est réalisée in-vitro à partir d'une bibliothèque constituée de courtes séquences artificielles d'ADN ou d'ARN générées de manière aléatoire⁽⁵⁸⁾. Cette méthode permet d'obtenir des aptamères spécifiques vis à vis de cibles de nature très variée : protéines, ions, toxines, haptènes, molécules de faible masse moléculaire, enzymes et même des cellules entières⁽⁵⁹⁾. La réalisation in-vitro de ce processus permet également de modifier les conditions de sélection de l'aptamère qui peut alors être utilisé dans des conditions non physiologiques de pH et de température ou présenter des paramètres cinétiques modulables pour l'application au diagnostic in-vitro.

L'interaction Ag/Ac repose sur la reconnaissance moléculaire de l'épitope présent sur l'Ag par la région variable de l'Ac ou paratope. Ce phénomène peut induire des réactions croisées avec des Ag exhibant des épitopes présentant une forte homologie structurale avec l'épitope cible et générer des résultats faux-positifs. La survenue de faux-positifs peut également être provoquée par l'existence, dans l'échantillon biologique à tester, d'Ac hétérophiles capables de reconnaître des Ac d'origine non humaine.

Les aptamères, quant à eux, démontrent à la fois une très haute affinité avec une constante de dissociation de l'ordre du nanomolaire ainsi qu'une très bonne spécificité pour leur cible. Ces propriétés résultent du processus SELEX qui permet de sélectionner

l'aptamère optimal à partir de bibliothèques enrichies en ligands présentant une spécificité et une affinité préalable pour la cible.

Enfin, de par leur nature protéique, les anticorps montrent une forte sensibilité à la chaleur ainsi qu'aux variations de pH qui provoquent une dénaturation et diminuent leur durée de conservation et d'utilisation.

En comparaison, les aptamères présentent l'avantage d'être obtenus par synthèse chimique ce qui permet d'avoir une très grande précision ainsi qu'une excellente reproductibilité. De plus, la purification de ces composés implique des étapes de dénaturation qui sont réversibles et qui n'altèrent pas les propriétés de l'aptamère. Cette étape de synthèse chimique permet également de conjuguer facilement et de façon régiosélective l'aptamère avec le système reporteur via la fonctionnalisation adéquate du brin d'ADN ou d'ARN au cours de sa synthèse.

En conclusion, les aptamères démontrent une affinité égale voire supérieure à celle des anticorps ainsi qu'une excellente spécificité pour leur cible. De plus, la capacité des aptamères à reconnaître un ligand n'est pas dépendante du pouvoir immunogène de ce dernier. A ces caractéristiques remarquables s'ajoute la grande flexibilité des stratégies de systèmes de détection, le faible coût de production de ces motifs de reconnaissance, leur facilité de fonctionnalisation par des groupements pour le couplage avec des systèmes reporteurs permettant la transduction du signal.

Ces atouts font de ces aptamères des motifs de reconnaissance moléculaire de choix pour l'application à la détection de biomarqueurs. De plus, l'association de ces aptamères à des nanomatériaux tels que les nanoparticules d'or (AuNPs) font de ces constructions nanométriques des outils à haut potentiel pour le dépistage des pathologies.

Chapitre III : LES NANOPARTICULES D'OR AU SERVICE DU BIOSENSING

III-1 GÉNÉRALITÉS

Que ce soit pour des considérations économiques, esthétiques, philosophiques, alchimiques ou thérapeutiques, la fascination des hommes pour l'or comme symbole de puissance et de perfection remonte à l'antiquité. En effet, des traces d'exploitation minière ont été découvertes en Bulgarie et datent de plus de 5000 ans avant Jésus-Christ. Cependant, cette utilisation se limitait à la manipulation d'or massif et n'avait que pour principales applications la joaillerie et l'économie⁽⁶⁰⁾.

L'emploi d'or en solution ou « or soluble » n'apparaît que vers 500-400 ans avant Jésus-Christ en Egypte et en Chine où il était utilisé en thérapeutique puis en Grèce où Paracelse l'utilisa notamment pour le diagnostic et le traitement de la syphilis et de la lèpre⁽⁶⁰⁾.

Dès le Moyen-Age, la mise en évidence des propriétés optiques de l'or soluble trouve des applications dans la fabrication de verres colorés et de vitraux. L'un des exemples le plus fameux illustrant ces propriétés optiques est la coupe de Lycurgue⁽⁶¹⁾. Cet objet présente une coloration différente en fonction de son exposition à la lumière incidente. Elle prend une couleur verte et un aspect opaque lorsqu'elle est éclairée de l'extérieur (lumière réfléchie, image de gauche, figure 16) mais elle devient rouge et translucide lorsqu'elle est éclairée de l'intérieur (lumière transmise, image de droite).



Figure 16: Photographie de la coupe de Lycurgue exposée au British Museum⁽⁶¹⁾. A gauche, la coupe est éclairée de l'extérieur et apparaît verte alors qu'à droite elle est éclairée de l'intérieur et exhibe une coloration rouge.

C'est au XVII^{ème} siècle que Johann Kunckel émet l'hypothèse de l'existence d'un état d'or à un degré de subdivision invisible à l'œil nu dans les solutions d'or buvables. Mais ce n'est qu'en 1818 que Jeremias Benjamin Richters propose une corrélation entre la couleur observée et cet état de subdivision : la coloration rose-rouge traduit un état extrêmement fractionné alors que la coloration jaune découle d'un état d'agrégation⁽⁶⁰⁾.

Ces hypothèses sont confirmées par les travaux de Michael Faraday⁽⁶²⁾ en 1857. Il procède à la réduction de sels d'or aurique $AuCl_4^-$ par du phosphore en utilisant le sulfure de carbone comme solvant ce qui aboutit à l'obtention d'une solution rouge-

rubis. Cette solution est alors séchée puis étalée en film afin d'étudier l'influence de la compression mécanique sur la coloration du film. Il observe des modifications réversibles de la coloration, de violet à vert lorsque la force de compression augmente. Néanmoins, il faudra attendre 1861 pour que soit introduit par Graham le terme de suspension colloïdale d'or⁽⁶⁰⁾.

Le XXème siècle voit se développer un immense intérêt pour les suspensions d'or colloïdal corrélé à l'émergence des nanotechnologies et leurs applications potentielles dans des domaines aussi variés que l'optique, la catalyse, la biologie ou la médecine. Ces applications découlent des propriétés optiques, électroniques et magnétiques uniques des nanomatériaux.

III-2 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'OR

Deux approches peuvent être mises en œuvre pour la synthèse de nanoparticules d'or (AuNPs) :

- L'approche « top-down » dans laquelle de l'or à l'état massif est subdivisé afin d'obtenir des AuNPs.
- L'approche « bottom-up » qui implique un processus de réduction biologique, chimique ou physique de précurseurs (sels métalliques) afin de former les AuNPs.

III-2-1 STRATÉGIE « BOTTOM-UP »

Les techniques de préparation des AuNPs mettant en œuvre une stratégie « bottom up » sont largement privilégiées par rapport à la procédure « top down » qui sera évoquée ultérieurement. Ces techniques « bottom up » permettent un meilleur contrôle de la taille et de la forme des AuNPs obtenues. Cette stratégie se ramifie en deux voies de synthèse : la synthèse directe et la synthèse par croissance de germes.

III-2-1-1 SYNTHÈSE « BOTTOM-UP » DIRECTE

III-2-1-1-1 SYNTHÈSE DES AuNPs PAR LA MÉTHODE DE TURKEVICH

Turkevich peut être considéré comme le pionnier de la synthèse directe des AuNPs. En effet, l'étude de la synthèse des AuNPs par la réduction de sels d'or aurique Au^{3+} ($HAuCl_4$) par le citrate trisodique en milieu aqueux à reflux a permis d'obtenir une suspension colloïdale stable de AuNPs de forme sphérique et d'un diamètre moyen de 20 nm⁽⁶³⁾.

Les AuNPs synthétisées par la méthode de Turkevich sont considérées comme le standard de référence : 95 mL de solution aqueuse d'acide chloraurique $HAuCl_4$ à 5% massique sont chauffés à reflux puis 5 mL de solution aqueuse de citrate de sodium à 1% sont ajoutés sous agitation mécanique vigoureuse. Après quelques minutes une coloration gris-bleue apparaît au sein du mélange réactionnel. Cette couleur s'intensifie de plus en plus puis un virage de coloration survient. A la fin de la réaction, la

suspension de AuNPs exhibe une couleur rouge-vin très intense. Les AuNPs obtenues sont sphériques, avec un diamètre moyen de 20 nm et une déviation standard de 12,5%.

III-2-1-1-2 SYNTHÈSE DE TURKEVICH : CONSIDÉRATIONS MÉCANISTIQUES

La taille et la forme des suspensions colloïdales d'or sont des caractéristiques étroitement corrélées aux propriétés optiques et électroniques des nanoparticules d'or. C'est pourquoi, depuis la publication de la synthèse de Turkevich, diverses études ont été réalisées pour déterminer le mécanisme réactionnel.

Le travail le plus exhaustif a été réalisé par Turkevich lui-même en 1951. Il propose un processus de nucléation suivi d'une étape de croissance plus lente obéissant au modèle de LaMer⁽⁶⁴⁾. Ces conclusions ont été corroborées par les travaux de Frens⁽⁶⁵⁾⁽⁶⁶⁾ et Takiyama⁽⁶⁷⁾ qui montrent que l'uniformité de taille des nanoparticules obtenues résulte d'une courte période de nucléation suivie d'une étape de croissance. En effet, plus l'étape de nucléation est courte, plus les nucléi sont formés dans un intervalle de temps restreint, ce qui permet de réduire le décalage entre la fin de la nucléation et le début de la croissance au sein de la population de AuNPs.

La nucléation peut être définie comme le processus par lequel une particule discrète et différenciée se forme au sein d'une phase pré-existante. Dans le cas de la synthèse des AuNPs, cette particule discrète ou nucléus correspond au plus petit assemblage polyatomique individualisé et stable qui se forme au sein d'une solution homogène.

Le citrate de sodium permet la réduction des sels d'or aurique Au^{3+} en or métallique Au^0 mais c'est le produit issu de l'oxydation du citrate, l'acétone dicarboxylate, qui permet l'initiation du processus de nucléation en agissant comme agent de stabilisation.

C'est pourquoi la nucléation ne survient qu'après une période de latence, appelée période d'induction et qui correspond à l'oxydation du citrate en acétone dicarboxylate. Après cette période d'induction, une augmentation rapide du nombre de nucléi est observée.

De plus, l'allure générale de la courbe suggère un mécanisme auto-catalytique. En effet, lorsque le nombre de nucléi formé est suffisant, l'acétone dicarboxylate peut alors s'adsorber à la surface et être ensuite utilisée comme agent de croissance (figure 17).

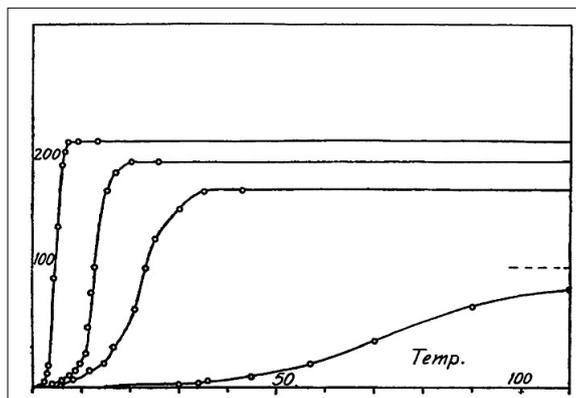


Figure 17 : Courbes de nucléation obtenues lors de la synthèse des nanoparticules d'or en présence de citrate trisodique à différentes températures : 50°C, 39°C, 30°C et 15,4°C. l'axe des ordonnées représente le nombre de particules par unité de volume déterminé par néphélémétrie et l'axe des abscisses représente le temps en minute. Figure issue de la référence (63).

La phase de croissance correspond à l'addition successive de matériel à la surface de la particule : c'est à dire un dépôt d'or en couche concentriques à la surface du nucléus. L'absence de croissance en l'absence de nuclei dans le milieu suggère un mécanisme d'auto-réduction des sels d'or à la surface du nucléus. L'étude précise du processus de croissance a été réalisée grâce à des réducteurs incapables d'initier le processus de nucléation comme le peroxyde d'hydrogène ou l'hydrochloride d'hydroxylamine. Les AuNPs voient ainsi leur taille augmenter mais leur nombre reste fixe⁽⁶³⁾.

Si l'étape de nucléation est rapide, c'est cette étape de croissance qui va majoritairement déterminer la taille des AuNPs. En effet, lors de cette phase, une augmentation du potentiel de surface est observée. Cette augmentation de potentiel est consécutive au recouvrement de la nanoparticule par l'acétone dicarboxylate. Par conséquent, une compétition émerge entre les sels d'or aurique Au^{3+} et l'agent de stabilisation qui viennent tous les deux s'adsorber à la surface de la nanoparticule. En fonction du rapport Au/Citrate utilisé, l'équilibre sera déplacé en faveur des ions Au^{3+} ou en faveur du citrate. Si l'adsorption du citrate prédomine, le processus de croissance aboutira à des AuNPs de petite taille mais si le phénomène inverse est observé, le diamètre des AuNPs sera beaucoup plus important.

De plus, en fonction de la nature du stabilisateur, un tropisme pour certains plans cristallographiques de la nanoparticule peut être observé ce qui aboutit à la formation d'une AuNP présentant une forme anisotrope. Cette propriété est notamment exploitée dans la synthèse des nanobâtonnets et sera développée ultérieurement dans ce manuscrit.

Grâce aux propriétés optiques des AuNPs, ces différentes étapes peuvent être objectivées à l'œil nu en observant le changement de coloration du milieu réactionnel. L'addition du réducteur citrate entraîne une coloration noire-bleutée du milieu réactionnel, il s'ensuit un virage violacée puis la solution devient rouge. Cette couleur rouge s'intensifie de plus en plus au cours du temps. Ces constatations visuelles sont

corrélées aux mesures d'absorbance effectuées lors de la réaction avec un maximum à 590 nm (aspect violacé de la solution) au début de la réaction puis une stabilisation vers 525 nm (couleur rouge)(figure 18A).

Cela signifie que la taille des nanoparticules varie au cours de la réaction. Des AuNPs de grande taille sont observées en début de réaction ($\lambda_{\text{max}} = 590$ nm, aspect bleu-violacé de la solution), puis une diminution lente est observée, celle-ci s'accélère brusquement et enfin se stabilise à une valeur moyenne de 20 nm ($\lambda_{\text{max}} = 525$ nm, aspect rouge-rubis de la solution)(figure 18B).

La détermination de la perte d'or aurique Au^{3+} par titration iodométrique vérifie l'hypothèse cinétique proposée ci-dessus avec une période d'induction lente suivie d'une accélération importante du taux de disparition de l'or (figure 18C).

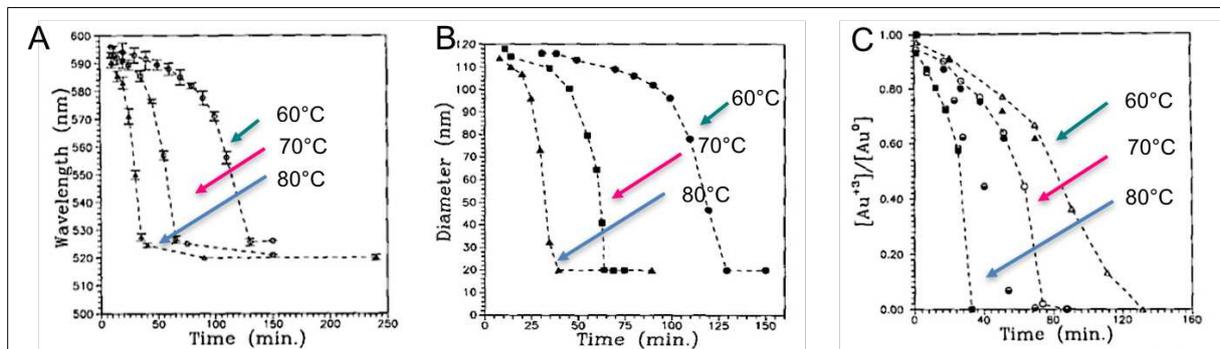


Figure 18 : Variation de A) l'absorbance maximale B) du diamètre des nanoparticules C) de la concentration en ions Au^{3+} au cours de la réaction de synthèse des AuNPs par la méthode de réduction au citrate à 80, 70 et 60°C.

Le mécanisme de nucléation proposé par Turkevich consiste en la formation d'un complexe copolymérique Au^{3+} /Réducteur. En effet, le citrate trisodique ou son dérivé oxydé possède des groupements carboxylates qui peuvent former des liaisons ioniques avec les cations Au^{3+} et se comporter comme des ligands chélateurs multidentés.

Ce cluster augmente en taille jusqu'à atteindre une taille critique pour laquelle survient une réduction rapide de Au^{3+} en Au^0 et la fragmentation de ce complexe en nucléi⁽⁶³⁾. Cette hypothèse est corroborée par les travaux de Chow et Zukoski⁽⁶⁸⁾ publiés en 1994 comme le montre les images de microscopie électronique à transmission (MET) ci-dessous (figure 19) ainsi que par les travaux plus récents de Polte et Kraehnert⁽⁶⁹⁾ en 2010.

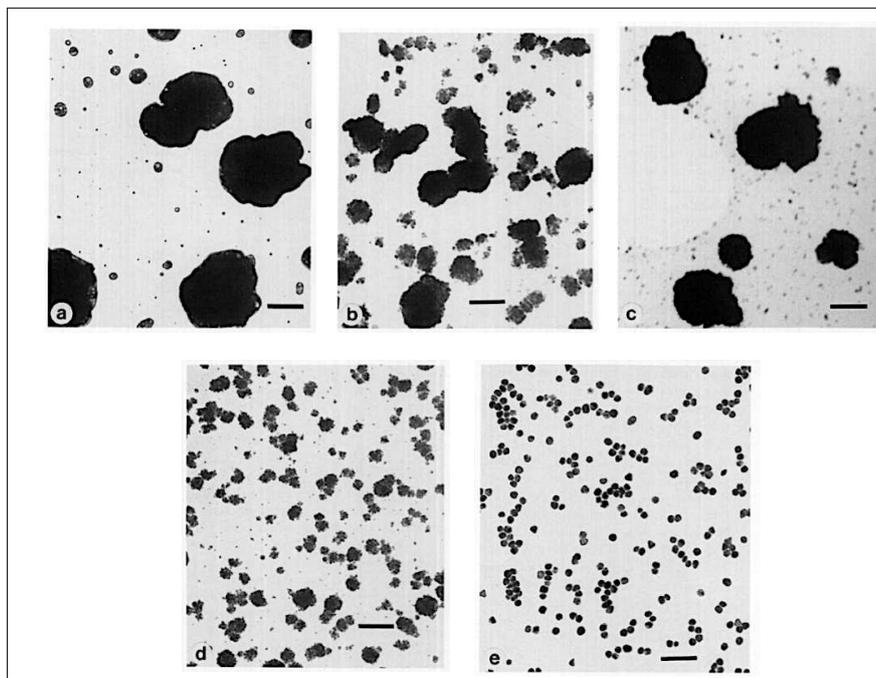


Figure 19 : Images MET des AuNPs au cours de la synthèse au citrate à 50°C après a) 10 minutes, b) 30 minutes, c) 60 minutes, d) 120 minutes et e) à la fin de la réaction, lorsque la coloration rouge-rubis est stabilisée.

En effet, durant la première moitié du processus de synthèse des AuNPs, une population de particules présentant une distribution de taille bimodale est obtenue. Cette population est constituée de particules de très petite taille avec une densité électronique élevée et de particules de grande taille, d'aspect floconneux et exhibant une faible densité électronique. Au fur et mesure de l'avancement de la synthèse, une fragmentation des grandes particules est observée de même qu'une croissance des petites particules. A la fin de la réaction, une population unique de nanoparticules d'or est obtenue. Les grandes particules sont constituées de plusieurs sous-unités et correspondent aux assemblages copolymériques Au^{3+} /Réducteur alors que les petites particules sont les nucléi.

L'étude du devenir du réducteur au cours de la synthèse des AuNPs par spectrométrie de masse en utilisant une technique de désorption-ionisation de surface assistée par laser (SALDI-MS) vient corroborer les hypothèses de Turkevich relatives à la mise en œuvre d'une réaction d'oxydo-réduction⁽⁷⁰⁾. La synthèse des AuNPs va être réalisée en présence de dopamine qui servira de réducteur. Ce choix de la dopamine comme agent réducteur s'explique par le grand nombre de produits d'oxydation qu'elle peut générer (schéma 21). En présence de 100 μM de dopamine, les produits d'oxydation sont majoritairement présents sur le spectre de masse, en particulier le dérivé 5,6-dihydroxyindole dont le pic à 172,04 m/z prédomine. Ainsi, la réduction des sels d'or aurique Au^{3+} en or métallique Au^0 est réalisée en parallèle à des réactions d'oxydations successives de la dopamine et de ses dérivés oxydés.

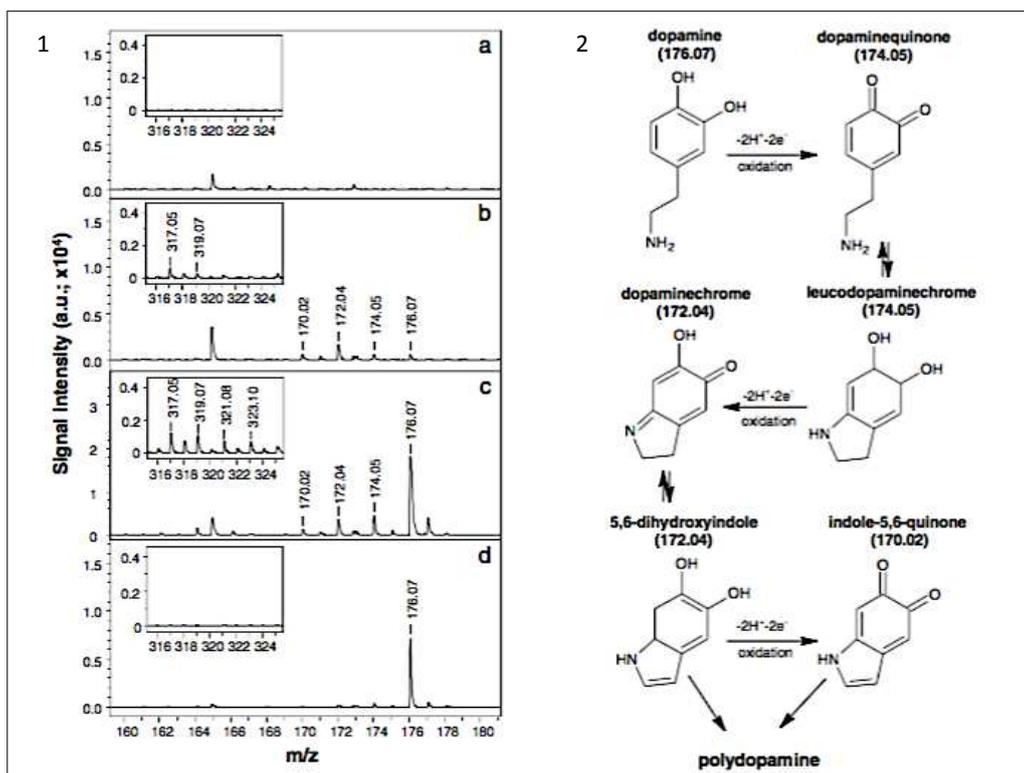


Schéma 21 : 1) Spectres de masse des solutions de AuNPs obtenues par réduction de 200 μM de sels d'or HAuCl₄ en solution dans un tampon phosphate en l'absence (a) ou en présence de (b) 100 μM, (c) 400 μM et (d) 1000 μM de dopamine. 2) Schéma représentant les différents produits issus de l'oxydation de la dopamine. Illustrations issues de la référence (70).

La compréhension mécanistique de la synthèse des AuNPs a permis de mettre en évidence que la taille des AuNPs ainsi que leur caractère mono ou polydisperse dépendaient de nombreux facteurs : le temps de réaction, la température, la concentration initiale en sels d'or ainsi que le ratio Au³⁺/Citrate utilisé au cours de la synthèse⁽⁶³⁾⁽⁷¹⁾.

Le premier paramètre étudié a été l'influence de la température : cette synthèse « bottom-up » directe a été réalisée à 70°C, 80°C et 100°C (qui sera considérée comme la température de référence). Il a été constaté qu'un abaissement de la température entraînait un ralentissement de la cinétique de la réaction mais permettait d'avoir des AuNPs de plus petite taille et avec un caractère plus monodisperse⁽⁶³⁾.

L'influence de la quantité de citrate de sodium a également été étudiée en utilisant des solutions aqueuses à 0,1% ; 0,2% et 0,5% en citrate trisodique (Na₃Citrate). Dans ces conditions, les variations de colorations observées dans la méthode de référence surviennent plus rapidement et de façon plus marquée. De plus, à partir d'une diminution de la quantité en citrate d'un facteur 10, une augmentation du diamètre des AuNPs et de leur caractère dispersif sont observés. Le diagramme de distribution devient non symétrique et présente un épaulement vers les valeurs plus élevées de diamètre (figure 20). De plus, lorsque cette quantité de citrate continue de diminuer, une coalescence des AuNPs est observée⁽⁶³⁾.

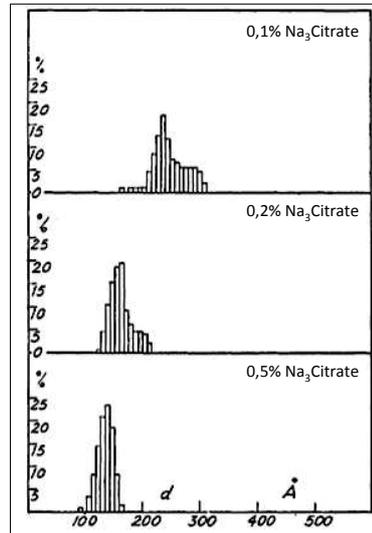


Figure 20 : Diagramme de distribution en taille des AuNPs obtenues en présence de quantité variable de citrate de sodium. En ordonnée, le pourcentage de particules et en abscisse, le diamètre mesuré en Ångström. Diagramme issu de la référence (63).

Le taux de formation des nucléi dépend à la fois de la concentration en citrate et de la concentration en sels d'or. L'influence de la concentration en acide chloraurique et celle du ratio Citrate/Au sur la taille et la polydispersité des AuNPs ont été initialement étudiées par Turkevich⁽⁶³⁾ en 1951 puis par Kimling et Plech⁽⁷²⁾ en 2006 et Zabetakis et Daniel⁽⁷³⁾ en 2012.

En effet, il a été constaté que l'influence du ratio Citrate/Au sur le caractère polydisperse des AuNPs diffère en fonction de la concentration en ions Au³⁺ utilisée. Pour des concentrations en sels d'or supérieures à 0,8 mM, le caractère polydisperse des AuNPs synthétisées est beaucoup plus marqué pour des ratio Citrate/Au équivalents (figure 21A).

De même, la fluctuation du diamètre des AuNPs est corrélée à la concentration en ions aurique Au³⁺ quel que soit le ratio Citrate/Au considéré. Pour des concentrations en sels d'or inférieures à 1 mM, le diamètre des AuNPs diminue lorsque la concentration en Au³⁺ augmente et la valeur du ratio Citrate/Au détermine le diamètre minimum. Inversement, lorsque la concentration en Au³⁺ devient supérieure à 1 mM, le diamètre des AuNPs augmente avec la concentration (figure 21B).

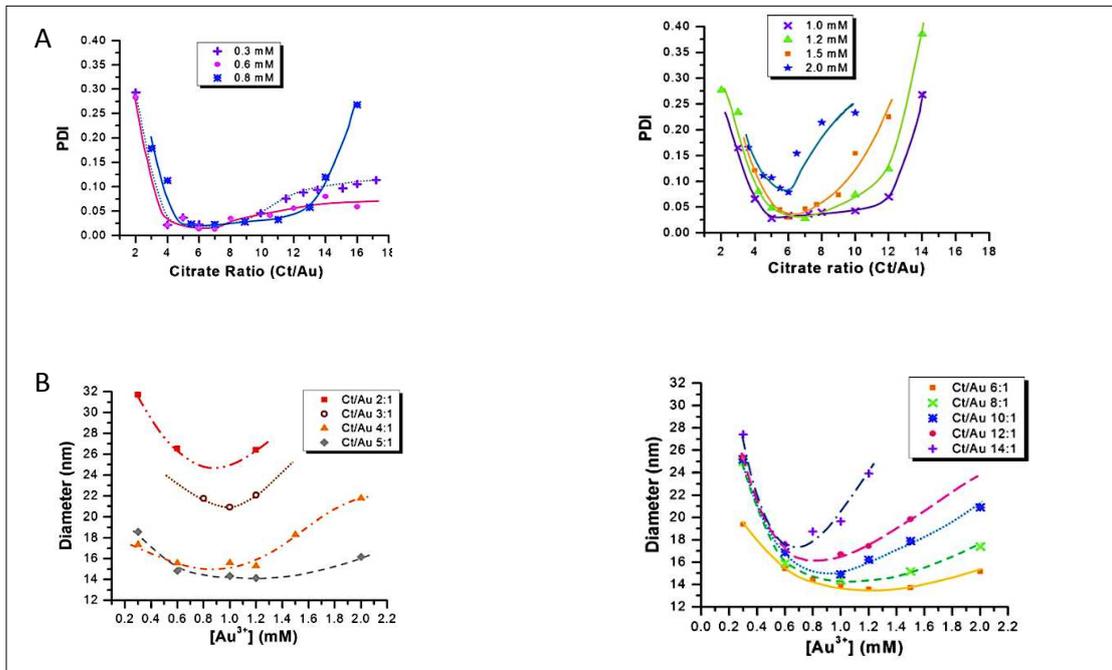


Figure 21 : Graphiques représentant l'évolution de A) l'index de polydispersité mesuré par DLS en fonction du ratio Citrate/Au pour différentes concentrations en sels d'or aurique Au^{3+} et B) le diamètre des AuNPs en fonction de la concentration en ions aurique Au^{3+} pour différents ratios Citrate/Au. Graphiques issus de la référence (73).

Cette interdépendance entre le diamètre des AuNPs, leur dispersion, la concentration en sels d'or aurique Au^{3+} et le ratio Citrate/Au résulte de l'augmentation de la force ionique induite par l'augmentation des électrolytes Au^{3+} dans le milieu réactionnel. Cette augmentation de la force ionique va entraîner un phénomène de coagulation des AuNPs par exacerbation des forces attractives inter-particules. Au contraire, l'augmentation du ratio Citrate/Au va favoriser les forces répulsives en augmentant le potentiel de surface des AuNPs. Pour de faibles concentrations en Au^{3+} , l'augmentation de la force ionique n'est pas suffisante pour contrebalancer l'effet de potentiel de surface mais lorsque cette concentration augmente, elle devient prépondérante et entraîne un accroissement de taille des AuNPs par un processus d'agrégation.

La force ionique de la solution ainsi que le potentiel de surface ne sont pas les seuls facteurs expliquant cette interrelation, le rôle du pH de la solution résultant du mélange entre l'acide chloraurique (acide) et le citrate trisodique (alcalin) doit également être évoqué. Cette relation entre concentration en acide chloraurique, ratio Citrate/Au et pH du milieu réactionnel a été confirmée par des expériences de synthèse des AuNPs avec une inversion de l'ordre d'introduction des réactifs⁽⁷⁴⁾⁽⁷⁵⁾.

L'ionisation de l'acide chloraurique HAuCl_4 en chloraurate AuCl_4^- est totale en milieu alcalin. La formation de cet anion peut être considérée comme l'espèce active permettant l'oxydation du citrate en acétone dicarboxylate et donc l'initiation du processus de nucléation. Dans la méthode de Turkevich, l'acide chloraurique est majoritairement sous forme acide car le pH initial de la solution est de 3,2. Pour des ratios Citrate/Au élevés, le pouvoir tampon du citrate trisodique est important et

permet de passer d'un environnement acide à un environnement neutre ce qui favorise la spéciation des ions auriques en anions chloroaurates actifs. Cette spéciation permet d'accélérer l'oxydation du citrate et réduit la période de nucléation ce qui permet d'obtenir des particules monodisperses.

III-2-1-1-3 AMÉLIORATION DE LA MÉTHODE DE TURKEVICH

Les propriétés optiques et électroniques des suspensions colloïdales des AuNPs étant étroitement corrélées à la taille et à la forme de ces dernières, de nombreuses équipes de recherche ont développé cette méthode de Turkevich afin d'élaborer des voies de synthèse permettant l'obtention de AuNPs avec une taille contrôlée et uniforme. En effet, la compréhension mécanistique de la formation des AuNPs a permis d'identifier différents facteurs d'influence comme la température, le pH, la concentration en sels d'or HAuCl_4 , la concentration en réducteur, la force ionique de la solution. Le contrôle de ces différents paramètres permet l'obtention de populations homogènes et monodisperses de AuNPs avec une taille et une forme prédéfinies et contrôlées.

Ainsi, en 1973, Frens⁽⁶⁶⁾ a présenté une méthode permettant d'obtenir une population monodisperse de AuNPs avec une isotropie de taille et de forme en modifiant le ratio $\text{Na}_3\text{Citrate}/\text{HAuCl}_4$. De plus, la taille des AuNPs peut être contrôlée et prédéfinie. Par cette procédure, plusieurs populations homogènes de AuNPs présentant un diamètre variant de 16 à 147 nm ont pu être obtenues.

En 1985, Slot et Geuze⁽⁷⁶⁾ ont remplacé le citrate trisodique par un mélange acide tannique/citrate comme réducteur. En faisant varier le ratio réducteur/ Au^{3+} , des populations monodisperses de AuNPs avec des diamètres variant entre 3 et 17 nm ont été obtenues.

Plus récemment, l'équipe de Puntès *et al.*⁽⁷⁴⁾ a modifié l'ordre d'introduction des réactifs afin d'accroître le taux de conversion du citrate trisodique en acétone dicarboxylate par oxydation thermique en milieu aérobie. L'acétone dicarboxylate étant l'agent responsable de la formation et de la stabilisation des clusters d'or lors de l'étape de nucléation, une conversion du citrate en acétone dicarboxylate avant l'introduction des sels d'or permet de supprimer la période d'induction. De plus, cette addition inversée permet d'accroître le ratio Citrate/Au. Par cette méthode, des populations de AuNPs présentant une isotropie de taille et de forme ont été obtenues. Ces particules sont plus petites et plus monodisperse que celles préparées par la voie classique avec un diamètre moyen de $9,0 \pm 1,2$ nm pour la méthode d'addition inversée contre $36,6 \pm 6,8$ nm pour la stratégie directe. Ces résultats de MET sont corrélés aux analyses spectrales UV-Visible qui montrent un déplacement de 10 nm de la bande d'absorption du plasmon de surface vers de plus faible valeur de longueur d'onde (figure 22). Cette même stratégie a été utilisée avec des résultats similaires par l'équipe de Sivaraman et Santhanam⁽⁷⁵⁾.

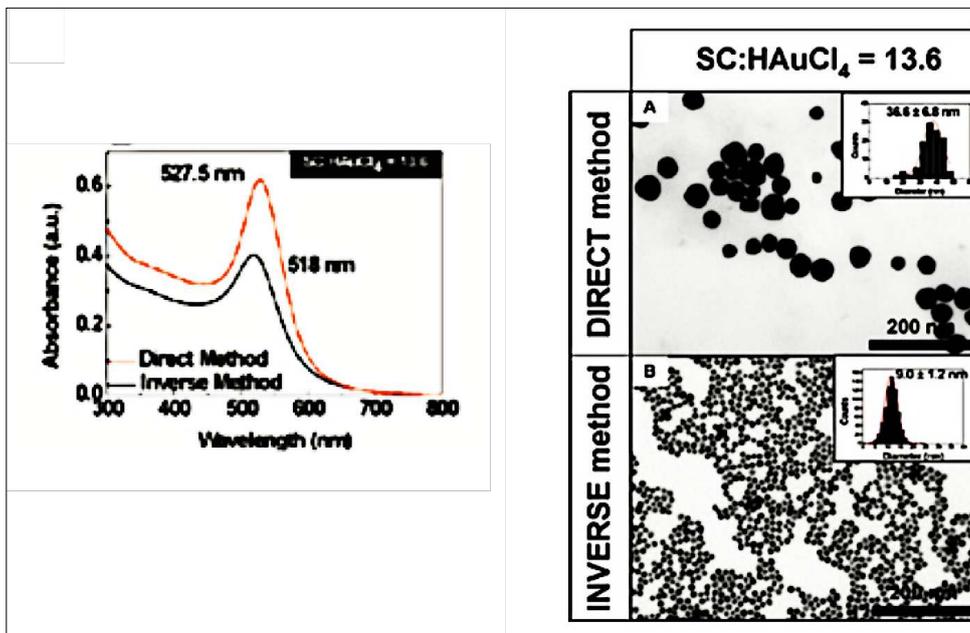


Figure 22 : Spectre UV-Visible, images MET et diagramme de distribution en taille des AuNPs obtenues par synthèse directe (courbe en rouge, image A) ou indirecte (courbe en noir, image B). Illustrations et graphique issus de la référence (74).

La préparation de AuNPs avec un diamètre moyen inférieur à 10 nm est particulièrement intéressante en terme d'applications biologiques car cette faible dimension leur permet de traverser les membranes cellulaires et nucléaires ce qui peut être mis à profit pour la délivrance dirigée de gènes ou d'agent thérapeutiques. De plus, elles peuvent être utilisées comme germes pour la mise en œuvre de la synthèse de nanoparticules présentant une anisotropie contrôlée de forme.

Néanmoins, le principal désavantage de la méthode de Turkevich est l'utilisation de solution diluée d'acide chloraurique HAuCl_4 (inférieure à 0,8 mM) comme source de cations Au^{3+} . Il en résulte que les suspensions de nanoparticules d'or sont également très diluées, de l'ordre de 0,005% massique. En effet, pour des concentrations en Au^{3+} supérieures à 1 mM, l'acidité du milieu réactionnel augmente et les AuNPs obtenues sont de grande taille et présentent une grande polydispersité. Cependant, les travaux de Li et Hou⁽⁷⁷⁾ ont permis la synthèse de AuNPs à partir d'une solution aqueuse d'acide chloraurique à 2,5 mM par contrôle du pH (ajout de NaOH) et de la température du milieu réactionnel (85°C). Ces suspensions colloïdales exhibent une coloration ainsi qu'une résonance plasmonique de surface similaires à celles observées avec la méthode classique de Turkevich.

III-2-1-1-4 SYNTHÈSE DES AuNPs STABILISÉES PAR DES LIGANDS SOUFRÉS : MÉTHODE DE BRUST ET SCHIFFRIN

L'une des caractéristiques principales des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or est que leur stabilité nécessite la présence d'un agent de surface prévenant l'agrégation des AuNPs entre elles. Dans les stratégies de synthèse présentées ci-dessus, le citrate de sodium, ou plus précisément son dérivé oxydé, l'acétone dicarboxylate, jouait ce rôle de stabilisation et empêchait la perte du caractère monodisperse.

L'existence d'une forte affinité entre les atomes de soufre et d'or aboutissant à la formation d'une liaison covalente stable et forte a donné lieu à l'émergence de nouvelles voies de synthèse permettant la formation de nanoparticules d'or directement stabilisées par des ligands soufrés via une liaison covalente Au-S.

C'est en 1993 que Mulvaney et Giersig⁽⁷⁸⁾ ont publié la première synthèse de AuNPs stabilisées par des ligands porteurs d'une fonction thiol via l'établissement de liaisons covalentes Au-S. Puis, en 1994, Brust *et al.*⁽⁷⁹⁾ se sont inspirés de la méthode biphasique de Faraday⁽⁶²⁾ et ont proposé une voie de synthèse permettant l'obtention d'une population monodisperse d'AuNPs dont la taille est contrôlée.

Les sels d'or aurique Au^{3+} sont réduits en or métallique Au^0 en présence d'un réducteur fort, le borohydrure de sodium ($NaBH_4$), et d'un agent de transfert de phase, le bromure de tétraoctylammonium (TOAB). Ce dernier composant va permettre le passage des ions Au^{3+} depuis la phase aqueuse vers la phase organique. L'ajout au sein de ce milieu réactionnel d'un composé alcane thiol, le dodécane-thiol, va permettre la stabilisation des AuNPs via la formation de liaisons covalentes Au-S⁽⁷⁹⁾.

L'analyse par microscopie électronique à transmission montre que cette méthode permet d'obtenir des AuNPs d'un diamètre moyen de 2 nm et montrant un caractère très monodisperse. Cependant, ces AuNPs présentent une forme cuboctaédrale ou icosaédrale plutôt que sphérique.

Cette fonctionnalisation permet d'obtenir des AuNPs particulièrement stables. En effet, elles peuvent être isolées par précipitation puis redissoutes dans des solvants organiques sans agrégation ni dénaturation et être utilisées comme une structure moléculaire individualisée afin d'être engagées dans des réactions de chimie organique de couplage ou de fonctionnalisation.

III-2-1-2 SYNTHÈSE « BOTTOM UP » PAR CROISSANCE DE GERMES

Cette procédure permet de réguler pas à pas la croissance des nanoparticules et d'orienter ce développement dans une direction privilégiée de l'espace par dissociation des étapes de nucléation et de croissance. Cela permet l'obtention de AuNPs dont la taille mais aussi la forme sont rigoureusement contrôlées. Elle se déroule en deux étapes (schéma 22) :

- La première étape est similaire à celle de la synthèse in-situ et correspond à un processus de nucléation et aboutit à la formation de clusters individualisés de nanoparticules d'or de très petite taille par réduction du sel d'or aurique Au^{3+} en or métallique Au^0 . Ces clusters sont appelés germes.
- La deuxième étape correspond à une phase d'expansion dirigée et contrôlée. La suspension de germes est ajoutée à une solution de croissance contenant des sels d'or HAuCl_4 ainsi que des agents réducteur et stabilisant.

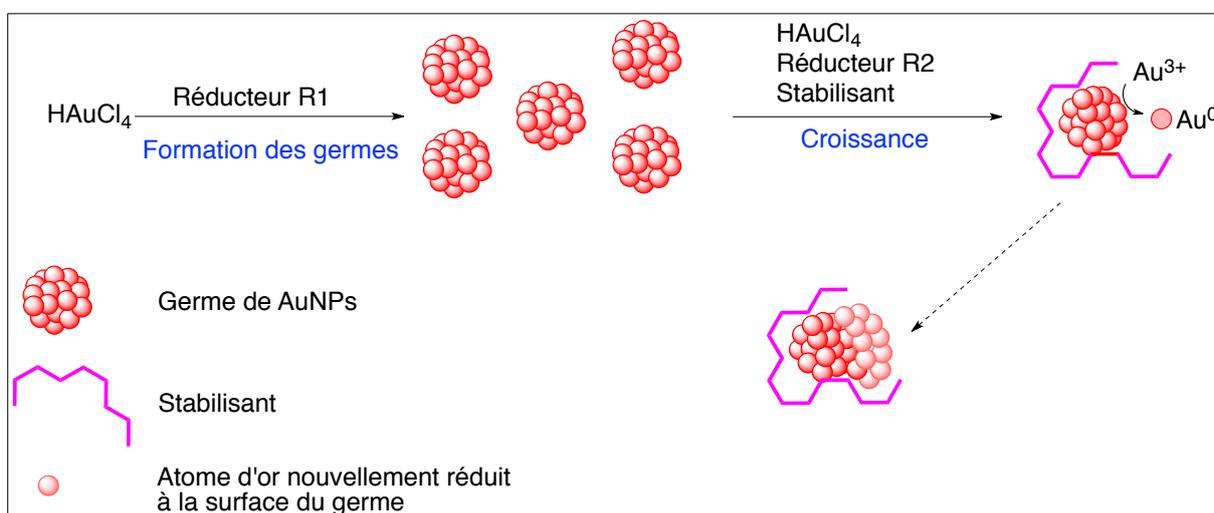


Schéma 22 : Synthèse des AuNPs par la méthode « bottom up » en utilisant la stratégie de croissance de germes.

Le contrôle en taille et en forme est assuré par :

- L'utilisation de réducteurs de force différente. La préparation des germes est effectuée en présence d'un réducteur fort alors qu'un réducteur plus doux est utilisé dans la phase de croissance. Les nouveaux atomes d'or Au^0 formés lors de la deuxième étape ne pourront pas générer de nouveaux germes car la réduction se fera à la surface du germe qui agit comme catalyseur ce qui permet d'obtenir une croissance homogène et continue à partir d'un nombre fixe de germes. Le germe sert de support pour le développement de la future nanoparticule d'or.
- L'utilisation, lors de la phase de croissance, d'un agent réducteur et stabilisant qui oriente la synthèse dans une direction de l'espace. Le citrate trisodique, l'acide ascorbique, l'hydroquinone ainsi que le bromure d'hexadecyltriméthylammonium (ou CTAB) sont couramment utilisés dans la synthèse par croissance de germes (figure 23).

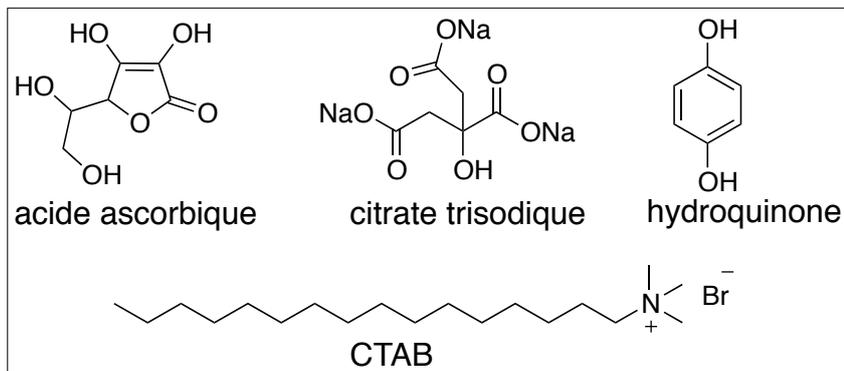


Figure 23 : Structure de différents réducteurs et stabilisants couramment rencontrés dans les stratégies de synthèse des AuNPs par croissance de germes « bottom up ».

C'est en 1990 que Nathan⁽⁸⁰⁾ et son équipe ont proposé la première synthèse de nanoparticules d'or sphériques via la procédure de croissance de germes afin de préparer des suspensions colloïdales de AuNPs de grande taille (100 nm) et présentant un caractère monodisperse. Les germes furent obtenus en présence de NaBH₄ et de citrate trisodique. Le borohydrure de sodium permettait la réduction des sels d'or en or métallique et le citrate stabilisait les germes ainsi formés. Ces germes furent ensuite mis au contact de la solution de croissance contenant des sels d'or et un réducteur doux comme le citrate ou l'hydroxylamine. Cependant, les AuNPs ainsi obtenues présentaient une anisotropie de forme avec une population de AuNPs sphériques mais également une population de AuNPs en forme de bâtonnets ou nanorods (AuNRs).

De nombreux groupes de recherche ont alors étudié cette stratégie de synthèse et modifié certains paramètres afin d'obtenir des populations homogènes de AuNPs avec une isotropie de taille et de forme et présentant un caractère monodisperse. Sous l'impulsion de Murphy⁽⁸¹⁾ en 2001, le citrate trisodique fut remplacé par de l'acide ascorbique et en 2006, l'équipe de Liz-Marzan⁽⁸²⁾ a décrit la première synthèse par croissance de germes permettant la formation d'une population monodisperse de AuNPs sphériques et d'un diamètre moyen de 200 nm.

Pourtant, le caractère anisotropique des nanoparticules d'or obtenues par cette voie de synthèse a également été largement exploité afin de préparer des suspensions de nanoparticules avec des formes variées : nanobâtonnets, nanocubes, nanohexapodes, nanorubans, nanocages creuses ou nanobranches (figure 24)⁽⁸³⁾ ⁽⁸⁴⁾.

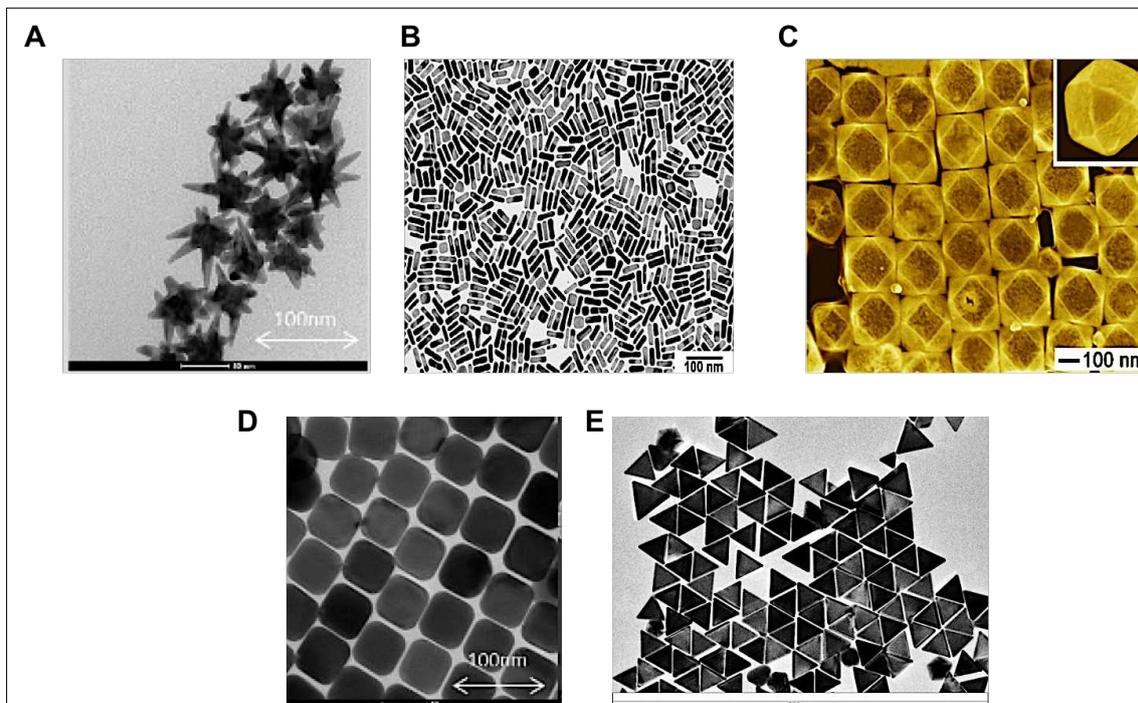


Figure 24 : Images obtenues par microscopie électronique à transmission illustrant le caractère anisotrope des AuNPs. A) Formation de AuNPs en étoiles⁽⁸⁵⁾ ; B) Formation de AuNPs en bâtonnets ou nanorods d'or⁽⁸⁶⁾ ; C) Formation de nanocages⁽⁸⁷⁾ ; D) Formation de AuNPs en cubes⁽⁸⁸⁾ ; E) Formation de AuNPs en triangle⁽⁸⁸⁾.

Parmi ces formes anisotropes, la plus étudiée est la forme bâtonnet ou nanorod (AuNRs). Cette structure est particulièrement attractive car, de par sa structure asymétrique et contrairement aux nano-sphères, elle présente deux bandes d'absorption plasmonique de surface : une bande d'absorption vers 525 nm, associée à la composante transverse et une seconde bande d'absorption dans le proche infra-rouge (IR), à partir de 680 nm, associée à la composante longitudinale ⁽⁸⁹⁾.

L'existence de cette bande d'absorption dans le proche IR suscite un fort intérêt pour son application en nano-médecine et plus précisément dans les techniques d'imagerie in-vivo car cela permet de s'affranchir de l'absorption intrinsèque des tissus qui devient négligeable dans ce domaine de longueur d'onde. En effet, le corps humain est transparent à 820 nm.

Depuis plusieurs décennies, la préparation des AuNRs était réalisée par des techniques de réduction électrochimique ou photochimique à l'aide de support matrice nanoporeux. Cependant, les travaux de Murphy *et al.*⁽⁹⁰⁾ en 2001 puis de El Sayed *et al.*⁽⁹¹⁾ en 2003 ont permis l'élaboration d'une méthode de synthèse chimique via la stratégie de croissance de germes selon un processus séquentiel. Les sels d'or aurique Au^{3+} sont réduits en présence de citrate et de $NaBH_4$ et servent de germes. Une première séquence consiste à ajouter ces germes à une solution de croissance contenant des sels d'or (précurseur de Au^{3+}), du CTAB (agent de surface permettant une expansion orientée) et de l'acide ascorbique (agent réducteur). Après quelques minutes d'exposition au repos, des AuNRs de première génération sont obtenus et serviront à leur tour de germes pour la formation de AuNRs de seconde génération (schéma 23)⁽⁸³⁾.

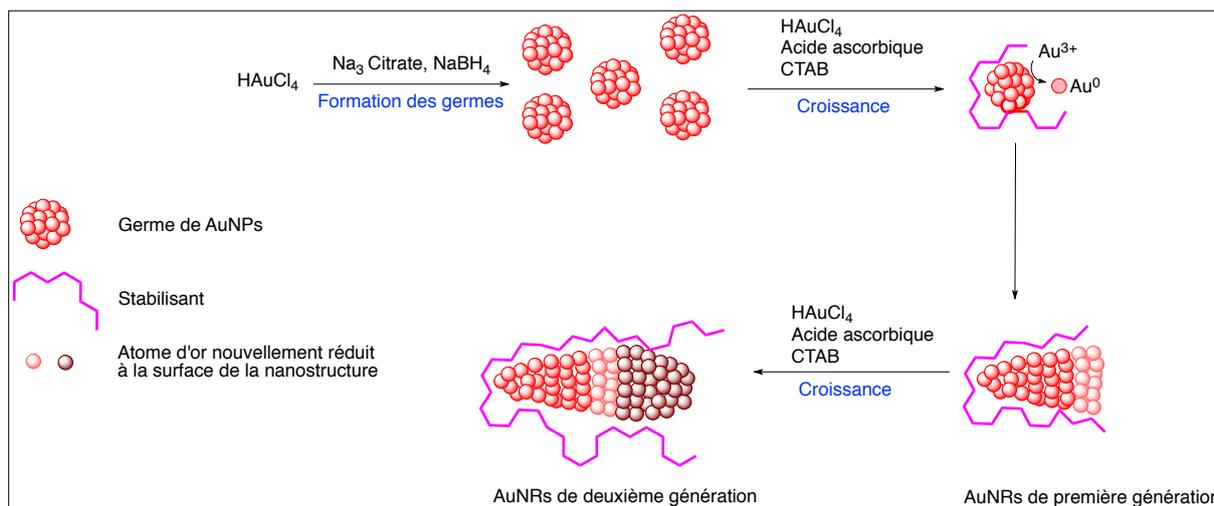


Schéma 23 : Application de la stratégie « bottom up » à croissance de germes pour les synthèses de nanorods (AuNRs).

III-2-2 AUTRES STRATÉGIES DE SYNTHÈSE ET DE STABILISATION DES AuNPs

La stratégie « top down » utilise de l'or à l'état massif sous forme de film ou de pastille. Celui-ci est alors fractionné par des processus physiques au sein de matrices ce qui permet de contrôler la taille et la forme des AuNPs. Les procédés physiques les plus largement utilisés sont la lithographie par faisceau d'électron et l'ablation laser introduite par Cotton⁽⁸³⁾ en 1959. La lithographie électronique aboutit à la formation de AuNPs présentant des formes variées et avec un contrôle de précision de la taille limité à une dizaine de nanomètre. L'ablation laser permet d'obtenir des AuNPs sphériques de taille contrôlée, peu dispersées et directement fonctionnalisées.

D'autres voies de synthèse mettant en œuvre des procédés physiques ont également été proposées : l'irradiation UV ou dans le proche IR, la sonication à 200 kHz, la radiolyse par γ -irradiation, la thermolyse, la photolyse ou encore l'ablation laser.

L'engouement pour les procédés de chimie verte et de biosynthèse a abouti à l'utilisation de micro-organismes et de biomolécules pour la synthèse in-situ des AuNPs. De nombreux extraits naturels tels que la gomme arabique, l'Aloès Véra, l'huile de castor, ... possèdent des fonctions carboxyliques, carbonyles, hydroxyles ainsi que des groupements phénoliques. Ces fonctionnalités chimiques permettent à la fois de réduire les sels d'or aurique Au^{3+} en or métallique Au^0 mais également de stabiliser les AuNPs ainsi produites.

De même, les micro-organismes tels que les bactéries, les levures et les champignons possèdent un arsenal enzymatique capable de mettre en œuvre des réactions d'oxydo-réductions et l'abondance des groupements électronégatifs permet d'assurer la stabilisation des AuNPs ainsi obtenues⁽⁸³⁾.

La stabilisation des AuNPs peut également être réalisée à l'aide de micelles polymériques ou de micelles inverses au sein de microémulsions. Il s'agit d'un système

biphasique où un surfactant va permettre la formation de micelles créant un microenvironnement favorable à la synthèse des AuNPs et assurant l'extraction de l'ion métallique depuis la phase dispersante vers l'intérieur de la micelle. De plus, ces micelles serviront de matrice et permettront d'obtenir un contrôle de la taille et de la forme des AuNPs par variation du ratio Surfactant/Au⁽⁶⁰⁾.

De façon assez similaire, les AuNPs peuvent également être stabilisées par des dendrimères ou des polymères tels que la polyvinylpyrrolidone (ou PVP) ou le polyéthylène glycol. Le plus souvent il s'agit d'une synthèse in-situ des AuNPs au sein des matrices de polymères par réduction des sels d'or aurique Au³⁺ dissous dans la matrice ou obtenus après évaporation du précurseur au contact de la surface chauffée du polymère. Mais il peut également s'agir de la polymérisation de la matrice autour des AuNPs bien que cette stratégie soit beaucoup moins utilisée. Cette méthode permet de stabiliser les AuNPs et d'éviter l'agrégation par l'utilisation du nombre d'or de Toshima⁽⁶⁰⁾. Ce nombre d'or correspond au nombre de mg de polymères nécessaires pour prévenir l'agrégation des AuNPs lors de l'addition d'1 mL d'une solution aqueuse saline à 10%. Cette agrégation est marquée par le virage de coloration de la solution de rouge à violet. Plus ce nombre d'or est bas, plus le polymère possède un pouvoir protecteur élevé.

III-3 STABILISATION DU COLLOÏDE, SURFACTANT ET MONOCOUCHE AUTO-ASSEMBLÉE

III-3-1 STABILITÉ DU COLLOÏDE ET SURFACTANT : QUELQUES NOTIONS GÉNÉRALES

Depuis les travaux de Turkevich⁽⁶³⁾, de nombreuses procédures mettant en œuvre la réduction chimique de sels d'or H₂AuCl₄ ont été développées afin d'obtenir des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or. Toutes ces voies de synthèse ont en commun l'utilisation d'agents de surface, également appelés agents surfactants ou tensioactifs qui empêche le phénomène de coagulation et assure la stabilité de la suspension colloïdale.

En effet, la stabilité d'un colloïde en phase aqueuse est régie par la théorie DLVO ou Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek qui suggère que l'énergie libre totale d'interaction entre deux particules résulte de deux composantes : l'énergie libre liée aux interactions de Van der Waals et celle liée aux interactions électrostatiques selon l'équation suivante :

$$G = G_{\text{Van der Waals}} + G_{\text{électrostatique}}$$

Les forces de Van der Waals entre deux particules identiques sont attractives. En revanche, les forces électrostatiques issues du chevauchement des nuages électroniques sont répulsives. L'intensité de la répulsion électrostatique est corrélée au potentiel présent à la surface de la particule. L'équilibration de ces deux forces permet d'assurer

la stabilité des particules en solution en générant une barrière énergétique qui prévient la coagulation (figure 25).

Cependant, ce modèle DLVO est insuffisant pour expliquer la stabilité du colloïde lorsque la distance inter-particulaire atteint l'échelle nanométrique car il ne prend pas en compte les interactions entre les particules et le milieu dispersif, notamment les forces stériques, hydrophobes et de solvation.

Ainsi, l'interaction entre deux particules peut être exprimée par cette équation DLVO modifiée⁽⁹²⁾:

$$G = G_{\text{Van der Walls}} + G_{\text{électrostatique}} + G_{\text{forces non-DLVO}}$$

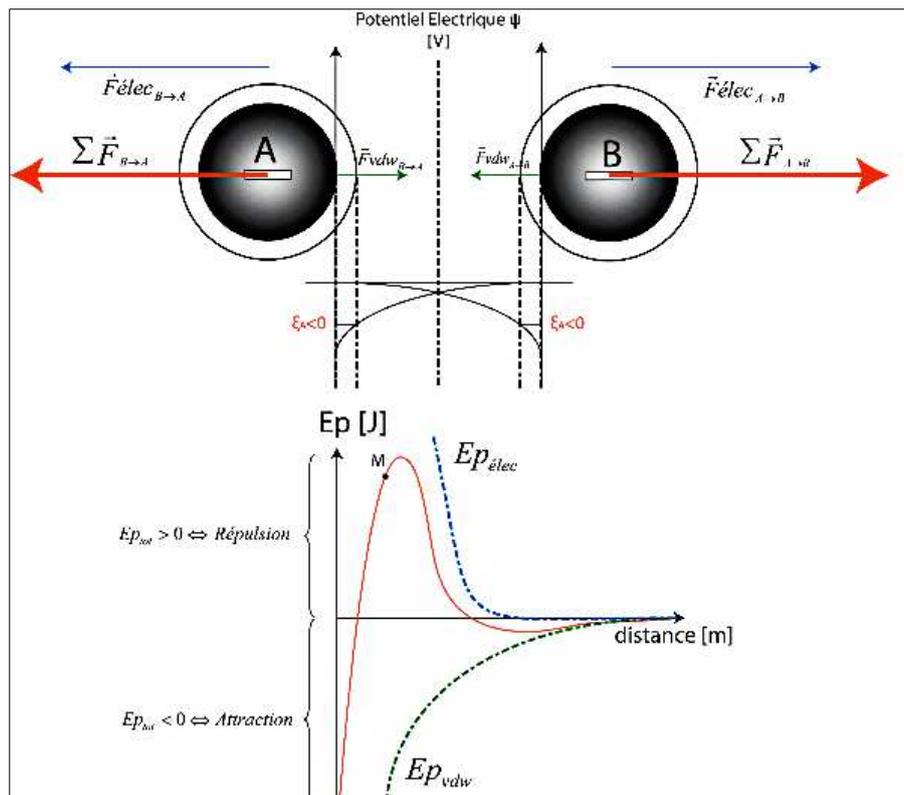


Figure 25 : Représentation simplifiée des forces attractives (Van der Walls) et répulsives (électrostatique) qui s'exercent à la surface de deux nanoparticules d'or en interaction. Représentation de la résultante de ces forces en fonction de la distance inter-particulaire.

En l'absence de tout surfactant, la réduction chimique des sels précurseurs d'or en or métallique Au^0 entraîne la formation de nanoparticules non électriquement chargées et non encombrées. Les forces électrostatiques et stériques sont donc nulles et l'attraction de Van der Waals prédomine ce qui conduit à l'agrégation des AuNPs et à la destruction de la suspension colloïdale.

Inversement, l'utilisation d'agent de surface comme le citrate de sodium (Turkevich⁽⁶³⁾), le TOAB (Brust-Schiffrin⁽⁹³⁾(79)) ou le CTAB (Nikoobakht⁽⁹¹⁾) permet de créer à la fois une charge ainsi qu'un encombrement stérique à la surface de la nanoparticule. Les forces répulsives deviennent alors prépondérantes et la coalescence n'a pas lieu.

De plus, le choix de l'agent de surface est important car son caractère hydrophobe ou hydrophile conditionne le comportement des AuNPs au sein du milieu dispersif. Ainsi, des AuNPs recouvertes de citrate exhiberont un caractère hydrosoluble alors que celles entourées de CTAB ou de TOAB pourront être dispersées dans des solvants organiques. C'est d'ailleurs cette propriété qui est utilisée dans la synthèse biphasique de Brust-Schiffrin afin de permettre le transfert de phase des ions auriques Au^{3+} depuis la phase aqueuse vers la phase organique où aura lieu la réaction de réduction. En effet, le CTAB est une molécule amphiphile caractérisée par une chaîne alcane de 16 atomes de carbone apolaire et lipophile et par la présence d'un ammonium quaternaire hydrophile. Ainsi, la partie hydrophile du CTAB s'organise et s'oriente autour du cation Au^{3+} hydrosoluble tandis que la queue hydrophobe est dirigée vers le milieu apolaire.

Ce transfert des ions auriques ne pourra être effectué que lorsque la concentration en surfactant sera supérieure à la concentration micellaire critique ou CMC. Pour des concentrations inférieures, le CTAB forme un film à l'interface Eau/Toluène avec la tête hydrophile de la molécule dirigée vers la phase aqueuse et la queue hydrophobe vers la phase organique. Lorsque la concentration en CTAB atteint la CMC, l'interface Eau/Toluène est saturée en surfactant. C'est pourquoi, pour des concentrations supérieures à la CMC, le tensio-actif se retrouve dispersé dans la phase aqueuse et peut alors jouer son rôle d'agent de transfert de phase (schéma 24).

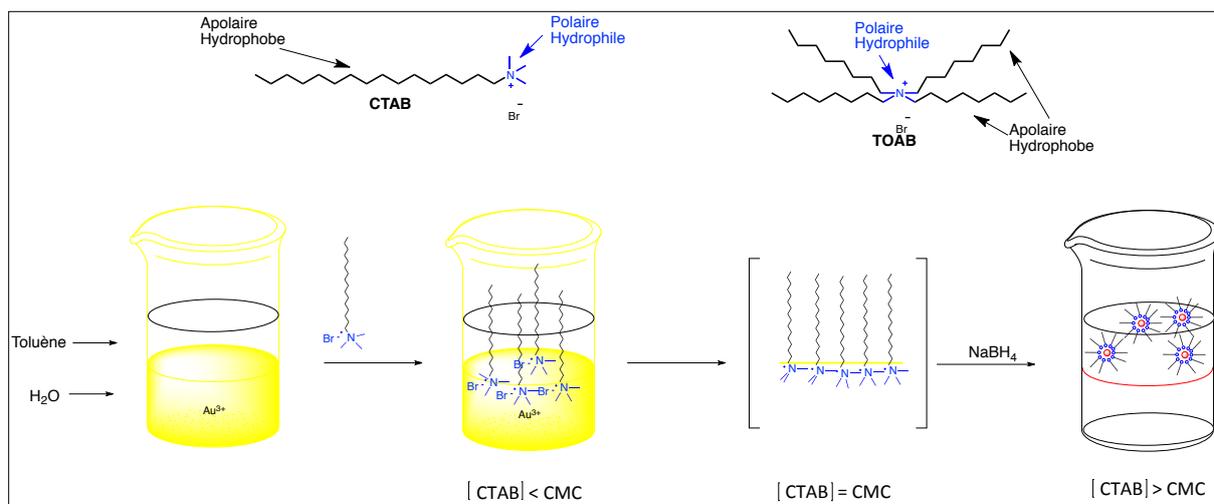


Schéma 24 : Représentation du mécanisme d'action moléculaire des agents tensioactifs permettant le transfert de phase des ions auriques Au^{3+} depuis la phase aqueuse vers la phase organique où aura lieu la réduction en Au^0 .

Ces agents de surface interviennent dès le stade de la nucléation afin de protéger les germes de l'agglomération. De plus, en fonction de la structure nanocristalline du germe, le surfactant peut présenter un tropisme pour certains plans cristallographiques et engendrer un abaissement localisé de l'énergie libre et donc une réactivité diminuée. Cette propriété est notamment exploitée dans le processus de synthèse par croissance de germe afin d'obtenir des AuNPs présentant une forme anisotrope⁽⁹⁴⁾.

III-3-2 LA MONOCOUCHE : UNE STRUCTURE ORGANISÉE

Avant 1994 et les travaux de Brust-Schiffrin⁽⁷⁹⁾, les agents de surface classiquement utilisés étaient le citrate trisodique, le CTAB, le TOAB ou encore l'acide ascorbique. La stabilisation des AuNPs était assurée par des interactions électrostatiques entre le surfactant et les électrons de surface de la nanoparticule.

La cohésion étant assurée par des interactions faibles, la suspension colloïdale est particulièrement sensible aux propriétés physico-chimiques de son environnement comme le pH ou la force ionique. En effet, une modification de ces paramètres pouvait entraîner une désorption du surfactant et induire une agrégation.

C'est pourquoi la synthèse des AuNPs élaborée par Brust et son équipe a constitué un tournant dans le domaine des nanotechnologies par l'émergence du concept de « cluster protégé par une monocouche ».

Le ligand initialement utilisé était le dodécanthiol mais par la suite de nombreux autres ligands soufrés ont été utilisés comme par exemple le paramercaptophénol⁽⁹³⁾, le didécylsulfure et le décylthiooctadécane⁽⁹⁵⁾, l'acide 11-mercaptoundécanoïque et le 11-mercaptoundécaneamide⁽⁹⁶⁾ (figure 26).

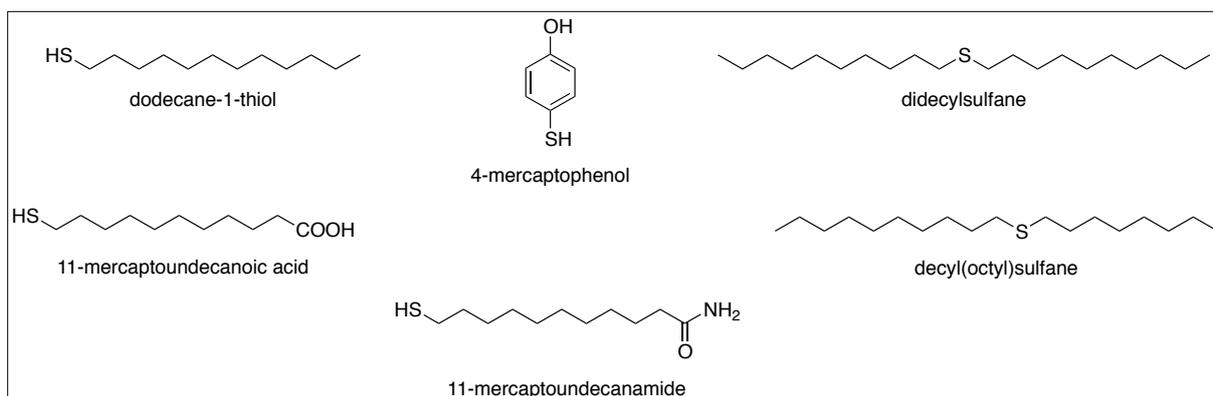


Figure 26 : Structure chimique de quelques ligands soufrés utilisés pour la synthèse et la stabilisation des AuNPs via une monocouche auto-assemblée.

Cette monocouche résulte d'un assemblage ordonné et structuré de ligands mono- ou bi-fonctionnalisés (figure 27).

L'interaction entre le ligand et la surface de la nanoparticule repose sur la grande affinité entre les atomes de soufre et d'or qui permet la formation d'une liaison covalente Au-S thermodynamiquement stable dont l'énergie de liaison est de -47 kcal/mol ce qui rend beaucoup plus difficile le phénomène de désorption chimique et donc augmente la stabilité de la nanoparticule au sein de son environnement.

Ce ligand peut également arborer une fonction ω-terminale qui pourra permettre la mise en œuvre de réactions d'orthologation avec des biocomposés tels que des protéines, des oligonucléotides. De plus, ce groupement terminal influera sur le

caractère lipophile ou hydrophile de la nanoparticule. Par exemple, une fonction acide ou amine en position ω , pourra en fonction du pH présenter un état ionisé qui permettra la dispersion de la nanoparticule dans un milieu aqueux.

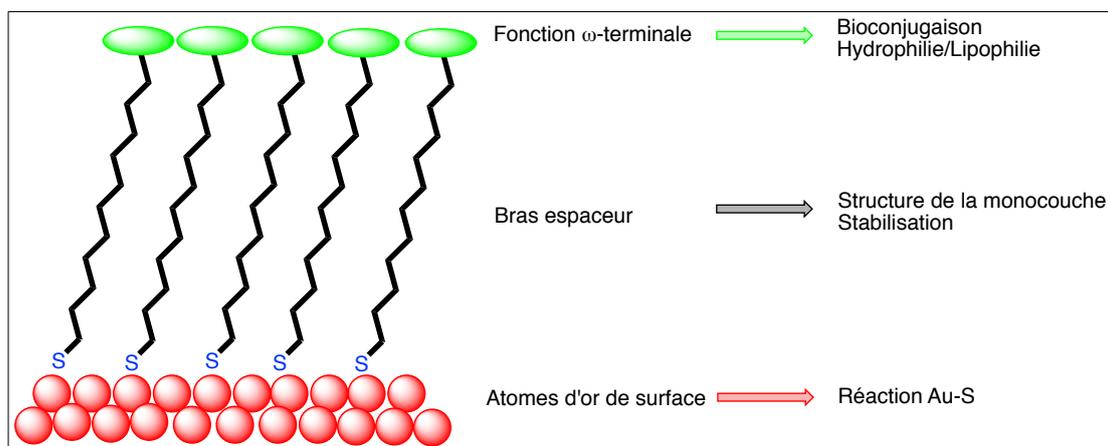


Figure 27 : Structure de la monocouche auto-assemblée de ligands soufrés présente à la surface des AuNPs lors de la synthèse des AuNPs par la méthode de Brust-Schiffrin.

L'agencement des ligands à la surface de la nanoparticule n'est pas aléatoire. En effet, les interactions de Van der Waals inter-ligands ainsi que les interactions dipolaires entre les groupements ω -terminaux constituent les forces motrices aboutissant à l'organisation structurale tridimensionnelle de la monocouche⁽⁹²⁾.

Les ligands alcanes adoptent une conformation linéaire « tout trans » afin de favoriser les interactions de Van der Waals intermoléculaires et d'abaisser l'énergie libre de la monocouche organique pour favoriser la stabilité de cet édifice⁽⁹⁷⁾.

De plus, cette monocouche organique présente un caractère tridimensionnel et dynamique induit par le mouvement des ligands à la surface de la particule. Ce phénomène conditionne l'efficacité du recouvrement de la nanoparticule en influant sur la densité de ligand par unité de surface⁽⁹⁸⁾.

Ce caractère dynamique est induit par l'oscillation tridimensionnelle par rapport à la surface de la nanoparticule selon un angle α et par la libre rotation des liaisons carbone-carbone selon un angle β (figure 28A). La valeur limite de ces angles est conditionnée à la fois par les interactions électrostatiques entre le ligand et les électrons de conduction des atomes d'or en surface de la nanoparticule et par l'encombrement stérique induit par la proximité des ligands les uns avec les autres.

De ce fait le ligand occupe virtuellement une surface plus importante que sa superficie réelle ce qui limite le nombre de ligands pouvant effectivement s'adsorber à la surface de la nanoparticule (figure 28B).

Contrairement à ce qui est observé dans les structures bidimensionnelles telles que les films d'or fonctionnalisés, la densité de recouvrement est variable en fonction de la distance à la surface. Ce phénomène résulte de l'existence d'une courbure à la surface

de la nanoparticule. En effet, plus on s'éloigne de la surface plus la densité d'occupation diminue⁽⁹⁴⁾.

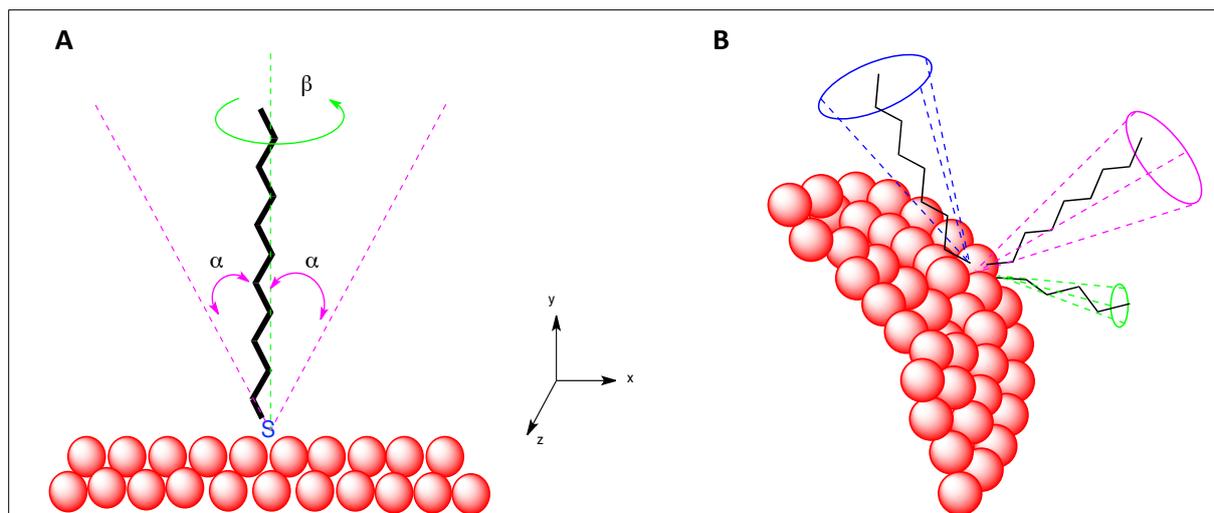


Figure 28 : Représentation de l'occupation spatiale d'un ligand et de son caractère mobile à la surface A) D'un film d'or bidimensionnel ; B) D'une nanoparticule d'or tridimensionnelle.

III-4 FONCTIONNALISATION DES AuNPS

La méthode de Brust-Schiffrin a permis de synthétiser des nanoparticules d'or sphériques très stables et présentant une isotropie de taille et de forme associée à un faible index de polydispersité. Cette haute stabilisation résulte de la formation d'une monocouche organisée de ligands qui enveloppe la nanoparticule et la protège des processus de coagulation par des répulsions stériques et électrostatiques. Le ligand initialement utilisé dans cette synthèse était le dodécane-thiol. La présence d'un groupement thiol terminal a donné lieu à une forte adsorption du ligand à la surface de la nanoparticule grâce à la formation d'une liaison covalente Au-S très stable⁽⁷⁹⁾.

Depuis la publication de ces travaux, la synthèse de AuNPs directement fonctionnalisées par une grande variété de ligands soufrés a connu un véritable essor et a permis d'élargir le champ d'application des AuNPs à de nombreux domaines comme le biosensing ou la vectorisation thérapeutique. En effet, la synthèse de telles nanoparticules constitue une voie d'accès simple et rapide à l'élaboration de structure macromoléculaire par couplage de l'extrémité terminale avec des molécules très variées : fluorophores, protéines, oligonucléotides, agent thérapeutique...

Plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin de fonctionnaliser la monocouche avec des composés biologiques ou des fluorophores (schéma 25).

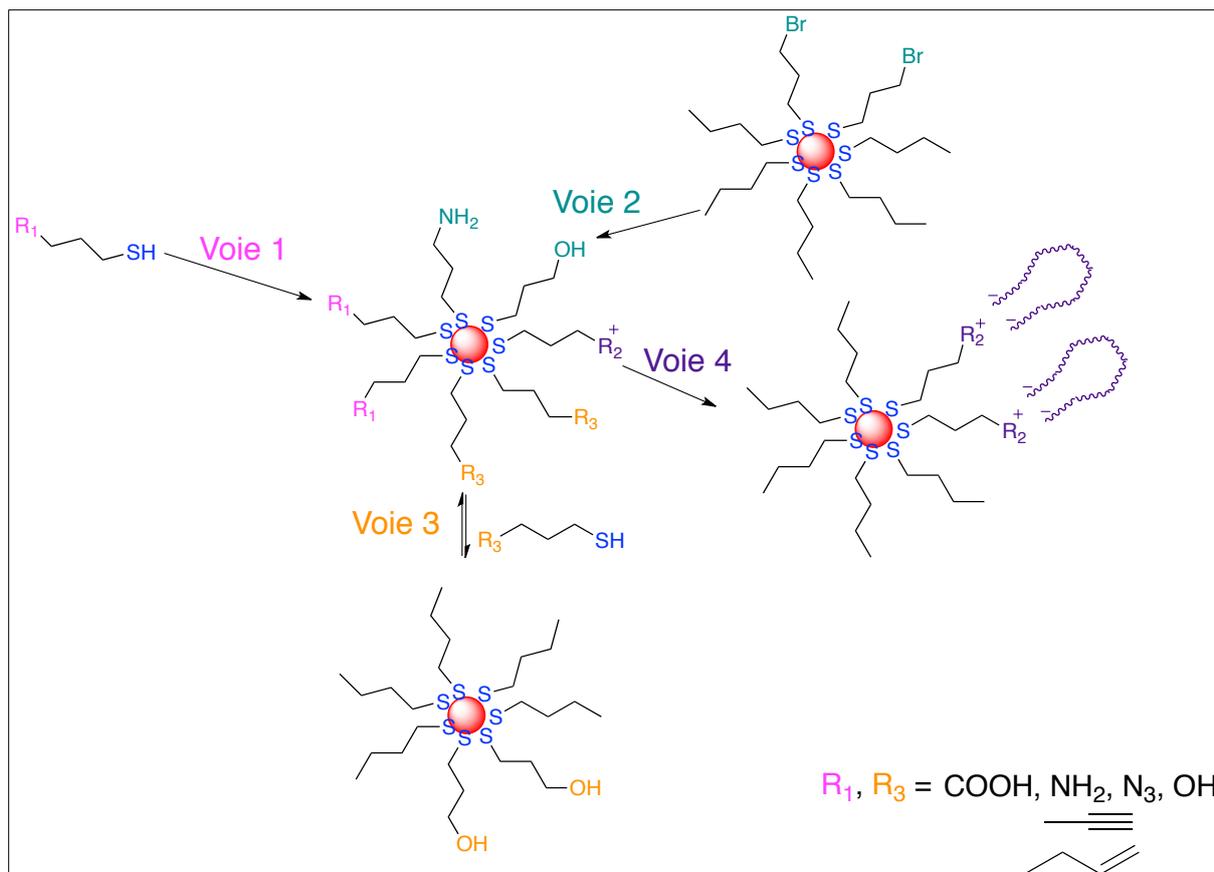


Schéma 25 : Représentation schématique des différentes stratégies de fonctionnalisation de la monocouche de ligands entourant les AuNPs afin de réaliser un couplage avec un composé d'intérêt.

Afin de mettre en œuvre cette bio-fonctionnalisation de la monocouche, le ligand doit être hétérobifonctionnalisé, c'est à dire que les deux extrémités doivent présenter un groupe fonctionnel. L'un de ces groupements doit être une fonction thiol afin de permettre l'adsorption covalente à la surface de la nanoparticule. L'autre fonctionnalité, en position ω et exposée à la périphérie de la nanoparticule, doit permettre de réaliser un couplage covalent tel qu'une réaction de chimie-click, une réaction d'estérification ou encore un couplage peptidique⁽⁹⁹⁾. Cependant, la nature de ce couplage peut également être électrostatique. De plus, en fonction du choix de cette fonctionnalité terminale, des nanostructures hydrosolubles et utilisables au sein de milieux biologiques vont être obtenues. De même, la formation de monocouche mixte avec des ligands arborant des fonctions différentes va permettre de générer des plateformes polyvalentes et multifonctionnelles pouvant associer des capacités de détection et de délivrance d'agent thérapeutique, on parle alors de théranostique.

La première stratégie (voie 1 sur le schéma 25) est directement inspirée de la méthode de Brust-Schiffrin et consiste à synthétiser les AuNPs directement avec le ligand porteur de la fonctionnalité d'intérêt. Cependant, la fonctionnalité en position ω doit être compatible avec les conditions réductrices mises en œuvre au cours de cette synthèse.

Afin d'éviter la dégradation du thio-ligand ω -fonctionnalisé, une stratégie de conversion de la fonction terminale peut être mise en œuvre (voie 2 sur le schéma 25). L'étude de la réactivité des monocouches protectrices de clusters d'or a été réalisée par Templeton et Murray⁽¹⁰⁰⁾ et a montré que cette réactivité dépendait de l'encombrement stérique induit par le ligand à la surface de la nanoparticule d'or.

En effet, la réactivité de plusieurs ligands bromoalcane-thiol vis à vis d'amines primaires plus ou moins encombrées a été évaluée. La conversion de l'halogénure en amine est une réaction de substitution nucléophile de type S_N2 et son rendement dépend à la fois de l'encombrement stérique de l'amine, de la longueur de chaîne du ligand ainsi que, dans le cas d'une monocouche mixte, de la longueur de chaîne des autres ligands non fonctionnalisés.

La conversion du bromoalcane en amino-alcane est quasi totale dans le cas d'une amine peu encombrée comme la n-propylamine puis le rendement diminue avec l'encombrement stérique de l'amine selon l'ordre de réactivité décroissant suivant : n-propylamine > isopropylamine > tertbutylamine. De même, l'efficacité de la réaction augmente avec la longueur de chaîne du ligand ω -bromofonctionnalisé. Cela résulte d'une diminution de l'encombrement stérique induite par la courbure de la nanoparticule. L'existence de ce rayon de courbure induit un gradient décroissant de densité d'occupation au fur et à mesure que l'on s'éloigne du cœur de la nanoparticule vers la périphérie. L'extrémité ω -fonctionnalisée est donc plus disponible pour subir l'attaque du nucléophile. La même raison est évoquée pour expliquer que plus l'environnement stérique du ligand est important, moins celui-ci est accessible et donc moins réactif (schéma 26).

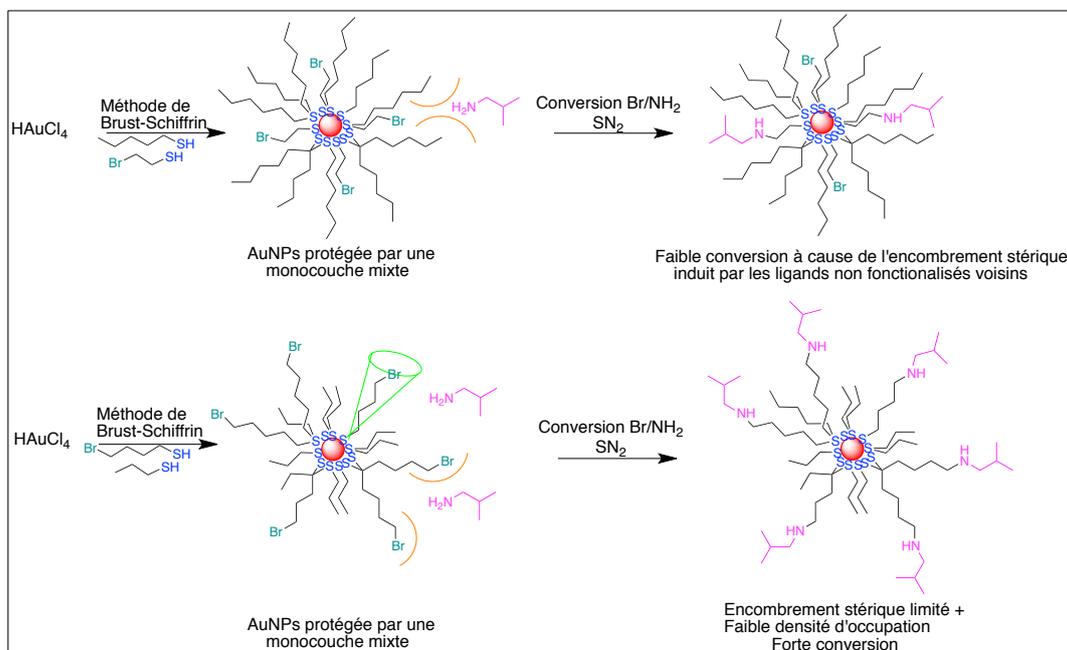


Schéma 26 : Représentation de l'encombrement stérique (en orange) et de la densité d'occupation (en vert) des ligands constitutifs de la monocouche en fonction de la longueur de chaîne et de leurs répercussions sur l'efficacité de la conversion.

Une stratégie d'échange de ligands (voie 3 sur le schéma 25) peut également être mise en œuvre pour fonctionnaliser la monocouche et prévenir toute altération de la fonctionnalisation en position ω . Cette réaction d'échange de ligands obéit aux mêmes contraintes stériques que celles régissant les réactions de conversion. Le taux d'échange dépend à la fois de l'encombrement stérique du ligand initialement présent à la surface de la nanoparticule d'or et de celui d'intérêt. Il est également à noter qu'un ligand disulfure peut être échangé contre un ligand soufré mais que l'inverse n'est jamais observé. D'un point de vue mécanistique, cet échange semble plus consécutif à une adsorption du ligand d'intérêt entraînant une modification des charges de surface qu'à une désorption du ligand initial⁽¹⁰¹⁾⁽¹⁰²⁾.

Enfin, une dernière stratégie (voie 4 sur le schéma 25) exploite l'abondance de groupements fonctionnels fortement ionisés au pH physiologique des composés biologiques comme les protéines ou les oligonucléotides (protonation des amines latérales, groupements carboxylate ou phosphate) pour former des interactions ioniques à la surface de la monocouche.

III-5 PROPRIÉTÉS OPTIQUES ET ÉLECTRONIQUES DES NANOPARTICULES D'OR

La dimension nanométrique de ces matériaux leur confère des propriétés qui ne sont pas retrouvées chez leurs homologues à l'état massif ou moléculaire. En effet, les électrons de conduction des atomes en surface de la nanoparticule possèdent une certaine quantité de mouvement et peuvent alors être assimilés à un gaz. D'après le principe de la dualité onde-corpuscule, ces électrons possèdent une longueur d'onde, appelée longueur d'onde thermique de de Broglie. Dans le cas des nanoparticules, la valeur de la longueur d'onde de de Broglie des électrons de valence est du même ordre de grandeur que la nanoparticule elle-même ce qui induit un effet de confinement quantique responsable des propriétés optiques uniques des nanoparticules.

Ces propriétés sont corrélées à de nombreux facteurs comme la taille et la forme des nanoparticules, mais aussi à la distance entre les particules entre elles et à la nature des monocouches organiques qui entourent la nanoparticule et la stabilisent.

Parmi ces nanomatériaux, les nanoparticules d'or ou AuNPs sont particulièrement étudiées car elles sont stables, facilement obtenues selon des procédés de synthèse permettant de contrôler leur taille et leur forme et aisément fonctionnalisées et conjuguées à des entités très variées ce qui leur confèrent un caractère très polyvalent et des applications potentielles dans de nombreux domaines.

L'une des propriétés les plus largement étudiées et utilisées est la résonance plasmonique de surface qui traduit l'interaction des électrons présents à la surface des nanoparticules avec la lumière incidente. En effet, la couleur rouge-rubis des nanoparticules d'or correspond à une bande d'absorption de la lumière aux alentours de 520-530 nm. Cette absorption résulte de l'oscillation collective et cohérente du nuage électronique présent à la surface de la nanoparticule en présence du champ

électromagnétique induit par la lumière incidente. Ce nuage électronique est constitué par les électrons de conduction de l'orbitale 6s des atomes d'or présents à la surface de la nanoparticule. Ces électrons occupent le niveau d'énergie immédiatement supérieur au niveau énergétique de Fermi. Cette excitation de la lumière entraîne la formation de dipôles électriques à la surface des nanoparticules (figure 29).

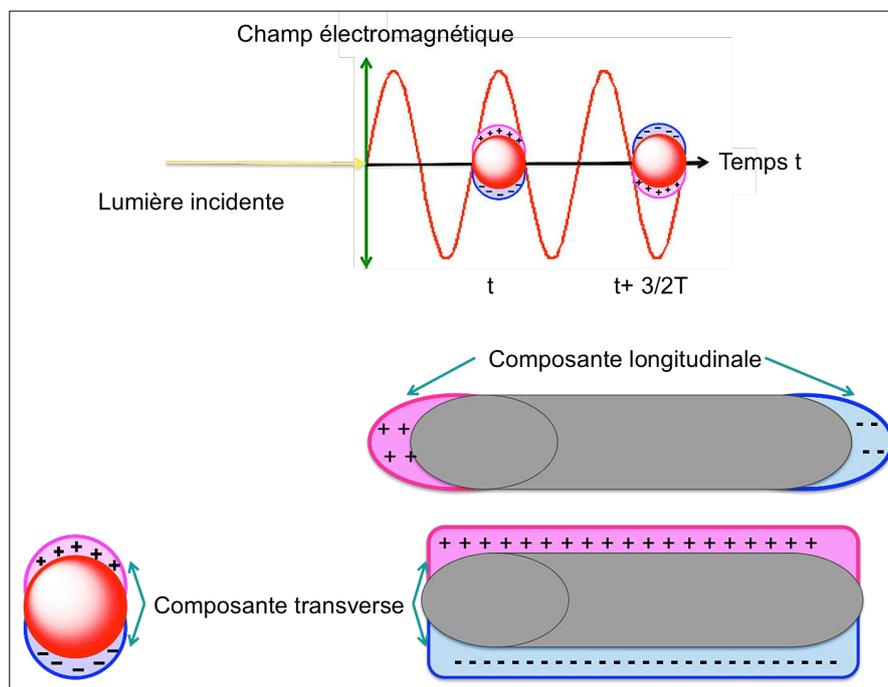


Figure 29 : Représentation du mouvement oscillatoire collectif des électrons de conduction des atomes d'or présents à la surface de la nanoparticule sphérique en présence du champ électromagnétique induit par un faisceau de lumière incidente. Représentation des composantes transverse et longitudinale de l'effet de résonance plasmonique à la surface d'une nanoparticule d'or sphérique et en bâtonnet.

En 1908, la théorie de Mie permet d'apporter une résolution de l'équation de Maxwell et propose que l'absorption et la diffusion plasmonique soit égale à la somme de toutes les oscillations électriques et magnétiques. La position ainsi que la largeur à mi-hauteur de la bande d'absorption plasmonique de surface dépend de la taille et de la forme des AuNPs considérées mais également de la température, de la constante diélectrique du milieu ainsi que de son indice de réfraction. En effet, la formation d'une couche de ligand autour de la nanoparticule entraîne une modification de l'indice de réfraction du milieu et conduit à un déplacement de la bande de plasmon de surface. Par exemple, en présence d'AuNPs de 5,2 nm de diamètre, fonctionnalisées par un ligand dodécane thiol, le milieu voit son indice de réfraction passer de 1,33 à 1,55. Cette modification est corrélée à un déplacement de 8 nm de la bande d'absorption⁽⁶⁰⁾. Ce déplacement de l'absorbance du plasmon de surface est très significatif lorsque la nanoparticule d'or est fonctionnalisée par des ligands soufrés. Ce phénomène résulte de la forte interaction de la fonction thiol avec le nuage électronique de surface et est un bon indicateur de la fonctionnalisation d'une nanoparticule d'or via la formation d'une liaison covalente Au-S.

Les travaux de Turkevich sur la synthèse des AuNPs en présence de citrate de sodium ont permis de mettre en exergue la corrélation entre le diamètre des nanoparticules et la valeur de la longueur d'onde pour laquelle l'absorbance plasmonique de surface est maximale⁽⁷²⁾.

Ainsi, une simple analyse spectrale UV-Visible permet de caractériser non seulement la taille et la forme des AuNPs synthétisées mais également de vérifier l'efficacité d'une fonctionnalisation via la formation d'une liaison covalente Au-S.

La capacité des électrons de conduction présents à la surface de la nanoparticule à former des dipôles sous l'action du champ électromagnétique de la lumière incidente peut également être mise en évidence dans le phénomène de FRET⁽¹⁰³⁾ ou Transfert d'Énergie de Fluorescence par Résonance décrit pour la première fois par Theodor Förster en 1946. Il s'agit d'un transfert d'énergie sans émission de lumière résultant d'une interaction dipôle-dipôle entre une molécule « donneur d'énergie » et une molécule « accepteur d'énergie ». Dans le cas des AuNPs fonctionnalisées avec des ligands arborant des sondes fluorescentes comme le pyrenyl, le fluorenyl ou le polyoctylthiophenyl, une neutralisation de l'émission de fluorescence peut être observée⁽¹⁰⁴⁾ (figure 30).

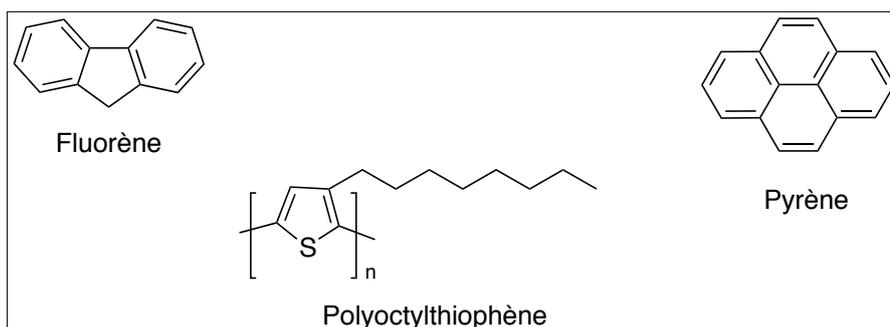


Figure 30 : Structures chimiques de quelques fluorophores fréquemment couplés à des AuNPs.

Le fluorophore joue le rôle de donneur d'énergie et les électrons de conduction des atomes d'or en surface de la nanoparticule constituent les accepteurs. Néanmoins, ce quenching de fluorescence nécessite une correspondance énergétique entre le donneur et l'accepteur. En pratique, il faut que le spectre d'émission de fluorescence du donneur soit en chevauchement avec le spectre d'absorbance de l'accepteur. Dans le cas des AuNPs, des fluorophores présentant une longueur d'onde d'émission vers 520-530 nm verront leur fluorescence neutralisée. Cependant, d'autres facteurs influencent le phénomène de FRET, notamment la taille et la forme des AuNPs mais également la distance entre la sonde fluorescente et la surface de la nanoparticule d'or⁽⁶⁰⁾⁽⁸⁹⁾.

III-6 APPLICATIONS DES NANOPARTICULES D'OR AU BIOSENSING

Les nanoparticules d'or constituent des éléments de biosensing très attractifs grâce à leurs propriétés optiques et électroniques mais aussi grâce à leur facilité d'obtention et de fonctionnalisation. Ainsi, de nombreux systèmes de détection ont été développés en insérant des motifs de reconnaissance moléculaire tels que des aptamères ou des anticorps à la surface ces nanoparticules. Les propriétés de résonance plasmonique de surface, de conductivité, d'activité rédox ou de stabilité colloïdale des suspensions de nanoparticules d'or bio-fonctionnalisées peuvent servir à la transduction de l'interaction du ligand avec sa cible⁽¹⁰⁵⁾.

En effet, la corrélation existant entre la coloration d'une suspension colloïdale de nanoparticules d'or et le niveau d'agrégation des particules qui la composent a permis le développement de système de sensing colorimétrique⁽¹⁰⁶⁾. La coloration rouge vin d'une solution de AuNPs traduit un état nanoparticulaire non aggloméré alors qu'une coloration violette est évocatrice d'une agrégation et/ou d'une isotropie de forme.

La fonctionnalisation des AuNPs avec des aptamères permet de modifier l'environnement à la surface de la nanoparticule d'or et donc de modifier la stabilité de la solution colloïdale. Cette modification de l'environnement est la résultante du repliement de l'aptamère en présence de sa cible. Ce brusque changement de la conformation tridimensionnelle du ligand en présence de sa cible induit une évolution de l'espace stérique et électronique en surface ce qui modifie les forces attractives et répulsives inter-particulaires. En fonction de la résultante de ces forces, la modification structurale de la monocouche de ligands à la surface de la nanoparticule confère une stabilité accrue ou au contraire défavorise la stabilité du colloïde.

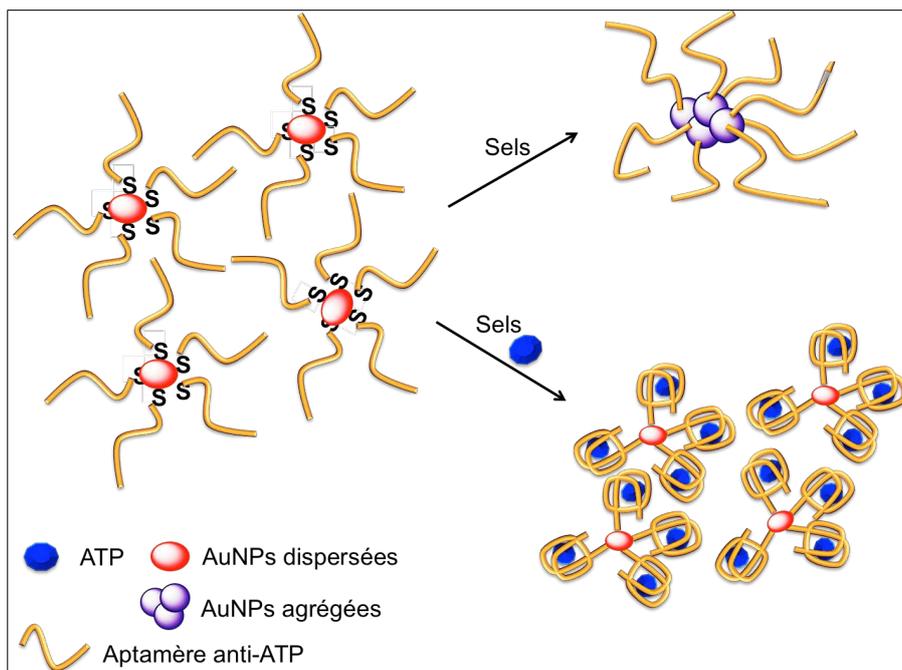


Schéma 27 : Détection colorimétrique de l'ATP urinaire utilisant la différence de stabilité de la solution colloïdale en fonction de l'organisation structurale des ligands présents à la surface des AuNPs.

Chang⁽¹⁰⁷⁾ et ses collaborateurs ont utilisé ce principe pour développer un système de biosensing capable de détecter la présence d'adénosine triphosphate (ATP) dans les urines. Des AuNPs de 13 nm de diamètre ont été fonctionnalisées avec des aptamères sélectionnés pour se fixer sélectivement sur l'ATP via une liaison covalente Au-S. En l'absence de cible, ces aptamères sont disposés de façon aléatoire et non organisée à la surface de la nanoparticule. Ce complexe est alors mis en présence de fortes concentrations salines ce qui aboutit à l'agrégation des AuNPs et à une modification de la coloration de la solution colloïdale. En revanche, la présence d'ATP induit une modification de la conformation de l'aptamère qui adopte une structure tridimensionnelle en G-Quadruplex pour pouvoir interagir avec sa cible. Ce repliement provoque une modification de l'environnement électronique à la surface de la nanoparticule qui devient alors stable même en présence de concentrations salines importante (schéma 27).

Des systèmes de biosensing colorimétriques utilisant la modification structurale d'un aptamère fixé à une nanoparticule d'or ont été développés pour la détection d'un grand nombre d'analytes comme l'adénosine, la cocaïne mais aussi pour la détection d'espèces ioniques comme les ions mercure Hg^{2+} , potassium K^+ ou encore le plomb Pb^{2+} ⁽¹⁰⁸⁾.

L'existence du phénomène de résonance plasmonique à la surface des nanoparticules d'or permet d'élaborer des systèmes de quenching de fluorescence par fonctionnalisation de ces dernières avec des ligands de reconnaissance couplés à des fluorophores. L'utilisation d'aptamères est particulièrement efficace pour ce type de stratégie. En effet, la reconnaissance de la cible par l'aptamère va entraîner une profonde modification conformationnelle ce qui induit une variation de la distance entre le fluorophore et la surface de la nanoparticule et donc la restauration de la fluorescence.

Wang et Zhao⁽¹⁰⁹⁾ ont proposé différents systèmes de détection de la thrombine par fonctionnalisation des AuNPs avec des aptamères préalablement couplés à un fluorophore dérivé de la rhodamine (schéma 28). Des AuNPs sont fonctionnalisées par des aptamères associés en duplex mais seul l'un des deux brins est immobilisé à la surface de la nanoparticule via une liaison covalente Au-S. La séquence complémentaire non immobilisée est couplée à un fluorophore. En l'absence de cible, la structure duplex est stable et le fluorophore est maintenu à proximité de la surface de la nanoparticule d'or ce qui inhibe l'émission de fluorescence par effet FRET. Lors de l'introduction de la cible, la structure duplex est détruite car l'affinité de l'aptamère pour la thrombine est supérieure à celle pour le brin complémentaire. Il en résulte une libération de la séquence fluoro-marquée non immobilisée à la surface de la nanoparticule ainsi que la restauration du signal fluorescent (schéma 28 A et B). Cependant, l'aptamère antithrombine fonctionnalisé avec de la rhodamine peut également venir s'adsorber à la surface de la nanoparticule via des interactions électrostatiques faibles ce qui entraîne une extinction de la fluorescence. En présence de la cible, la haute affinité de l'aptamère

pour la thrombine induit sa désorption, la distance entre le fluorophore et la surface de la nanoparticule d'or augmente et l'inhibition de fluorescence est levée (schéma 28).

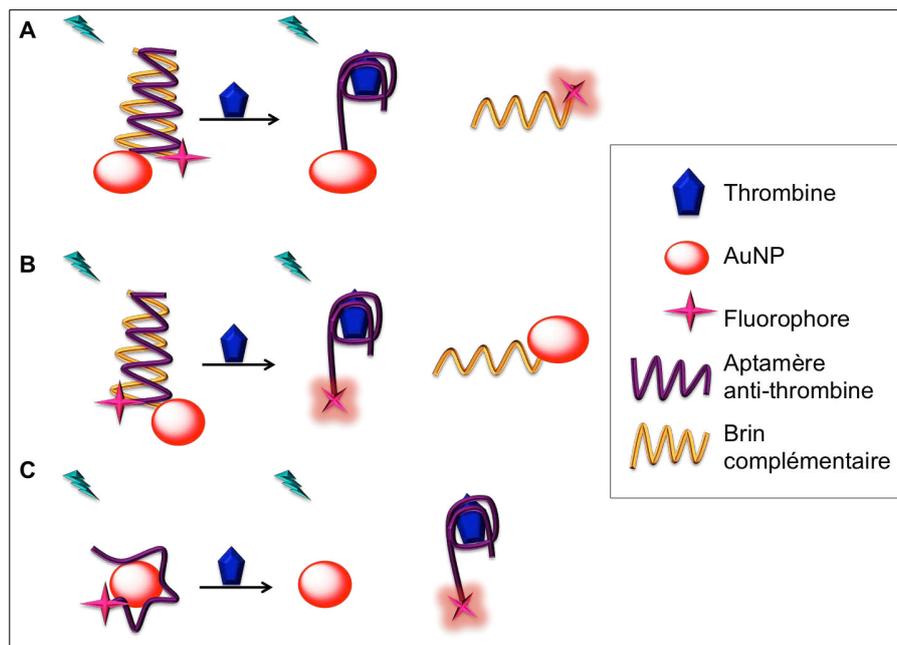


Schéma 28 : Représentation de trois stratégies de détection de la thrombine à partir d'aptamères fonctionnalisés avec une sonde fluorescente et fixés à la surface de nanoparticules d'or. L'introduction de la cible induit une profonde modification de la conformation de l'aptamère ce qui entraîne une dissociation du duplex (A et B) ou une désorption de l'aptamère (C). Il en résulte un accroissement de la distance entre le fluorophore et la surface de la nanoparticule ce qui permet de restaurer la fluorescence.

Les applications potentielles du quenching de fluorescence induit par la proximité entre un fluorophore et la surface des nanoparticules d'or ne se limitent pas à la fonctionnalisation des AuNPS par des aptamères. En effet, Cui et son équipe ont développé un test immunologique permettant la détection de l' α -foetoprotéine (AFP)⁽¹¹⁰⁾. Il s'agit d'un système sandwich faisant intervenir des Ac anti-AFP immobilisés à la surface de particules magnétiques ainsi que des Ac anti-AFP immobilisés à la surface de nanoparticules d'or. Les Ac immobilisés sur les billes magnétiques sont des motifs de capture. Au contraire, les Ac immobilisés à la surface des AuNPs sont les motifs de reconnaissance et de transduction du signal (schéma 29). La fraction non liée des Ac couplés aux AuNPs est alors incubée en présence de fluorescéine isothiocyanate et un quenching de fluorescence est observé. L'importance de ce quenching est inversement proportionnelle à la quantité d' α -foetoprotéine présente dans l'échantillon d'étude. L'utilisation de particules magnétiques permet de faciliter les étapes de séparation des fractions libres et liées.

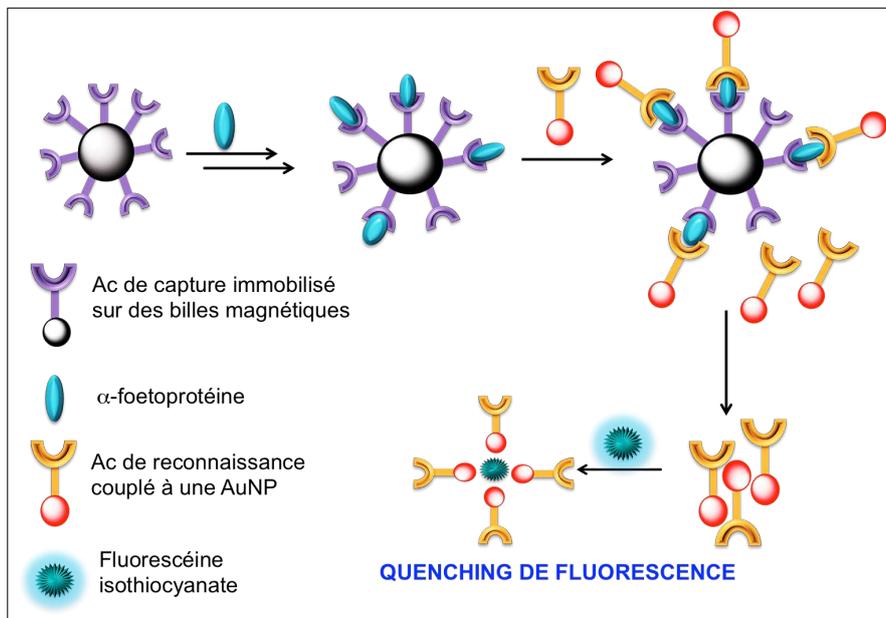


Schéma 29 : Représentation schématique d'un test immunologique de reconnaissance de l'AFP utilisant les propriétés de quenching d'un fluorophore induit par sa proximité avec la surface de AuNPs.

Les propriétés électrochimiques des AuNPs, notamment leur conductivité et leur activité rédox, sont également mises à profit pour l'élaboration de système de biodétection⁽¹¹¹⁾.

Ainsi, Das et Yang⁽¹¹²⁾ ont élaboré un système permettant une détection de l'antigène spécifique de la prostate (PSA) en utilisant les propriétés rédox des nanoparticules d'or comme amplificateur du signal de transduction. Des Ac anti-PSA ont été immobilisés à la surface d'une électrode d'indium et d'oxyde d'étain par l'intermédiaire de molécules dendritiques de ferrocène. Ces Ac permettaient la capture du PSA cible ainsi que son immobilisation à la surface de l'électrode. L'ajout d'Ac secondaires anti-PSA conjugués à la surface de nanoparticules d'or permettait de piéger la cible selon une technique sandwich. Enfin, la transduction du signal était assurée par l'introduction de nitrophénol qui était réduit en aminophénol à la surface des nanoparticules d'or. Les molécules d'aminophénol ainsi formées étaient ensuite oxydées en iminoquinone par le ferrocène de l'électrode. Le transfert des électrons impliqués dans ces réactions d'oxydoréduction a entraîné la génération d'un courant électrique mesurable par voltampérométrie cyclique. Cette technique a permis une détection ultrasensible du PSA de l'ordre du fg/mL.

III-7 CONCLUSION

L'amélioration de la sensibilité des systèmes de reconnaissance est l'un des objectifs majeurs de la prise en charge des pathologies cancéreuses. En effet, les concentrations des marqueurs tumoraux au sein des milieux biologiques sont corrélées positivement avec l'importance du développement de la pathologie. Or l'élaboration d'outils diagnostiques dont la sensibilité est accrue permet une détection précoce de ces marqueurs et participe à l'amélioration du pronostic du patient.

Nous avons vu précédemment que les systèmes immunologiques et nucléotidiques constituaient d'excellents outils moléculaires pour la reconnaissance spécifique d'une cible donnée. De plus, la fonctionnalisation de ces biosenseurs avec un motif reporteur tel qu'un radioisotope, un fluorophore ou une enzyme permet de traduire l'interaction entre le ligand de reconnaissance et sa cible en un signal physique facilement mesurable. Le couplage de ces motifs de reconnaissance à des structures capables d'amplifier le signal généré et donc d'améliorer la sensibilité du dispositif semble particulièrement attractif. Les nanoparticules d'or constituent des outils particulièrement intéressants dans la mise au point de stratégie d'amplification d'un signal.

Ces nanoparticules d'or sont des structures polyatomiques stables formées par l'agencement organisé d'atomes d'or métallique au degré d'oxydation Au^0 . L'échelle nanométrique de ces particules leur confère des propriétés physiques uniques qui découlent de l'effet de résonance plasmonique de surface.

En effet, les électrons de conduction des atomes d'or en surface de la nanoparticule interagissent avec le rayonnement électromagnétique de la lumière incidente et oscillent pour former des dipôles électriques. La polarisation de ces nuages électroniques s'organise en deux composantes : une composante transverse et une composante longitudinale.

L'interaction avec la lumière incidente provoque une excitation de ces électrons de valence résultant de l'absorption d'une partie des photons du rayonnement incident. L'énergie des photons pouvant être absorbés par les électrons en surface de la nanoparticule dépend de la taille et de la forme de la particule.

De plus, les électrons de surface sont également capables d'absorber les radiations de fluorescence émises par une sonde fluorescence lorsque celle-ci est à proximité de la surface de la nanoparticule. Cet effet FRET est largement mis à profit pour la génération de systèmes de détection fluorométriques utilisant la fluctuation entre quenching et restauration de fluorescence induite par la présence de la cible.

De nombreuses stratégies de synthèse ont été développées pour obtenir des populations de nanoparticules d'or homogènes en taille et en forme. De plus ces nanoparticules peuvent être très aisément associées à des biomolécules via la formation

d'une monocouche auto-assemblée de ligands. La modification de la surface des nanoparticules par ces ligands est facilitée par la grande affinité entre les atomes d'or et de soufre. De plus, la fonctionnalisation de l'extrémité terminale des ligands de la monocouche permet la mise en œuvre de réactions de couplage très variées.

L'importance du ratio Surface/Volume des nanoparticules d'or ainsi que leur effet de résonance plasmonique de surface associé aux propriétés colorimétriques, spectrales et électrochimiques qui en découlent sont des caractéristiques extrêmement attractives pour le développement de nouveaux systèmes de biosensing sensibles et spécifiques.

Chapitre IV : APPLICATION À L'ÉPIGÉNÉTIQUE

IV-1 QU'EST-CE QUE L'ÉPIGÉNÉTIQUE

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique d'un être vivant. Chez les organismes eucaryotes, cette molécule d'ADN est localisée au sein d'organites intracellulaires tels que les mitochondries ou dans le noyau sous forme de chromosomes. Au sein de la structure chromosomique, cette information génétique s'organise en unité fonctionnelle d'information génétique appelée gène.

Chez les eucaryotes, toutes les cellules constitutives de l'organisme renferment la même molécule d'ADN. Cette molécule est copiée à l'identique par réplication lors de la phase S du cycle cellulaire. Cependant, les études d'embryogénèse et de différenciation cellulaire ont montré qu'à partir d'un matériel génétique commun, les cellules eucaryotes exprimaient des protéines différentes et/ou à des concentrations variables et se différenciaient les unes des autres par leur spécificité fonctionnelle.

Cela signifie qu'au sein d'une cellule, seuls certains gènes spécifiques doivent être exprimés. Cette constatation implique l'existence de mécanismes de régulation capables de reconnaître et de réprimer les processus de transcription des gènes. Ce phénomène d'expression différentielle du génome permet aux cellules de se développer en acquérant une spécialisation fonctionnelle et participe ainsi à la construction d'organismes supérieurs dotés d'un haut niveau de complexité.

En 1942, Conrad Waddington⁽¹¹³⁾ a proposé le terme « épigénétique » pour désigner la relation entre un génotype déterminé et la plasticité des phénotypes qui peuvent lui être associés. Étymologiquement, ce terme est construit à partir du préfixe grec « epi » qui signifie « au-dessus » et de « genetikós » qui signifie « propre à la génération ».

Ce terme a ensuite été repris par Nanney⁽¹¹⁴⁾ en 1958 afin de distinguer deux systèmes intervenant dans le contrôle cellulaire. Le premier correspondait aux composantes génétiques responsables du maintien et de la transmission de la librairie de gènes via des mécanismes réplicatifs. Au second, qualifié de composante épigénétique, était associé des mécanismes auxiliaires contrôlant l'expression de gènes spécifiques. De plus, la définition de Nanney faisait également intervenir un caractère héréditaire de ces différents états d'expression génique.

En 1994, Holliday⁽¹¹⁵⁾ a proposé de définir l'épigénétique comme étant « l'étude des changements de l'expression des gènes survenant chez des organismes à cellules différenciées et l'étude de l'hérédité mitotique de ces états d'expression génique ». De plus il a émis l'hypothèse que cette expression génique différentielle « possède une hérédité nucléaire qui ne repose pas sur des différences au niveau de la séquence d'ADN ».

IV-2 LES DIFFÉRENTS NIVEAUX D'EXPRESSION ÉPIGÉNÉTIQUE CHEZ LES EUCARYOTES

L'acquisition d'un nouvel état épigénétique est le résultat de la reconnaissance et de l'intégration de trois signaux distincts :

- L'épigénateur qui correspond à une modification de l'environnement extracellulaire nécessitant une réponse métabolique adaptative pour assurer la survie de l'organisme.
- L'initiateur épigénétique qui est généré en réponse à l'épigénateur et qui détermine la région chromosomique où doit s'exercer l'expression génique différentielle.
- Les éditeurs épigénétiques qui maintiennent, au cours des générations cellulaires successives, la chromatine préalablement ciblée par l'initiateur dans un état structurel permettant le contrôle adéquat de l'expression des gènes.

Nous allons essentiellement nous intéresser aux éditeurs épigénétiques qui peuvent s'exprimer via deux voies moléculaires et qui interviennent essentiellement au décours de l'étape de transcription de l'ADN en ARNm :

- La méthylation de l'ADN
- Les modifications post-traductionnelles des protéines histones

Afin de comprendre l'implication de ces éditeurs épigénétiques dans le contrôle de l'expression des gènes, une brève introduction sera consacrée au processus de transcription de l'ADN en ARN.

IV-2-1 LA TRANSCRIPTION DE L'ADN EN ARNm

L'expression des gènes se déroule en deux grandes étapes : une étape de transcription de l'ADN en ARN messager et une étape de traduction de cet ARNm en protéines.

Cette étape de transcription correspond à la synthèse d'un brin d'ARN à partir d'un brin d'ADN servant de brin matrice et nécessite la présence de plusieurs effecteurs. Elle se décompose en trois phases : initiation, élongation et terminaison (schéma 30).

La phase d'initiation correspond à la fixation de l'enzyme ARN polymérase sur la double hélice de l'ADN. Cette fixation le long de la séquence nucléotidique n'est pas aléatoire et est dirigée par la présence de séquences reconnues par l'enzyme. Ces séquences sont appelées promoteurs et sont situées en amont de la zone de transcription. Chez les eucaryotes, la reconnaissance de cette séquence promoteur par l'ARN polymérase est facilitée par la présence de protéines qualifiées de facteurs de transcription et qui servent d'intermédiaires pour la fixation de l'enzyme sur l'unité de transcription. Le système formé par l'association de l'ARN polymérase avec les facteurs de transcription est qualifié de complexe d'initiation de la transcription. Ce complexe garantit la bonne position ainsi que l'orientation correcte de l'ARN polymérase le long du brin matrice.

Après s'être positionnée sur le brin matrice, l'ARN polymérase déroule localement la double hélice ce qui lui permet de progresser le long du brin matrice et de synthétiser le transcrit d'ARN. Cette synthèse s'effectue dans le sens 5' vers 3' en respectant l'appariement des bases selon les règles de Watson et Crick⁽²¹⁾.

L'élongation du brin d'ARN se poursuit jusqu'à ce que l'ARN polymérase rencontre un motif de terminaison. Chez les eucaryotes ce motif de terminaison est une séquence de poly-adénylation qui entraîne la dissociation du complexe formé par l'ARN polymérase et les facteurs de transcription. Le transcrit d'ARN est alors libéré.

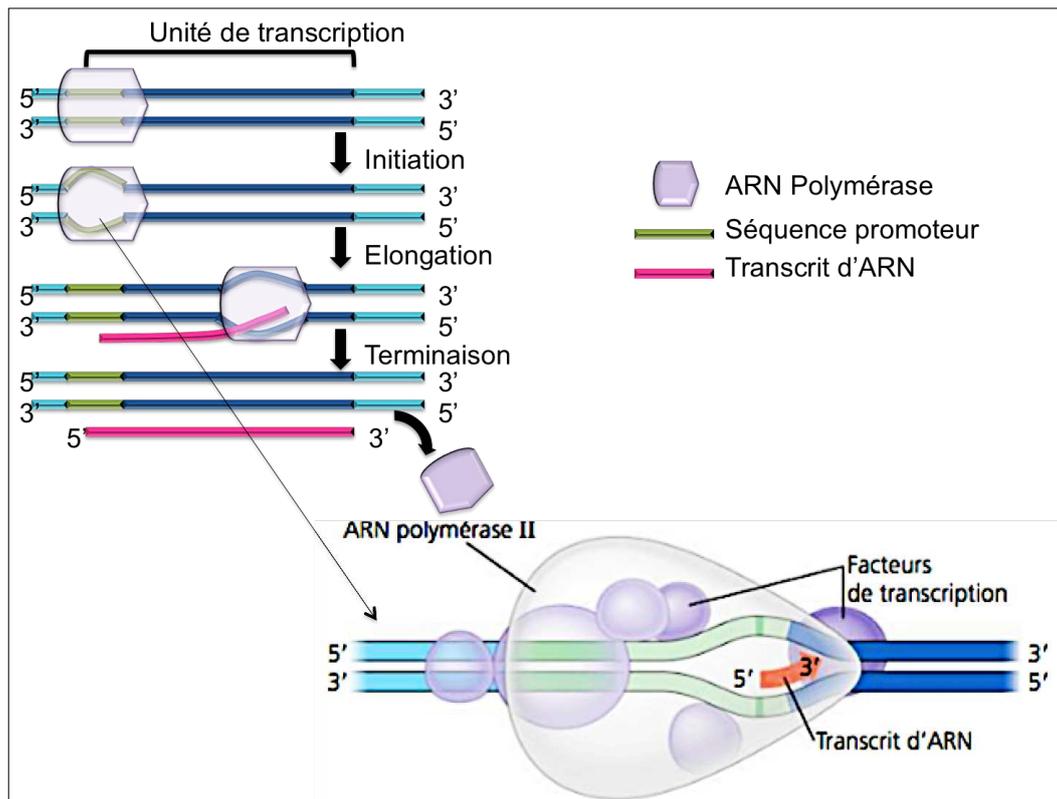


Schéma 30 : Représentation simplifiée des phases d'initiation, d'élongation et de terminaison qui se succèdent lors du processus de transcription de l'ADN en ARNm.

Un même gène peut être transcrit en simultanée par plusieurs complexes de transcription. Cette « transcription en chaîne » permet d'obtenir un grand nombre de molécules d'ARN qui, après maturation, seront traduites en protéines⁽²²⁾.

IV-2-2 LA MÉTHYLATION DE L'ADN

La transcription d'un gène dépend de la reconnaissance de la séquence promoteur par le complexe d'initiation de transcription. Cependant cette reconnaissance peut être altérée par des modifications chimiques intervenant au niveau des bases azotées constitutives du promoteur. La modification la plus fréquemment rencontrée est la méthylation des résidus cytosine en position 5 sous l'action d'une ADN-méthyltransférase (schéma 31).

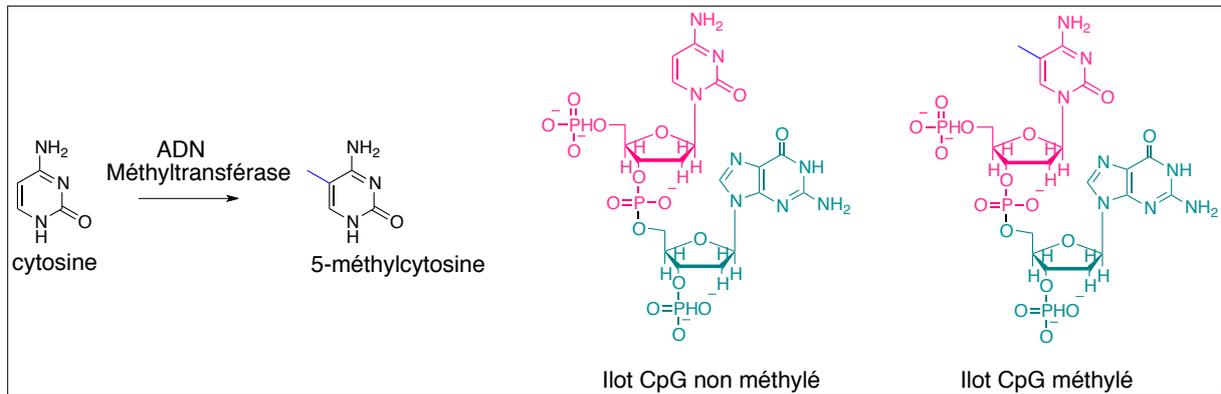


Schéma 31 : Représentation de la structure de la cytosine et de son dérivé méthylé, seul et au sein de la structure 5'-CpG-3'.

Cette méthylation de la cytosine s'effectue au niveau de séquences nucléotidiques riches en motifs 5'-CpG-3'. Ce motif 5'-CpG-3' correspond à la formation d'une liaison phosphodiester entre la position 3' d'un résidu cytosine et la position 5' d'un résidu guanine. Une proportion variant de 60% à 90% de ces motifs CpG rencontrés au sein des cellules somatiques eucaryotes sont méthylés. Ces motifs, qu'ils soient ou non méthylés, sont disséminés aléatoirement au sein du génome mais peuvent également se regrouper afin de former des îlots CpG.

Beaucoup de ces îlots sont retrouvés au niveau des régions promotrices de la transcription des gènes. La région promotrice des gènes majeurs exprimés chez la plupart des cellules possède des îlots CpG dans un état non méthylé. Au contraire, la méthylation des îlots CpG constitutifs du promoteur est corrélée à une répression de l'expression du gène concerné⁽¹¹⁶⁾.

Nous avons vu précédemment que l'initiation de la transcription nécessitait la reconnaissance d'un promoteur par des facteurs de transcription qui servaient d'intermédiaire pour la fixation de l'ARN polymérase. Ces facteurs de transcription sont des protéines possédant un domaine de reconnaissance et de fixation du motif CpG non méthylé présent au sein du promoteur. La méthylation de la cytosine en position 5 modifie l'exposition de la cytosine et diminue l'accessibilité de cette base vis à vis du site de fixation des protéines⁽¹¹⁷⁾.

Cependant, la diminution de l'affinité de la séquence promotrice pour les facteurs de transcription n'est pas le seul mécanisme par lequel la méthylation de l'ADN régule l'expression des gènes. Des îlots CpG fortement méthylés sont rencontrés au niveau des régions centromériques et télomériques des chromosomes. Ces régions chromosomiques ne sont pas transcrites en ARNm car elles sont constituées de chromatine extrêmement condensée ce qui les rend inaccessibles à la machinerie de transcription. En effet, la présence d'îlots CpG méthylés (mCpG) attire des protéines présentant un domaine de fixation des motifs mCpG. L'interaction entre ces protéines et l'ADN méthylé induit le recrutement de complexes de répression qui provoque des modifications de protéines impliquées dans la structure et le degré de condensation de l'ADN au sein des chromosomes⁽¹¹⁸⁾.

IV-2-3 LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES

IV-2-3-1 CONDENSATION DE L'ADN ET RÔLE DES HISTONES

Chez les organismes eucaryotes, la double hélice d'ADN est localisée dans le noyau où elle s'organise en chromosomes (46 chromosomes pour les cellules somatiques et 23 chromosomes pour les gamètes). Ces chromosomes sont des structures complexes constituées d'ADN et de protéines en interaction. Ce complexe ADN/protéine est appelé chromatine.

Cette chromatine est indispensable pour assurer la localisation nucléaire de l'information génétique. En effet, le génome humain est constitué de près de 3,4 milliards de paires de bases. Si celles-ci étaient mises bout à bout, une molécule d'ADN de plus de 2 mètres de long serait obtenue ce qui est incompatible avec la taille du noyau d'une cellule (5 μm de diamètre).

L'organisation du chromosome en chromatide permet d'accéder à des états de condensation extrême par enroulement et surenroulement de l'ADN autour de protéines structurales appelées histones (figure 31).

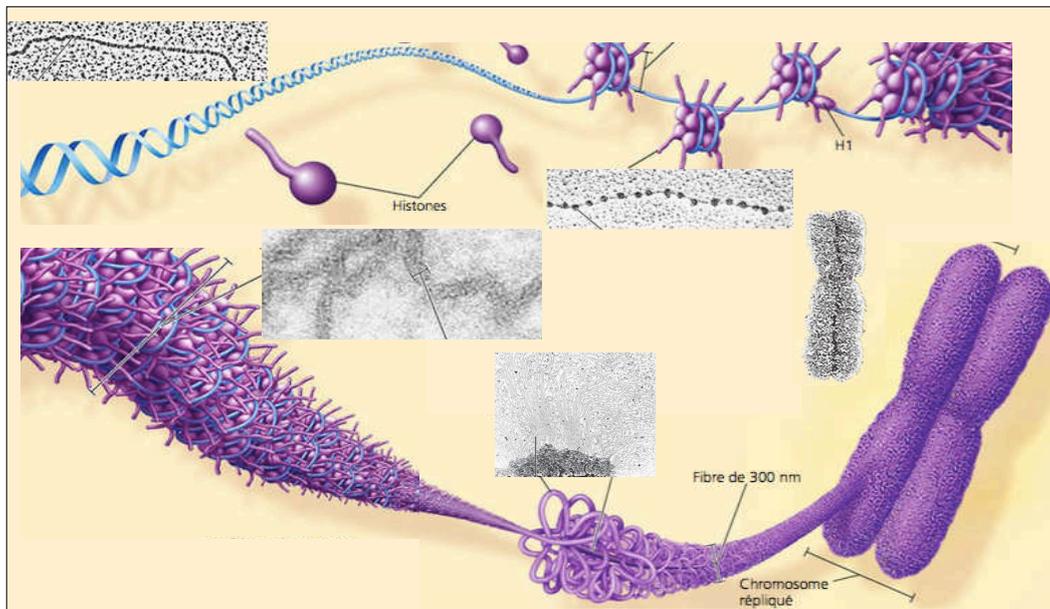


Figure 31 : Représentation des différents états de condensation et de surenroulement de l'ADN depuis la structure en double hélice jusqu'au chromosome. Illustration issue de la référence (22).

Ces histones sont des petites protéines constituées d'une centaine d'acides aminés. Leurs séquences peptidiques sont riches en résidus lysine et arginine. Ces acides aminés sont chargés positivement au pH physiologique ce qui leur permet d'interagir fortement avec les groupements phosphates de l'ADN via des liaisons ioniques (figure 32).

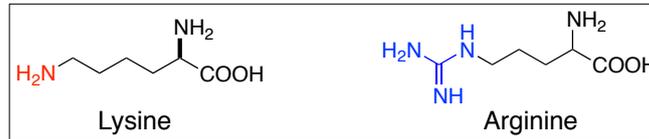


Figure 32 : Structure de la lysine et de l'arginine avec respectivement en rouge le groupement amine de la lysine et en bleu le groupement guanidine de l'arginine qui sont protonés au pH physiologique.

Il existe cinq grands types d'histones : H1, H2A, H2B, H3 et H4.

Les histones H2 à H4 interviennent dans la première étape de condensation de l'ADN qui correspond à la structure en collier de perles dont l'unité structurale de base est le nucléosome. Cette structure en collier de perles présente un diamètre de 10 nm et résulte de l'enroulement de l'ADN autour du cœur du nucléosome formé par deux molécules de chacune des histones qui forment ainsi un octamère (figure 33).

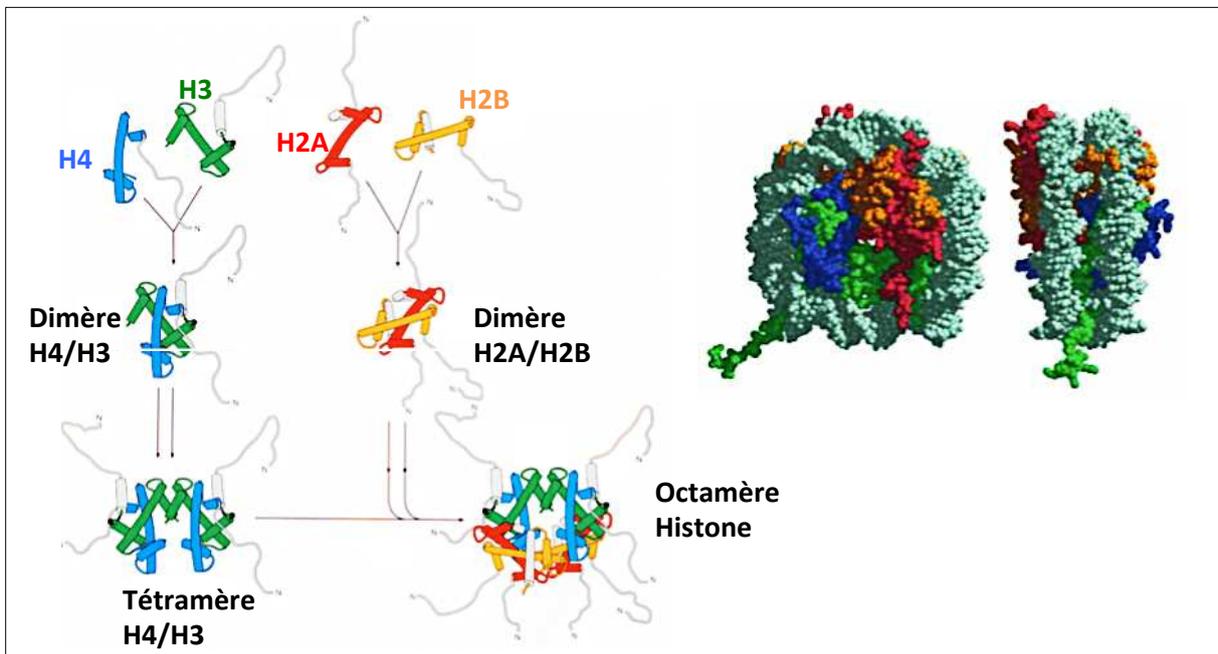


Figure 33 : A gauche) Représentation schématique de l'association des histones H2A, H2B, H3 et H4 deux à deux pour former la structure octamérique du cœur du nucléosome autour duquel va venir s'enrouler l'ADN chromosomique ; A droite) Modélisation d'un nucléosome obtenu après cristallographie. Illustrations issues de la référence(119).

L'extrémité N-terminale de chaque protéine histone est tournée vers l'extérieur du nucléosome et intervient dans le deuxième degré de condensation correspondant à la formation de la fibre de 30 nm de diamètre. Cette fibre résulte des interactions entre des nucléosomes voisins, l'ADN internucléosomique et la queue des histones. Il s'agit d'un surenroulement de la structure en collier de perle. L'histone H1 intervient à ce stade afin de stabiliser la nouvelle structure ainsi obtenue.

Le surenroulement de cette fibre de 30 nm sur elle-même aboutit à la formation de domaines en boucles de 300 nm de diamètre qui sont également stabilisés par l'histone H1. Le repliement de ces domaines en boucles débouche sur la formation d'une structure extrêmement condensée et d'un diamètre moyen de 700 nm, c'est la chromatine du chromosome.

Les études de microscopies photonique et électronique montrent que le degré de condensation de la chromatine varie fortement au décours du cycle cellulaire en fonction de la phase considérée (figure 34). Durant l'interphase, la chromatine présente un état relâché alors que son niveau de compaction s'intensifie de plus en plus au fur et à mesure du déroulement de la mitose et atteint son maximum en métaphase.

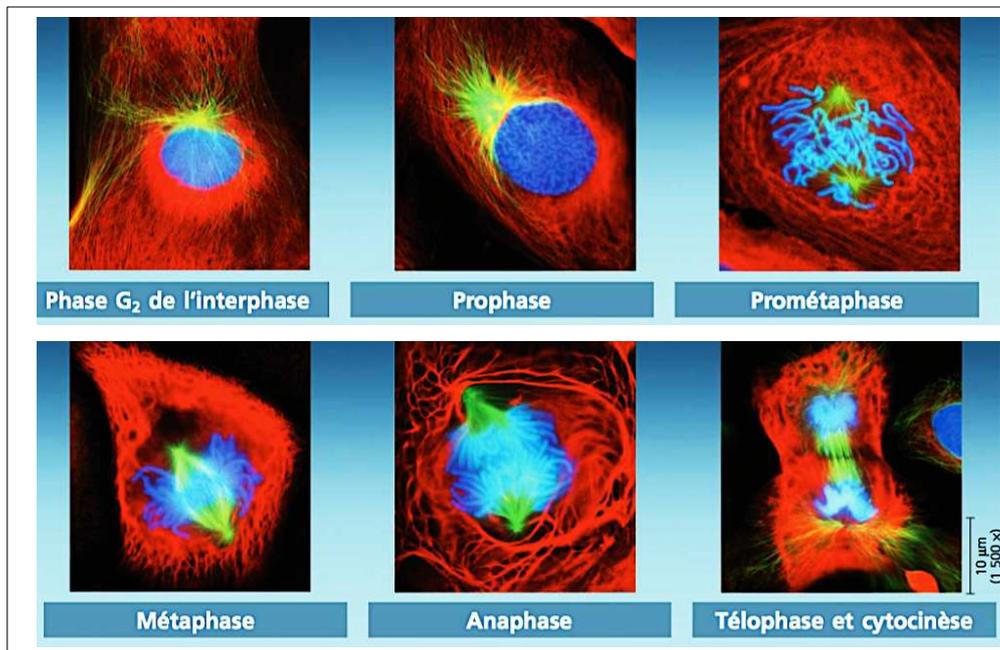


Figure 34 : Micrographies photoniques montrant les différents niveaux de condensation de la chromatine lors des étapes de la mitose. Illustrations issues de la référence (22).

Cet état de relâchement de la chromatine peut être corrélé avec la nécessité d'une disponibilité dynamique de l'ADN lors de l'interphase. En effet, cette étape correspond à la réplication de l'ADN et implique la progression du complexe de réplication le long de la double hélice. De même, il est intéressant de noter que l'étape de transcription de l'ADN en ARN nécessite également une chromatine décondensée afin de permettre la fixation du complexe d'initiation de la transcription ainsi que son cheminement le long du brin matrice.

Pourtant, même pendant l'interphase, 10% du matériel chromosomique reste sous forme de chromatine hautement condensée. L'existence de ces structures a permis de différencier deux types de chromatine :

- La chromatine vraie ou euchromatine dont l'organisation relâchée permet l'interaction avec les différents effecteurs de la réplication et de la transcription.
- L'hétérochromatine, hautement condensée, qui est inaccessible aux structures moléculaires gouvernant l'expression génique.

Le chromosome est une structure dynamique grâce à sa capacité à moduler le degré de condensation de la chromatine ce qui lui permet d'interagir de façon ordonnée et contrôlée avec les différents facteurs impliqués dans l'expression des gènes, la mitose et la méiose. Cette variation du niveau de surenroulement de la chromatine est sous la dépendance des protéines structurales constitutives du nucléosome, les histones.

IV-2-3-2 LES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES HISTONES...

Les histones, comme la plupart des protéines, vont subir des modifications post-traductionnelles (MPT). Celles-ci sont réversibles et correspondent à l'addition de groupements fonctionnels tels que des phosphates, des méthyles, des acétyles, des crotonyles ou encore le couplage avec l'ubiquitine ou une molécule ubiquitine-like...

Ces MPT peuvent affecter les acides aminés basiques, tels que la lysine et l'arginine, situés au niveau de l'extrémité N-terminale de l'histone, orientée à l'extérieur du nucléosome. Cette fonctionnalisation de l'extrémité N-terminale entraîne une modification de l'environnement électronique ou de l'encombrement stérique local et perturbe les interactions internucléosomiques. Il en résulte une variation de la structure de la chromatine qui devient plus ou moins condensée selon la MPT considérée. De plus, ces modifications sont réversibles et font intervenir des enzymes de remodelage afin de repositionner les nucléosomes dans leur état initial⁽¹²⁰⁾.

L'acétylation des histones a été décrite pour la première fois en 1964 par Allfrey⁽¹²¹⁾ et représente la modification post-traductionnelle des histones la plus largement étudiée. Ce phénomène correspond au transfert d'un groupement acétyle depuis le co-enzyme A vers la fonction amine latérale d'un résidu lysine et est catalysé par des enzymes appartenant à la classe des histone-acétyltransférases (HAT). Cette acétylation neutralise la charge positive de la lysine et affaiblit les interactions entre la protéine histone et les groupements phosphates de l'ADN. Il en résulte une ouverture des nucléosomes et donc un relâchement de la structure chromatinienne. La réaction inverse est catalysée par une enzyme différente qualifiée de désacétylase d'histone (HDAC). Cette réaction permet de rétablir les interactions ioniques et électrostatiques entre l'histone et l'ADN en restaurant la charge positive. C'est pourquoi l'acétylation des histones est considérée comme un facteur d'activation de l'expression des gènes au contraire de la désacétylation qui est assimilée à un phénomène répressif⁽¹²²⁾.

La phosphorylation/déphosphorylation des histones est également un processus hautement dynamique catalysé respectivement par des histones kinases et des histones phosphatases. Le groupement phosphate est fourni par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Cette MPT s'effectue majoritairement sur les groupements hydroxyles des résidus sérine, thréonine et tyrosine de l'extrémité N-terminale de l'histone. L'introduction d'un groupement phosphate modifie profondément l'environnement électronique et induit des répulsions entre la queue de l'histone et les groupements phosphates de l'ADN. Il en résulte une déstabilisation de la structure de la chromatine.

La méthylation des histones est une MPT survenant essentiellement au niveau de la chaîne latérale des résidus lysine et arginine. Contrairement aux réactions d'acétylation et de phosphorylation, cette méthylation ne provoque pas de modification de la charge de l'histone mais induit un niveau de complexité supérieur en fonction du nombre de méthylation réalisé sur un même aminoacide. En effet, la fonction amine latérale de la lysine peut subir jusqu'à trois méthylation et le résidu guanidine de

l'arginine peut être mono ou diméthylé de façon symétrique ou asymétrique. Ces réactions de méthylation sont catalysées par des méthyltransférases en utilisant la S-adénosylméthionine (SAM) comme source de méthyle⁽¹²³⁾. Cette méthylation des histones peut être associée à une activation ou au contraire une répression des gènes en fonction de l'acide aminé modifié et du nombre de méthylation. La réaction inverse fait intervenir une histone déméthylase (HDM).

Les MPT des histones modifient l'encombrement stérique et/ou l'environnement électronique local des nucléosomes ce qui altère les interactions entre les nucléosomes et aboutit à la modulation du degré de condensation de la chromatine. Une chromatine peu surenroulée reste disponible et accessible à la fixation des différents effecteurs impliqués dans les processus de réplication, de réparation et de transcription de l'ADN⁽¹²⁴⁾.

De plus, ces effecteurs possèdent des domaines structuraux capables de reconnaître spécifiquement la répartition et la nature des MPT des histones le long de la chromatine⁽¹²⁵⁾. Ainsi, les chromodomaines et les bromodomaines sont des domaines peptidiques capables de reconnaître les résidus lysine méthylés et acétylés respectivement (figure 35).

La fixation de ces domaines permet alors le recrutement d'autres effecteurs capables d'amplifier les variations structurales de la chromatine et de moduler l'expression des gènes⁽¹²⁶⁾.

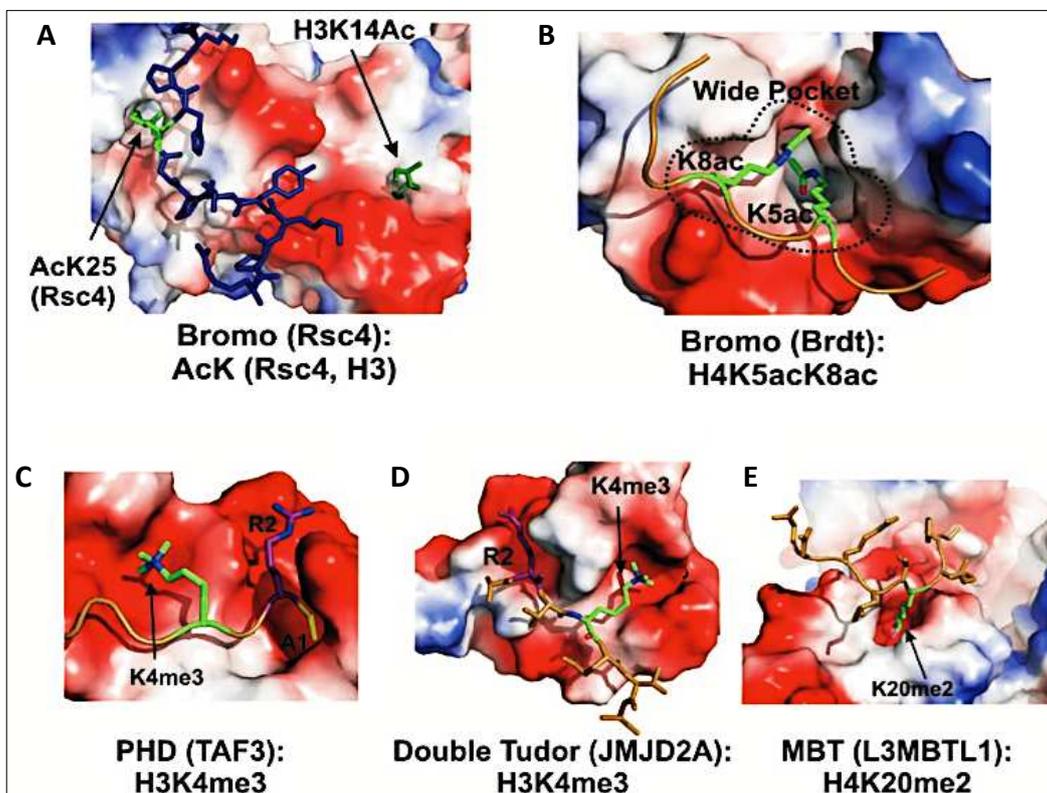


Figure 35 : Modélisation moléculaire de l'interaction entre des histones acétylées ou méthylées au niveau du résidu lysine et les bromodomaines et chromodomaines présents sur les facteurs protéiques associés à la chromatine. Illustrations issues de la référence (125).

IV-2-3-3 ... ET LEURS CONSÉQUENCES : LES PATHOLOGIES CANCÉREUSES, UN EXEMPLE.

Les pathologies cancéreuses sont souvent associées à un dysfonctionnement des systèmes de contrôle du cycle cellulaire ce qui entraîne une prolifération incontrôlée. Les différentes étapes du cycle cellulaire sont sous dépendance de l'expression différentielle des gènes qui gouvernent les processus de réplication, de différenciation et d'apoptose. Ainsi, une désorganisation du contrôle épigénétique peut être à l'origine du développement de cancers.

En 1983, Feinberg et Vogelstein⁽¹²⁷⁾ ont mis en évidence l'existence d'une hypométhylation des régions promotrices de certains gènes spécifiques chez des patients atteints d'adénocarcinome du colon ou de carcinome pulmonaire comparé au degré de méthylation retrouvé chez des sujets sains. De plus, ils ont pu montrer que ce degré d'hypométhylation était corrélé à l'importance du développement des lésions tumorales. Cette hypométhylation provoque une augmentation de la transcription de ces gènes qui ont par la suite été identifiés comme des gènes activateurs de tumeurs ou proto-oncogènes⁽¹²⁸⁾.

Inversement, des phénomènes d'hyperméthylation au niveau de régions promotrices de gènes suppresseurs de tumeurs entraînent une diminution de l'expression de ces derniers ce qui peut favoriser l'apparition de pathologies prolifératives.

De plus, il a été observé que la méthylation des motifs CpG provoquait une instabilité de la cytosine qui était alors substituée par une base thymine (figure 36). Le remplacement de la cytosine par la thymine induit, après transcription et traduction, une modification de la séquence peptidique pouvant aboutir à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle ou dotée de propriétés différentes⁽¹²⁹⁾.

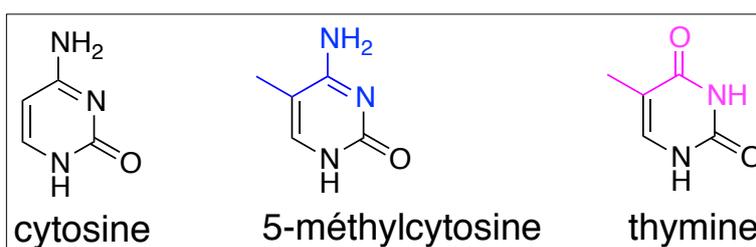


Figure 36 : Représentation de la structure chimique de la cytosine, de son dérivé méthylé et de la thymine qui présente une forte homologie structurale avec la 5-méthylcytosine.

A ces phénomènes aberrants d'hypo ou d'hyperméthylation des régions promotrices des gènes s'ajoutent des processus non contrôlés d'acétylation et de méthylation des histones qui perturbent la structure de la chromatine et modulent l'expression des gènes.

Tout comme il existe un code génétique associant un codon ARN à un acide aminé, il est possible de définir un code histone permettant de corrélérer la nature des modifications post-traductionnelles des histones au degré d'expression des gènes (figure 37).

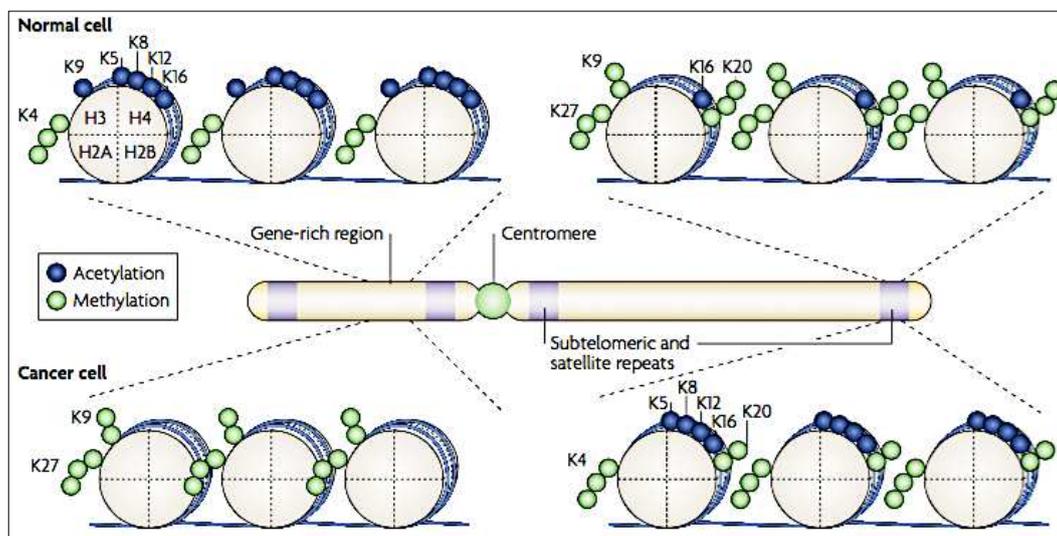


Figure 37 : Représentation simplifiée du code histone au sein d'une cellule saine (en haut) et d'une cellule tumorale (en bas). Illustration issue de la référence (130).

Des travaux de cartographie des MPT des histones ont montré que l'acétylation des histones est traditionnellement associée à une transcription active des gènes. En revanche, le rôle fonctionnel de la méthylation des histones dépend du nombre de substituants et de leurs localisations sur la queue de l'histone. Ainsi, la lysine 4 di et triméthylée et la lysine 9 monométhylée de l'histone H3 constituent des motifs de transcription active des gènes car ils permettent d'obtenir une chromatine structurellement relâchée. Au contraire, la di et/ou triméthylation des résidus lysines en position 9 et 27 de l'histone H3 entraînent une répression des gènes via la formation d'une chromatine structurellement inactive⁽¹³¹⁾⁽¹³²⁾.

Les mêmes études réalisées sur des lignées cellulaires cancéreuses gastriques et prostatiques ont montré une perte globale du caractère acétylé des histones associée à une surexpression des enzymes histone-désacétylases. De même, les motifs de méthylation font l'objet de profondes modifications qui sont associées à une expression anormale des enzymes histone-méthyltransférases. Des surexpressions des enzymes EZH2 et G9a responsables de la méthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 ont été retrouvées chez des patients atteints de cancer du sein, de la prostate et du foie⁽¹³³⁾.

Les implications physiopathologiques des modifications post-traductionnelles des histones au niveau épigénétique justifient donc pleinement le développement d'outils de détection sensibles et spécifiques.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I : PRÉSENTATION DU PROJET DE THÈSE ET DE SES PROBLÉMATIQUES

L'objectif de ce sujet de thèse est d'élaborer un système de détection permettant la reconnaissance sensible et spécifique d'un biocomposé d'intérêt présent en faible concentration au sein d'environnements biologiques complexes, tels que des lysats cellulaires, des cultures cellulaires ou encore du sang total. Ce biocomposé cible, noté H4K16 est l'histone H4 acétylée sur le résidu lysine en position 16.

Afin de construire un système de détection qui soit le plus performant possible, nous allons réaliser un assemblage moléculaire qui combinera les propriétés optiques et électroniques uniques des nanomatériaux avec les propriétés de reconnaissance des aptamères.

Ce système de détection sera composé d'un support solide sur lequel sera immobilisé un système de reconnaissance associé à un reporteur capable de transcrire l'interaction entre le système et sa cible en un signal physique facilement mesurable par des appareils de mesure conventionnels.

Le support solide sera constitué de nanoparticules d'or, le système de reconnaissance sera assuré par un aptamère spécifiquement dirigé contre la modification post-traductionnelle d'intérêt H4K16, enfin une molécule fluorescente dérivée de la rhodamine ou de la fluorescéine servira de reporteur optique.

La localisation nucléaire de la cible ainsi que sa nature protéique nécessitent d'utiliser ce dispositif au sein de milieux biologiques complexes ce qui soulève de nombreuses problématiques. La première d'entre elles est que ce système doit être hydrosoluble et stable dans des conditions de température, de force ionique et de pH compatibles avec la stabilité des biocomposés et assurant la survie cellulaire. Cette biocompatibilité permettra, à terme, d'utiliser ce système de détection in-vitro ou in-vivo.

Afin de répondre à ce critère, les nanoparticules d'or seront synthétisées en phase aqueuse, sans utiliser d'agent de transfert de phase potentiellement cytotoxique. De plus, les réactions de fonctionnalisation et de bioconjugaison des nanoparticules avec le motif de reconnaissance devront également être réalisées en respectant ces mêmes exigences de biocompatibilité.

La deuxième question soulevée par une utilisation en milieu biologique complexe est la stabilité du système vis-à-vis des différents constituants biologiques éventuellement présents au sein de l'échantillon à tester et qui peuvent entraîner la dégradation de cet assemblage moléculaire.

La solution proposée pour prévenir cette détérioration est d'introduire des synthons pegylés entre la nanoparticule et l'aptamère qui joueront le rôle de bras espaceur. L'une des extrémités de ces synthons sera fonctionnalisée par un groupement

thiol afin de permettre son ancrage à la surface des nanoparticules d'or via une liaison covalente de grande stabilité. L'autre extrémité sera fonctionnalisée par différents groupements permettant dans un deuxième temps de réaliser le couplage avec l'aptamère.

Un autre problème concerne le risque d'interférences du motif de reconnaissance avec les autres constituants non ciblés du milieu ce qui peut entraîner une baisse de la spécificité de la détection.

Afin de garantir la meilleure spécificité de ce dispositif, l'aptamère peut être sélectionné par un processus SELEX avec une haute spécificité et une haute affinité pour sa cible.

Après l'étape de SELEX, le séquençage de l'aptamère de reconnaissance sélectionné sera réalisé et le motif nucléotidique sera synthétisé. Cette étape de synthèse post-SELEX permettra de fonctionnaliser l'une des extrémités de l'aptamère afin de permettre son ancrage sur la nanoparticule d'or ou son couplage avec le bras espaceur.

La présence d'une fonction terminale soufrée sur l'aptamère va permettre sa fixation sur la nanoparticule d'or via la formation d'une liaison covalente Au-S. En revanche, une fonctionnalité azoture, alcyne, amine ou acide permettra de coupler ce motif de reconnaissance moléculaire au bras espaceur pegylé via des réactions de chimie click ou de couplage peptidique.

L'une des stratégies de détection envisagées dans cette étude repose sur les propriétés optiques et électroniques des nanoparticules d'or et plus particulièrement le quenching de fluorescence. L'aptamère de reconnaissance immobilisé à la surface de la nanoparticule d'or va être apparié à un brin complémentaire pour s'organiser en un duplex typique de la double hélice de l'ADN. Le marquage préalable de ce brin complémentaire avec un fluorophore dérivé de la fluorescéine permettra d'obtenir un système reporteur capable de traduire la reconnaissance et l'interaction entre le ligand aptamère et sa cible épigénétique H4K16 acétylée.

Notre hypothèse de travail est que le fluorophore porté par le bras complémentaire est suffisamment proche de la surface de la nanoparticule pour que ses propriétés de fluorescence soient inhibées par les électrons de conduction.

Cependant, lorsque la cible est présente, l'interaction entre l'aptamère et l'histone cible va générer une modification de la conformation de ce dernier et rompre l'association duplex. Le bras complémentaire est alors libéré dans le milieu et la distance avec la nanoparticule devient alors trop importante pour maintenir ce quenching ce qui permet de restaurer la fluorescence qui pourra alors être mesurée par spectrofluorimétrie (schéma 32).

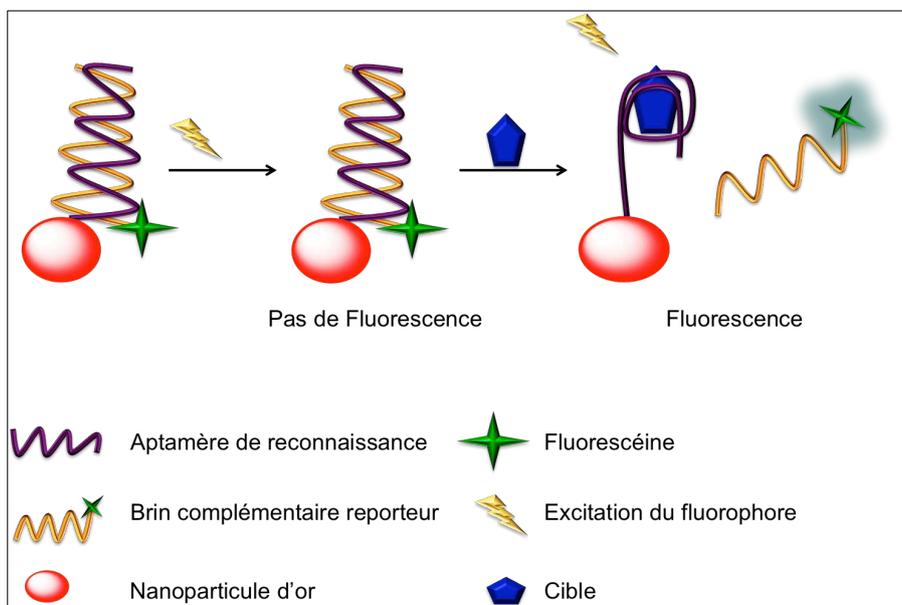


Schéma 32 : Stratégie de détection de marque épigénétique utilisant les propriétés de quenching de fluorescence des nanoparticules d'or ainsi que la grande flexibilité conformationnelle des aptamères comme système de transduction du signal.

Un autre mode de détection a également été envisagé en utilisant les propriétés colorimétriques des suspensions colloïdales de nanoparticules d'or. En effet, nous avons vu précédemment que la coloration de ces solutions était fonction de la taille, de la forme ainsi que du degré d'agrégation des nanoparticules qui les composent. Cette caractéristique peut être mise à profit pour élaborer un système de détection fondé sur l'affinité différentielle d'un aptamère entre sa cible et son brin complémentaire.

CHAPITRE II : SYNTHÈSE ET FONCTIONNALISATION DU LIGAND

II-1 ÉTUDE DU LIGAND EN SÉRIE PEG₄

II-1-1 HÉTÉROFONCTIONNALISATION DU LIGAND

La fonctionnalisation des nanoparticules d'or repose sur la forte affinité entre les atomes de soufre (S) et d'or (Au) ce qui permet la formation d'une liaison covalente Au-S stable.

Cette fonctionnalisation nécessite donc la présence d'un ligand porteur d'une fonction thiol. Les AuNPs peuvent donc être directement fonctionnalisées par des aptamères porteurs de groupements fonctionnels thiols. Cependant, afin d'améliorer la stabilité et/ou la biodisponibilité de ces structures nanoparticulaires au sein de milieux biologiques complexes, un bras espaceur peut être inséré entre la nanoparticule d'or et le biosenseur. Pour ce bras espaceur, également appelé linker, nous avons choisi d'utiliser une chaîne tétraéthylène glycol (PEG₄). Ce motif PEG₄ est constitué de quatre répétitions d'unité éthyloxy (-CH₂CH₂O-).

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la synthèse d'un bras espaceur pegylé permettant le couplage avec la nanoparticule d'or (AuNPs) via une liaison covalente Au-S et la conjugaison avec l'aptamère via une chimie click. Cela a nécessité la synthèse d'un bras espaceur hétéro-bi-fonctionnalisé portant un groupement thiol à l'une de ses extrémités et un groupement azoture à l'autre (schéma 33).

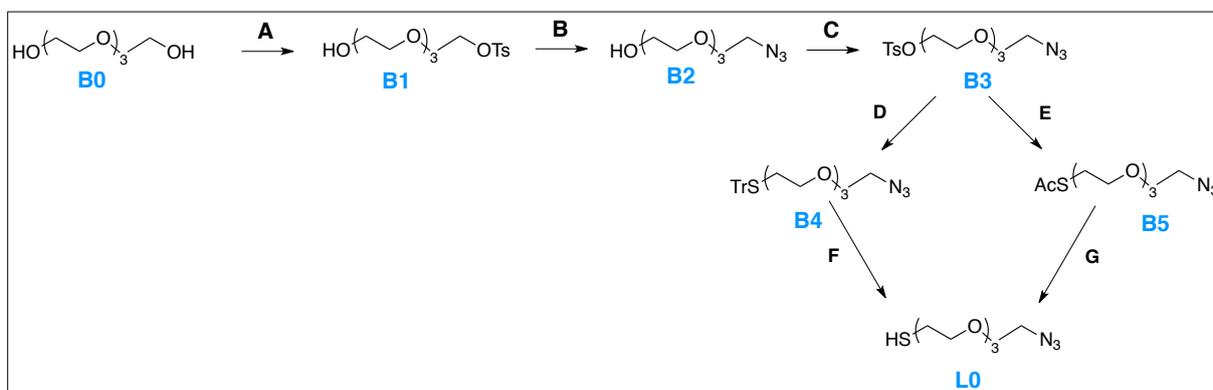


Schéma 33 : Schéma de synthèse du ligand tétraéthylène glycol porteur d'une fonction thiol à l'extrémité α et d'un groupement azoture à l'extrémité ω . A) Et₃N, TsCl, DCM, de 0°C à température ambiante ; B) NaN₃, Acétone, Reflux ; C) NaOH, TsCl, THF, de 0°C à température ambiante ; D) TrSH, NaI, K₂CO₃, Acétone, sous Argon ; E) AcSK, EtOH absolu, Reflux, Argon ; F) Hydrolyse acide, Et₃SiH, TFA, Argon ; G) Hydrolyse basique, NaOH, Argon.

Pour réaliser ce linker, il a fallu dans un premier temps fonctionnaliser l'une des extrémité OH libre du PEG₄ (B0) par un groupement nucléofuge, et ce de façon régiosélective.

Concernant la nature du groupement partant nucléofuge, nous nous sommes orienté vers un groupement tosyloxy (Ts), aisément obtenu par une réaction de substitution nucléophile de type S_N2 entre l'alcool terminal du PEG₄ et le chlorure de tosyloxy TsCl.

Cette réaction, dont le mécanisme est représenté sur le schéma 34, a été effectuée en présence d'une base comme la triéthylamine Et₃N qui permet d'accélérer la cinétique de la réaction. De plus, afin d'assurer une monotosylation régiosélective, la réaction a été réalisée en présence d'un très large excès de PEG₄ (10 Eq).

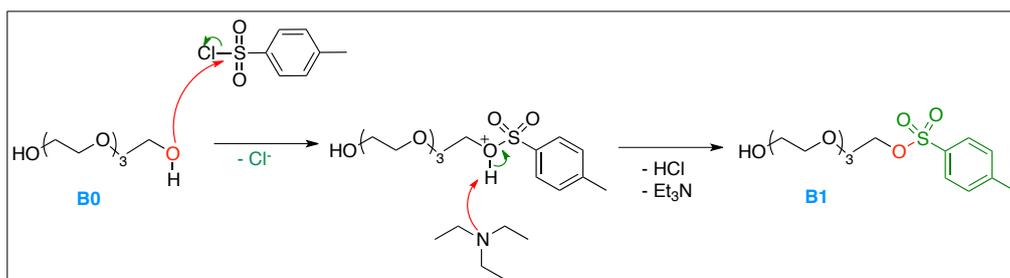


Schéma 34 : Mécanisme réactionnel de la réaction de tosylation en présence de triéthylamine.

La réaction a conduit à l'obtention d'un mélange des composés **B0** et **B1**. L'isolation du produit de réaction **B1** repose sur l'hydro-solubilité préférentielle du réactif de départ **B0**. En effet, bien que les composés **B0** et **B1** soient tous les deux solubles dans des solvants organiques halogénés tels que le dichlorométhane (DCM), le composé **B0** présente une solubilité supérieure dans l'eau. Ainsi, après extraction du produit de réaction avec du DCM, il a été possible d'isoler le produit d'intérêt **B1** en éliminant le composé de départ **B0** par des lavages successifs avec de l'eau. Il est également à noter que l'élimination de ce composé **B0** est favorisée par des lavages successifs avec une solution aqueuse saline saturée.

Une fois le composé **B1** isolé, une réaction d'azidation a été mise en œuvre afin d'obtenir la fonction azoture terminale qui permet de conjuguer ce linker avec un différentes biomolécules porteuses d'une fonction alcyne terminale via une réaction de chimie click. Cette réaction d'azidation qui conduit à l'obtention du composé **B2** a été réalisée à partir du composé **B1** en présence d'azoture de sodium en excès et en chauffant le milieu réactionnel à reflux. Initialement, cette réaction était réalisée dans un mélange DMF/Acétone en proportion 1/1, cependant, des rendements similaires ont été obtenus en réalisant cette azidation dans l'acétone uniquement.

L'utilisation d'un mélange DMF/Acétone lors de cette réaction avait pour but de favoriser la dissociation de l'azoture de sodium et de favoriser la réaction d'azidation. Le caractère dissociatif de ce mélange est corrélé aux constantes diélectriques des solvants qui le compose, à savoir 36,70 et 21,01 pour le DMF et l'acétone respectivement.

La substitution du mélange binaire DMF/Acétone par de l'acétone pure présente de nombreux avantages. Tout d'abord, la température nécessaire pour obtenir le reflux du milieu réactionnel est fortement abaissée (de 160°C à 60°C) ce qui réduit les risques

de dégradations thermiques éventuelles bien que les composé pegylés soient relativement thermostables. De plus, lors de l'utilisation du DMF, une étape supplémentaire de lavage acide en présence de HCl 6N est nécessaire afin d'éliminer ce solvant. Cette étape n'est plus utile en présence d'acétone seule.

La fonction alcool restante en position α a alors été convertie en groupement thiol afin de permettre la formation d'une liaison covalente stable entre le groupement hydroxy du composé **B2** et la nanoparticule d'or. La conversion de cet alcool terminal en thiol a également nécessité le passage par un synthon intermédiaire tosyle, le composé **B3**. Deux conditions de synthèse ont été envisagées pour cette deuxième réaction de tosylation (schéma 35).

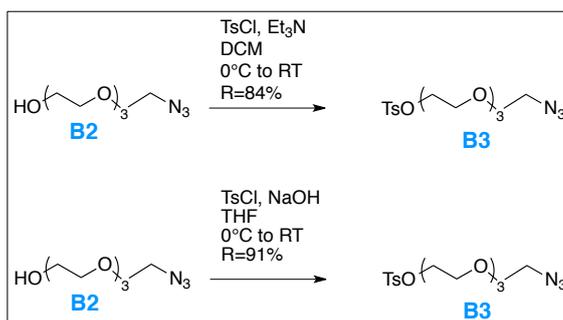


Schéma 35 : Présentation des deux voies de synthèse testées pour la seconde réaction de tosylation.

La première voie est identique à celle mise en œuvre pour l'obtention du composé **B1**, à savoir une tosylation du composé **B2** à partir de TsCl et en présence de Et₃N et n'en diffère que par la stœchiométrie mise en jeu. Avec cette voie de synthèse, les rendements obtenus ont été excellents, de l'ordre de 84%, mais le composé **B3** ainsi obtenu devait être purifié par flash chromatographie. Par comparaison, une voie de synthèse alternative utilisant NaOH comme base a permis d'obtenir des rendements supérieurs (91%). De plus, le composé **B3** n'a pas eu besoin d'être purifié par des techniques chromatographiques.

Le composé **B3** ainsi obtenu peut ensuite être fonctionnalisé en groupement thiol, soit directement en présence de thiourée, soit indirectement via un groupement protecteur de la fonction thiol. La stratégie de synthèse impliquant un groupement protecteur a été privilégiée.

En effet, le groupement thiol est sensible à l'oxydation au contact de l'oxygène de l'air pour former un mélange de composés thiol et disulfures. Pour éviter cette oxydation et faciliter la manipulation et le stockage du composé thiol **L0**, deux types de groupement protecteurs ont été envisagés.

Le premier groupement protecteur est un motif tritylthiol (TrSH, composé **B4**) hydrolysable en groupement thiol dans des conditions acides alors que le deuxième groupement protecteur est un motif thioacétate (composé **B5**) convertit en thiol libre après une étape d'hydrolyse en milieu basique.

La synthèse de ce ligand hétérofonctionnalisé est représentée sur le schéma et le protocole détaillé de la synthèse de ces différents composés est répertorié dans la section expérimentale de ce manuscrit.

II-1-2 DÉPROTECTION DU LIGAND ET STRATÉGIE DE FONCTIONNALISATION

La finalité de la synthèse de ce bras espaceur pegylé est de réaliser son insertion à la surface des nanoparticules d'or synthétisées en milieu aqueux en utilisant la très forte affinité entre les atomes d'or et de soufre afin de construire une liaison covalente stable Au-S.

Initialement, deux stratégies avaient été envisagées afin d'obtenir des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le linker.

La première mettait en jeu une déprotection in-situ du ligand (**B4** ou **B5**) directement dans une suspension aqueuse de nanoparticules d'or préalablement synthétisées, alors que la deuxième était une stratégie « one-shot » (schéma 36). Ces nanoparticules d'or ont été synthétisées selon la procédure NP1 qui sera présentée en détail dans le chapitre suivant de ce manuscrit.

Le principe de la méthode « one-shot » consistait à réaliser simultanément la déprotection du ligand et la synthèse des nanoparticules. Ainsi, les nanoparticules nouvellement formées réagissent directement avec le ligand porteur d'une extrémité thiol libre qui s'organise à la surface de la nanoparticule en une monocouche auto-assemblée.

Néanmoins, quelle que soit la voie de fonctionnalisation envisagée, il a fallu au préalable s'assurer que les réactifs ainsi que les conditions opératoires nécessaires à la déprotection du thiol étaient compatibles et n'interfèraient pas avec celles nécessaires à la synthèse des nanoparticules d'or qui se déroule en milieu aqueux et en présence de réducteur.

Le principal facteur limitant de cette étape de fonctionnalisation semblait être l'insolubilité des ligands **B4** et **B5** en milieu aqueux ainsi que celle du triéthylsilane nécessaire à la déprotection du groupement trityle. Cependant, nous postulons que cette difficulté relative au caractère hydrophobe des ligands serait surmontée lors de la déprotection qui générera alors le ligand **L0** porteur d'une extrémité thiol libre SH ce qui favorisera la solubilité aqueuse du ligand et permettra son insertion sur les nanoparticules. De même, le triéthylsilane nécessaire à la déprotection du trityle pouvait être dissous dans un mélange binaire de solvants, tel que H₂O/Acétone ou H₂O/PEG₄.

Les deux stratégies de fonctionnalisation des AuNPs avec le ligand **L0** ont été mises en œuvre avec les composés **B4** et **B5**.

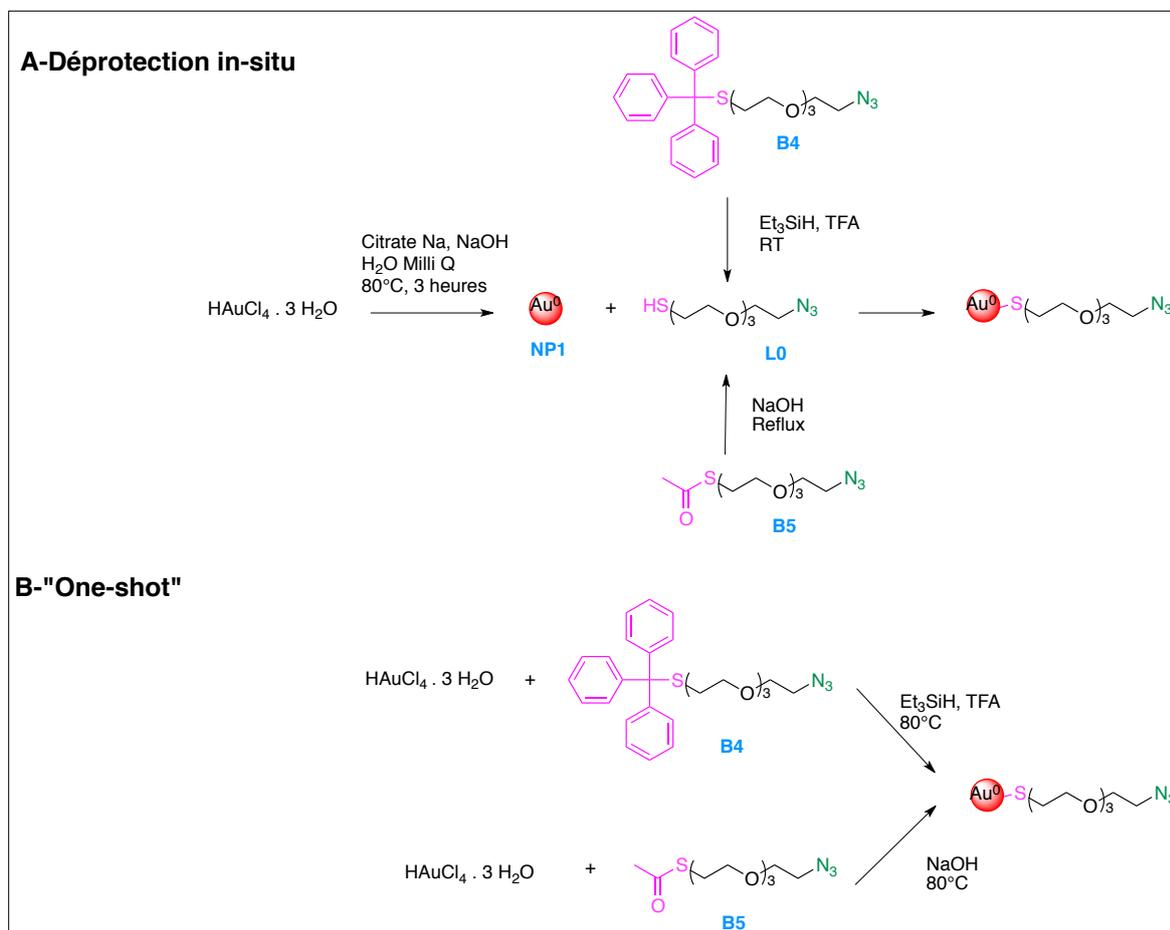


Schéma 36 : Présentation des deux stratégies mises en œuvre pour la déprotection du groupement thiol en position α du bras espaceur pegylé et la synthèse des nanoparticules d'or : A) Déprotection du groupement protecteur « in-situ » en présence de nanoparticules d'or déjà fonctionnalisées ; B) Déprotection « one-shot » du linker simultanément à la synthèse des nanoparticules.

II-1-2-1 DÉPROTECTION DU GROUPEMENT THIOACÉTATE

La procédure conventionnelle de déprotection du thioacétate correspond à une hydrolyse en milieu basique avec de la soude (NaOH) ou de la potasse (KOH) comme agents hydrolysants (schéma 37).

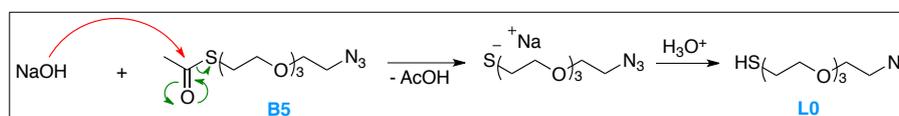


Schéma 37 : Mécanisme réactionnel de déprotection du groupement thioacétate en milieu basique.

Lors de la déprotection du composé **B5**, le risque d'interférence avec les nanoparticules préformées (stratégie de déprotection in-situ) ainsi qu'avec les nanoparticules en cours de synthèse (stratégie « one-shot ») n'est pas négligeable. En effet, on a constaté que la déprotection/insertion « one-shot » fut un échec de même que la déprotection in-situ.

Plusieurs causes peuvent être incriminées pour expliquer ces échecs. La première d'entre elles était l'insolubilité du composé **B5** en milieu aqueux évoquée plus haut.

Néanmoins, l'introduction d'un supplément d'hydroxyde de sodium NaOH au sein du milieu réactionnel pouvait également avoir un effet délétère. En effet, l'hydroxyde de sodium est impliqué dans la synthèse des AuNPs comme agent tampon afin de ralentir la cinétique de formation des nanoparticules⁽⁷⁷⁾.

Lorsque la solution aqueuse de NaOH fut ajoutée à la suspension de AuNPs lors de la déprotection in-situ, on a immédiatement observé une dégradation de celle-ci qui est devenue violacée puis incolore avec des particules sédimentaires noires visibles à l'œil nu et correspondant à des AuNPs agrégées. Ce résultat était prévisible car la relative sensibilité des AuNPs stabilisées par du citrate à différents facteurs comme le pH et la force ionique est largement décrite dans la littérature⁽⁷¹⁾⁽¹³⁴⁾⁽¹³⁵⁾.

De même, lorsque les sels d'or aurique Au³⁺ ont été mis en présence d'une quantité plus importante de soude lors de la déprotection « one-shot », la formation de nanoparticules ne fut pas observée même après 48 heures de réaction. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer ce résultat est liée au rôle de NaOH comme modulateur de la cinétique de nucléation et de croissance des nanoparticules.

II-1-2-2 DÉPROTECTION DU GROUPEMENT THIOTRITYLE

La déprotection du groupement trityle thiol fait intervenir un transfert successif d'hydrure et de proton en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) et de triéthylsilane (Et₃SiH) afin de libérer le composé **LO** selon le mécanisme réactionnel présenté sur le schéma 38⁽¹³⁶⁾.

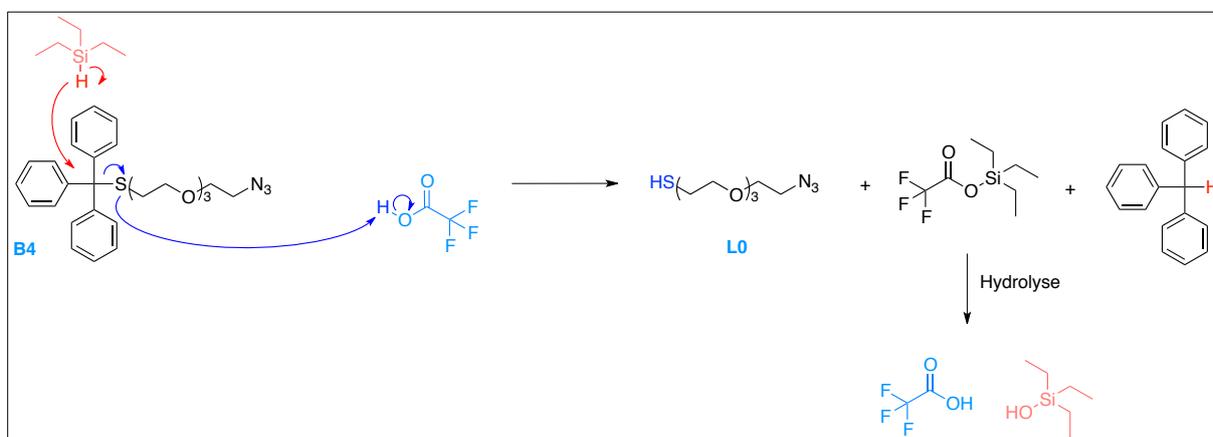


Schéma 38 : Mécanisme réactionnel de déprotection du thiotrityl en présence de triéthylsilane et d'acide trifluoroacétique.

Concernant la voie tritylthiol, en plus de l'insolubilité du triéthylsilane en phase aqueuse, l'ajout de Et₃SiH à une suspension de nanoparticules d'or a conduit à des résultats similaires à ceux observés avec la voie thioacétate au décours de la déprotection in-situ.

Toutefois, dans le contexte d'une stratégie de fonctionnalisation « one-shot », la protection de la fonction thiol par un groupement thiotrityle (composé **B4**) peut sembler particulièrement intéressante grâce au pouvoir réducteur du dérivé silane qui pourra être utilisé pour la synthèse des nanoparticules d'or.

II-1-3 FONCTIONNALISATION DES BRAS ESPACEURS AVEC UNE STRUCTURE DISULFURE

Afin de s'affranchir à la fois des problèmes d'oxydation du thiol libre en disulfure et des problèmes de déprotection in-situ, une stratégie alternative de fonctionnalisation du ligand pour la modification de la surface des AuNPs a été envisagée. Celle-ci consiste à fonctionnaliser les bras espaceurs avec un motif présentant un atome de soufre directement sous forme disulfure, c'est à dire une liaison covalente S-S forte et stable⁽⁹⁵⁾⁽¹³⁷⁾⁽¹³⁸⁾.

Deux types de groupement disulfure ont été proposés, l'un est sous forme disulfure cyclique et l'autre est sous forme disulfure linéaire. Ils correspondent aux ligands **L1** et **L1bis** respectivement (Figure 38).

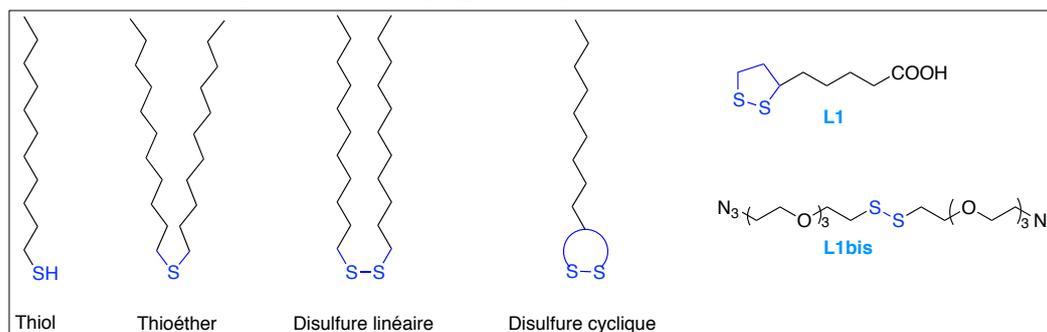


Figure 38 : Structure chimique de différents composés soufrés ainsi que des ligands L1 et L1bis utilisés pour la fonctionnalisation des nanoparticules d'or.

L'oxydation d'un thiol par l'action du diméthylsulfoxyde (DMSO) a été largement décrite par Wallace⁽¹³⁹⁾ et permet d'obtenir le dérivé disulfure correspondant avec un taux de conversion élevé. Cette stratégie de synthèse va être mise en œuvre pour convertir le bras espaceur thioacétate **B5** en ligand disulfure **L1bis** avec un rendement de 91% (schéma 39).

La première étape de cette oxydation est une hydrolyse du groupement thioacétate par l'action d'une base forte comme le méthanolate de sodium ce qui génère le composé thiolate **B53** en équilibre avec le thiol conjugué **L0** issu de la déprotonation du méthanol utilisé comme solvant.

Le thiolate **B53** va ensuite attaquer le sulfoxyde du DMSO ce qui conduit, après passage par un état de transition à quatre centres, à la formation équilibrée d'un adduit sulfoxythiol non isolable. Cet adduit va attaquer l'acétate libéré lors de la première étape d'hydrolyse ce qui va permettre l'attaque nucléophile du thiol/thiolate restant.

Cela a abouti à la libération d'une molécule de diméthylthioéther volatil ainsi que le composé disulfure d'intérêt **L1bis** (schéma 39).

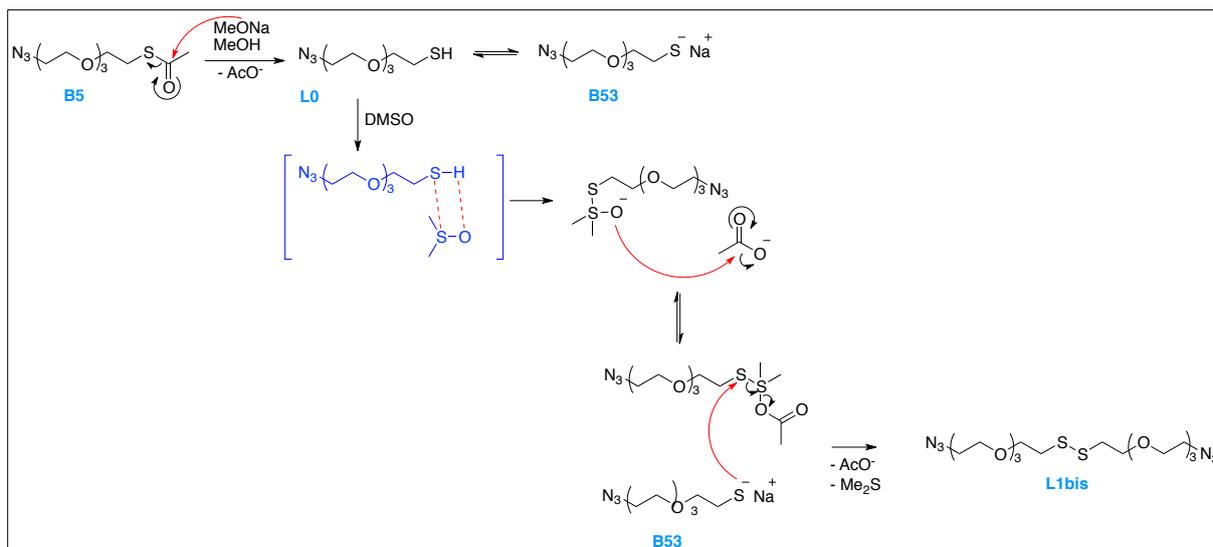


Schéma 39 : Mécanisme réactionnel de l'oxydation d'une fonction thiol en disulfure en présence de DMSO.

Le deuxième type de modification envisagée fut l'introduction d'une molécule d'acide lipoiqye dans la structure du bras espaceur.

L'acide lipoiqye (**L1**) est constituée d'une chaîne alkyle porteuse d'une fonction acide carboxylique et d'un cycle dithiolane à chaque extrémité. La fonction acide carboxylique va permettre le couplage avec le bras espaceur via une réaction d'estérification. Le cycle dithiolane quant à lui, servira de source d'atome de soufre pour la chimisorption des ligands à la surface des nanoparticules d'or (schéma 40).

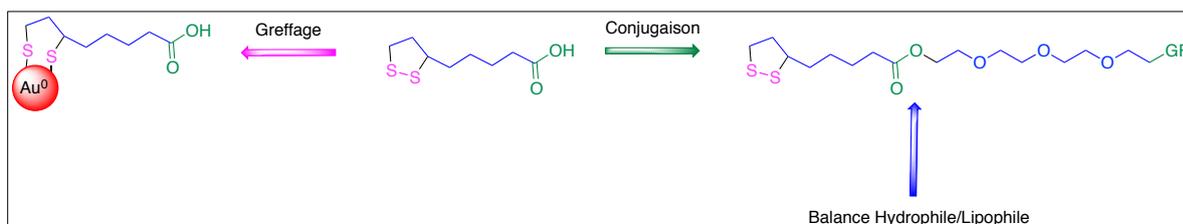


Schéma 40 : Stratégie d'utilisation de la molécule d'acide lipoiqye L1 comme structure d'ancrage à la surface de la nanoparticule d'or. Son extrémité acide carboxylique permettra le couplage avec le bras espaceur via une liaison ester ou amide.

De plus, l'association d'une chaîne alkyle hydrophobe avec la chaîne PEG hydrophile du bras espaceur va permettre de moduler la balance lipophile/hydrophile du système ce qui favorisera le passage des doubles couches phospholipidiques des membranes cellulaires et nucléaires et pourra ainsi améliorer la capture et l'internalisation de notre dispositif de détection⁽¹⁴⁰⁾.

En outre, cette association alcane/éthylène glycol permettra d'augmenter la stabilité des AuNPs au sein des milieux biologiques⁽¹⁴¹⁾⁽¹⁴²⁾ mais aussi celle des aptamères⁽¹⁴³⁾⁽¹⁴⁴⁾.

II-2 ÉLONGATION DU BRAS ESPACEUR

Ces travaux d'élongation de la chaîne polyéthylène glycol avaient pour finalité d'étudier l'influence de la longueur du bras espaceur sur la stabilité des nanoparticules d'or en milieu aqueux. En effet, la variation de la longueur de la chaîne PEG va entraîner une modification de la polarité et de l'hydro-solubilité du bras espaceur.

Il peut donc être supposé que les AuNPs dont la surface a été modifiée avec les chaînes les plus longues puis fonctionnalisées avec une biomolécule présenteront une meilleure pérennité. Cependant, l'accroissement de l'éloignement physique entre la surface de la nanoparticule d'or et un reporteur fluorescent associé à l'aptamère ou au bras espaceur peut aboutir à la restauration de la fluorescence et perturber la stratégie de détection des histones cibles.

Pour vérifier ces hypothèses, une première série de bras espaceur a été synthétisée en reliant les unités PEG₄ entre elles par des ponts éthers afin d'obtenir des bras espaceurs constitués de quatre **B2**, huit **B28**, douze **B29** et seize **B30** unités éthylène glycol (figure 39).

En parallèle, une deuxième série de linkers a été synthétisée en reliant les unités PEG₄ entre elles par des ponts triazoles via des réactions de chimie-click Cu(I)-catalysées (figure 39).

Ces nouvelles structures permettent non seulement d'augmenter la polarité des bras espaceurs mais également d'engendrer une plus grande flexibilité.

Cette flexibilité accrue pourra générer une modification de la répartition du ligand à la surface de la nanoparticule par augmentation de l'encombrement stérique et avoir des répercussions sur la conjugaison avec les bio-entités d'intérêt ou inhiber la neutralisation du quenching de fluorescence par repliement du bras espaceur sur lui-même.

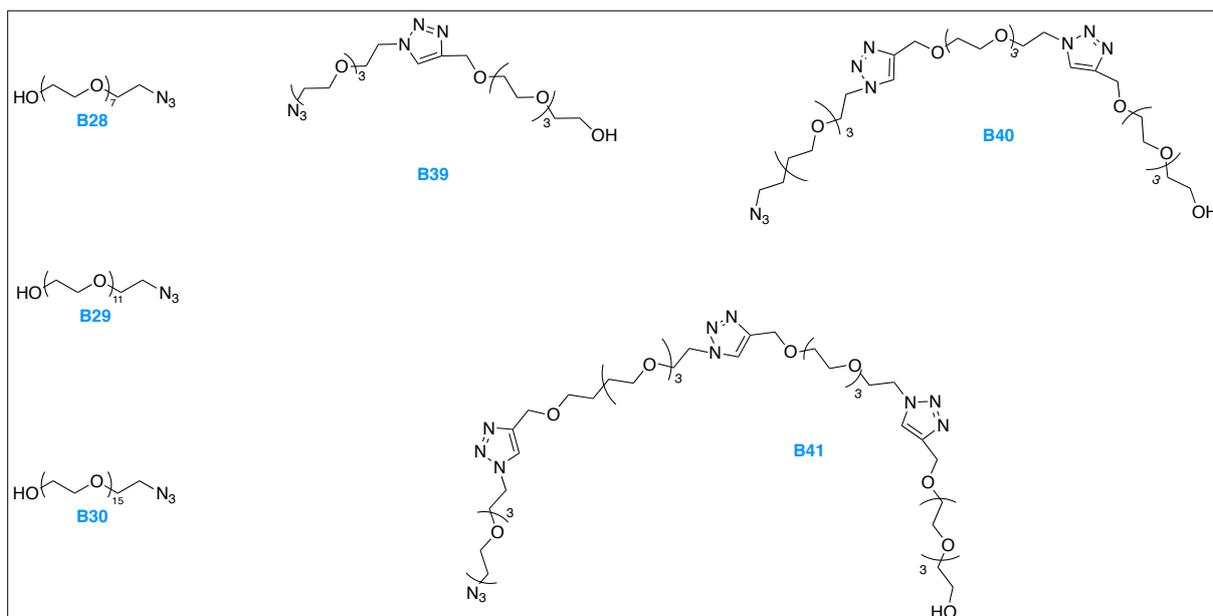


Figure 39 : Structure chimique des bras espaceurs constitués d'unité PEG₄ reliées entre elles par des ponts triazoles ou par des ponts éthers.

Ces bras espaceurs, dont les structures sont représentées sur la figure 33, ont été fonctionnalisés à l'une de leur extrémité avec un groupement azoture afin de permettre la conjugaison avec l'aptamère via une réaction de chimie-click et l'alcool libre restant a été utilisé pour réaliser une réaction d'estérification avec l'acide lipoiq.

II-2-1 ÉLONGATION DU BRAS ESPACEUR VIA DES PONTS ÉTHERS

La première méthode mise en œuvre pour l'obtention de ces bras espaceurs reposait sur un processus d'élongation pas à pas en combinant des unités PEG₄ deux à deux via des stratégies de protection/déprotection⁽¹⁴⁵⁾.

Au décours de cette synthèse, la fonction hydroxyle terminale a été convertie, soit en groupement protecteur (noté GP, en bleu sur le schéma 41), soit en groupement partant nucléofuge tosylé (en vert sur le schéma), soit est restée inchangée sous forme d'alcool libre (en rouge sur le schéma).

Le traitement de l'alcool libre par une base forte telle que l'hydrure de sodium NaH dans des conditions inertes et anhydres a généré un alcoolate présentant une nucléophilie suffisante pour attaquer le groupement tosylé et aboutir à l'obtention d'un bras espaceur PEG₈ arborant des groupements protecteurs distincts à chacune de ces extrémités, ce qui aurait permis l'extension de la chaîne dans un sens ou dans l'autre.

Puis, la déprotection sélective d'un des groupements a été réalisée, l'alcool libre ainsi obtenu pouvait être, soit converti en groupement tosylé et subir une attaque nucléophile, soit traité par NaH pour ensuite s'additionner sur un groupement nucléofuge et générer un bras espaceur PEG₁₂ protégé par deux groupements terminaux distincts et ainsi de suite.

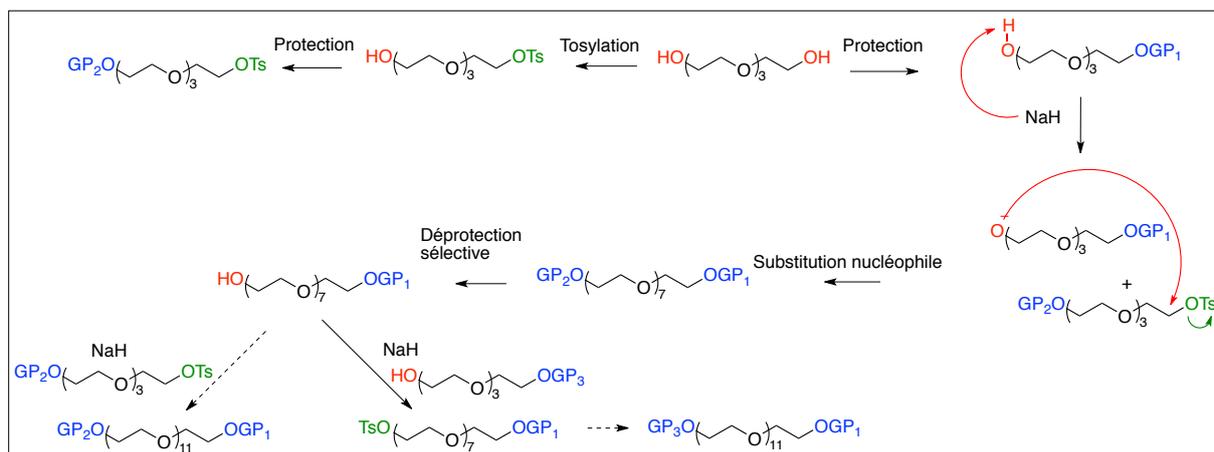


Schéma 41 : Elongation de la chaîne PEG par formation de ponts éthers via une stratégie de protection/déprotection sélective.

Les conditions de cette stratégie de synthèse reposaient sur l'utilisation de groupements protecteurs stables en présence de NaH et présentant des conditions de déprotection différentes les unes des autres et n'interférant pas entre elles. De ce fait, quatre types de groupements protecteurs ont été envisagés :

- la conversion de l'alcool libre en O-benzyle (OBn) qui est éliminé par hydrogénation Pd-catalysée
- la conversion de l'alcool libre en O-tétrahydropyrane (OTHP) qui est hydrolysé en milieu acide
- la conversion de l'alcool libre en silyléther tel que le tertbutyldiméthylsilyléther (OTBDMS) dont la liaison covalente avec l'atome d'oxygène peut être coupée par l'attaque nucléophile d'un anion fluorure comme par exemple le fluorure de tétrabutylammonium (TBAF)
- la conversion de l'alcool libre en azoture. Il ne s'agit pas à proprement parler d'une protection car ce groupement servira ultérieurement pour la bioconjugaison avec des ligands biologiques.

Afin d'appliquer cette stratégie, les bras espaceurs **B3** et **B7** ont été synthétisés (schéma 42). Le composé **B7** a été traité par un léger excès de NaH afin de former l'alcoolate correspondant puis s'est additionné sur le composé **B3** par attaque nucléophile ce qui a généré le composé **B42** par élimination d'une molécule d'acide paratoluène sulfonique (APTS).

Le groupement protecteur OTHP du composé **B42** a été hydrolysé en milieu acide afin d'obtenir le composé **B28**.

Néanmoins, le rendement global de ces deux réactions fut faible, de l'ordre de 20 à 30%. L'hydroxyle terminal libre du composé **B28** a alors été converti en tosyloxy (composé **B43**) sur lequel a été substitué l'alcoolate correspondant au composé **B7** afin de produire le composé **B44**.

Le rendement de la réaction de tosylation est quantitatif, malheureusement l'addition nucléophile du composé **B7** sur le composé **B43** a abouti à l'obtention d'un mélange complexe de produits qui n'ont pas pu être isolés ni caractérisés.

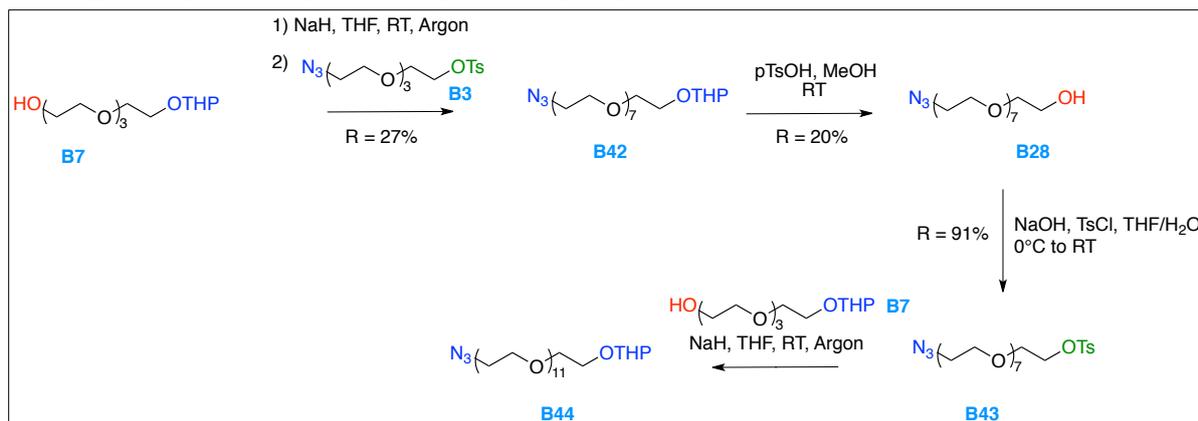


Schéma 42 : Stratégie d'élongation de la chaîne PEG en présence des synthons **B3**, fonctionnalisé par un azoture et un porteur du nucléofuge tosylo et **B7**, mono-protégé par un groupement THP.

Afin d'améliorer ces rendements, les composés **B13** et **B8** ont été substitués aux composés **B3** et **B7** respectivement (schéma 43). Cependant, la réaction de substitution nucléophile conduit à un mélange complexe de produits qui n'ont pas pu être purifiés et caractérisés.

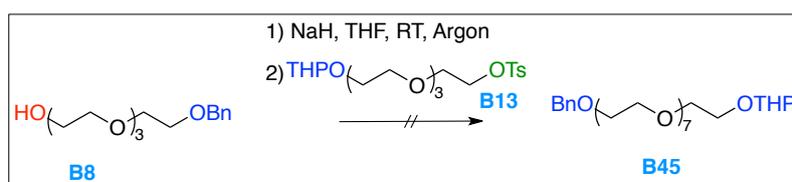


Schéma 43 : Stratégie d'élongation de la chaîne PEG en présence des synthons **B13**, protégé par un groupement THP et un porteur du nucléofuge tosylo et **B8**, mono-protégé par un groupement O-benzyl.

Considérant les faibles rendements obtenus ainsi que les difficultés à purifier ces composés d'intérêt, une stratégie de synthèse alternative a alors été proposée. Elle consiste à coupler deux équivalents de bras espaceurs mono O-benzylé en présence d'un équivalent de chlorure de tosylo (TsCl) et d'un large excès d'hydroxyde de potassium par la mise en jeu de deux substitutions nucléophiles successives (schéma 44)⁽¹⁴⁶⁾.

En effet, la base présente dans le milieu réactionnel déprotone l'alcool libre pour former l'alcoolate correspondant. Cet alcoolate se substitue au chlore du chlorure de tosylo et génère un produit intermédiaire PEG_{n+n} porteur d'un groupement tosylo et d'un groupement benzyle à chacune de ses extrémités.

Le deuxième équivalent d'alcoolate s'ajoute alors sur le carbone en alpha du groupement tosylo, ce qui permet l'obtention, après élimination d'une molécule d'APTS, du composé PEG_{n+n} dibenzylé.

Ces groupements protecteurs O-benzyles sont alors éliminés par hydrogénation catalytique au palladium afin de former le composé PEG_{n+n} porteur de deux fonctions hydroxyles terminales.

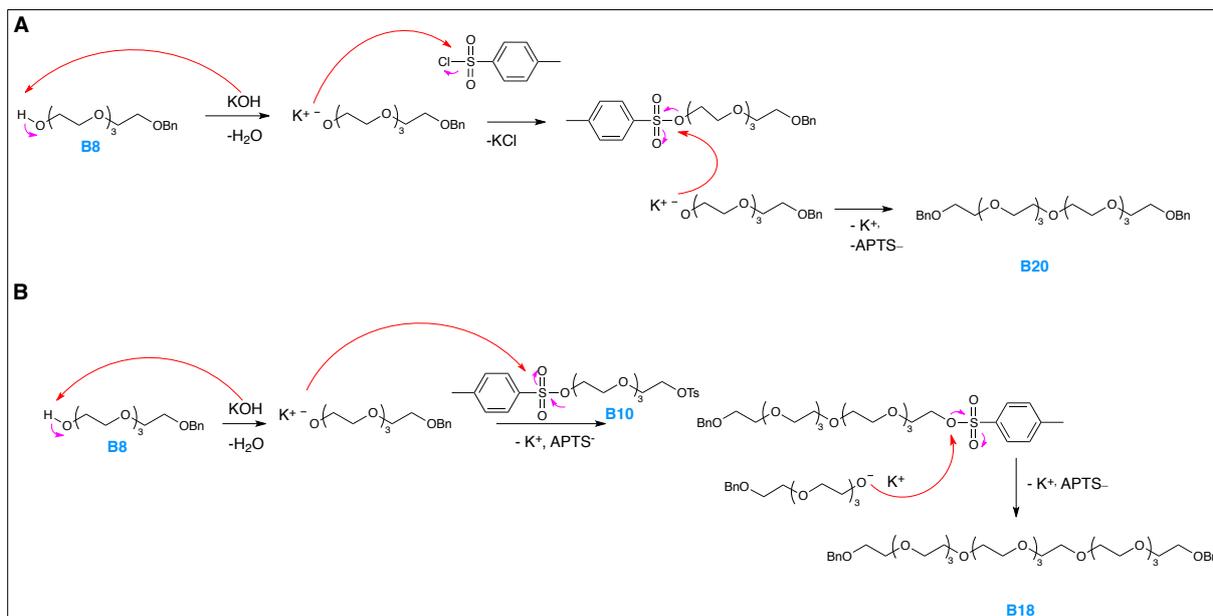


Schéma 44 : Elongation de la chaîne PEG par substitutions nucléophiles successives : A) En présence de chlorure de tosylate ; B) En présence du synthon B10 ditosylé.

A partir de cette voie de synthèse, deux produits finaux ont été obtenus et correspondent aux composés **B30** et **B28**. Le composé **B28** est obtenu à partir du composé **B0** commercial en cinq étapes, alors que le composé **B30** est obtenu après 8 étapes. Ces deux composés ont nécessité la synthèse de deux synthons intermédiaires correspondants aux composés **B8** et **B23** (schéma 45).

La réaction de O-benzylation régiosélective du composé commercial **B0** a formé directement le composé **B8**, constitué de quatre unités éthylène glycol.

La régiosélectivité de cette réaction a été favorisée par l'utilisation d'un excès de tétraéthylène glycol mais a néanmoins généré deux produits de réaction, le dérivé monobenzylé **B8** d'intérêt et le dérivé dibenzylé.

L'isolement du composé **B8** repose notamment sur la solubilité préférentielle du dérivé dibenzylé indésirable dans le cyclohexane puis sur la mise en œuvre de techniques séparatives chromatographiques.

Le synthon **B8** a alors été couplé à lui-même selon le mécanisme réactionnel explicité plus haut afin de générer le composé **B20**, constitué de huit unités éthylène glycol. La déprotection des groupements O-benzyle par hydrogénation catalysée au palladium a permis l'obtention du deuxième synthon intermédiaire **B23** qui possède huit unités éthylène glycol et deux fonctions hydroxyles libres terminales.

A partir du synthon **B23**, le produit **B28** a été obtenu en deux étapes. La première était une monotosylation régiosélective en présence d'oxyde d'argent Ag₂O (composé **B25**) et la deuxième était une réaction d'azidation réalisée selon un mécanisme de substitution nucléophile S_N2 classique (schéma 45).

En outre, le synthon **B23** fut également le précurseur du composé **B30** obtenu en cinq étapes (schéma 45).

Une réaction de monoprotection régiosélective d'un des alcools libres par un groupement O-benzyle a formé le produit **B19** qui, comme le composé **B8**, a subi deux réactions de substitutions nucléophiles successives afin de générer le composé **B21** constitué de seize unités éthylène glycol.

Ce composé a alors été déprotégé par hydrogénation pallado-catalysée (composé **B24**) puis a subi une monotosylation régiosélective (composé **B27**) et enfin une réaction d'azidation pour former le produit final **B30**.

Les étapes de tosylation et de benzylation mises en œuvre pour la synthèse des intermédiaires **B25**, **B27** et **B19** doivent être régiosélectives et ne fonctionnaliser qu'un seul alcool libre.

La stratégie employant un large excès (10 Eq molaire) de composé diol utilisée pour la synthèse du composé **B1** n'a plus été envisageable dans le cadre de cette synthèse multi-étape à cause de la chute drastique des rendements qu'une telle méthode engendre.

En revanche, des méthodes alternatives de monotosylation régiosélective de diols et d'oligoéthylène glycols symétriques ont été étudiées par Bouzide *et al.*⁽¹⁴⁷⁾. Des rendements supérieurs à 84% associés à des régiosélectivités variant de 73% à 98% en faveur du dérivé monotosylé ont été obtenus en utilisant de l'oxyde d'argent (Ag₂O) associé à une quantité catalytique d'iodure de potassium (figure 40).

L'hypothèse avancée pour expliquer cette régiosélectivité est l'existence d'une liaison hydrogène interne entre l'atome d'hydrogène d'une fonction alcool avec l'atome d'oxygène du deuxième hydroxyle consécutivement au repliement de la molécule sur elle-même engendrée par la chélation avec le métal.

L'hydrogène impliqué dans cette liaison faible, noté Ha sur la figure, voit son acidité décroître tandis que celle de son homologue, noté Hb, est exacerbée par cette complexation et devient alors plus disponible.

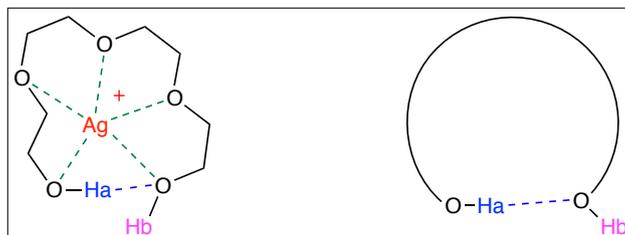


Figure 40 : Mécanisme de la tosylation régiosélective induite par l'utilisation d'oxyde d'argent (I).

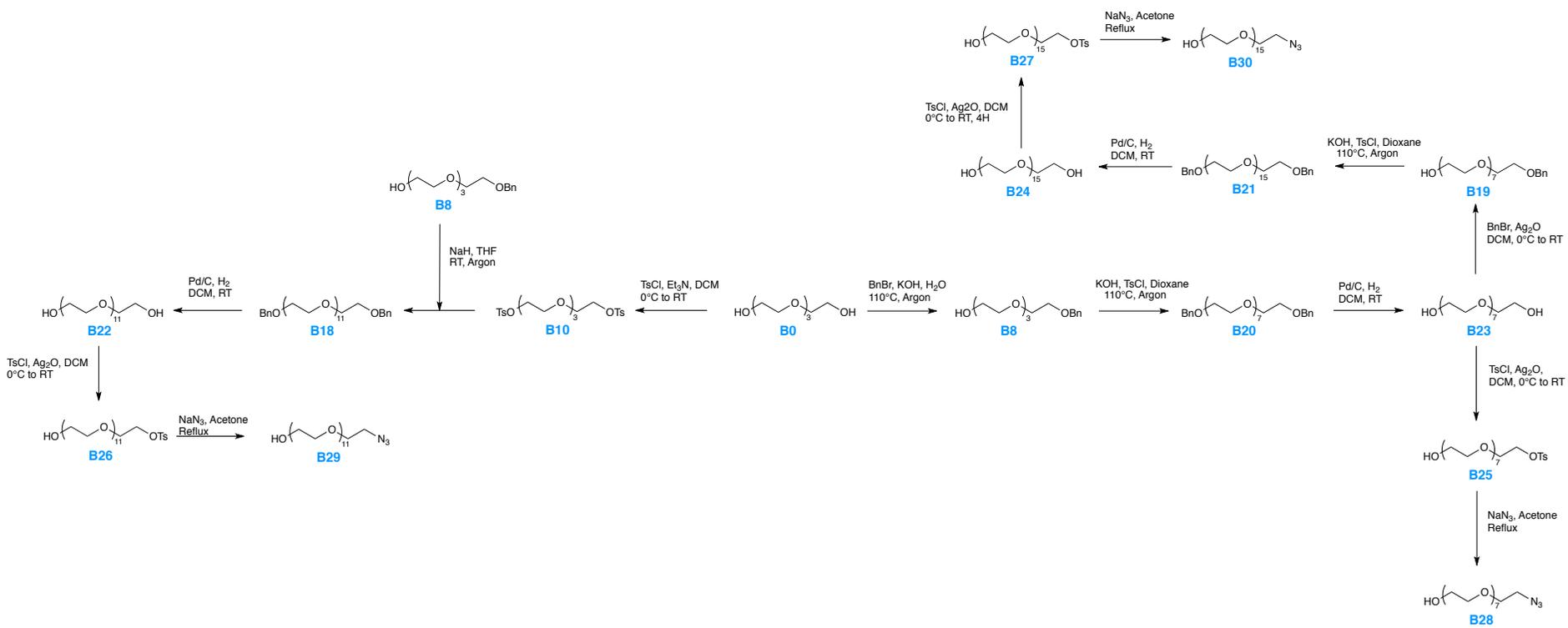
Une stratégie de synthèse similaire a été proposée pour la synthèse du bras espaceur en série PEG₁₂ (schéma 45).

Dans cette synthèse, le composé **B8** s'est substitué, non plus au chlore du TsCl, mais au groupement tosylo porté par le composé **B10** à chacune de ces extrémités selon le mécanisme détaillé dans le schéma afin d'aboutir à un dérivé PEG₁₂ porteur de deux fonctions O-benzyles et correspondant au composé **B18**.

Bien que le produit brut de réaction était composé d'un mélange complexe de dérivés PEG₄, PEG₈ et PEG₁₂, le produit **B18** d'intérêt a pu être isolé après purification par Combi-Flash.

Cet intermédiaire a alors été déprotégé par hydrogénation catalytique et le composé **B22**, constitué de douze unités éthylène glycol et de deux fonctions alcool libre fut alors obtenu. Comme les composés **B23** et **B24**, une tosylation régiosélective Ag₂O-orientée a été mise en œuvre (composé **B26**) et fut suivie d'une réaction d'azidation qui a permis la synthèse du composé final **B29**.

Schema 45 : Synthèse totale convergente permettant l'élongation du bras espaceur en série PEG₈, PEG₁₂ et PEG₁₆.



II-2-2 ÉLONGATION DU BRAS ESPACEUR VIA DES PONTS TRIAZOLES

L'élément clef de cette stratégie d'extension du bras espaceur est la mise en œuvre d'une réaction de chimie-click entre une unité PEG₄ fonctionnalisée avec un azoture (composés **B2**, **B3** ou **B11**) et un deuxième motif PEG₄ fonctionnalisé avec un groupement alcyne terminal (composé **B15**). Lorsque le bras espaceur a la dimension souhaitée, il est hétérofonctionnalisé afin de permettre son insertion sur les nanoparticules et son couplage avec l'aptamère (schéma 48).

Cette réaction de chimie-click a été décrite pour la première fois par Sharpless *et al.*^(148a) en 2001 et s'inspire de la réaction de 1,3-cycloaddition dipolaire précédemment développée par Huisgen *et al.*⁽¹⁴⁹⁾⁽¹⁵⁰⁾ en 1963 (schéma 46).

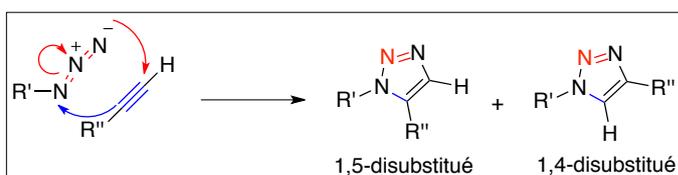


Schéma 46 : Principe de la réaction de 1,3-cycloaddition dipolaire développée par Huisgen.

Cette cycloaddition dipolaire de Huisgen correspond à la réaction entre un composé dipolarophile comme un dérivé alcyne avec un composé 1,3-dipolaire comme un groupement azoture.

Lors de cette réaction, deux des électrons π de l'alcyne (en bleu sur le schéma 46) et quatre électrons π de l'azoture (en rouge) sont impliqués dans une délocalisation péricyclique selon un mécanisme concerté.

Cette cycloaddition, réalisée à chaud, est stéréoconservative mais n'est pas régiosélective et dépend notamment de l'encombrement stérique et des effets électroniques engendrés par les substituants des réactifs lorsque ceux-ci sont asymétriques. Cela aboutit à la formation de composés triazoles 1,4 ou 1,5-disubstitués.

La modification de cette méthode par Sharpless permet d'améliorer la régiosélectivité de la réaction avec un composé porteur d'un groupement alcyne terminal.

Dans cette réaction de chimie-click, le cuivre à l'état d'oxydation I (Cu⁺) sert de catalyseur et permet d'accélérer la cinétique d'un facteur 10⁷. Ce cuivre Cu⁺ peut être généré in-situ par réduction du sulfate de cuivre (CuSO₄) ou de tout autre sel cuivrique (Cu II) en présence d'ascorbate de sodium ou résulter directement de la dissociation d'un complexe ou de celle d'un halogénure cuivreux comme CuBr ou CuI (schéma 47).

Néanmoins, l'utilisation de CuSO₄ associé à un léger excès d'ascorbate de sodium est préférable car cela permet de prévenir une éventuelle réoxydation du cuivre Cu⁺ (I) en Cu²⁺ (II).

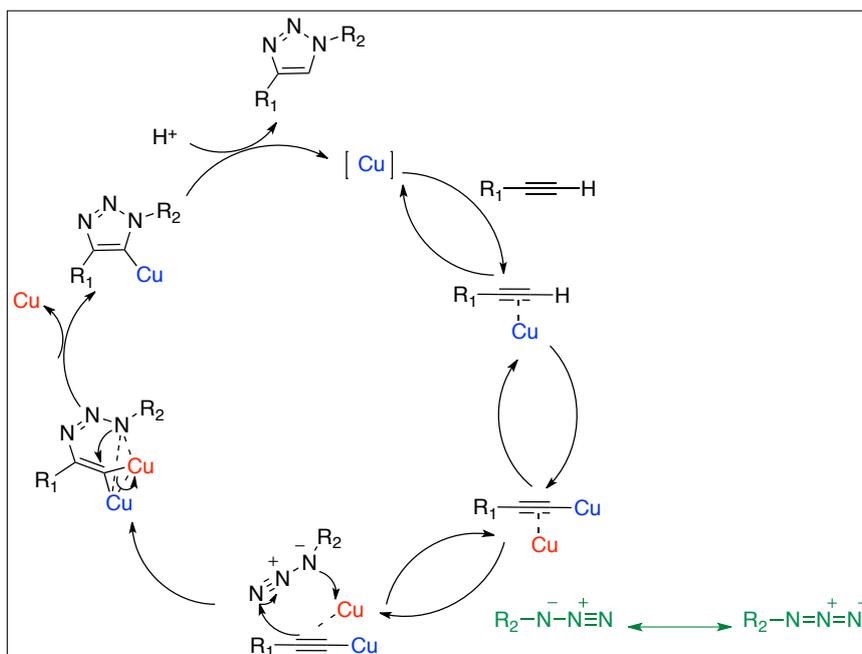


Schéma 47 : Mécanisme de la réaction de chimie click catalysée au cuivre I^(148b).

Cette cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée au cuivre permet d'obtenir d'excellents rendements, ne génère pas de produits indésirables et est stéréospécifique. De plus, elle est applicable à de nombreux composés, peu sensible vis à vis de nombreux groupements fonctionnels et est utilisable dans des conditions variées de pH, de solvant ou de température.

Afin de réaliser l'élongation de ces bras espaceurs, plusieurs voies de synthèse ont été envisagées à partir de quatre synthons de départ différents :

- Le composé **B15** qui porte une fonction alcyne terminale et dont la fonction alcool est protégé par un groupement OTHP
- Le composé **B2** monofonctionalisé avec un groupement azoture (schéma 49)
- Le composé **B3** dont les groupements hydroxyles sont convertis respectivement en fonction azoture et tosyle (schéma 50)
- Le composé **B11** qui présente une double fonctionnalisation azoture sur chacun de ces hydroxyles (schéma 48).

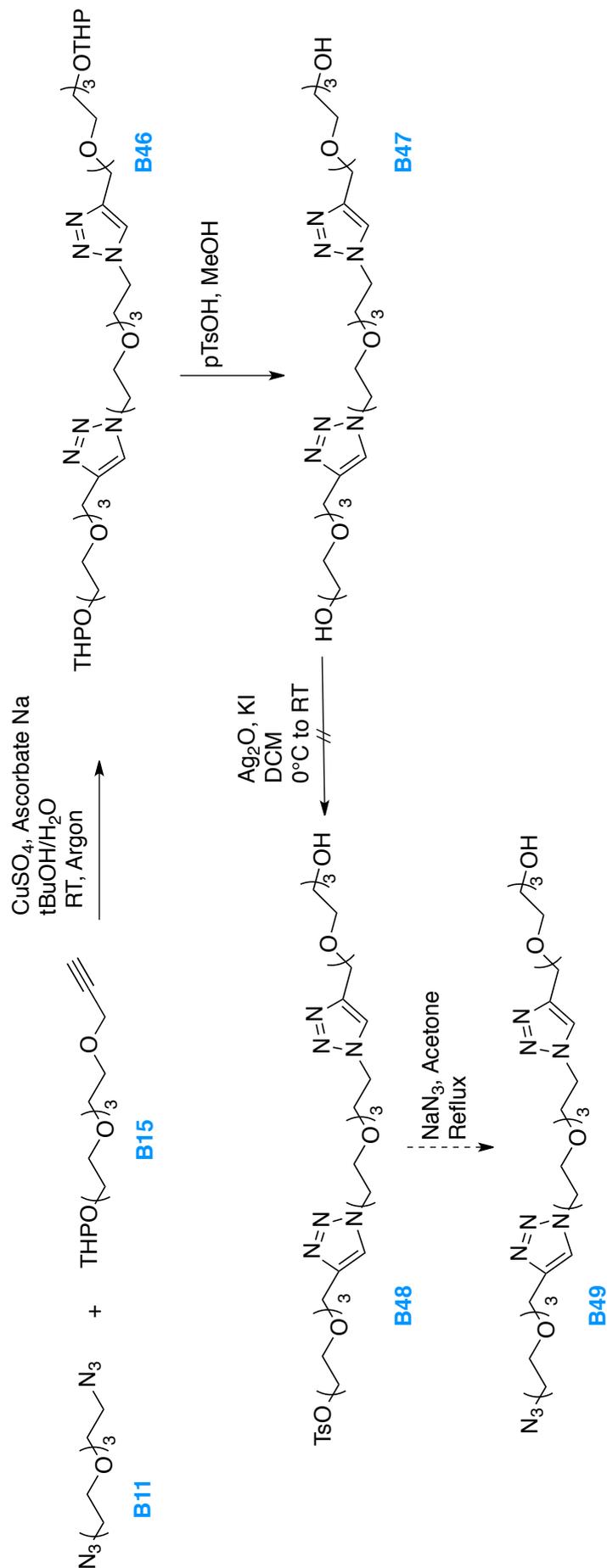


Schéma 48 : Première stratégie d'élongation de la chaîne PEG par des ponts triazoles, à partir du synthon B11 dont chaque extrémité est fonctionnalisée avec un groupement azoture et du synthon B15.

La première stratégie de synthèse envisagée consistait à mettre en œuvre une réaction click entre le composé **B15** et le composé **B11** afin d'obtenir directement une chaîne constituée de trois unités PEG₄ et de deux ponts triazoles (composé **B46**) (schéma 48).

Après hydrolyse des groupements protecteurs (composés **B47**), la conversion d'un des deux groupements hydroxyles en azoture (composé **B49**) permettant le couplage avec l'aptamère a été obtenue en deux étapes : une monotosylation régiosélective en présence d'oxyde d'argent Ag₂O (composé **B48**) suivie d'une réaction d'azidation. Malheureusement, la réaction de conversion régiosélective de l'alcool en tosylo fut un échec.

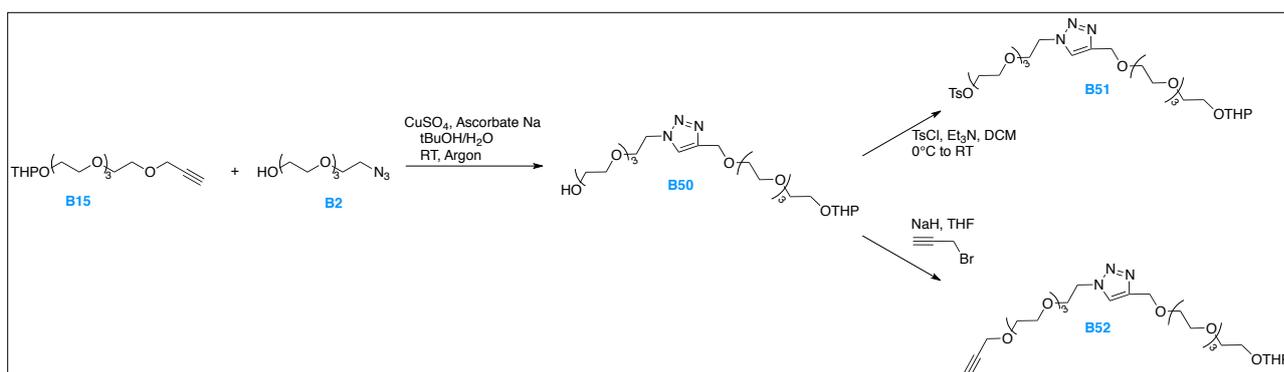


Schéma 49 : Stratégie d'élongation à partir du synthon B2 porteur d'une fonction hydroxyle non protégée.

Cette faible réactivité de l'alcool a également été observée après la réaction de click entre le composé **B2** et le composé **B15**. En effet, le synthon **B50** ainsi obtenu ne fut pas réactif ni vis à vis de la tosylation, ni vis à vis de la propargylation (schéma 49).

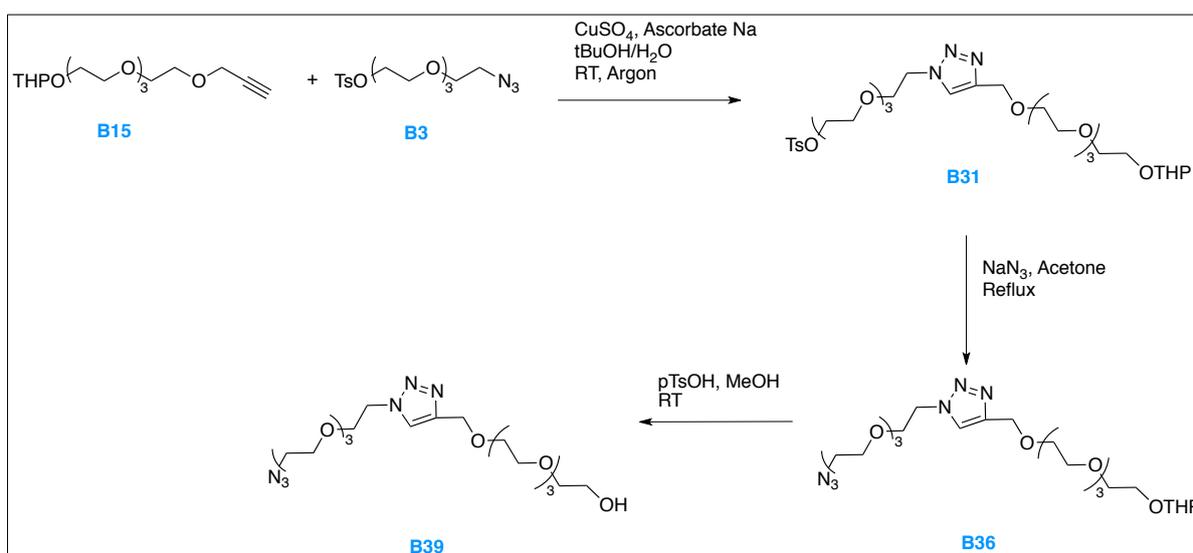


Schéma 50 : Elongation de la chaîne PEG avec le synthon B15 et le synthon B3 dont la fonction hydroxyle terminale a été substituée par un groupement tosylo nucléofuge.

Une deuxième stratégie de synthèse a alors été mise au point et consistait en une élongation séquentielle du bras espaceur. La première étape fut une réaction de click entre le composé **B3** et le composé **B15** et a formé le composé **B31** avec un rendement de 98% (schéma 50).

A partir de ce synthon **B31**, une réaction d'azidation a formé le composé **B36** avec un rendement de 47% (schéma 50).

Ce composé fut alors déprotégé par hydrolyse du groupement OTHP en milieu acide et a conduit à l'obtention du composé **B39** avec un rendement de 79% après purification (schéma 50).

Ce produit final **B39** est constitué de deux unités PEG₄ associées par un pont triazole et d'une extrémité azoture.

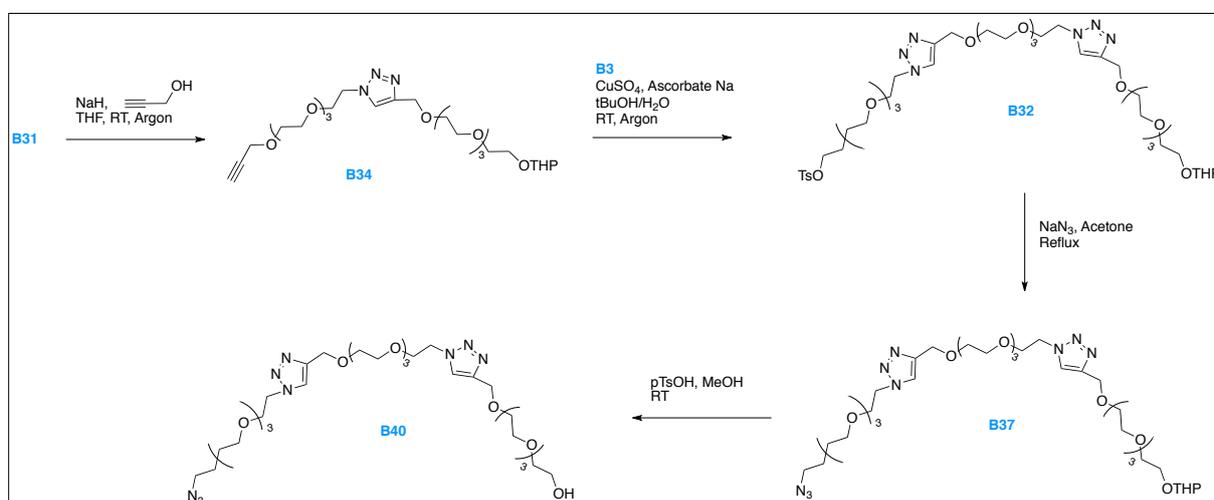


Schéma 51 : Synthèse de la chaîne PEG constituée de trois unités tétraéthylène glycol reliées entre elles par des ponts triazoles.

Cependant, à partir de **B31**, l'élongation du bras espaceur a pu être poursuivie afin d'obtenir le composé **B40**, constitué de 3 unités PEG₄ et de deux ponts triazoles, en 4 étapes ; ou le composé **B41**, constitué de 4 unités PEG₄ et de trois ponts triazoles, en 6 étapes (schéma 51).

Le synthon **B32** fut obtenu par conversion du tosyloxy en alcyne terminal via une réaction de substitution nucléophile S_N2 par l'alcool propargylique qui a formé le composé **B34** avec un rendement de 82%. Une réaction de click fut ensuite mise en œuvre et a généré le synthon d'intérêt avec un rendement de 99%.

Comme le synthon **B31**, ce synthon **B32**, a pu être engagé dans la fonctionnalisation du bras espaceur et a formé le composé **B40** après azidation (composé **B37**) et déprotection avec des rendements respectifs de 100% et de 43% (après purification) (schéma 51).

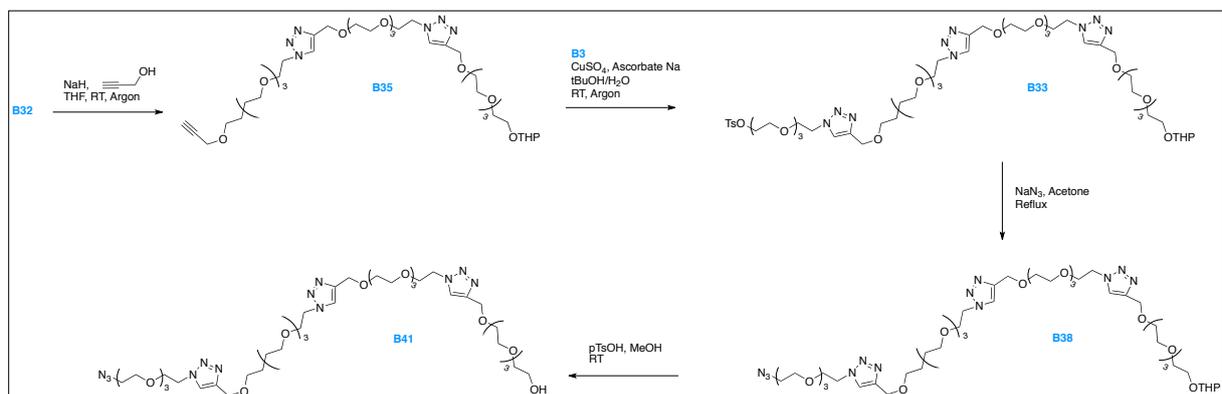


Schéma 52 : Synthèse du bras espaceur constitué de quatre unités tétraéthylène glycol.

En outre, il peut servir de précurseur pour la synthèse du produit **B41** en formant, après propargylation, l'alcyne **B35** avec un rendement de 81%. **B35** fut alors engagé dans la réaction de click avec le composé azoté **B3** pour générer le composé **B33** avec un rendement de 98% (schéma 52).

Le groupement tosylé a alors été converti en azoture (composé **B38**) avec un rendement de 82% puis déprotégé pour obtenir le produit final **B41** avec un rendement de 44% après purification.

II-3 CONCLUSION

Avec ces différents travaux de synthèse, plusieurs séries de ligands ont été obtenues.

La série PEG₄ servira de modèle pour la fonctionnalisation des AuNPs et le couplage avec des biomolécules, afin de déterminer les conditions expérimentales optimales. Pour atteindre cet objectif, l'une des deux fonctions hydroxyles a été convertie en azoture et sera additionnée sur l'alcyne terminal d'une biomolécule.

L'hydroxyle restant a, dans un premier temps, été converti en groupement thio-protégé. Malheureusement, les premières tentatives de fonctionnalisation des nanoparticules d'or à partir de bras espaceur pegylés porteurs d'une fonction thiol protégée sous forme de thioacétate (B5) ou de thiotrityle (B4) furent décevantes et ont conduit à une destruction des AuNPs. La forte modification de la cinétique, du pH et de la force ionique induite par l'utilisation d'hydroxyde de sodium a conduit à abandonner la stratégie thioacétate.

Une stratégie alternative a également été élaborée et consistait à utiliser des linkers porteurs de groupements disulfures générés par l'oxydation du thioacétate ou via le couplage avec une molécule d'acide lipoïque.

Les séries PEG₈, PEG₁₂ et PEG₁₆ seront ainsi utilisées pour évaluer l'influence de la longueur du ligand sur les propriétés optiques et électroniques des AuNPs mais aussi sur la stabilité de ces nanoparticules. Chacune des molécules de ces séries a vu l'une de ses fonctions hydroxyles terminales convertie en azoture pour la conjugaison avec des bio-entités alors que l'autre est restée sous forme libre et a été couplée à l'acide lipoïque pour pouvoir être reliée à la nanoparticule d'or.

Malgré le manque de réussite des tests d'insertion du ligand à la surface des AuNPs à partir du thiotrityle, la nécessité de déprotéger ce groupement par le triéthylsilane nous a orienté vers l'utilisation de ce réducteur pour la synthèse des AuNPs.

CHAPITRE III : VERS UNE NOUVELLE VOIE DE SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'OR

III-1 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'OR

La voie de synthèse des nanoparticules d'or a été précédemment développée au sein de l'équipe E3 SAMCat de l'IC2MP⁽¹⁵¹⁾. Le protocole s'inspire de la méthode de Turkevich⁽⁶³⁾⁽⁷³⁾ et est réalisé en milieu aqueux sans utiliser d'agent de transfert de phase comme le CTAB, potentiellement cytotoxique.

Les nanoparticules sont obtenues à partir d'acide tétrachloroaurique (HAuCl_4) en présence de citrate de sodium qui joue le rôle de réducteur, et d'hydroxyde de sodium qui joue à la fois un rôle de tampon et de neutralisation.

En effet, la synthèse des nanoparticules correspond à la réduction du sel d'or aurique Au^{3+} en or métallique Au^0 . Cette réduction est assurée par le citrate de sodium dont l'alcool en position 3 s'oxyde en cétone (en bleu sur le schéma) et libère une molécule de formate de sodium (en violet) comme le montre le schéma 53.

Le citrate de sodium intervient également dans la stabilisation de la nanoparticule ainsi formée grâce à des interactions faibles de type électrostatique qui s'établissent entre les deux groupements carboxylate (en vert sur le schéma) et les électrons de surface de la nanoparticule d'or.

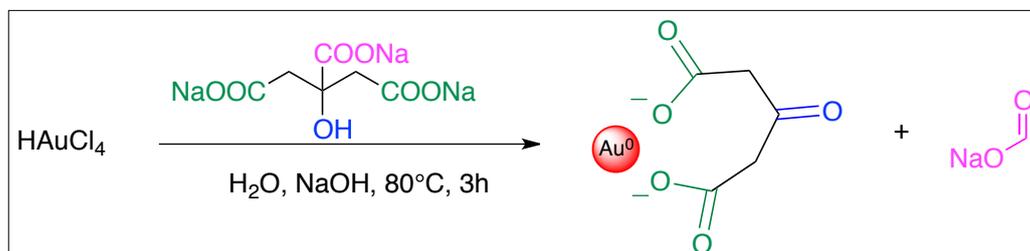


Schéma 53 : Synthèse des nanoparticules d'or en milieu aqueux à partir de sels d'or aurique Au^{3+} et en présence de soude et de citrate de sodium.

Dans cette méthode adaptée de la synthèse de Turkevich, l'hydroxyde de sodium NaOH permet non seulement de réguler le pH du milieu réactionnel mais également de capter les ions chlorures Cl^- libérés au cours de l'oxydation des sels d'or Au^{3+} .

La régulation du pH permet d'influer sur la cinétique de la réaction de nucléation et donc sur la taille finale des clusters de nanoparticules d'or⁽¹⁵²⁾. En effet, plus la solution de sels d'or est acide, plus la nucléation et la croissance des nanoparticules d'or sont rapides et plus les nanoparticules sphériques présentent une hétérogénéité de taille. En revanche, le maintien du milieu réactionnel à un pH alcalin (pH compris entre 8,5 et 9) va permettre de ralentir la cinétique de croissance des nanoparticules et d'obtenir des nanoparticules sphériques homodisperses dont le diamètre sera compris entre 20 et 50 nm⁽⁷⁷⁾.

Tout comme le pH, la température est un paramètre extrêmement important dans le processus de nucléation et de croissance des nanoparticules⁽¹⁵³⁾⁽¹⁵⁴⁾.

Nous avons vu précédemment que les nanoparticules d'or présentaient des propriétés optiques et électroniques uniques et que ces propriétés étaient corrélées à la taille et à la forme des nanoparticules.

Cela se vérifie au décours de la réaction de synthèse des nanoparticules. En effet, la solution aqueuse d'acide aurique présentait une coloration jaune vif qui traduisait la présence d'or sous forme Au^{3+} . Cependant, 60 minutes après l'ajout des différents réactifs, on a constaté que cette coloration disparaissait et que le milieu réactionnel se colorait en rose. Cette coloration s'intensifiait de plus en plus et le milieu prenait une teinte d'un rouge profond environ 2 heures après le début de la réaction.

Cette couleur rouge est caractéristique de la présence d'une population isotrope en taille et en forme de nanoparticules sphériques d'or métallique Au^0 .

Le protocole détaillé de la synthèse des nanoparticules en milieu aqueux et en présence de citrate de sodium comme agent réducteur est présenté dans la section expérimentale de ce manuscrit (procédure NP1).

Les nanoparticules ainsi synthétisées ont ensuite été analysées par spectroscopie UV-Visible ainsi que par microscopie électronique à transmission (MET).

Dans le cas des nanoparticules d'or sphériques, les composantes (transverse et longitudinale) évoquées précédemment se superposent en une seule bande d'absorption, ce qui est corrélé par l'analyse UV-Visible qui montre la présence d'un pic d'absorbance unique dont le maximum correspond à une valeur de longueur d'onde de 530 nm⁽¹⁵⁵⁾⁽¹⁵⁶⁾.

L'analyse MET confirme la formation d'une population de nanoparticules en grande majorité sphériques. Seule une petite partie des nanoparticules présente des formes non sphériques : triangulaire ou cylindrique principalement.

Le comptage des nanoparticules à partir des images de MET a montré des nanoparticules présentant un diamètre moyen de 30 nm avec une assez large distribution de taille.

Afin de réduire cette anisotropie de taille, les nanoparticules d'or ont été soumises à des cycles de centrifugation en exerçant une accélération croissante. Le premier cycle de centrifugation réalisé à 2500 rotations par minutes (rpm) a permis d'éliminer les nanoparticules de grande taille et le culot ainsi obtenu ne fut pas conservé. Les cycles de centrifugation ultérieurs (5000, 10000 et 15000 rpm respectivement) permettaient théoriquement de séparer les différentes populations de nanoparticules en

fonction de leur taille. Plus l'accélération appliquée était importante, plus cela favorisait la sédimentation des nanoparticules, même de petite taille. Ainsi, le dernier cycle de centrifugation à 15000 rpm devait permettre de récupérer uniquement les nanoparticules les plus petites, les nanoparticules de taille plus importante ayant sédimentées au cours des cycles précédents.

Sur chacun de ces culots de centrifugation, une analyse UV-Visible ainsi qu'une analyse MET ont été réalisées (figure 41). On a constaté que le processus de centrifugation ne semblait pas avoir eu d'influence sur le maximum d'absorption qui est resté à 530 nm quel que soit l'échantillon analysé.

En revanche, l'analyse par MET montre que l'étape de centrifugation semblait nécessaire pour séparer les nanoparticules en différentes populations de taille et pour réduire la distribution de taille au sein d'une même population.

La différence de population de nanoparticules était particulièrement marquée entre les culots de centrifugation à 5000 et 10000 rpm alors qu'elle était presque négligeable entre les culots de centrifugation à 10000 et 15000 rpm.

En effet, le diamètre moyen des nanoparticules analysées par MET après centrifugation à 5000 rpm était de 32 ± 6 nm alors qu'il n'était plus que de 24 ± 8 nm et 23 ± 4 nm après centrifugation à 10000 et 15000 rpm respectivement.

Il est également intéressant de noter que l'intensité du signal UV-Visible décroissait au fur et à mesure des cycles de centrifugation. Or, d'après la loi de Beer-Lambert, l'intensité du signal est directement corrélée à la quantité de nanoparticules ce qui signifie que la quantité de nanoparticules présentes dans les culots diminuait.

Avec cette voie de synthèse dérivée de la méthode de Turkevich, deux populations de nanoparticules sphériques ont été obtenues, la première, majoritaire, présentant un diamètre moyen de 32 ± 6 nm et la seconde avec un diamètre moyen de 24 nm. La figure 41 présente une photographie de la suspension de nanoparticules d'or avant centrifugation (en haut à gauche, encart a) ainsi que les spectres d'absorbance UV-Visible en fonction de l'accélération de centrifugation (en bas à gauche, encart b) et les images MET obtenues après centrifugation à 5000, 10000 et 15000 rpm (à droite, respectivement en haut, au milieu et en bas, encart c).

Ces nanoparticules d'or se caractérisent par une coloration rouge vif corrélée à leur pic d'absorption UV-Visible dont le maximum correspond à une valeur de longueur d'onde λ_{\max} de 530 nm.

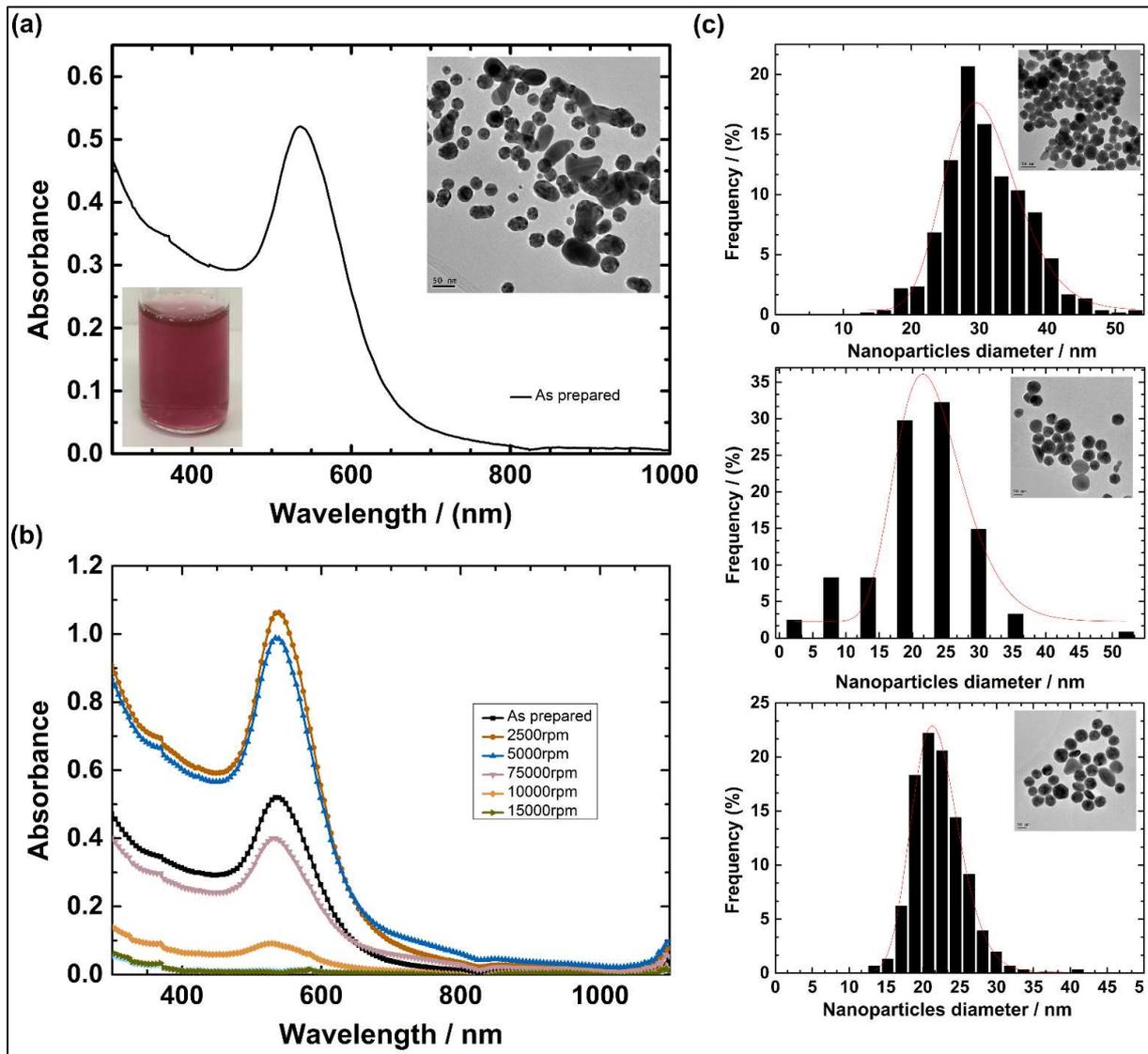


Figure 41 : a) Spectre UV-Visible de la solution colloïdale de nanoparticules d'or obtenues avec la synthèse dérivée de Turkevich et photographie de ces nanoparticules montrant la coloration rouge typique des solutions de nanoparticules d'or sphériques ; b) Spectres UV-Visible de ces nanoparticules après les différents cycles de centrifugation ; c) Diagramme de distribution de la taille des nanoparticules d'or après centrifugation à 5000 rpm (en haut), 10000 rpm (au milieu) et 15000 rpm (en bas).

III-2 SYNTHÈSE DES AuNPS ET DÉPROTECTION IN-SITU EN PRÉSENCE DE TRIÉTHYLSILANE Et₃SiH

Malgré des premiers résultats peu satisfaisants, la mise en œuvre de la déprotection du thiotriptyle par le triéthylsilane Et₃SiH reste prometteuse. En effet, l'utilisation de dérivés alkylsilanes comme agents réducteurs pour la synthèse de nanoparticules métalliques, notamment les nanoparticules d'argent (AgNPs) et les nanoparticules d'or (AuNPs), a déjà été décrite⁽¹⁵⁷⁾⁽¹⁵⁸⁾.

Une nouvelle hypothèse de travail a alors été proposée et consistait à remplacer le citrate par le triéthylsilane comme agent réducteur pour la synthèse des AuNPs puis à réaliser la déprotection in-situ du composé [B4](#).

La voie classique de synthèse des AuNPs en présence de citrate servira de référence pour évaluer l'efficacité de cette nouvelle voie de synthèse.

C'est pourquoi nous avons essayé de déterminer les conditions opératoires permettant la réduction de l'or aurique Au³⁺ en or métallique Au⁰ en substituant le citrate de sodium par du triéthylsilane selon la procédure NP2A détaillée dans la section expérimentale.

Cependant, le triéthylsilane étant insoluble dans l'eau, la solution à la concentration de 170 mM a été réalisée non plus dans l'eau mais dans un mélange binaire H₂O/Acétone en proportion 50/50.

Malheureusement, cet essai d'insertion du ligand fut encore un échec qui se traduit par une absence de formation des AuNPs ou leur agrégation sous forme de particules sédimentaires noires de grande taille.

Cet insuccès est consécutif à l'insolubilité du réducteur en phase aqueuse : un milieu biphasique avec une fine pellicule de surnageant qui correspond vraisemblablement au réducteur silylé est obtenu. De plus, l'acétone utilisée pour solubiliser le réactif est un solvant relativement volatil avec un point d'ébullition de 56°C qui s'évapore au cours de la réaction. Cependant, l'insolubilité du réducteur n'est pas le seul paramètre responsable de cet échec.

Le deuxième facteur concerne les solvants utilisés pour la réaction. En effet, l'ajout d'acétone sur des AuNPs synthétisées entraîne leur dégradation et leur agglomération les unes aux autres.

Afin de contourner ces différentes difficultés, un nouveau mélange binaire a été proposé. Il s'agit du mélange H₂O/PEG₄. Le haut point d'ébullition (t_{eb}= 314°C) du tétraéthylène glycol associé à ses propriétés de solubilisation devrait permettre de réaliser la synthèse des nanoparticules en présence de triéthylsilane sans risque d'évaporation et donc avec une solubilité constante.

La synthèse des AuNPs dans ces nouvelles conditions a alors été réalisée en suivant la procédure NP2B détaillée dans la section expérimentale.

Afin de déterminer les conditions opératoires optimales, différents essais ont été réalisés en faisant varier la concentration en réducteur en présence ou non d'acide trifluoroacétique. Il a ainsi été constaté que l'acide trifluoroacétique ne semblait pas influencer sur le processus de nucléation et de croissance des nanoparticules.

De plus, la synthèse fut beaucoup plus rapide qu'en présence de citrate, en effet, 30 minutes après l'ajout du réactif silylé, une coloration intense et stable du milieu réactionnel est observée.

Cependant, quelle que soit la concentration de triéthylsilane employée, cette coloration est restée très violacée ce qui traduit une anisotropie de taille et/ou de forme de la population de nanoparticules.

Toujours dans un souci d'optimiser les conditions opératoires, l'influence de la température sur la synthèse des nanoparticules a été étudiée. Il a été constaté que plus la température diminuait, plus la cinétique de la réaction était ralentie.

Bien que les solutions obtenues soient encore assez violacées (tableau 2), ce qui correspond à une population hétérogène de nanoparticules, ces résultats étaient assez prometteurs.

	H ₂ AuCl ₄	H ₂ O/PEG ₄ 50/50	Citrate	NaOH	Et ₃ SiH	Résultat
NP1	2.5 mM 2 mL	18 mL	170 mM 0,6 mL	20 mM 1 mL		 (80°C)
NP2B-1	2.5 mM 2 mL	18 mL		20 mM 1 mL	170 mM 0,6 mL	 (TA)
NP2B-2	2.5 mM 2 mL	18 mL		20 mM 1 mL	85 mM 0,6 mL	 (TA)
NP2B-3	2.5 mM 2 mL	18 mL		20 mM 1 mL	340 mM 0,6 mL	 (TA)
NP2C	2.5 mM 2 mL	18 mL		20 mM 1 mL		 (TA)

Tableau 2 : Récapitulatif des AuNPs obtenues après synthèse en présence de différentes concentrations de Et₃SiH comme agent réducteur (NP2-1 à NP2-3). L'entrée NP1 correspond aux conditions classiques de synthèse des AuNPs en présence de citrate comme agent réducteur. L'entrée NP2-4 correspond à la synthèse des AuNPs en présence de PEG₄ uniquement.

Malheureusement, l'étape de déprotection du linker **B4** a encore conduit à une dégradation complète des AuNPs avec l'obtention d'un milieu très hétérogène faisant apparaître des AuNPs agrégées les unes aux autres sous forme de grosses particules sédimentaires noires ainsi que le composé **B4** présent sous forme de congglomérats insolubles.

III-3 SYNTHÈSE DES AUNPS EN PRÉSENCE DE PEG₄

III-3-1 UNE OBSERVATION INATTENDUE

Lors des essais d'optimisation de synthèse des AuNPs par le Et₃SiH en milieu biphasique H₂O/PEG₄, la séquence d'introduction des différents composants a été modulée (Cf. procédure **NP2B** et **NP2C** de la section expérimentale).

Lorsque la procédure **NP2C** a été mise en œuvre, l'apparition d'une coloration rose du milieu réactionnel a été observée, cela révèle la formation de nanoparticules d'or.

Non seulement cette coloration est survenue avant même l'introduction du réducteur mais s'intensifie de plus en plus jusqu'à devenir rouge (tableau 2, entrée **NP2C**). Cela signifie que la présence du PEG₄ a permis la réduction du sel d'or aurique Au³⁺ en or métallique Au⁰.

Considérant d'une part les propriétés de biocompatibilité du tétraéthylène glycol

et d'autre part la rapidité de la synthèse des AuNPs, un nouvel axe d'étude relatif à la synthèse des nanoparticules d'or en présence de PEG₄ a été exploré.

III-3-2 ÉTUDE DES FACTEURS INFLUENÇANT LA SYNTHÈSE DES AuNPS

Plusieurs procédures ont été mises en œuvre afin d'étudier l'influence du PEG₄ sur le processus de synthèse des AuNPs et d'évaluer son impact sur deux facteurs : la taille et la forme des nanoparticules obtenues.

Dans chacune des procédures envisagées, l'étude de l'aspect des nanoparticules d'or obtenues en fonction de la quantité de PEG₄ introduite dans le milieu réactionnel a été effectuée. Un intérêt particulier a été porté sur l'influence du ratio volumique PEG₄/H₂O rapporté au volume réactionnel total qui est constant et égal à 23 mL.

Ces procédures différaient néanmoins les unes des autres par la présence (procédure [NP3A](#)) ou l'absence de soude (procédure [NP3B](#)), par l'ordre d'introduction du PEG₄ par rapport à l'eau. Cette introduction a été séquentielle (procédures [NP3](#)) ou simultanée (procédure [NP4](#)).

Des essais ont également été réalisés à partir de sels d'or non plus dissous dans de l'eau mais dans un mélange H₂O/PEG₄ dont on a fait varier les proportions (procédures [NP5](#)).

Après chaque synthèse, les AuNPs obtenues ont été photographiées et analysées par spectrométrie UV-Visible afin de déterminer leurs λ_{\max} respectives. Pour chacune des procédures engagées, les résultats sont répertoriés dans les tableaux 2 à 6 et les spectres UV-Visible sont représentés dans les figures 42 à 46 respectivement.

III-3-2-1 INFLUENCE DU RATIO PEG₄/H₂O

La procédure [NP3A](#) (tableau 2) mimait les conditions expérimentales de la synthèse préalablement développée au sein du laboratoire mais le citrate était remplacé par du PEG₄.

Il a été constaté que pour des ratios volumiques PEG₄/H₂O inférieurs ou égaux à 25%, des suspensions rouge vif de nanoparticules ont été obtenues ce qui correspondait à la formation d'une population homogène de AuNPs sphériques.

Pour des ratios PEG₄/H₂O compris entre 35 et 55%, la coloration de la suspension obtenue était de plus en plus violacée ce qui traduisait la formation d'une population de nanoparticules présentant une anisotropie de taille.

Pour des ratios PEG₄/H₂O compris entre 65 et 90%, la synthèse fut un échec et le milieu réactionnel apparaissait sous la forme d'une solution légèrement jaune pâle arborant des reflets dorés et la présence d'un dépôt jaune or. Les reflets dorés peuvent

correspondre à la synthèse de nanoparticules de très grande taille et en forme d'étoile. Le dépôt jaune peut être provoqué par l'agrégation de ces grosses particules associées à la présence résiduelle de sels d'or aurique Au^{3+} qui n'a pas réagi.

Lorsque le ratio volumique PEG_4/H_2O fut augmenté de 110% à 665%, la synthèse fut également un échec mais a abouti à des suspensions violettes hétérogènes avec un dépôt également violacé de particules agrégées.

Cependant, cette coloration violacée était de plus en plus marquée et est devenue franchement bleue pour des ratios supérieurs à 475% (NP3B-19 et NP3B-20). En parallèle, la présence du dépôt s'est estompée avec la progression de la coloration violacée et a disparu dans les suspensions bleutées.

Ces résultats sont corrélés avec ceux obtenus par spectrométrie UV-Visible (figure 42). En effet, les spectres des solutions correspondants aux ratios 5 à 25% montrent un pic unique d'absorbance dont l'allure est gaussienne et centré sur la λ_{max} , ce qui signifie que les AuNPs obtenues sont de forme sphérique et que la population présente une distribution de taille et de forme homogène. Ce pic s'élargit de plus en plus lorsque le ratio augmente de 35 à 45% (courbe orange et violet délavé, figure 42) et s'épaule totalement sur la droite pour des ratios supérieurs à 55%.

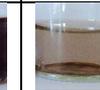
	NP 3A-1	NP 3A-2	NP 3A-3	NP 3A-4	NP 3A-5	NP 3A-6	NP 3A-7	NP 3A-8	NP 3A-9	NP3 A-10
HAuCl ₄ 2,5 mM (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NaOH 20 mM (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O (mL)	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10
PEG ₄ (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PEG ₄ /H ₂ O ratio (% v/v _{Tot})	5	10	15	20	25	35	45	55	65	75
Aspect										
	NP 3A-11	NP 3A-12	NP 3A-13	NP 3A-14	NP 3A-15	NP 3A-16	NP 3A-17	NP 3A-18	NP 3A-19	NP 3A-20
HAuCl ₄ 2,5 mM (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
NaOH 20 mM (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
H ₂ O (mL)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
PEG ₄ (mL)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
PEG ₄ /H ₂ O ratio (% v/v _{Tot})	90	110	130	155	185	230	285	360	475	665
Aspect										

Tableau 3 : Photographies des AuNPs obtenues après synthèse selon la procédure NP3A.

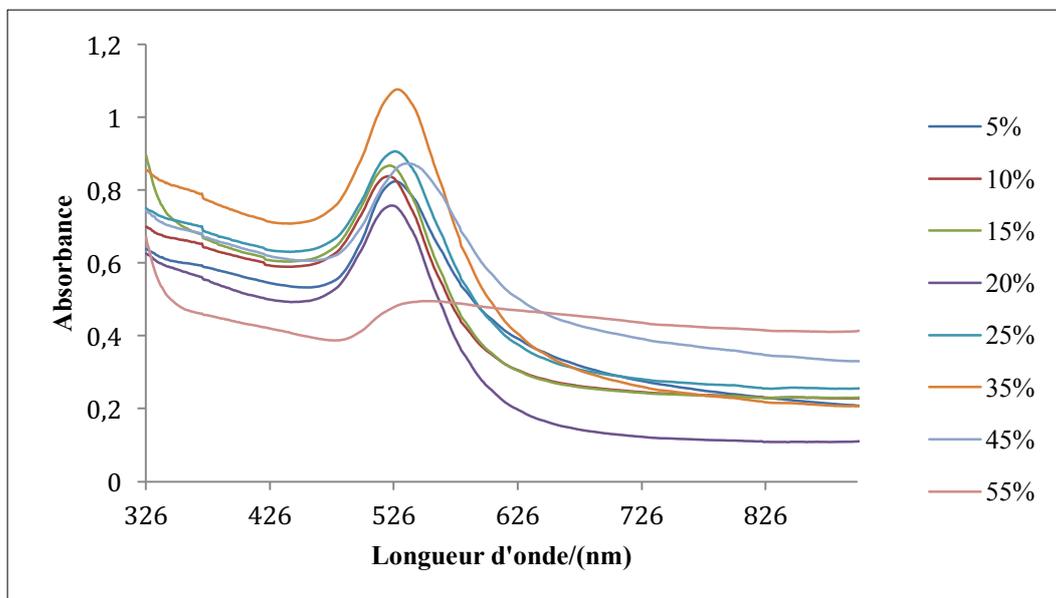


Figure 42 : Spectre UV-Visible des nanoparticules obtenues selon les différentes conditions explorées lors de la mise en œuvre de la procédure NP3A.

La procédure **NP3B** (tableau 4) futt identique à la procédure **NP3A** mais a été réalisée en l'absence de soude et les résultats observés furent très similaires à ceux obtenus précédemment.

En effet, pour des ratios PEG₄/H₂O inférieurs ou égaux à 35%, une suspension rouge vif a été obtenue, ce qui correspondait à une population de nanoparticules d'or monodisperse en taille et en forme.

Ces résultats macroscopiques subjectifs sont corrélés avec l'analyse UV-Visible (figure 43) qui montre la présence d'un seul et unique pic d'absorbance d'allure gaussienne et centré sur la λ_{\max} .

Plus le ratio PEG₄/H₂O augmente, plus il est observé une détérioration de la coloration et de l'aspect du milieu réactionnel qui de rouge vif devient plus violacé (**NP3B-7**) et opalescent (**NP3B-8**).

L'obtention d'une suspension violette de nanoparticules correspond à une anisotropie de taille et/ou de forme des nanoparticules. Cette hypothèse a été vérifiée par l'analyse spectrale qui montre un pic très élargi mais néanmoins centré sur la λ_{\max} . L'aspect trouble de la suspension observée en NP3B-8 est lié à la présence de reflets dorés qui correspondent à la formation de nanoparticules d'or de grande taille et en forme d'étoile et/ou à la présence de sels d'or aurique qui n'ont pas réagi.

Lorsque le ratio PEG₄/H₂O augmentait et devenait supérieur à 55%, la formation d'un dépôt de particules de couleur noire-violacée a été observée tandis que le surnageant restait incolore ou légèrement jaune.

Ce résultat a notamment été observé pour des ratios compris entre 70 et 175% et était identique à ceux obtenus en présence d'hydroxyde de sodium. La présence de particules observables à l'œil nu traduit l'existence d'une très forte agglomération des nanoparticules d'or alors que le surnageant légèrement jaunâtre peut être corrélé à la présence de sels d'or aurique Au^{3+} n'ayant pas réagi.

Contrairement à ce qui a été observé dans la procédure 3A, à partir d'un ratio PEG_4/H_2O supérieur à 215%, une solution incolore et non violacée a été obtenue, ce qui correspondait à l'absence totale de synthèse de nanoparticules d'or.

En conséquence, la présence d'hydroxyde de sodium n'est pas indispensable à la synthèse des nanoparticules lorsque le PEG_4 est utilisé comme réducteur.

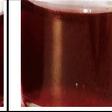
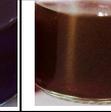
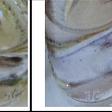
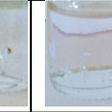
	NP 3B_1	NP 3B_2	NP 3B_3	NP 3B_4	NP 3B_5	NP 3B_6	NP 3B_7	NP 3B_8	NP 3B_9	NP 3B_10
H _{AuCl} ₄ 2,5 mM (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
H ₂ O (mL)	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10
PEG ₄ (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
PEG ₄ :H ₂ O ratio)	5	10	15	20	30	35	45	55	70	85
Aspect										
	NP 3B_11	NP 3B_12	NP 3B_13	NP 3B_14	NP 3B_15	NP 3B_16	NP 3B_17	NP 3B_18	NP 3B_19	NP 3B_20
H _{AuCl} ₄ 2,5 mM (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
H ₂ O (mL)	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
PEG ₄ (mL)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
PEG ₄ :H ₂ O ratio)	100	120	145	175	215	265	340	450	635	1000
Aspect										

Tableau 4 : Photographies des AuNPs obtenues après synthèse selon la procédure NP3B.

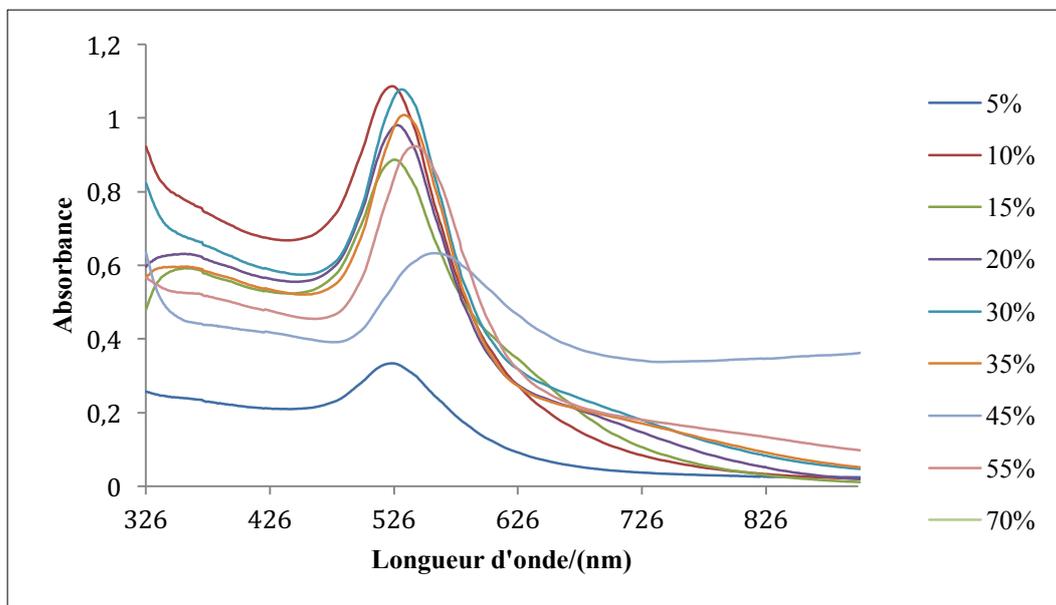


Figure 43 : Spectres UV-Visibles des nanoparticules obtenues dans les différentes conditions expérimentales investiguées lors de la réalisation de la procédure NP3B.

III-3-2-2 INFLUENCE DE L'ORDRE D'INTRODUCTION DES RÉACTIFS

Dans les procédures [NP3A](#) et [NP3B](#), le réducteur était ajouté en dernier à une solution aqueuse de sels d'or préalablement dissous dans un volume d'eau.

Cependant, lors des essais de synthèse de nanoparticules en présence de triéthylsilane, nous avons vu que l'ordre d'introduction des réactifs pouvait influencer sur la synthèse des nanoparticules.

C'est cette particularité qui a permis de mettre en évidence le rôle du tétraéthylène glycol comme agent réducteur au décours des processus de nucléation et de croissance des nanoparticules d'or.

C'est pourquoi la procédure 4 a été mise en œuvre (tableau 5 et figure 44). Dans cette méthode, la solution aqueuse de sels d'or Au^{3+} n'était plus dissoute dans de l'eau mais dans une solution aqueuse de PEG₄, toujours à une concentration de 2,5 mM.

Comme précédemment, l'influence de la quantité de réducteur sur la synthèse des AuNPs a été évaluée en faisant varier les proportions H₂O/PEG₄ de ce mélange binaire de 5% à 50%. Les résultats ainsi obtenus ne sont pas exactement superposables à ceux obtenus dans les deux procédures précédentes.

En effet, des suspensions rouge vif, caractéristiques d'une population isotropique de nanoparticules en taille et en forme ont été obtenues pour des ratios PEG₄/H₂O très variables.

Ce résultat optimal a été obtenu pour les essais [NP4-2](#), [NP4-3](#), [NP4-4](#) et [NP4-10](#) ; soit des ratios PEG₄/H₂O de 10, 15, 20 et 85% respectivement.

En revanche, les AuNPs [NP4-1](#), [NP4-5](#), [NP4-6](#) et [NP4-8](#) se présentaient sous la forme d'une suspension aqueuse plus violacée, ce qui traduisait une certaine polydispersité des deux paramètres étudiés (taille et forme).

Enfin, les conditions expérimentales correspondant à des ratios PEG₄/H₂O de 45 et 70% ([NP4-7](#) et [NP4-9](#) respectivement) furent des échecs avec la synthèse de AuNPs très fortement agrégées qui ont sédimenté.

En revanche, les analyses spectrales UV-Visible des suspensions colorées, qu'elles soient rouges ou violacées, ont toutes montré la présence d'un unique pic d'absorbance d'allure gaussienne et centré sur la longueur d'onde λ_{max} à une exception près (figure 44). En effet, le spectre UV-Visible des AuNPs obtenues en [NP4-10](#), soit une proportion PEG₄/H₂O de 85%, a révélé la présence d'un deuxième pic d'absorption à une valeur de longueur d'onde λ_{max2} de 720 nm.

L'existence de ce deuxième pic d'absorbance est révélateur une forte anisotropie de forme des AuNPs synthétisées dans ces conditions avec l'apparition d'une composante longitudinale différente de la composante transverse et signe la présence de nanoparticules non sphériques au sein de la population ainsi générée.

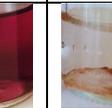
	NP4-1	NP4-2	NP4-3	NP4-4	NP4-5	NP4-6	NP4-7	NP4-8	NP4-9	NP4-10
HAuCl ₄ (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
PEG ₄ aq (mL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
H ₂ O : PEG ₄	19 : 1	18 : 2	17 : 3	16 : 4	15 : 5	14 : 6	13 : 7	12 : 8	11 : 9	10 : 10
PEG ₄ : H ₂ O ratio (% v/v)	5	10	15	20	30	40	45	60	70	85
Aspect										

Tableau 5 : Photographies des AuNPs obtenues après synthèse selon la procédure NP4.

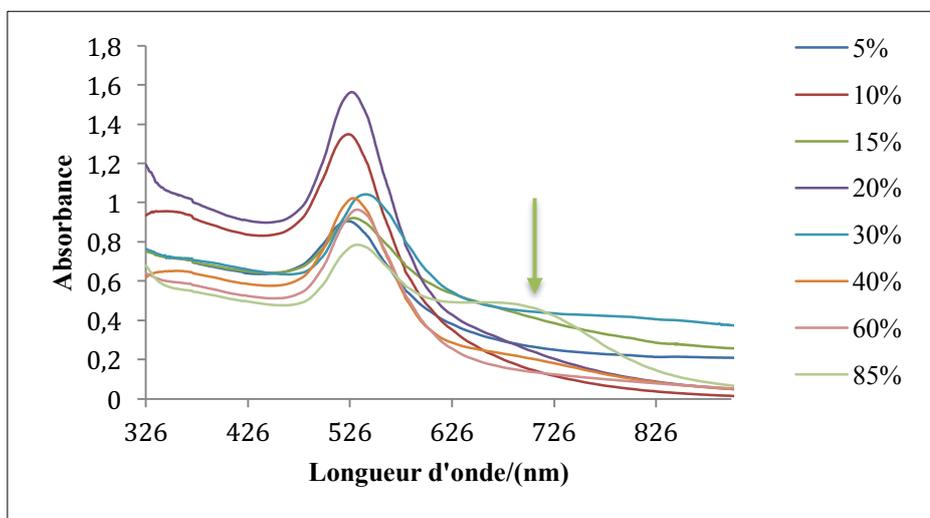


Figure 44 : Spectres UV-Visibles des Nanoparticules obtenues selon la procédure NP4.

Dans cette nouvelle procédure (procédure [NP5](#)), toujours afin d'étudier l'influence de l'ordre d'introduction des réactifs sur la synthèse des AuNPs, la solution de sels d'or aurique Au³⁺ ne fut plus préparée dans l'eau mais dans une solution aqueuse de PEG₄ dont on a fait varier la concentration en tétraéthylène glycol de 5% à 50 %.

Seules quelques conditions expérimentales ont généré des suspensions de AuNPs de qualité (tableau 6). Effectivement, seules les nanoparticules obtenues dans les conditions [NP5-3](#), [NP5-6](#), [NP5-7](#) et [NP5-9](#) se présentent sous la forme de suspensions rouge vif caractéristique d'une population homogène de nanoparticules.

Ces constatations visuelles ont été vérifiées par les données spectrales qui montrent l'existence un seul pic d'absorbance d'allure gaussienne centré sur la λ_{\max} (figure 45). Cependant, il a été constaté que la largeur du pic des nanoparticules [NP5-3](#) est plus large que les autres, ce qui peut se traduire par une plus grande dispersion de taille des AuNPs.

Les autres ratios PEG₄/H₂O testés aboutissaient à l'obtention de suspensions laissant apparaître des reflets dorés, ce qui peut correspondre à des nanoparticules de grande taille et de forme triangulaire.

En effet, le spectre UV-Visible de [NP5-1](#) exhibe un pseudo-pic d'absorbance dont l'allure n'est pas gaussienne, avec un très large épaulement sur la droite.

Dans le cas de [NP5-5](#), les conditions expérimentales ont conduit à l'obtention de AuNPs fortement agglomérées qui ont alors sédimentées sous forme de particules noires visibles à l'œil nu.

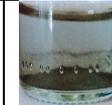
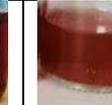
	NP5_1	NP5-2	NP5-3	NP5-4	NP5-5	NP5-6	NP5-7	NP5-8	NP5-9	NP5-10
H ₂ O:PEG ₄	2 19:1	2 18:2	2 17:3	2 16:4	2 15:5	2 14:6	2 13:7	2 12:8	2 11:9	2 10:10
H ₂ O (mL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
PEG ₄ :H ₂ O ratio	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5
Aspect										

Tableau 6 : Photographies des AuNPs obtenues après synthèse selon la procédure NP5.

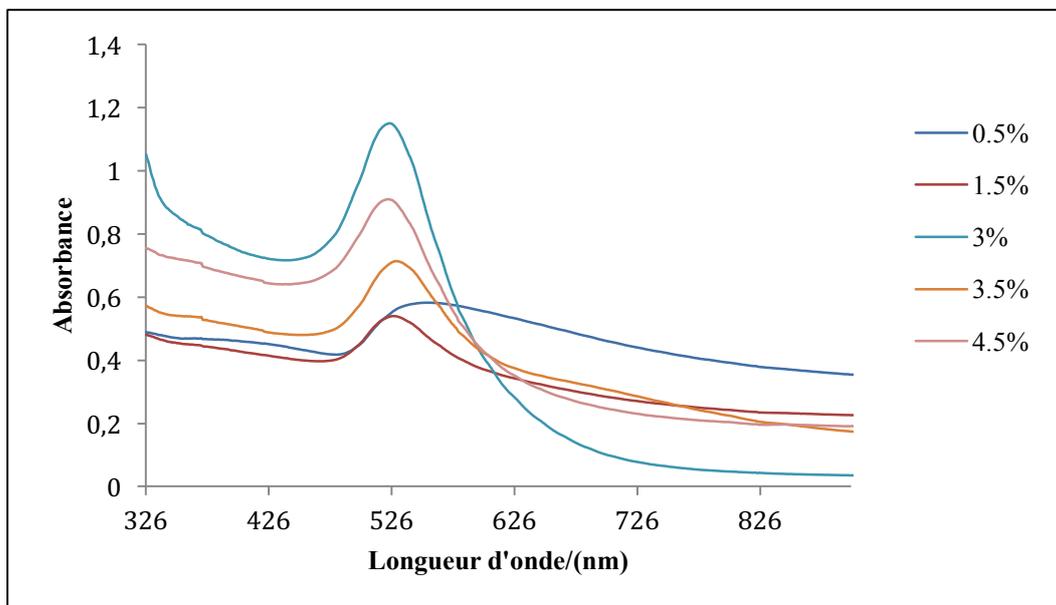


Figure 45 : Spectres UV-Visibles des nanoparticules obtenues selon la procédure NP5.

Enfin, dans la dernière procédure élaborée (procédure [NP6](#)), le solvant de la réaction et de la préparation des différents réactifs ne fut plus de l'eau mais un mélange binaire PEG₄/H₂O dont les proportions ont été variées.

En effet, dans cette méthode les sels d'or ont été préparés dans une solution aqueuse de PEG₄ et dissous dans cette même solution.

Cela a permis d'étudier l'influence de l'ordre d'introduction des différents réactifs sur le processus de synthèse des nanoparticules par comparaison avec les procédures [NP4](#) et [NP5](#) où les AuNPs étaient préparées à partir d'une solution aqueuse de PEG₄ ajoutée à une solution aqueuse de sels d'or auriques Au³⁺ ou à partir de ces sels d'or directement préparés dans une solution aqueuse de PEG₄ puis ensuite dissous dans de l'eau.

Comme le montre le tableau 7 ci-après, les nanoparticules synthétisées par cette méthode semblent être de moins bonne qualité que celle obtenue avec la méthode [NP4](#) pour des proportions PEG₄/H₂O équivalentes.

En effet, bien que des suspensions colorées soient obtenues pour des ratios PEG₄/H₂O compris entre 5 et 35% comme observée dans la procédure 4, ces suspensions exhibent des colorations beaucoup plus violacée ([NP6-2 à NP6-4](#)) traduisant une anisotropie de taille et/ou une agrégation des AuNPs. Cette notion d'agrégation est perceptible sur l'échantillon [NP6-4](#) qui présente une coloration plus bleutée que violacée.

Les nanoparticules [NP6-5](#) montrent un aspect opalescent et de nombreux reflets dorés ce qui évoque une population de nanoparticules de grande taille et dont la forme est triangulaire.

Au delà d'un ratio PEG₄/H₂O de 35%, la synthèse des nanoparticules est un échec aboutissant à la formation de nanoparticules très agglomérées les unes aux autres qui sédimentent sous forme de grosses particules noires visibles à l'œil nu.

Ces observations macroscopiques sont en accord avec les analyses spectrales UV-Visible (figure 46).

Effectivement, pour les nanoparticules **NP6-1 à NP6-5**, les spectres montrent la présence d'un seul pic d'absorption d'allure gaussienne et centré sur la λ_{\max} . Cependant, cette analyse doit être nuancée dans le cas de **NP6-4** car il est observé un élargissement du pic et la présence d'un deuxième signal très aplati et dont la valeur de λ_{\max} est proche de 825 nm.

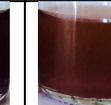
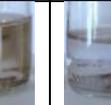
	NP6-1	NP6-2	NP6-3	NP6-4	NP6-5	NP6-6	NP6-7	NP6-8	NP6-9	NP6-10
H ₂ AuCl ₄ (mL)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
H ₂ O/PEG ₄	19:1	18:2	17:3	16:4	15:5	14:6	13:7	12:8	11:9	10:10
PEG ₄ (mL)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
H ₂ O/PEG ₄	19:1	18:2	17:3	16:4	15:5	14:6	13:7	12:8	11:9	10:10
PEG ₄ /H ₂ O ratio	5	10	15	25	35	40	55	65	80	100
Aspect										

Tableau 7 : Photographies des AuNPs obtenues après synthèse selon la procédure NP6.

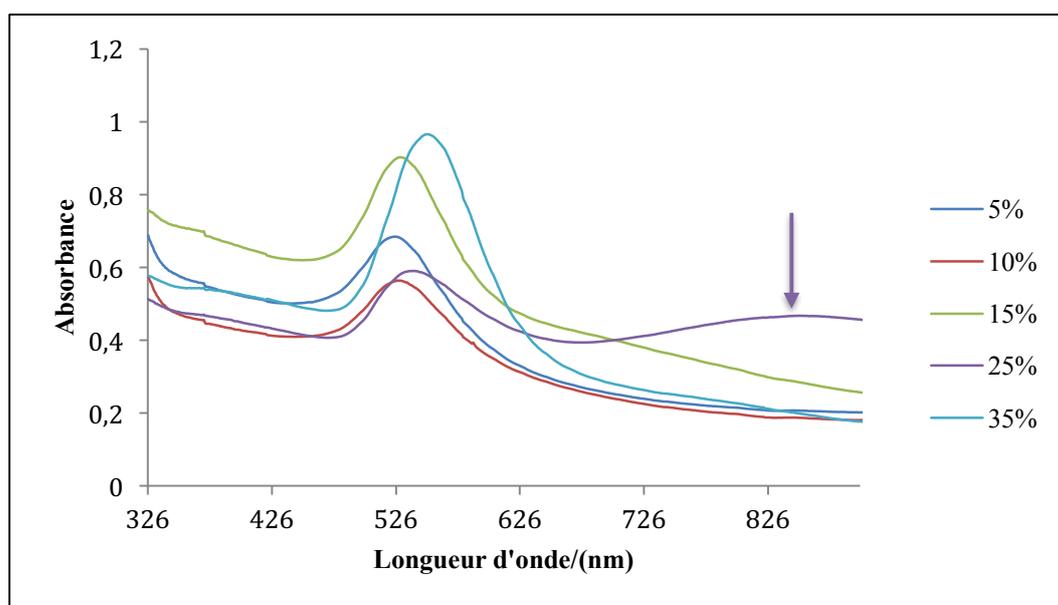


Figure 46 : Spectres UV-Visible des nanoparticules obtenues selon la procédure NP6.

III-3-2-3 CONSTATATIONS PRÉLIMINAIRES

A partir des suspensions de AuNPs synthétisées par ces cinq différentes méthodes, plusieurs hypothèses peuvent être formulées concernant l'utilisation du tétraéthylène glycol PEG₄ comme agent réducteur et stabilisant pour la synthèse de nanoparticules d'or.

Tout d'abord, quelle que soit la méthodologie employée, une solution présentant une coloration rouge vif caractéristique d'une population homogène de nanoparticules d'or sphériques est toujours obtenue.

De plus, cette coloration est en accord avec le spectre UV-Visible qui montre l'existence d'un unique pic d'absorption d'allure gaussienne et centré sur λ_{\max} .

De ce constat préliminaire, il peut donc être déduit que le tétraéthylène glycol est capable de réduire les sels d'or et ainsi d'amorcer la nucléation et la croissance des AuNPs.

Cette propriété réductrice est liée à la structure du PEG₄ qui possède deux fonctions alcool terminales. Ces groupements hydroxyles primaires peuvent donc s'oxyder en aldéhyde ou en acide carboxylique et permettre la réduction des sels d'or aurique Au³⁺ en or métalliques Au⁰ selon les réactions d'oxydo-réduction représentées ci-dessous (schéma 54).

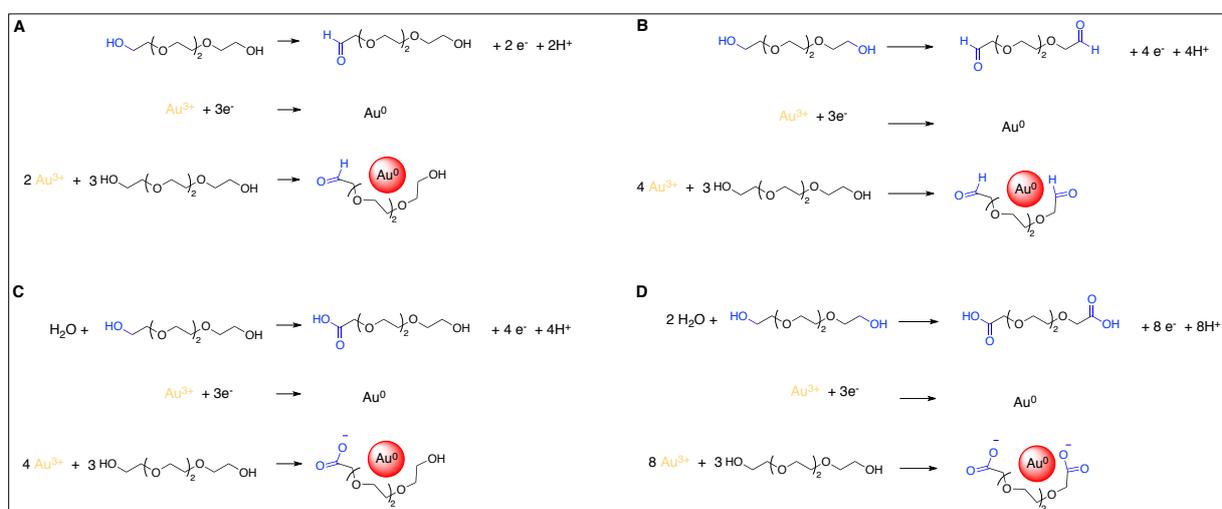


Schéma 54 : Réactions d'oxydoréductions supposées permettant la réduction des sels précurseurs Au³⁺ en nanoparticules d'or.

En comparant les résultats obtenus dans les procédures 1 et 2, la présence d'hydroxyde de sodium n'apparaît pas nécessaire à la synthèse des nanoparticules d'or.

En effet, pour des ratios PEG₄/H₂O compris entre 5 et 35%, des suspensions rouge vif de AuNPs sont obtenues, quelle que soit la méthode employée. Ces résultats sont également vérifiés par l'analyse spectrale UV-Visible qui montre, pour chacune des suspensions envisagées, un pic d'absorbance unique, gaussien et centré sur λ_{\max} .

Contrairement à ce qui avait été évoqué pour la synthèse classique au citrate, dans le cadre de la synthèse au PEG₄, l'hydroxyde de sodium ne semble pas avoir d'influence sur la cinétique de la réaction.

En effet, quelques 10 minutes après l'introduction du réducteur, il est observé l'apparition d'une coloration du milieu réactionnel. Cette coloration s'intensifie de plus en plus et se stabilise après 20 à 30 minutes d'agitation à 80°C. Cette cinétique est identique, en présence ou en l'absence d'hydroxyde de sodium.

Une troisième constatation évidente est l'influence importante de la quantité de PEG₄ présente dans le milieu réactionnel sur la taille et la forme des nanoparticules d'or. En effet, pour des ratios PEG₄/H₂O compris entre 5 et 35%, toutes les suspensions ainsi synthétisées arborent une coloration rouge vif ([NP3A-1 à NP3A-6](#) ; [NP3B-1 à NP3B-6](#) ; [NP4-1 à NP4-4](#)) en accord avec les données spectrales UV-Visible.

En revanche, pour des ratios supérieurs, les AuNPs produites sont agglomérées les unes aux autres ou constituent une population polydisperse en taille et/ou en forme comme le suggère leurs couleurs bleu-violacées ou la présence de reflets irisés au sein de la suspension.

De même, pour des ratios PEG₄/H₂O inférieurs à 5% (protocole [NP5](#)), il a été constaté que les nanoparticules sont également de mauvaise qualité car elles présentent des reflets dorés traduisant la présence de nanoparticules de grande taille et de forme triangulaire ainsi que la présence de sels d'or aurique Au³⁺ résiduels n'ayant pas réagi.

L'ordre d'introduction des différents réactifs semble également influencer sur les différents processus mis en jeu lors de la synthèse des AuNPs. En effet, des suspensions de nanoparticules de moins bonne qualité sont observées lorsque le réducteur est ajouté avant la mise en solution des sels d'or Au³⁺ comme le prouve les résultats obtenus avec le protocole [NP6](#) comparés à ceux obtenus avec les protocoles [NP3B](#) et [NP4](#).

Lorsque la méthodologie [NP6](#) est mise en œuvre, des suspensions colorées de nanoparticules sont bien synthétisées dans une gamme de ratio PEG₄/H₂O compris entre 5 et 35%, cependant à partir d'un ratio supérieur à 5%, ces suspensions apparaissent très violacées et/ou présentent des reflets irisés.

Ces caractéristiques traduisent une synthèse incomplète avec la présence résiduelle de sels d'or et/ou l'existence d'une population de nanoparticules d'or hétérogène en taille et en forme.

En conséquence, les méthodes [NP5](#) et [NP6](#) où les sels d'or sont dissous dans une solution aqueuse de PEG₄ ne semblent pas les plus efficaces pour la génération d'une suspension de nanoparticules d'or de bonne qualité, c'est à dire présentant une population monodisperse en taille et en forme.

La comparaison entre les procédures [NP3](#) et [NP4](#) montre que la première fait apparaître une corrélation manifeste entre le ratio PEG₄/H₂O et l'aspect des nanoparticules, contrairement à ce qui a été mis en évidence dans la procédure utilisant une solution aqueuse de PEG₄.

En effet, la coloration des suspensions de nanoparticules d'or synthétisées est rouge vif pour des ratios PEG₄/H₂O compris entre 5 et 35 % puis l'aspect du produit de la réaction se dégrade en parallèle de l'augmentation du ratio PEG₄/H₂O.

Cette corrélation n'est pas manifeste pour les suspensions synthétisées avec la méthode 4 où l'on obtient des colorations rouges vives pour des ratios de 10, 15, 20 60 et 80%. A partir de ces résultats préliminaires, il semble que la procédure [NP3B](#) donne les meilleurs résultats en terme de corrélation entre l'aspect des suspensions de nanoparticules d'or et le ratio PEG₄/H₂O utilisé pour la synthèse.

III-3-3 ÉTUDE DÉTAILLÉE DE LA MÉTHODE 3B

III-3-3-1 RELATION ENTRE LE RATIO PEG₄/H₂O ET LA VALEUR DE λ_{\max}

Afin d'affiner ces résultats, nous avons étudié la variation de la valeur de λ_{\max} en fonction du ratio PEG₄/H₂O utilisé pour la synthèse des nanoparticules d'or pour chacune des procédures envisagées (figure 47) puis plus spécifiquement pour la méthode [NP3B](#) (figure 48).

Ce paramètre λ_{\max} est très important car il est corrélé à la taille des nanoparticules. En effet, nous avons vu précédemment que les nanoparticules synthétisées par la voie classique au citrate se présentaient sous la forme d'une suspension aqueuse de couleur rouge vif avec une longueur d'onde maximale d'absorption λ_{\max} de 530 nm et dont les nanoparticules constitutives présentaient un diamètre moyen de 34 nm avec une distribution en taille assez hétérogène.

Les données issues de l'analyse de la valeur de λ_{\max} sont en parfait accord avec les constatations faites précédemment.

En effet, comme le montre la figure 47, quelle que soit la stratégie de synthèse employée pour la formation des nanoparticules d'or, la valeur de λ_{\max} est corrélée linéairement avec la quantité de réducteur et cela pour des ratios PEG₄/H₂O compris entre 5% et 40%. Cela signifie que dans cet intervalle considéré, la taille des nanoparticules est dépendante de la quantité de PEG₄.

Il est intéressant de noter que dans cette gamme de ratio, et ce quelle que soit la procédure mise en œuvre, la valeur de λ_{\max} reste comprise dans un intervalle relativement restreint ; de 522 nm à 531 nm, de 524 à 529 nm, de 524 à 530 nm et de 525 à 535 nm pour les méthodes [NP3A](#), [NP3B](#), [NP4](#) et [NP6](#) respectivement. Cette faible

amplitude de variation de la valeur de λ_{\max} pour des ratios PEG₄/H₂O variant de 5 à 40% est en faveur d'une voie de synthèse sensible et robuste.

Il a également été constaté que pour des ratios supérieurs, cette linéarité disparaît et correspond aux suspensions de nanoparticules de moindre qualité détaillées plus haut. Cependant, de façon générale, plus le ratio PEG₄/H₂O augmente, plus la valeur de λ_{\max} augmente, ce qui signifie que le diamètre moyen des nanoparticules augmente, mais que cette relation n'est plus linéaire.

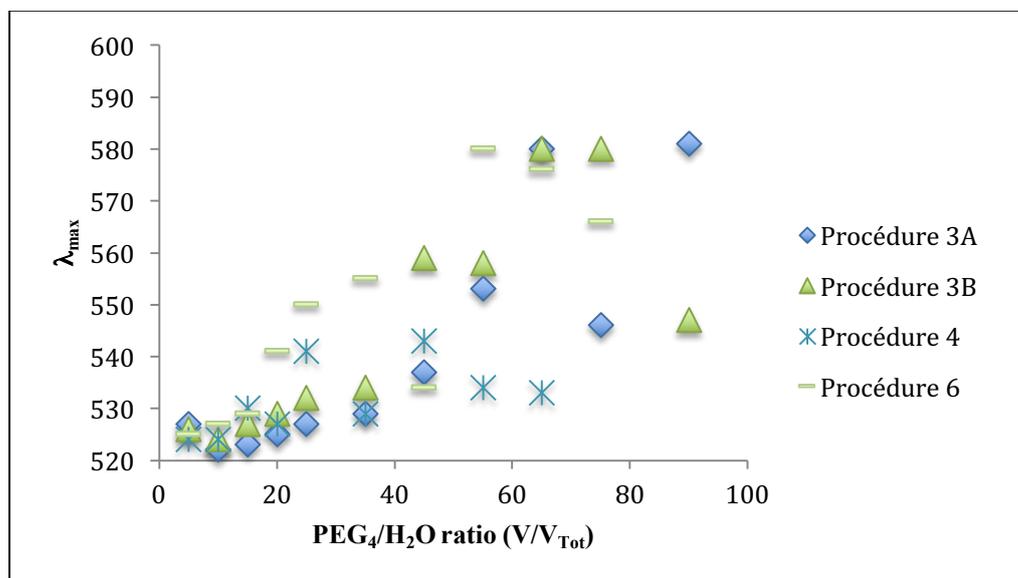


Figure 47 : Variation de la valeur de λ_{\max} en fonction de la procédure de synthèse des nanoparticules d'or.

Le graphe ci-après (figure 48) montre la variation de la longueur d'onde λ_{\max} en fonction du ratio PEG₄/H₂O utilisé pour la synthèse des nanoparticules selon la procédure **NP3B**. C'est avec cette procédure que les meilleurs résultats sont obtenus.

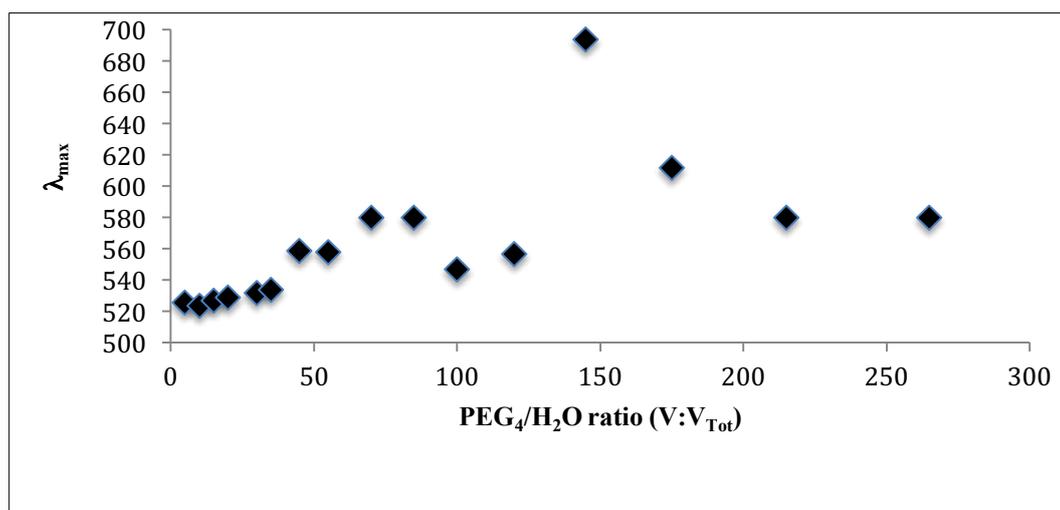


Figure 48 : Variation de la valeur de λ_{\max} en fonction du ratio volumique PEG₄/H₂O.

En effet, la corrélation entre le ratio PEG₄/H₂O et la valeur de λ_{\max} et donc la taille des nanoparticules formées est bien retrouvée. De plus, ce domaine de linéarité s'étend sur le plus large intervalle de ratios, toutes procédures considérées.

Cette corrélation linéaire est encore valable pour des ratios de 45% alors qu'elle disparaît pour des ratios supérieurs à 30-35% pour la procédure [NP6](#) et dès 25% pour la procédure [NP4](#). Seule la procédure [NP3A](#) présente un profil de linéarité similaire.

C'est un nouvel argument en faveur de l'influence de l'ordre d'introduction des réactifs sur la taille et la forme des nanostructures.

La procédure [NP3B](#) est donc celle qui semble former les suspensions de nanoparticules d'or présentant la meilleure qualité en terme de taille et de forme.

III-3-3-2 CARACTÉRISATION DES NP3B-1

Nous allons particulièrement nous intéresser aux conditions expérimentales permettant l'obtention des nanoparticules [NP3B-1](#).

En effet, cet échantillon présente une coloration rouge vif très intéressante car typique des nanoparticules d'or sphériques. De plus, cette couleur est corrélée à un spectre UV-Visible exhibant un seul et unique pic d'absorbance fin, d'allure gaussienne et centré sur une λ_{\max} dont la valeur est de 526 nm comme le montre la figure 49.

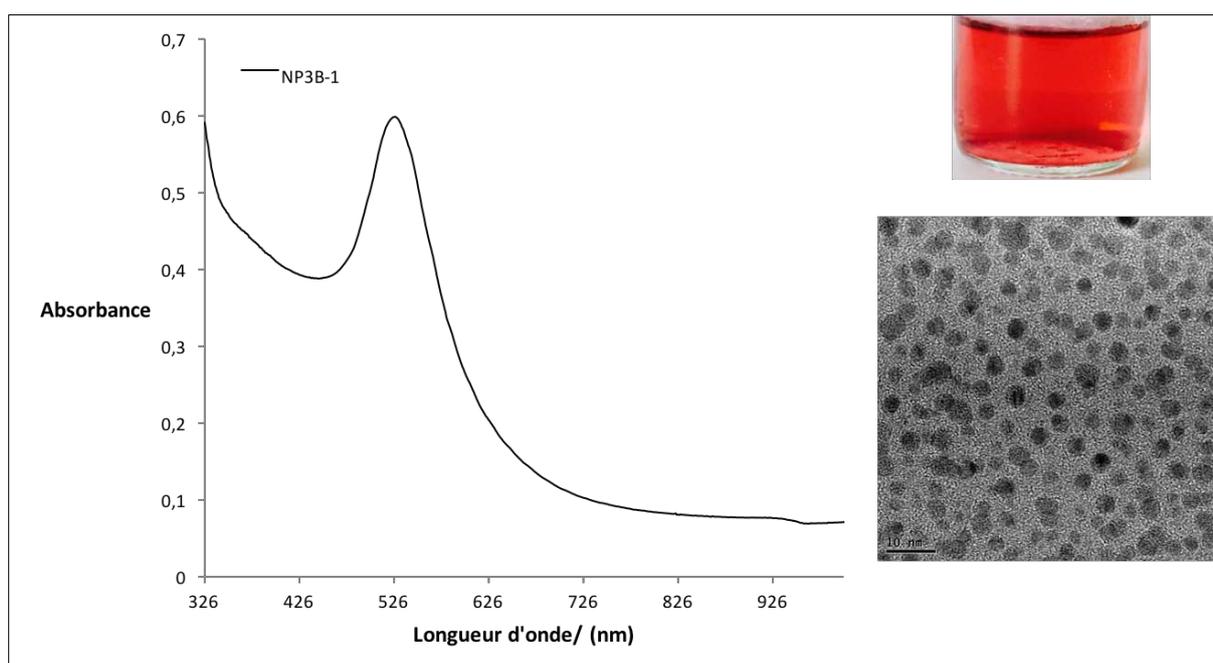


Figure 49 : Spectre UV-Visible des nanoparticules obtenues selon la procédure NB3B-1 et montrant le pic d'absorption centré sur 526 nm ; Photographie de ces nanoparticules exhibant une coloration rouge vif caractéristique d'une population homodisperse de nanoparticules d'or sphériques ; Image MET de ces mêmes nanoparticules d'or.

Afin de comparer la morphologie et l'homogénéité des nanoparticules d'or obtenues par cette nouvelle voie de synthèse par rapport à la méthode citrate classique, des analyses MET ont été réalisées sur les nanoparticules **NP3B-1** avant et après centrifugation différentielle. Les résultats sont présentés dans la figure 50.

Il a été constaté que, comme pour les AuNPs issues de la voie citrate, les cycles de centrifugation ne semblent pas altérer la taille et la forme des AuNPs. En effet, la valeur de la longueur d'onde λ_{\max} reste à 526 nm quelle que soit l'accélération appliquée.

Les arguments en faveur de la formation de AuNPs de bonne qualité sont confirmés par l'analyse MET qui montre que les AuNPs formées constituent une population monodisperse de nanoparticules sphériques dont le diamètre moyen est de 13 ± 2 nm.

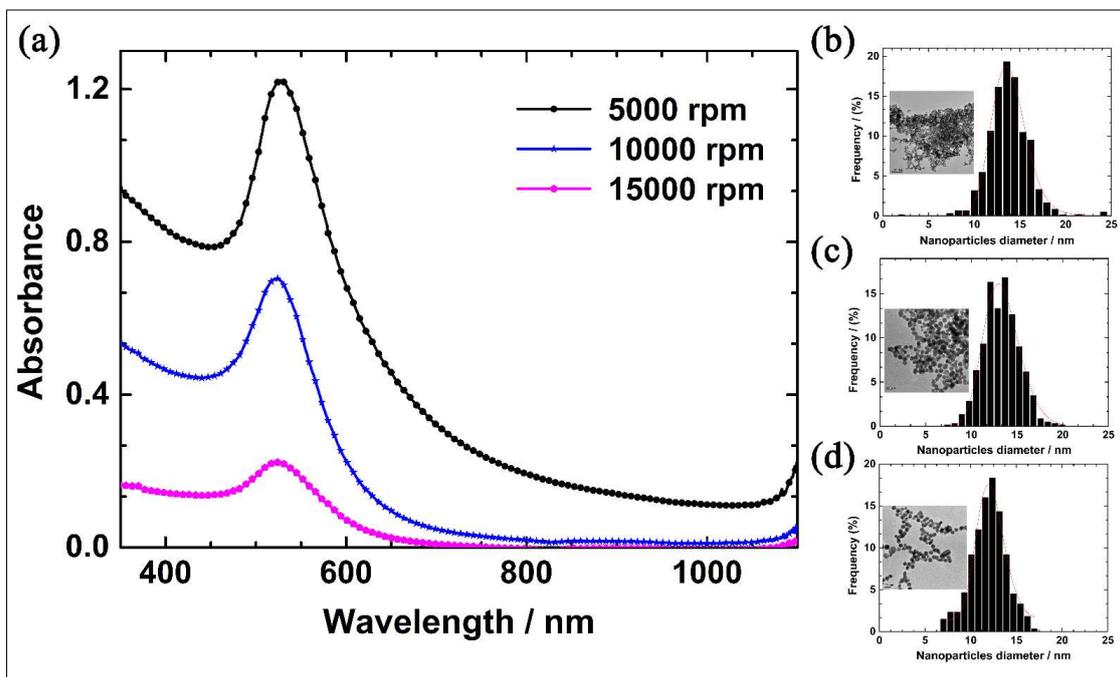


Figure 50 : a) Spectres UV-Visible des nanoparticules après centrifugation à 5000 (courbe noire), 10000 (courbe bleue) et 15000 rpm (courbe violette) ; Diagramme de distribution de la taille des nanoparticules après centrifugation à b) 5000 rpm ; c) 10000 rpm et d) 15000 rpm.

En conclusion, la voie de synthèse impliquant une réduction en présence de PEG₄ des sels d'or aurique Au³⁺ en nanoparticules d'or métallique Au⁰ présente de nombreux avantages comparée à la synthèse de référence au citrate en présence de soude.

Le premier argument est la cinétique accélérée de la réaction (30 minutes dans la procédure **NP3B-1** vs 3 heures dans la procédure de référence **NP1**).

En outre, les AuNPs ainsi obtenues présentent une taille réduite de moitié par rapport aux AuNPs issues de la voie citrate. Les analyses MET mettent également en évidence que les AuNPs formées constituent une population isotrope en taille et en forme et possèdent une distribution de taille très homogène.

En effet, le diamètre moyen de ces AuNPs est de 14 ± 2 nm, 13 ± 2 nm and 12 ± 2 nm après centrifugation à 5000, 10000 et 15000 rpm respectivement. Pour rappel, la distribution en taille des AuNPs obtenues par la méthode de référence au citrate était beaucoup plus hétérogène : 32 ± 6 nm, 24 ± 8 nm and 23 ± 4 nm dans les mêmes conditions de centrifugation.

L'analyse de la stabilité des AuNPs au cours du temps a démontrée que celles formées par la voie PEG₄ étaient beaucoup plus stables car elles ne présentaient ni agrégation, ni sédimentation, ni altération de leur structure, même après 12 mois de stockage à température ambiante.

La figure 51 présente les images MET réalisées sur des AuNPs formées au PEG₄ le jour de leur synthèse (en haut à gauche) et 8 mois après (en bas à gauche) ainsi que les analyses UV-Visible (à droite).

En revanche, concernant les AuNPs au citrate, après 1 mois de stockage, une tendance à la sédimentation est observée et s'accroît de plus en plus jusqu'à conduire à une agrégation des AuNPs qui s'adsorbent sur la paroi en verre du pilulier.

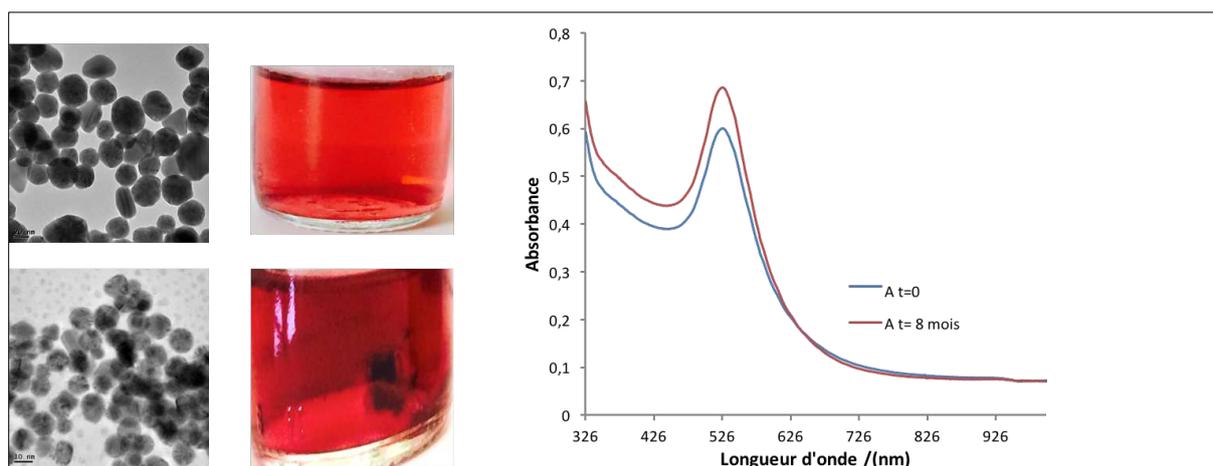


Figure 51 : Images MET, photographies et spectres UV-Visible des nanoparticules obtenues selon la procédure NP3B-1 à T0 et T+8 mois.

III-3-3-3 AVANTAGES TECHNIQUES DE LA SYNTHÈSE AU PEG₄

Cette voie de synthèse en présence de PEG₄ présente également des avantages techniques. En effet, elle ne requiert qu'une solution aqueuse de sels d'or à 2,5 mM, de l'eau de qualité Milli-Q et du tétraéthylène glycol. Tous ces réactifs sont aisément disponibles au sein du laboratoire.

En comparaison, la synthèse au citrate est plus lourde à mettre en œuvre. Elle nécessite la préparation de solutions aqueuses d'hydroxyde de sodium et de citrate de sodium. La solution aqueuse de soude est potentiellement problématique car elle doit être préparée extemporanément et utilisée dans les 24 heures pour éviter toute dégradation liée à la formation de bicarbonate de sodium. La formation de ce sous-

produit est consécutive à une exposition à l'air ambiant et plus particulièrement au dioxyde de carbone qu'il contient comme le montre la réaction sur le schéma 54 bis. La dégradation de la soude en bicarbonate de sodium entraîne une modification du pKa de la solution or celle-ci influence la cinétique de la réaction. Il en résulte donc une perturbation de la synthèse des AuNPs qui est particulièrement sensible aux variations de pH.

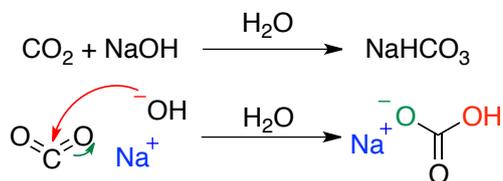


Schéma 54 bis : Dégradation irréversible de la soude en bicarbonate de sodium sous l'action du dioxyde de carbone à température ambiante.

III-3-3-4 ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Bien que la stratégie employée pour la synthèse de [NP3B-1](#) soit plus efficace que la synthèse au citrate, elle est dépendante de certains facteurs, le plus important d'entre eux étant la température.

C'est pourquoi l'influence de la température sur cette nouvelle voie de synthèse a été étudiée en réalisant cette réaction à différentes températures (30, 50, 60, 70 et 80°C). Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 8 ci-dessous.

NP3B-21	NP3B-22	NP3B-23	NP3B-24	NP3B-25
30°C	50°C	60°C	70°C	80°C

Tableau 8 : Variation de la coloration des solutions de nanoparticules synthétisées à des températures différentes, de 30°C à 80°C.

Comme attendu, la température est un paramètre essentiel du processus de nucléation et de croissance des AuNPs.

En effet, après 3 heures d'agitation, la synthèse des nanoparticules [NP3B-21](#) à [NP3B-23](#) est à peine initiée ou conduit à des suspensions de sels d'or non réduits et l'agrégation des AuNPs éventuellement formées lorsque les températures sont inférieures à 60°C.

La réaction est plus rapide pour [NP3B-24](#) (70°C) où une coloration rose vif est obtenue, cependant des particules agglomérées qui sédiment sont observées.

Deux éléments peuvent expliquer l'influence de la température sur la réussite de la synthèse des AuNPs. Le premier est lié à l'effet cinétique du chauffage qui entraîne une

agitation turbulente des molécules et favorise leur rencontre. Le deuxième est relatif à la viscosité du PEG₄. Or celui-ci est utilisé non seulement comme agent réducteur mais aussi comme surfactant. Il peut donc aisément être supposé que la présence d'un agent de surface avec une viscosité élevée puisse entraîner l'agrégation des AuNPs. Augmenter la température du milieu réactionnel permet de diminuer cette viscosité et par voie de conséquence son effet « piégeant » et d'améliorer la synthèse des AuNPs.

Nous avons donc fixé à 80°C la température optimale pour la synthèse des AuNPs en présence de PEG₄. En effet, cette température est suffisamment importante pour diminuer la viscosité du PEG₄ mais reste inférieure à la température d'ébullition de l'eau, ce qui permet de maintenir un volume réactionnel constant.

III-3-3-5 CONSIDÉRATIONS MÉCANISTIQUES

Au décours de la synthèse au citrate, le milieu réactionnel se colore en rose pâle après 90 minutes d'agitation à 80°C. Cette coloration s'intensifie de plus en plus et vire au rouge vif environ 2H30 après le début de la réaction et se stabilise après 3 heures.

Avec le PEG₄, une modification rapide de la couleur du milieu réactionnel d'incolore à gris-bleuté a été observée. Cette coloration s'intensifie très rapidement, en deux à trois minutes, pour donner une solution presque noire.

Ensuite la couleur du milieu réactionnel vire du noir violacé à cette coloration rouge vif si caractéristique des nanoparticules d'or. Cette étape de changement de couleur est également très fugace et ne dure que quelques minutes.

Enfin, la coloration rouge s'intensifie de plus en plus et se stabilise quelques 20 minutes après le début de la réaction. Tout se déroule comme si cette synthèse passait par un état intermédiaire correspondant à une agrégation des AuNPs.

Cette constatation est à mettre en relation avec le rôle de surfactant joué par le PEG₄ au décours de la synthèse des AuNPs.

Afin de déterminer si le PEG₄ s'oxyde en aldéhyde ou en acide lors de la synthèse de **NP3B-1**, des analyses spectrométriques RMN ¹H, IR et XPS ont été réalisées ainsi que des expériences de mesure du potentiel zêta.

Malheureusement, les analyses RMN et IR n'ont pas été probantes à cause d'une trop grande dilution de l'échantillon. Afin de résoudre ce problème, l'échantillon **NP3B-1** a été placé dans une étuve à 70°C pendant 24 heures afin d'éliminer l'eau mais une adsorption des AuNPs sur les parois du réacteur en verre a été observée et les tentatives pour remettre ces AuNPs en suspension furent des échecs.

La mesure du potentiel zêta fut beaucoup plus informative et a affichée une valeur négative moyenne de -30 mV ce qui signifie que la surface de la nanoparticule est chargée négativement et que la solution est stable.

Cet argument est en faveur d'une oxydation de la molécule de PEG₄ sous forme de carboxylate et non sous forme d'aldéhyde.

En effet, la nanoparticule en suspension est entourée de molécules de PEG₄ oxydées qui jouent le rôle de surfactant et entraînent donc une modification de l'environnement électrique proche de la nanoparticule.

Cette modification se traduit par la formation de la double couche d'Helmholtz engendrée par l'orientation du tensioactif vis à vis de la nanoparticule qui aboutit, par effet de répulsion électrostatique, à une polarisation des molécules d'eau constitutives du solvant (Figure 52).

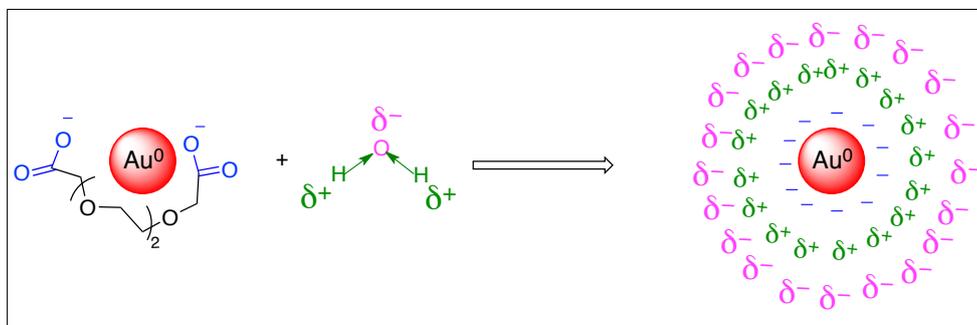


Figure 52 : Polarisation des molécules d'eau consécutive à l'oxydation du PEG₄ lors de la réduction des sels précurseurs en nanoparticules et formation d'une double couche d'Helmholtz dont la charge globale est négative.

Les analyses de spectrométrie du photon-électron X ou XPS montre la présence de deux pics à 84,25 eV et 87,96 eV correspondant aux énergies électroniques des électrons de la couche 4f de l'or (figure 53).

Deux pics apparaissent également à des niveaux énergétiques correspondant aux électrons de la couche 1s du carbone. La déconvolution mathématique de ce signal montre l'existence d'au moins trois pics à 285,21 eV, 286,74 eV et 288,92 eV respectivement. Ceci suggère la présence de trois types d'atome de carbone. Le pic à 285 eV est largement majoritaire et correspond sans doute aux atomes constitutifs de la chaîne éthylène glycol. Les surfaces respectives sous les pics à 287 et 289 eV sont du même ordre de grandeur. Il peut donc s'agir soit d'un atome de carbone portant une fonction alcool libre terminale, soit d'un atome de carbone oxydé en carbonyle. Compte-tenu des énergies de liaison mesurées, la plus forte énergie correspond au carbone présentant l'état d'oxydation le plus élevé. L'existence d'un signal à 289 eV est donc un argument supplémentaire en faveur d'un processus d'oxydation de l'alcool du PEG₄ en carbonyle lors de la synthèse des AuNPs. La présence d'atomes de carbone lié à un alcool peut être corrélée soit à l'oxydation d'une seule des deux fonctions hydroxyles du PEG₄, soit à la présence de PEG₄ n'ayant pas réagi.

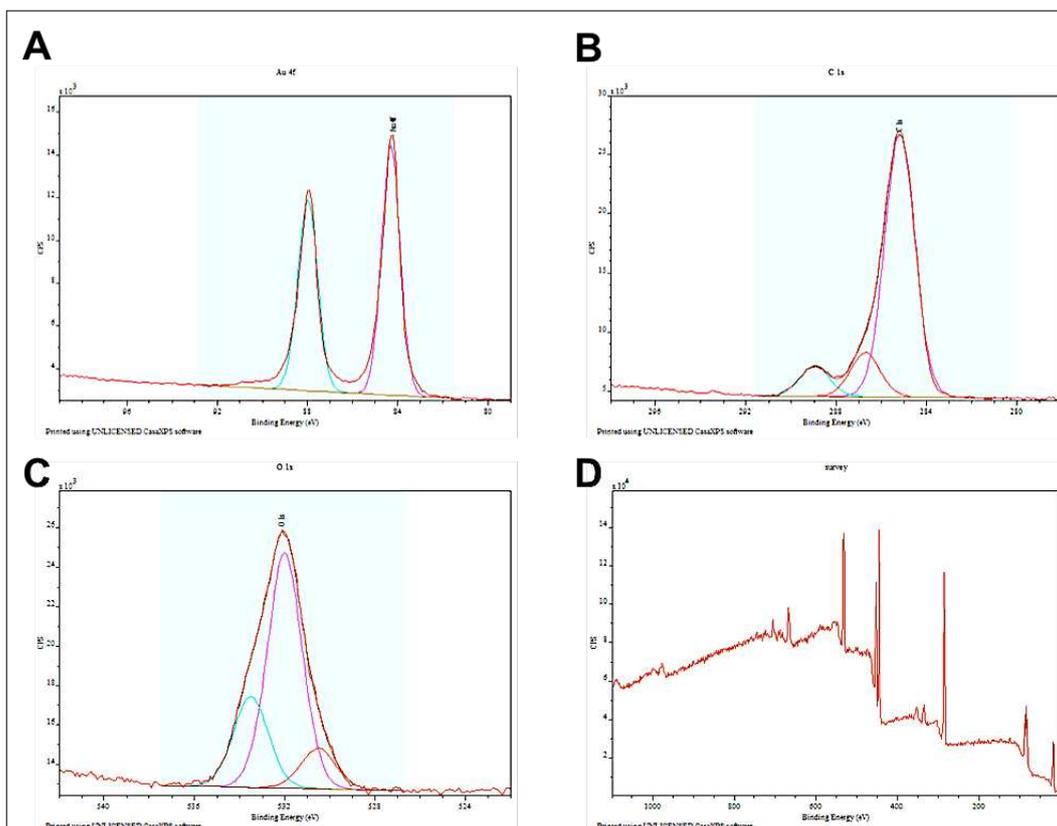


Figure 53 : Spectres XPS des nanoparticules d'or synthétisées selon la procédure NP3B-1. A) Signal de l'or ; B) Signal du carbone ; C) Signal de l'oxygène et D) Survey du spectre XPS.

III-3-3-6 ANALYSE QUANTITATIVE

Afin de déterminer la quantité de nanoparticules d'or présente dans l'échantillon après synthèse (**NP1** et **NP3B-1**), des dosages par spectrométrie d'absorption atomique ont été réalisés. A partir des résultats obtenus, des courbes d'étalonnage ont été construites pour chacune des deux voies de synthèse envisagées (la stratégie au PEG₄ en bleu et celle au citrate en rouge) (figure 54).

Comme le montre les graphiques ci-dessous, pour une valeur d'absorbance inférieure à 2, celle-ci est corrélée linéairement à la concentration en or Au⁰ dans le respect de la loi de Beer-Lambert, et cela indépendamment de la voie de synthèse mise en œuvre. Concernant les nanoparticules NP3B-1, la concentration d'or moyenne obtenue après synthèse est de 40 mg/L.

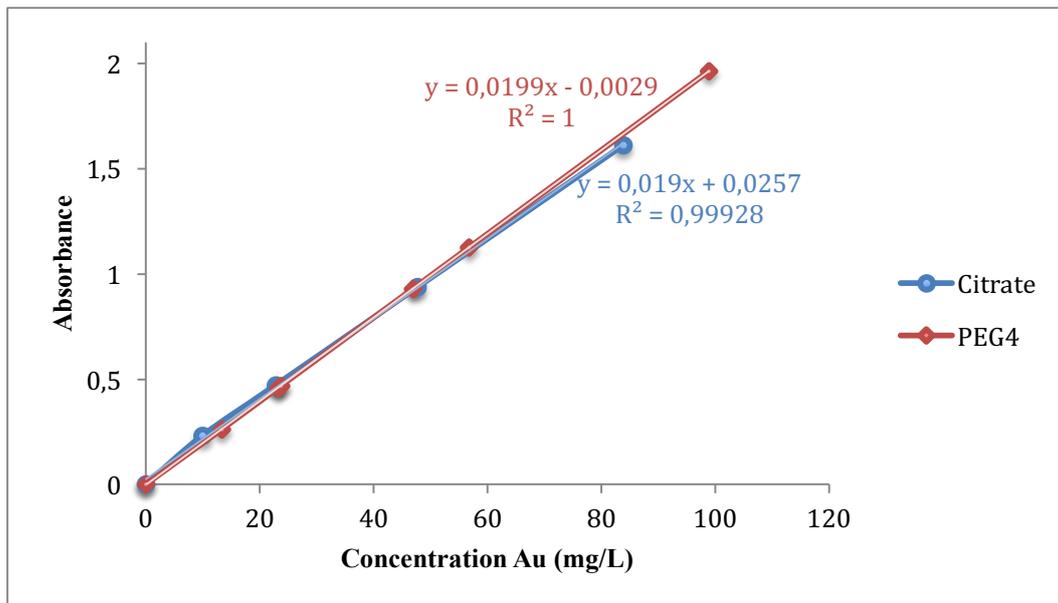


Figure 54 : Gamme d'étalonnage des nanoparticules d'or synthétisées au citrate (droite bleue) et au PEG4 selon la procédure NP3B-1 (droite rouge).

La mesure des concentrations en or Au^0 dans les suspensions de AuNPs a permis de déterminer la concentration en nanoparticules d'or en appliquant la théorie du « sphere packing ». Cette théorie, développée initialement par Jaeger et Nagel⁽¹⁵⁹⁾ en 1992 puis complétée par Torquato *et al.*⁽¹⁶⁰⁾ en 2000, suggère que le taux d'occupation atomique d'une sphère est compris entre 64% et 74% du volume total de la sphère considérée. Cela signifie que le nombre d'atomes d'or par nanosphère est compris entre $0,64R$ et $0,74R$ (soit une valeur moyenne de $0,69R$) où :

$$R = V_{\text{AuNPs}}/V_{\text{Au}} = (4 \cdot \pi r_{\text{AuNPs}}^3 / 3) / (4 \cdot \pi r_{\text{Au}}^3 / 3) = (r_{\text{AuNPs}}^3 / r_{\text{Au}}^3)$$

Avec V_{AuNPs} , le volume d'une nanoparticule d'or et V_{Au} , le volume d'un atome d'or et r_{AuNPs} et r_{Au} , respectivement le rayon d'une nanoparticule d'or et d'un atome d'or. D'après les images MET, le diamètre moyen des **NP3B-1** est de 13 nm. En conséquence, $R = (6,5 \cdot 10^{-9})^3 / (136 \cdot 10^{-12})^3 = 109200$. Il en découle que le nombre approximatif d'atome d'or par nanoparticule est de $0,69 \cdot R$ soit 75300 atomes/AuNPs.

A partir de la concentration en or Au^0 déterminée par spectroscopie UV-Visible (40 mg/L), il devient aisé d'en déduire le nombre de nanoparticules présentes au sein de l'échantillon. Pour 22 mL d'une suspension de AuNPs à la concentration de 40 mg/L, la quantité molaire d'or est de : $(22 \cdot 10^{-3} \cdot 40) / 196,96 = 0,0045$ mmol, soit un nombre d'atome d'or $N_{\text{Au}} = 0,0045 \cdot N_{\text{A}} = 2,69 \cdot 10^{21}$ atomes. Il peut donc en être déduit le nombre de nanoparticules $N_{\text{AuNP}} = (2,69 \cdot 10^{21}) / 75300 = 3,57 \cdot 10^{16}$ AuNPs/mL.

III-3-3-7 AuNPS ET INTERACTIONS CELLULAIRES

La finalité de ces nanoparticules est une application in-vitro et/ou in-vivo à la détection de biomarqueurs. Afin d'évaluer la biodisponibilité et la capacité d'internalisation cellulaire des AuNPs, celles-ci ont donc été incubées en présence de deux lignées cellulaires humaines, l'une cancéreuse et l'autre neuronale. Cette incubation a été réalisée en présence de 0,6 à 10 μg de nanoparticules d'or.

Avant toute exposition cellulaire, la stabilité des AuNPs vis à vis du milieu biologique utilisé pour la croissance des lignées cellulaires a été étudiée. Il a été constaté une rapide agrégation des AuNPs préparées au citrate tandis que celles au PEG₄ semblaient beaucoup plus stables.

Après 24 heures d'incubation, l'analyse MET montre que les deux lignées cellulaires ont internalisé les AuNPs. Celles-ci sont localisées au sein de structures vésiculaires (Figure 55). Cette localisation peut être un argument en faveur d'un processus d'endocytose pour la capture cellulaire des AuNPs.

La quantification des AuNPs par section cellulaire montre que la capture intracellulaire des AuNPs préparées au PEG₄ ne semble pas dépendante de la lignée cellulaire considérée.

En effet, ce comptage révèle une présence moyenne de 25 AuNPs par section et par μg de AuNPs. En revanche, les AuNPs préparées au citrate sont presque 10 fois moins abondantes, quelle que soit la lignée cellulaire évaluée.

Cette plus faible internalisation cellulaire est le reflet de l'instabilité de ces AuNPs en présence du milieu de culture mais également un argument en faveur de l'utilisation de tétraéthylène glycol comme agent réducteur et stabilisant pour la synthèse des AuNPs grâce à ses propriétés de biocompatibilité bien connues et reconnues.

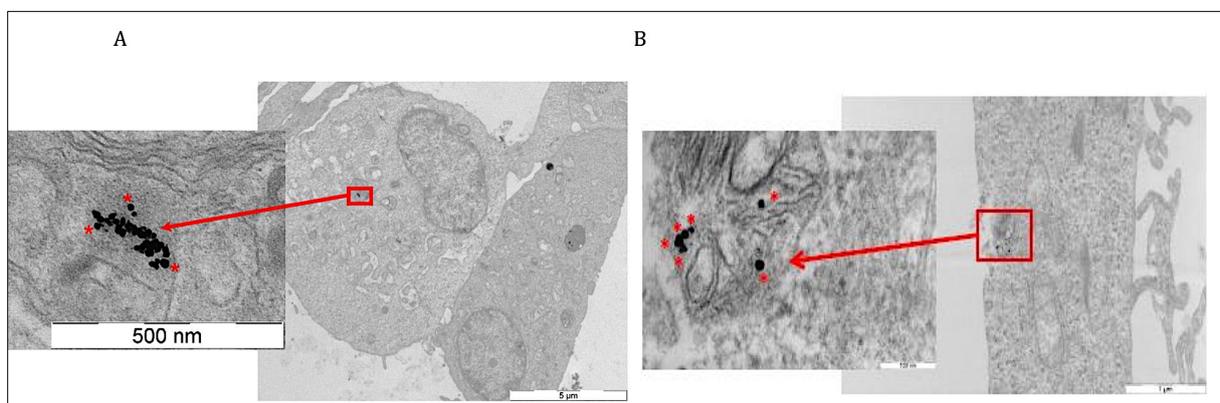


Figure 55 : Image MET de coupes cellulaires après incubation avec une solution de nanoparticules d'or. Les étoiles rouges montrent la présence de AuNPs isolées au sein de structures vésiculaires cytoplasmiques.

III-4 CONCLUSIONS

La synthèse des AuNPs par la méthode dérivée de Turkevich a permis l'obtention de nano-objets sphériques dans des conditions bio-compatibles (phase aqueuse, pas d'agents de transferts cytotoxiques). Ces nanoparticules ont pu être utilisées pour des essais de fonctionnalisation avec des ligands pegylés porteurs d'un groupement thiol protégé sous forme de thiotrityle.

Bien que ces tentatives n'aient pas été concluantes, l'utilisation du thiotrityle nous a orientés vers une nouvelle stratégie de synthèse des AuNPs en utilisant le triéthylsilane Et_3SiH comme agent réducteur. La substitution du citrate sodique par Et_3SiH a donné des résultats prometteurs mais a surtout fait apparaître l'utilisation du tétraéthylène glycol PEG₄ comme agent réducteur alternatif pour la synthèse des AuNPs.

La synthèse des AuNPs en présence de PEG₄ dépend de l'ordre d'introduction des réactifs, de la température, du ratio volumique PEG₄/H₂O ainsi que du volume réactionnel total. Elle peut être réalisée en l'absence ou en présence de soude et résulte de l'oxydation de la fonction hydroxyle terminale portée par le tétraéthylène glycol.

De nombreux essais empiriques nous ont permis de définir les conditions optimales de la synthèse PEG₄-assistée des nanoparticules d'or : Dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or aurique HAuCl_4 à 2,5 mM dans 19 mL d'H₂O Milli-Q et chauffer le milieu réactionnel à 80° à l'aide d'un bain-marie. Après 5 à 10 minutes d'agitation, ajouter rapidement 1 mL de PEG₄. Poursuivre l'agitation à 80°C pendant 30 minutes (protocole [NP3B-1](#)).

Cette synthèse permet d'obtenir une population monodisperse de nanoparticules d'or d'un diamètre moyen de 13 ± 2 nm et exhibant une isotropie de taille et de forme supérieures à celles observées avec les AuNPs synthétisées au citrate. Comme pour la synthèse au citrate, le PEG₄ joue le rôle de réducteur mais aussi d'agent stabilisant. Il a été constaté que les AuNPs synthétisées au PEG₄ sont également plus stables au cours du temps que celles obtenues par la réduction au citrate. Enfin, elles présentent une meilleure biodisponibilité cellulaire.

Pour l'ensemble de ces raisons, cette voie de synthèse sera dorénavant utilisée dans cette étude pour l'obtention des AuNPs.

En ce qui concerne la fonctionnalisation des AuNPs, la stratégie utilisant des bras espaceurs thio-protégés est abandonnée au profit de l'utilisation de ligands présentant une fonction disulfure qui permet de s'affranchir des problèmes d'oxydation et de déprotection.

IV-1 ÉTUDE PRÉLIMINAIRE : L'ACIDE LIPOIQUE, UN MODELE EXPÉRIMENTAL

IV-1-1 MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Afin de déterminer les conditions expérimentales optimales permettant la fonctionnalisation des nanoparticules d'or en milieu aqueux, plusieurs suspensions de AuNPs ont été synthétisées selon la procédure **NP3B-1**. Chaque suspension est ensuite photographiée afin de pouvoir estimer la modification de la coloration induite par l'insertion du ligand à la surface de la nanoparticule. Une analyse UV-Visible des AuNPs a également été mise en œuvre pour étayer cette appréciation visuelle et pour calculer la concentration des AuNPs.

Toutes ces suspensions présentent la coloration rouge-rubis typique des AuNPs corrélée avec une valeur de λ_{\max} de 526 ± 1 nm. Les concentrations calculées grâce à la droite d'étalonnage varient de 37,05 mg/L à 90,28 mg/L.

Pour chacune de ces suspensions de AuNPs, différentes quantités de ligand **L1** ont été introduites sous un volume constant de 1 mL. Les rapports massique, molaire et de concentration entre le ligand **L1** et l'or des AuNPs ont été calculés.

Après 30 à 40 minutes de réactions à 80°C, les AuNPs ainsi modifiées ont été photographiées et une analyse UV-Visible a été réalisée. Les résultats sont présentés dans les tableaux 9 à 17, de même que les spectres UV-Visible lorsqu'un déplacement de λ_{\max} est observé.

A une expérience de fonctionnalisation réussie doit correspondre une modification de la coloration du milieu réactionnel objectivée par un déplacement de la valeur de λ_{\max} vers des valeurs supérieures de longueur d'onde.

L'acide lipoïque (ou ligand **L1**) se présente sous la forme d'une poudre jaune compacte. Cette coloration pouvant interférer avec l'étude spectrale des nanoparticules d'or après les essais de fonctionnalisation, une analyse UV-Visible préliminaire du ligand a été réalisée et a montré que celui-ci présente un pic d'absorbance maximal à 333 nm mais aucune propriété d'absorption pour des longueurs d'onde supérieures à 390 nm. Il n'y aura donc pas de chevauchement avec le pic d'absorbance des AuNPs, que celles-ci soient ou non fonctionnalisées.

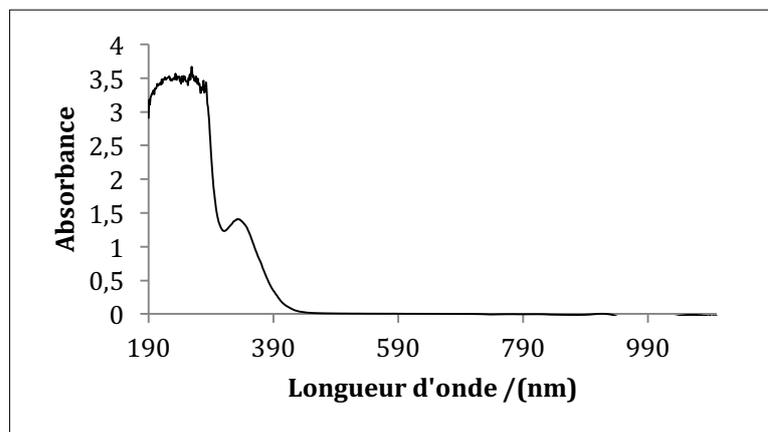


Figure 56 : Spectre UV-Visible de l'acide lipoiique faisant apparaître un maximum d'absorption à 333 nm.

Dans les deux premières séries d'expériences, référencées respectivement **NP7A** à **NP7G** et **NP8**, les solutions de différentes concentrations de ligand **L1** ont été préparées dans du PEG₄. En effet, l'acide lipoiique est insoluble dans l'eau. Le choix d'utiliser du PEG₄ pour le solubiliser fut naturel compte-tenu que ce composé sert également pour la synthèse et la stabilisation des AuNPs.

	[Au] mg/L	[L1] mg/mL	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Ratio (C/C _{Au})	Résultats		$\Delta\lambda_{\max}$ nm
						Avant	Après	
NP7A-1	37,05	30	405	386	810			
NP7A-2	37,05	40	540	515	1080			10
NP7A-3	37,05	50	675	644	1349			5
NP7A-4	37,05	60	810	773	1619			3
NP7A-5	37,05	70	945	902	1889			
NP7A-6	37,05	80	1080	1031	2159			
NP7A-7	37,05	90	1215	1160	2429			

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP7A.

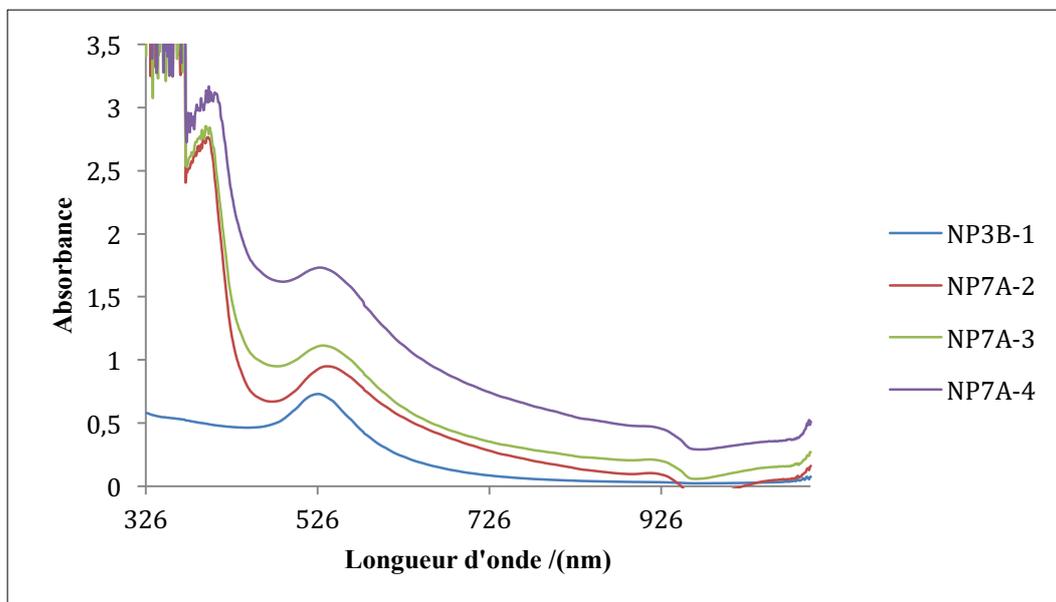


Figure 57 : Spectres UV-Visible des nanoparticules fonctionnalisées selon le protocole NP7A.

Les résultats présentés dans le tableau 8 ci-dessus montrent que l'ajout du ligand disulfure **L1** à une suspension de AuNPs entraîne une modification immédiate de la coloration du milieu réactionnel qui devient plus violacé. Cette addition perturbe également le spectre UV-Visible qui voit son pic d'absorbance s'élargir ainsi qu'un déplacement de λ_{\max} vers de plus basses énergies (figure 57). Ces phénomènes sont particulièrement bien mis en évidence avec **NP7A-2**.

Cependant, la majorité des suspensions ont un aspect trouble. Cette opalescence peut s'expliquer par l'utilisation du ligand **L1** en large excès associée à une solubilité partielle au sein de ce milieu réactionnel aqueux.

En effet, le déplacement de la valeur de λ_{\max} et l'allure générale du spectre suggèrent la réalisation d'un processus de fonctionnalisation de la surface de la nanoparticule. Cependant, la totalité du ligand n'a pas été consommée et reste en solution comme en témoigne le pic d'absorbance vers 330-340 nm.

	[Au] mg/L	[L1] mg/mL	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Ratio (C/C _{Au})	Résultats	
						Avant	Après
NP7B-1	47,91	50	522	498	1044		
NP7B-2	47,91	60	626	598	1252		
NP7B-3	47,91	70	731	698	1461		
NP7B-4	47,91	80	835	798	1670		
NP7B-5	47,91	90	939	897	1879		
NP7B-6	47,91	100	1044	997	2087		

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP7B.

L'expérience [NP7B](#) (tableau 10) confirme que les problèmes de limpidité observés précédemment sont liés, au moins en partie, à la solubilité partielle du ligand dans le milieu réactionnel comme le laisse présager la couleur jaune ainsi que l'odeur assez caractéristique d'un groupement thiol des échantillons [NP7B-5](#) et [NP7B-6](#).

Cependant, les problèmes d'excès et de solubilité du ligand ne sont pas les seuls facteurs dont dépend la réussite de l'insertion du ligand. En effet, les résultats obtenus en [NP7A](#) et [NP7B](#) sont très différents bien que des ratios massique, molaire ou de concentration similaires aient été utilisés. Serait-il possible que le processus de chimisorption dépende non seulement des concentrations en ligands mais également des concentrations en AuNPs ?

Afin de fournir des éléments de réponse, des suspensions de nanoparticules d'or de concentration croissante ont été fonctionnalisées avec le ligand [L1](#).

Ainsi des suspensions de AuNPs à des concentrations de 54 mg/L, 67 mg/L, 72 mg/L et 90 mg/L ont été mises en présence de quantités croissantes de ligands. Ces essais correspondent aux procédures [NP7C](#), [E](#), [F](#) et [G](#) respectivement.

La procédure [NP7C](#) (tableau 11) donne des résultats très encourageants. En effet, la quasi totalité des tests réalisés aboutit à la formation d'une solution limpide plus violacée que la solution mère rouge vif de AuNPs. Ces constatations visuelles sont confirmées par l'analyse spectrale UV-Visible qui montre un déplacement de la valeur de λ_{\max} de 7 nm ([NP7C-4](#)) à 17 nm ([NP7C-7](#)) vers les basses énergies. De plus, les pics présentent un élargissement modéré, sont d'allure gaussienne et centrés sur λ_{\max} ([NP7C-3](#), [NP7C-4](#), [NP7C-5](#) et [NP7C-6](#)). Cela évoque une population monodisperse de nanoparticules fonctionnalisées avec une isotropie de taille et de forme.

Le résultat le plus médiocre est l'essai [NP7C-7](#) avec l'obtention d'une solution d'aspect verdâtre qui peut s'expliquer par une agglomération des AuNPs entraînant une coloration bleutée et par la présence du ligand [L1](#), de couleur jaune, en excès.

Les essais [NP7C-1](#) et [NP7C-2](#) génèrent une coloration violette assez prononcée associée à un très fort déplacement de λ_{\max} (16 nm). Ces données suggèrent que les AuNPs ainsi modifiées constituent une population hétérodisperse en taille et en forme et/ou composée de AuNPs de grande taille à cause d'une agrégation partielle.

Des ratios de concentration supérieurs à 1000 (soit des ratios massique et molaire supérieurs à 500) définissent les conditions expérimentales pour lesquelles la qualité du processus de fonctionnalisation semble la meilleure (tableau 11 et figure 58).

Dans cette procédure, la présence d'un excès de ligand, dont le signal d'absorbance apparaît clairement sur le spectre, ne semble pas empêcher la fonctionnalisation des AuNPs.

De plus, l'évolution du processus de fonctionnalisation est visible à l'œil nu. Effectivement, l'ajout du ligand à la suspension de nanoparticules d'or entraîne une modification immédiate de la coloration du milieu réactionnel qui, de rouge-rubis devient violacée puis noire. Toutefois, après 10 à 20 minutes d'agitation à 80°C, une recoloration rouge-violacée progressive qui se stabilise après 5 à 10 minutes est observée.

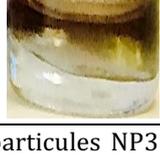
	[Au] mg/L	[L1] mg/mL	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Ratio (C/C _{Au})	Résultats		$\Delta\lambda_{\text{max}}$ nm
						Avant	Après	
NP7C-1	54,07	40	370	354	740			16
NP7C-2	54,07	50	463	442	925			9
NP7C-3	54,07	60	556	530	1110			8
NP7C-4	54,07	70	648	619	1295			7
NP7C-5	54,07	80	741	707	1480			10
NP7C-6	54,07	90	833	796	1665			9
NP7C-7	54,07	100	926	884	1850			17

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP7C.

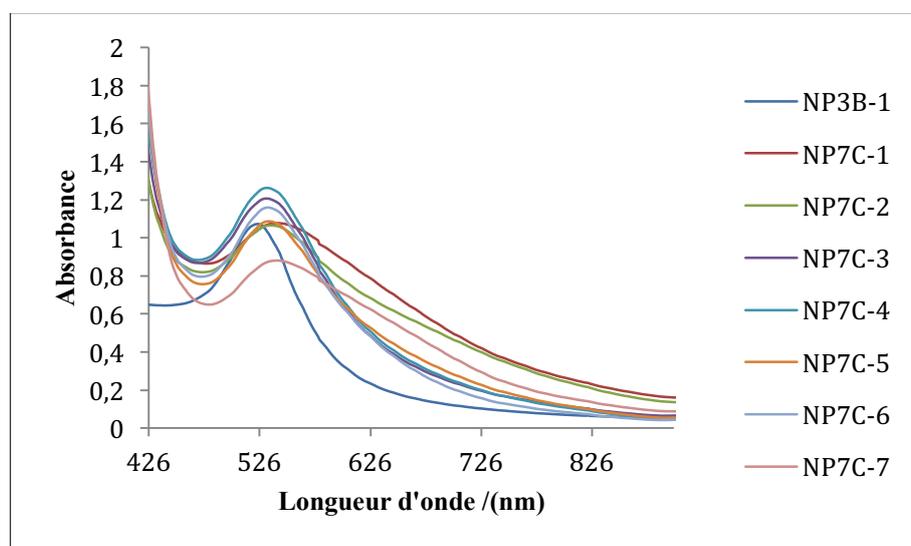


Figure 58 : Spectres UV-Visible des nanoparticules modifiées selon la procédure NP7C.

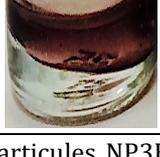
	[Au] mg/L	[L1] mg/mL	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Ratio (C/C _{Au})	Résultats		$\Delta\lambda_{\max}$ nm
						Avant	Après	
NP7D-1	56,72	50	441	422	881			
NP7D-2	56,72	60	529	507	1058			14
NP7D-3	56,72	70	617	591	1234			
NP7D-4	56,72	80	705	676	1410			
NP7D-5	56,72	90	793	760	1587			10
NP7D-6	56,72	100	882	845	1763			7
NP7D-7	56,72	110	970	929	1939			6
NP7D-8	56,72	120	1058	1014	2116			7

Tableau 12 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP7D.

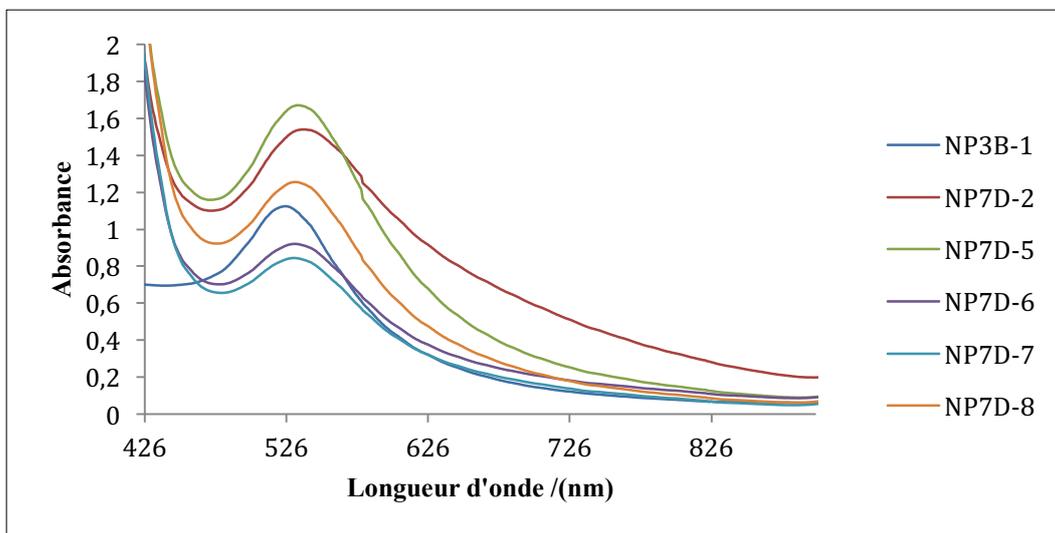


Figure 59 : Spectres UV-Visible des nanoparticules fonctionnalisées selon le protocole NP7D.

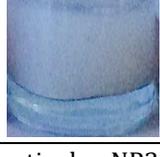
	[Au] mg/L	[L1] mg/mL	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Ratio (C/C _{Au})	Résultats		$\Delta\lambda_{\max}$ nm
						Avant	Après	
NP7E-1	67,00	50	373	356	746			5
NP7E-2	67,00	60	448	427	896			6
NP7E-3	67,00	70	522	499	1045			
NP7E-4	67,00	80	597	570	1194			

Tableau 13 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP7E.

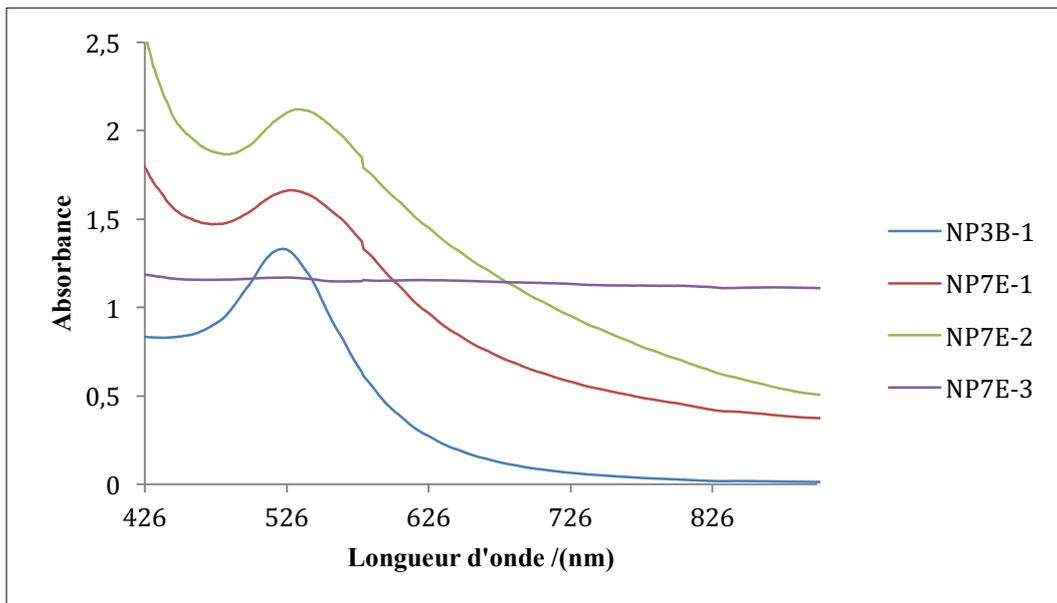


Figure 60 : Spectres UV-Visible des nanoparticules fonctionnalisées avec le ligand L1 dans les différentes conditions expérimentales testées lors de la mise en œuvre de la procédure NP7E.

Avec les procédures [NP7D](#) et [NP7E](#), les issues de l'insertion du ligand sont très aléatoires et il est très difficile de dégager un facteur d'influence majoritaire à partir de ces résultats.

	[Au] mg/L	[L1] mg/mL	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Ratio (C/C _{Au})	Résultats	
						Avant	Après
NP7F-1	71,60	50	358	334	698		
NP7F-2	71,60	60	421	400	838		
NP7F-3	71,60	70	493	467	978		
NP7F-4	71,60	80	558	534	1117		
NP7F-5	71,60	90	635	601	1257		
NP7F-6	71,60	95	663	634	1327		
NP7F-7	71,60	100	698	668	1397		
NP7F-8	71,60	105	733	701	1466		
NP7F-9	71,60	110	768	734	1536		

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP7F.

Dans la procédure **NP7F**, la réussite de l'insertion du ligand à la surface de la nanoparticule doit être pondérée par l'aspect trouble des suspensions. Cette opalescence s'estompe lorsque du PEG₄ est ajouté au milieu (1,5 mL, données non représentées) ce qui est en faveur d'un manque de solubilité du ligand. Les conditions expérimentales pour lesquelles le ratio des concentrations est supérieur à 1200, ce qui correspond à des ratios massique ou molaire supérieurs à 600, correspondent aux essais de fonctionnalisation les plus aboutis (tableau 14).

Réciproquement, pour des ratios de concentration inférieurs, la coloration verdâtre des milieux réactionnels semble être en rapport avec une agrégation des AuNPs et est toujours observée.

	[Au] mg/L	[L1] mg/mL	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Ratio (C/C _{Au})	Résultats		$\Delta\lambda_{\max}$ nm
						Avant	Après	
NP7G-1	90,28	70	388	369	775			
NP7G-2	90,28	90	498	475	997			12
NP7G-3	90,28	110	609	580	1218			12
NP7G-4	90,28	120	665	633	1329			12

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP7G.

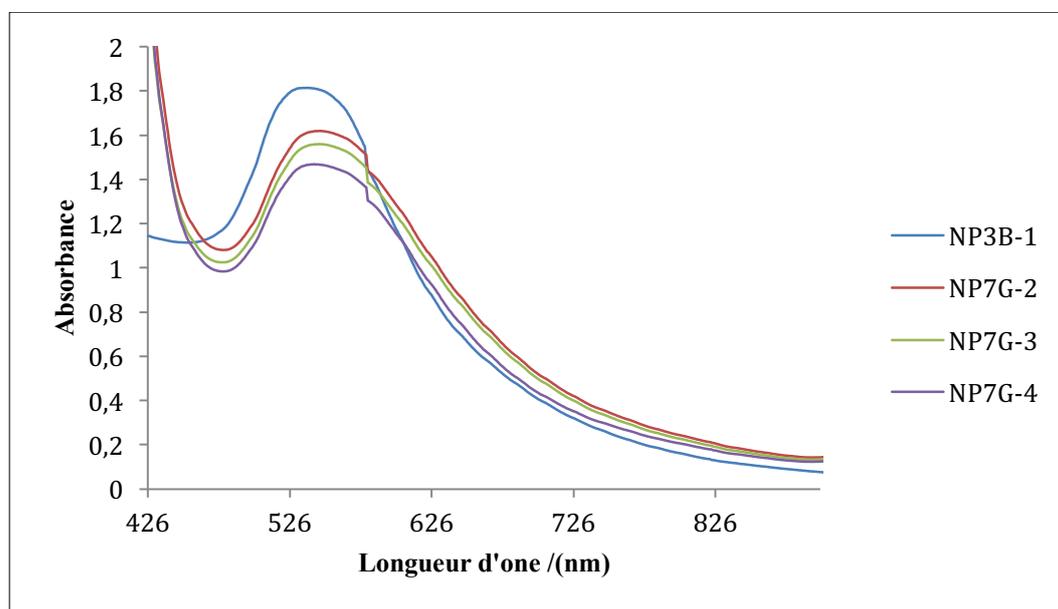


Figure 61 : Spectres UV-Visibles des nanoparticules fonctionnalisées avec le ligand L1 dans les conditions explorées lors de la réalisation de la procédure NP7G.

Les résultats obtenus avec la procédure **NP7G** sont en conformité avec ceux obtenus dans les procédures **NP7C** et **NP7E**. A savoir que les conditions opératoires mettant en œuvre des ratios de concentration supérieurs à 1000 semblent aboutir à la réussite de la fonctionnalisation des AuNPs comme en témoigne le déplacement de 12 nm de la valeur de λ_{\max} . Néanmoins, les pics d'absorbance sont plus élargis et leur allure

gaussienne est altérée avec un léger aplatissement vers la droite. L'excès de ligand est également visible sur le spectre UV-Visible (figure 61).

CONCLUSION PRÉLIMINAIRE :

Les résultats obtenus à partir des procédures **NP7C**, **NP7F** et **NP7G** semblent en contradiction avec l'hypothèse d'une influence de la concentration des AuNPs sur leur fonctionnalisation. En effet, des modifications en surface de bonne qualité, caractérisées par une modification de la coloration du milieu réactionnel associée à un déplacement de la valeur de λ_{\max} de plusieurs nm, sont effectuées avec des suspensions de AuNPs exhibant des concentrations différentes (54 mg/L, 72 mg/L et 90 mg/L respectivement).

Comme attendu, le principal paramètre influençant la fonctionnalisation des AuNPs semble être la concentration en ligand disulfure **L1**. En effet, quelle que soit la procédure **NP7C**, **F ou G** examinée, l'insertion du ligand est réussie à partir d'un ratio de concentration [**L1**/AuNPs] supérieur à 1000.

Néanmoins, les résultats obtenus avec les procédures **NP7D** et **NP7E** semblent tout à fait aléatoires et ne paraissent pas être corrélés avec un paramètre plutôt qu'un autre.

Il en résulte qu'avec cette méthode, non seulement les résultats obtenus manquent de reproductibilité mais la faible solubilité du ligand peut être un facteur très fortement perturbateur.

Cette difficulté à mettre au point une méthode répétable et reproductible pour la fonctionnalisation des AuNPs peut également être consécutive à la centrifugation des AuNPs. En effet, au décours des cycles de centrifugation, les AuNPs sont débarrassées d'une partie du PEG₄ utilisé pour leur synthèse et sont également concentrées ce qui les rapproche les unes des autres. Cette étape de centrifugation peut potentiellement rendre les AuNPs moins accessibles vis à vis du ligand.

Afin d'étayer ces hypothèses, la procédure **NP8** a été mise au point et consistait à réaliser l'étape de fonctionnalisation à partir de AuNPs nouvellement synthétisées et non centrifugées et en utilisant des concentrations croissantes de ligands.

Les résultats obtenus dans ces nouvelles conditions sont encourageants (Tableau 16). Bien qu'aucun déplacement significatif de la valeur de λ_{\max} ne soit enregistré, il a été observé une modification de l'allure du spectre UV-Visible (Figure 63). Celui-ci voit son allure gaussienne s'altérer avec un aplatissement du pic vers la droite. À noter également ce qui semble être l'émergence d'un deuxième massif d'absorption à 700 nm. Ces deux éléments sont en faveur d'une amorce de fonctionnalisation, c'est à dire une modification partielle de la surface de la nanoparticule avec un ligand qui se répartit de façon non homogène (Figure 62) :

- L'épaulement du pic évoquant le déplacement de la valeur de λ_{\max}
- Le deuxième signal à 700 nm qui traduit la formation de nanoparticules non sphériques présentant une composante transverse et une composante longitudinale.

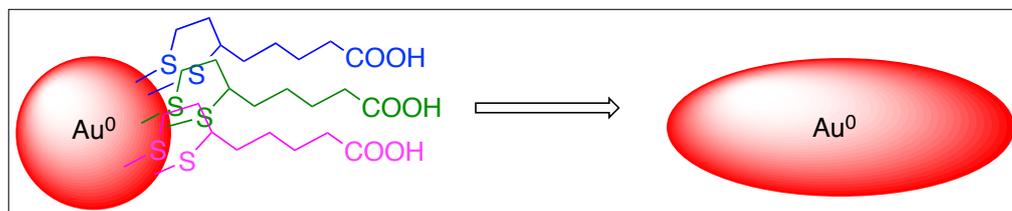


Figure 62 : Insertion partielle du ligand L1 à la surface de la nanoparticule entraînant une modification localisée de la forme des nanoparticules induisant une modification de l'effet de résonance plasmonique.

	[Au] mg/L	[L1] mM	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Résultats	
					Avant	Après
NP8-1	40,00	42	11	8		
NP8-2	40,00	82	20	16		
NP8-3	40,00	122	29	24		
NP8-4	40,00	174	41	35		
NP8-5	40,00	258	60	52		
NP8-6	40,00	325	76	65		

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP8.

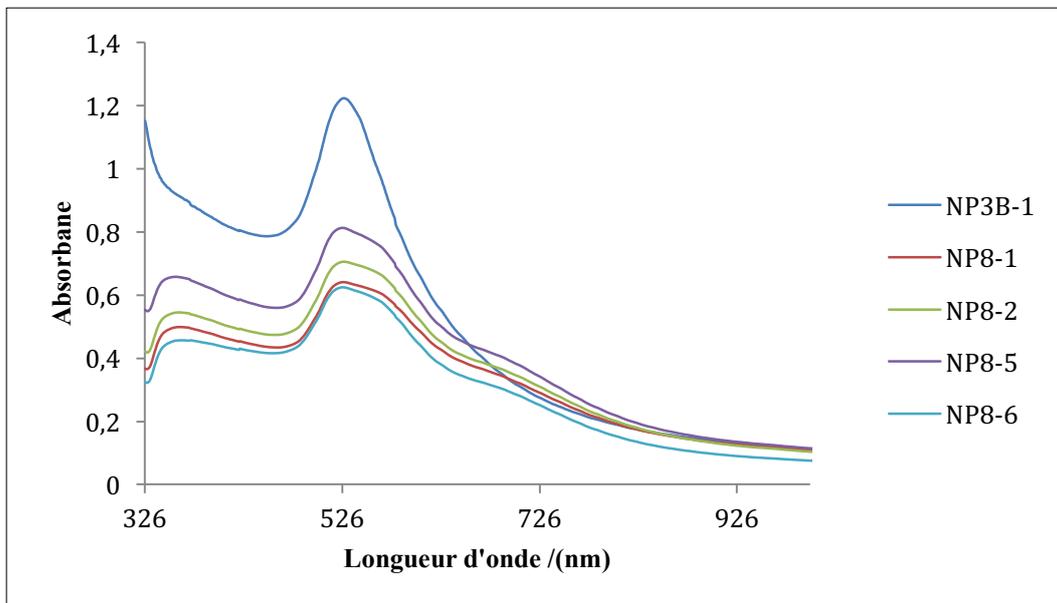


Figure 63 : Spectres UV-Visible des nanoparticules obtenues après mise en application du protocole NP8.

Afin d'obtenir une insertion du ligand plus homogène, la concentration en ligand a été augmentée mais contrairement à ce qui était espéré, cela conduit à la formation de AuNPs totalement agglomérées les unes aux autres.

Ce constat nous amène à penser que l'absence de chimisorption totale résulte d'un facteur indépendant de la concentration en ligand. Or, ce ligand **L1** est solubilisé dans du PEG₄, de nombreuses interactions faibles comme par exemple des liaisons hydrogènes présentées sur la figure 64 peuvent s'établir entre le groupement carboxyle du ligand et les fonctions alcools ainsi que les atomes d'oxygène du tétraéthylène glycol. Il est donc possible que le PEG₄ permette la solubilisation du ligand par effet tensio-actif et que par conséquent, ce ligand se retrouve isolé et que seule une petite fraction a accès à la surface de la nanoparticule d'or d'où une cinétique extrêmement ralentie (figure 64).

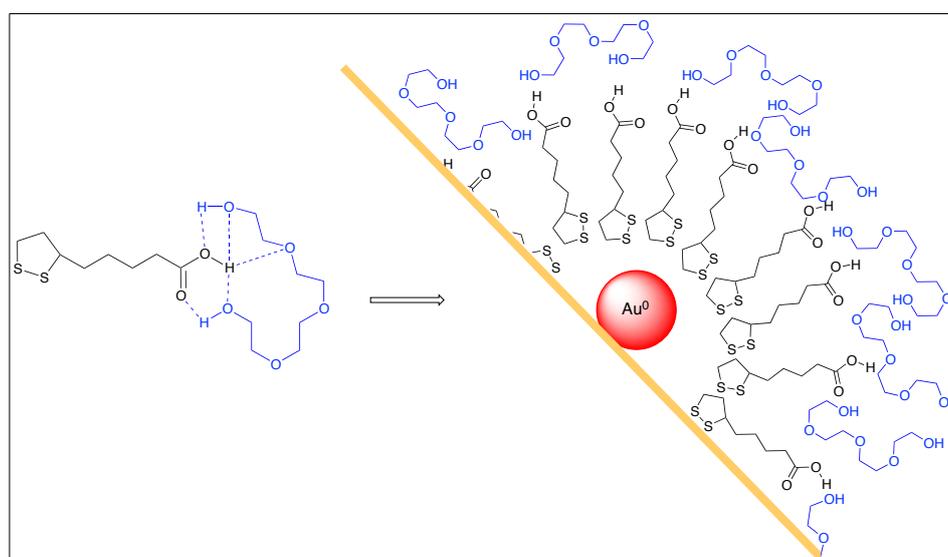


Figure 64 : Diminution de l'accessibilité à la surface de la nanoparticule induite par la dissolution du ligand L1 dans du PEG₄.

Afin de vérifier cette hypothèse, la procédure **NP9** a été engagée et a consisté à réaliser l'attachement du ligand **L1** sur des AuNPs fraîchement synthétisées et non centrifugées. Dans cette procédure des concentrations croissantes en ligand **L1** ont été utilisées, et ce dernier a été solubilisé dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium équimolaire. En présence de NaOH, le carboxylate est généré et le ligand est alors soluble en phase aqueuse.

L'utilisation de soude en quantité équimolaire a permis de prévenir tout risque d'interférence avec les AuNPs préalablement synthétisées, contrairement à ce qui avait été observé lors de la déprotection in-situ du bras espaceur thioacétate **B5**. Les résultats ainsi que les analyses spectrales sont présentées respectivement dans le tableau 17 et la figure 65.

	[Au] mg/L	[L1] mg/mL	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Ratio (C/C _{Au})	Résultats		$\Delta\lambda_{\max}$ nm
						Avant	Après	
NP9-1	40,00	20	23	20	500			5
NP9-2	40,00	30	34	30	750			7
NP9-3	40,00	40	45	40	1000			7
NP9-4	40,00	50	57	50	1250			7
NP9-5	40,00	60	68	60	1500			5

Tableau 17 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand L1 selon le protocole NP9.

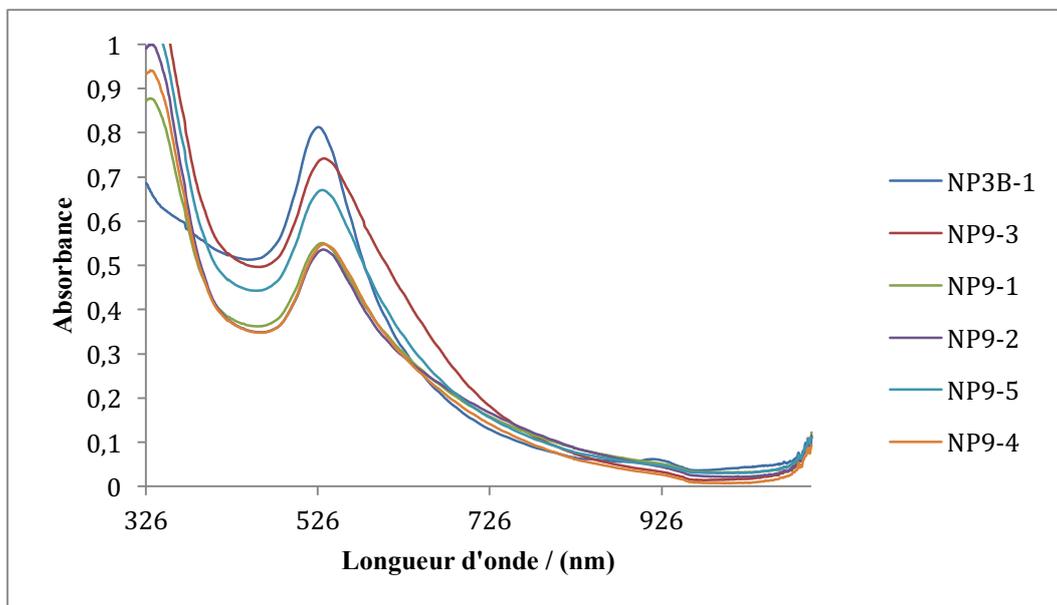


Figure 65 : Spectres UV-Visible des nanoparticules fonctionnalisées selon la méthode NP9.

Les analyses optiques et spectrales suggèrent qu'avec cette procédure [NP9](#) l'insertion du ligand est totale et conduit à une population monodisperse de nanoparticules d'or fonctionnalisées présentant une isotropie de taille et de forme.

En effet, la coloration du milieu réactionnel plus violacée est corroborée par le déplacement de la longueur d'onde λ_{\max} de 7 nm vers les basses énergies. Ce déplacement signifie que la surface de la nanoparticule a bien été modifiée par la formation de liaisons covalentes Au-S et donc que les électrons de la surface de la nanoparticule métallique interagissent différemment avec les photons incidents de la lumière.

De plus, le pic d'absorbance n'est que très peu élargi par comparaison avec le pic observé avec les AuNPs non modifiées [NP3B-1](#) ce qui évoque une population homodisperse de nanoparticules d'or.

Les AuNPs fonctionnalisées par cette méthode [NP9](#) sont très stables, même après plusieurs mois de conservation à température ambiante, aucun processus de sédimentation n'est observé.

L'utilisation de ratios massique et molaire diminués d'un facteur 10 par rapport aux procédures [NP7](#) ainsi que l'emploi du carboxylate hydrosoluble plutôt que l'acide [L1](#) insoluble permet de s'affranchir d'une accumulation de ligand éventuellement délétère pour la stabilité des AuNPs. Cependant, la présence d'un pic d'absorption vers 330 nm révèle que même avec ces quantités réduites, le ligand disulfure est toujours en excès ce qui est en faveur d'un pourcentage de recouvrement optimal de la nanoparticule d'or par le ligand.

Une dernière procédure (**NP10**) a été mise en œuvre avec un deuxième ligand, le 2-{2-[2-(2-Mercaptoéthoxy)éthoxy]éthoxy}éthanol **L1ter** commercial.

La fonctionnalisation a été réalisée à 80°C, à partir d'une suspension fraîchement synthétisée et non centrifugée de nanoparticules d'or, la seule différence avec la procédure **NP9** est que le ligand est introduit directement sans mise en solution préalable. Cela permet de s'assurer que les résultats obtenus avec le ligand disulfure sont cohérents avec ceux obtenus avec le ligand thiol.

	[Au] mg/L	[L1ter] mg	Ratio (m/m _{Au})	Ratio (n/n _{Au})	Résultats		$\Delta\lambda_{\max}$ nm
					Avant	Après	
NP10-1	40,00	22	25	21			« 5 »
NP10-2	40,00	44	50	42			« 7 »
NP10-3	40,00	66	75	63			« 7 »
NP10-4	40,00	88	100	84			« 7 »
NP10-5	40,00	110	125	105			« 5 »

Tableau 18 : Tableau récapitulatif des résultats de fonctionnalisation des nanoparticules NP3B-1 par le ligand **L1ter** selon le protocole **NP10**.

Les résultats des essais de fonctionnalisation réalisés selon la procédure **NP10** montrent une forte dépendance entre le ratio molaire de ligand et l'aspect de la suspension de nanoparticules. En effet, pour des ratios [**L1ter**/AuNPs] compris entre 40 et 80, la suspension de nanoparticules est limpide et présente une modification de sa couleur qui devient plus violacée. En revanche, pour des ratios inférieurs à 40 ou supérieurs à 80, une modification violacée du milieu réactionnel est certes observée mais elle est associée à un aspect trouble de la suspension.

De plus, après 24 heures de stockage à température ambiante, une sédimentation totale des AuNPs est constatée. Le surnageant aqueux est alors éliminé aux $\frac{3}{4}$ et le sédiment est soumis aux ultra-sons pour permettre sa redispersion en milieu aqueux. Après cette étape de resolubilisation, aucune nouvelle précipitation n'est observée. Cependant, les échantillons ainsi obtenus sont extrêmement concentrés ce qui explique

que l'intensité de l'absorbance soit supérieure à 2 et n'obéisse plus à la loi de Beer-Lambert. Des dilutions au 1/10^{ème} et au 1/50^{ème} ont été effectuées pour obtenir un spectre UV-Visible interprétable mais sans succès, d'autant plus qu'on assiste à une sédimentation rapide après cette opération de dilution.

Cette différence de stabilité entre les AuNPs modifiées par **L1** ou **L1ter** est à mettre en relation avec la structure du ligand.

En effet, **L1** est constitué d'une chaîne alcane hydrophobe et d'une extrémité carboxylate hydrophile. En milieu aqueux, la molécule est donc orientée et s'organise à la surface de la nanoparticule afin d'exposer la tête ionisée hydrophile vers le milieu aqueux. Les chaînes alcanes se stabilisent entre elles par des interactions faibles hydrophobes (Figure 66)⁽¹⁶¹⁾⁽¹⁶²⁾⁽⁹⁷⁾.

Le ligand **L1ter**, au contraire, est composé d'une chaîne éthylène glycol hydrosoluble et d'une fonction alcool terminale. En conséquence, des liaisons hydrogènes peuvent s'établir entre l'atome d'hydrogène de la fonction alcool et les doublets non liants des atomes d'oxygène constitutifs de la chaîne éthylène glycol. Ces interactions faibles peuvent être inter ou intramoléculaire et induire un repliement du ligand sur lui-même engendrant la sédimentation observée. Cette flexibilité accrue est favorisée par la longueur de la chaîne PEG₄ : 13 atomes enchainés versus 7 pour le ligand **L1** (Figure 66)⁽¹⁶³⁾⁽¹⁶⁴⁾.

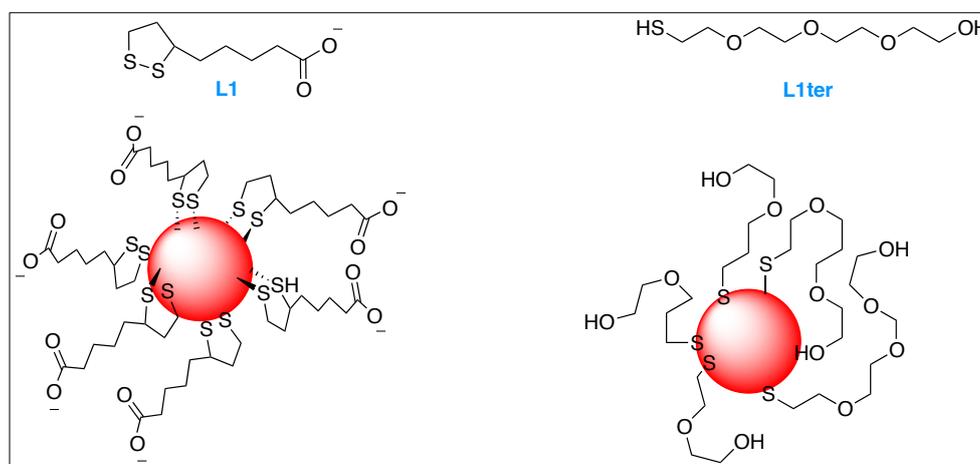


Figure 66 : Représentation d'un mode d'organisation possible des ligands L1 et L1ter à la surface de la nanoparticule d'or.

IV-1-2 CARACTERISATION DES AuNPS FONCTIONNALISÉES

D'après les analyses préliminaires optiques et spectrales, les AuNPS issues des procédures **NP9-3** et **NP10-2** sont celles présentant la meilleure qualité de fonctionnalisation pour les ligands **L1** et **L1Ter** respectivement. Une caractérisation plus poussée a alors été mise en œuvre. Cette étude comprenait une mesure du potentiel zêta afin de déterminer la charge électrique globale présente à la surface de la nanoparticule d'or et donc de fournir des éléments relatifs à l'agencement spatial du

ligand en surface. L'analyse XPS permettait de prouver la formation de la liaison covalente Au-S et l'analyse MET permettait de contrôler le caractère sphérique et monodisperse des AuNPs fonctionnalisées.

La mesure du potentiel zêta pour **NP9-3** affiche une valeur de -35 mV. La particule globulaire constituée de la nanoparticule d'or, de sa couronne de ligand **L1** et de la double couche d'Helmholtz porte donc une charge globalement négative. Cette valeur du potentiel zêta est cohérente avec notre hypothèse d'une organisation « rigidifiée » du ligand autour de la nanoparticule et de son orientation exposant le groupement carboxylate hydrosoluble vers le milieu aqueux.

Théoriquement, la valeur attendue du potentiel zêta de **NP10-2** devrait être proche de 0 mV car le ligand **L1ter** ne porte pas de groupement fonctionnel chargé et donc devrait induire une orientation dipolaire modérée des molécules aqueuses de solvant. Pourtant, la valeur mesurée est de -17 mV. Cette valeur négative peut s'expliquer par l'exposition de la fonction alcool terminale vers les molécules d'eau et la formation de liaisons hydrogènes conduisant à une polarisation de ces molécules. Néanmoins, ces liaisons hydrogènes peuvent impliquer différents atomes :

- entre l'oxygène de la fonction alcool terminale et l'hydrogène de l'eau
- entre l'oxygène des unités hydroxy et l'hydrogène de l'eau
- entre l'hydrogène de la fonction alcool et l'oxygène de l'eau

L'existence d'une charge négative semble plutôt en faveur d'un repliement et d'une flexibilité de la chaîne pegylée qui entraîne des polarisations différentes des molécules d'eau dont la résultante est globalement une orientation avec le dipôle négatif dirigé vers l'extérieur. A contrario, si l'organisation du ligand **L1ter** à la surface de la nanoparticule impliquait un dépliement de la molécule et l'exposition unique de la fonction alcool terminale, la charge globulaire résultante serait neutre (Figure 67).

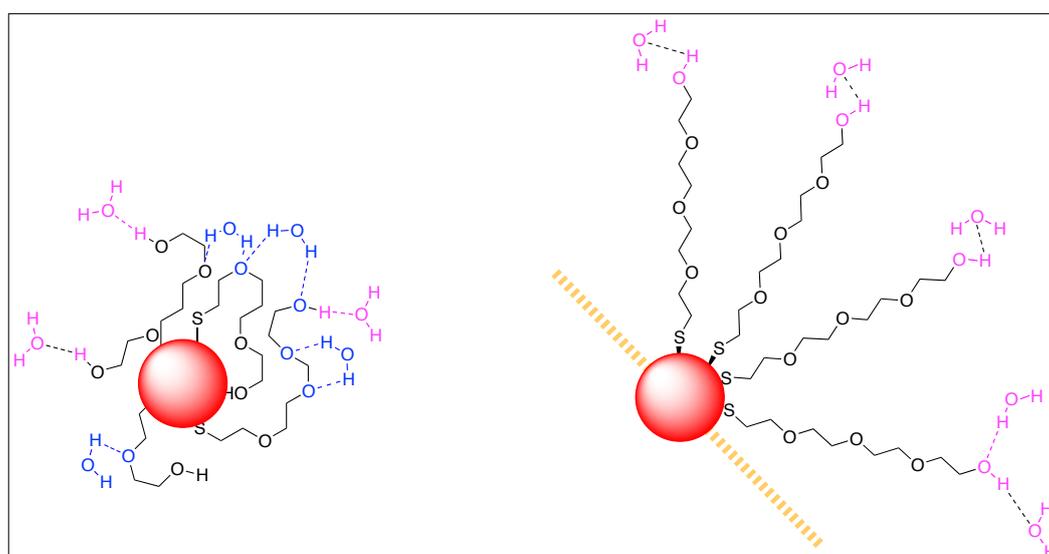


Figure 67 : Organisation des ligands à la surface de la nanoparticule d'or et répercussion sur la double couche d'Helmholtz et la polarisation des molécules d'eau.

Comme pour les nanoparticules d'or synthétisées avec du PEG₄, l'analyse XPS des [NP9-3](#) montre les deux pics énergétiques à 84,28 eV et 87,92 eV correspondants aux électrons de la couche 4f de l'or (figure 68A).

Les signaux correspondants aux électrons de la couche 1s du carbone sont également très similaires à ceux obtenus avec [NP3B-1](#). La décomposition du signal fait apparaître trois pics : à approximativement 285 eV, 287 eV et 289 eV. L'intensité du signal à 285 eV prédomine sur les autres signaux et correspond aux atomes de carbone de la chaîne éthylène glycol. Il semble tout à fait normal de retrouver ce signal malgré l'attachement du ligand car cette fonctionnalisation repose sur un échange de ligand. Le PEG₄ est donc toujours présent dans le milieu.

L'intérêt de cette analyse est de pouvoir affirmer l'existence d'une liaison covalente Au-S et donc la réussite de l'insertion du ligand à la surface de la nanoparticule d'or. Concernant l'atome de soufre, un signal large est observé entre 160 et 168 eV et correspond aux électrons de la couche 2p. La déconvolution laisse apparaître au moins six pics à des énergies respectives de 161,79 eV ; 162,90 eV ; 163,34 eV ; 164,49 eV ; 165,42 eV et 166,49 eV.

Plus l'énergie augmente, plus l'état d'oxydation de l'atome considéré augmente. Ainsi, dans le cas du soufre, un signal à une énergie supérieure à 166 eV est corrélé à une oxydation du soufre en disulfure, sulfoxyde ou sulfone en fonction des énergies croissantes.

La présence de deux pics de faible intensité à 166,49 eV et 165,42 eV peut signifier la présence d'atomes de soufre engagés dans une liaison disulfure. Il peut s'agir de ligand en excès n'ayant pas réagi (166,49 eV) ou bien d'atomes de soufre liés de façon covalente à la fois à l'or et au deuxième atome de soufre (165,42 eV).

Le pic avec une aire sous la courbe importante à 163,34 eV correspond vraisemblablement aux atomes de soufre liés aux atomes de carbone de la chaîne alcane du ligand.

En revanche, les deux pics de plus faible énergie, à 162,90 eV et 161,79 eV sont caractéristiques d'atomes de soufre liés à un métal. Cela permet donc de corroborer les hypothèses formulées précédemment concernant la réussite de la fonctionnalisation des AuNPs.

En ce qui concerne les AuNPs fonctionnalisées avec le ligand [L1ter](#) selon la procédure [NP-10](#), les pics énergétiques de l'or et de l'oxygène sont quasiment identiques. Il en est de même pour les pics du soufre mais avec une différence toutefois : l'absence des pics de hautes énergies (166,49 eV et 165,42 eV). L'absence de ces pics au sein d'une molécule arborant uniquement un motif thiol est un argument en faveur des attributions S-S et S-Au supposées ci-dessus. Les pics de bas niveaux d'énergie

correspondants à des atomes de soufre lié à un métal (figure 68B) sont observés.

Il est également intéressant de noter que l'analyse XPS de l'échantillon **NP7C-3** fournit des arguments en faveur de notre hypothèse relative à l'effet tensio-actif piégeant du PEG₄. En effet, les pics correspondants aux électrons 3f de l'or ne sont pas détectés, le signal des électrons 1s du carbone fait apparaître un pic majoritaire à 285 eV et le signal des électrons 2p du soufre est constitué de deux pics à 163 eV et 164 eV, le pic à 164 eV correspondant à des atomes de soufre non liés à un métal (figure 68C).

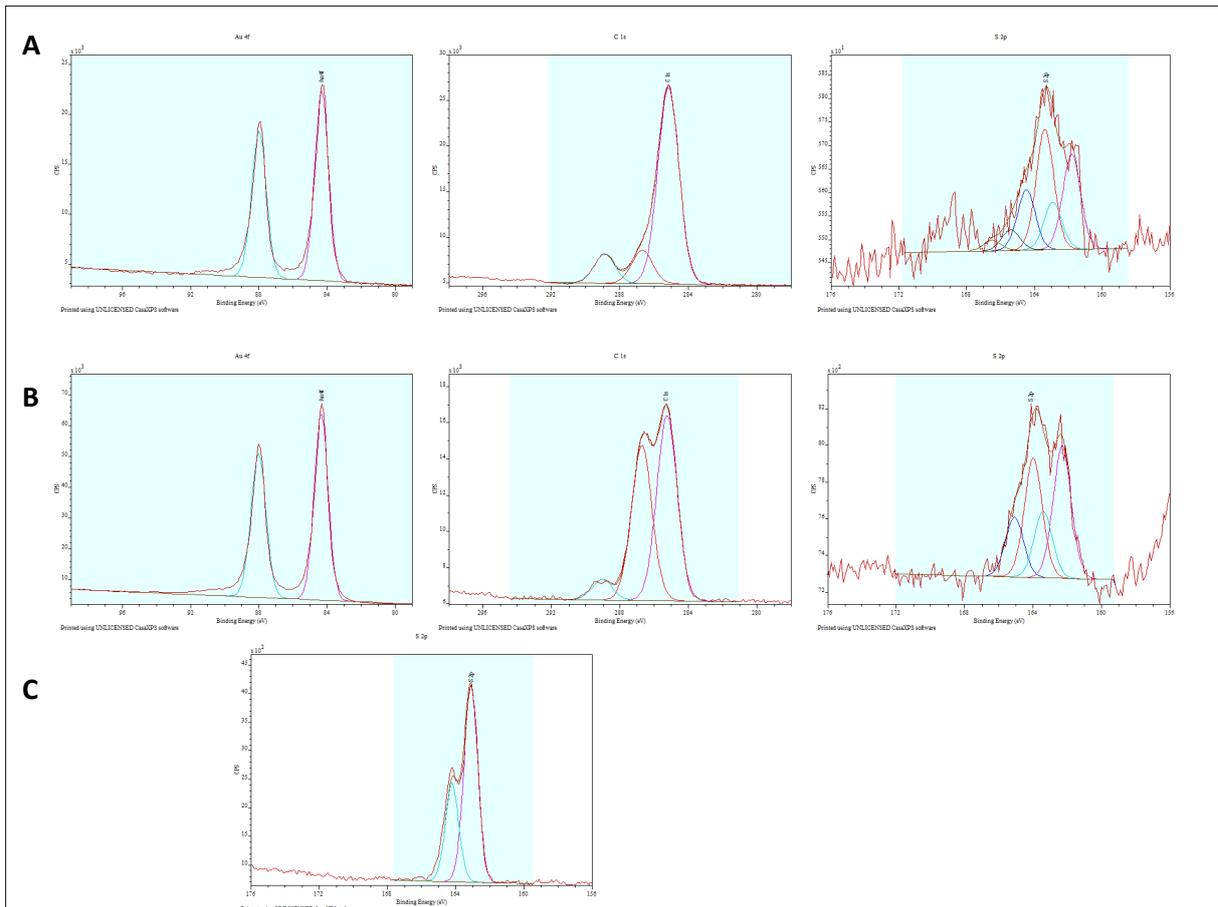


Figure 68 : A) Spectres XPS des nanoparticules NP9-3 fonctionnalisées avec le ligand L1, avec de gauche à droite le spectre XPS de l'or, du carbone et du soufre ; B) Spectre XPS des nanoparticules NP10 modifiées avec le ligand L1ter, avec de gauche à droite le spectre XPS de l'or, du carbone et du soufre ; C) Spectre XPS du soufre obtenu à partir des nanoparticules NP7C-3 fonctionnalisées avec le ligand L1 dissous dans le PEG₄.

L'analyse MET des nanoparticules d'or **NP9-3** fonctionnalisées par le ligand **L1** révèle que cette modification aboutit à l'obtention d'une population de nanoparticules d'or sphériques avec une isotropie de taille et de forme. Cette étude microscopique permet d'établir la courbe de distribution de taille des AuNPs qui présente une allure gaussienne centrée sur une valeur de diamètre moyen de $14,6 \pm 2$ nm (figure 69).

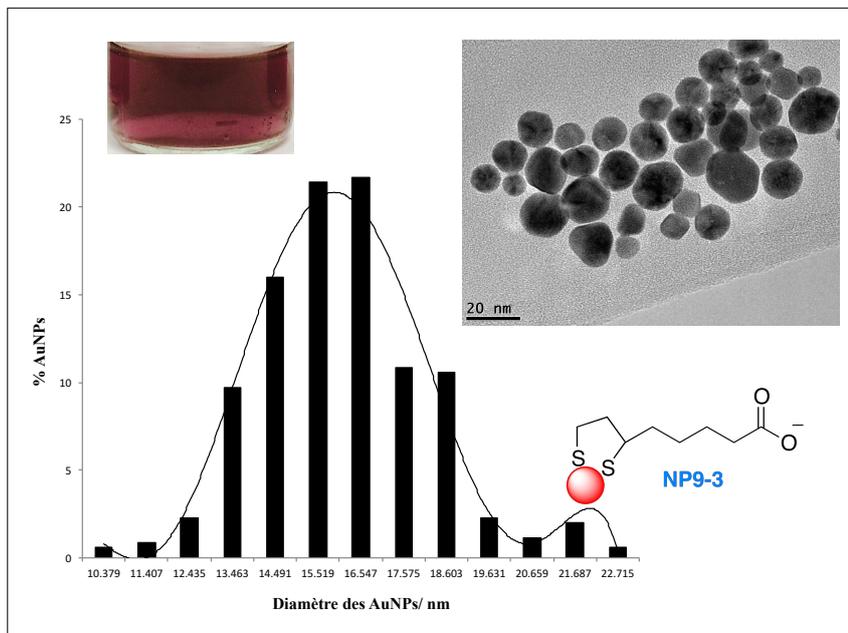


Figure 69 : Diagramme de distribution de la taille des AuNPs NP9-3 (en bas) ; Illustration de la coloration violacée corrélée à la modification de surface des nanoparticules (en haut à gauche) ; Image MET des AuNPs 9-3 (en haut à droite).

IV-2 FONCTIONNALISATION DES AuNPS AVEC LES BRAS ESPACEURS PEGYLÉS

Afin d'améliorer la stabilité et la biodisponibilité de notre système de détection, les nanoparticules d'or ont été fonctionnalisées avec un bras espaceur constitué de plusieurs unités polyéthylène glycol successives.

Plusieurs bras espaceurs (composés [B2](#), [B28](#), [B29](#), [B30](#), [B39](#), [B40](#) et [B41](#)) ont été synthétisés afin d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne sur la stabilité des nanoparticules ainsi que sur leurs propriétés optiques et plus particulièrement l'extinction de fluorescence.

Ces bras espaceurs ou linkers pegylés vont s'insérer entre la molécule d'acide lipoiqye fixé à la nanoparticule d'or par une liaison covalente Au-S et l'aptamère de reconnaissance.

Concernant le couplage entre le bras espaceur et l'aptamère, une réaction de chimie click est envisagée, c'est pourquoi chaque linker possède une fonction terminale azoture.

Le couplage entre l'acide lipoiqye et le bras espaceur a été réalisé par une réaction d'estérification selon la méthode de Steglich décrite en 1978. Cette réaction d'estérification est effectuée dans des conditions douces en présence de dicyclohexylcarbodiimide ou DCC et de 4-diméthylaminopyridine ou DMAP (schéma 55).

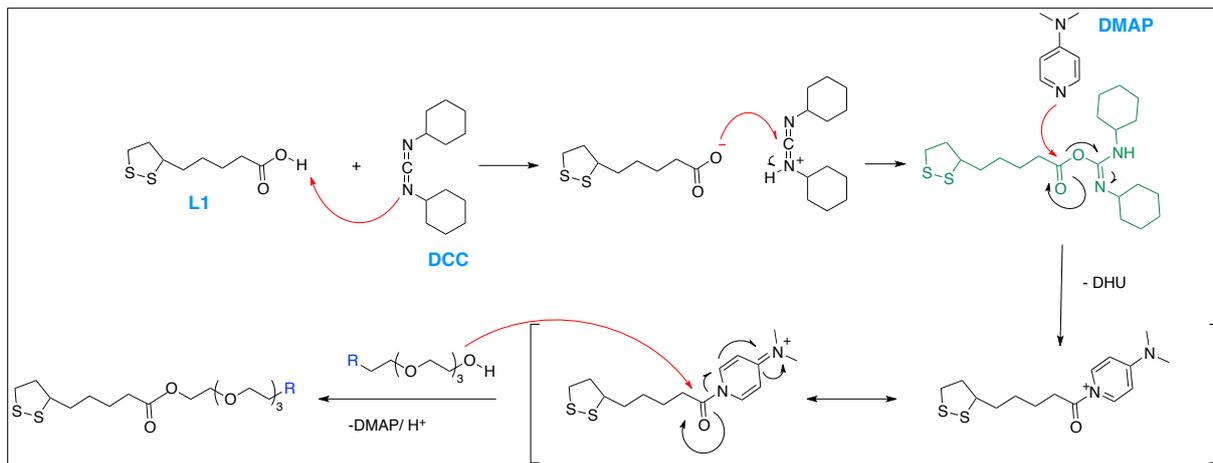


Schéma 55 : Mécanisme réactionnel de la réaction d'estérification de Steglich catalysée par le DMAP.

L'attaque basique de l'une des imines du DCC permet de générer le carboxylate. L'attaque nucléophile du carboxylate sur le carbone électrophile du carbodiimide entraîne la formation d'un intermédiaire réactionnel O-acyluréé (en vert sur le schéma). Cet intermédiaire réactionnel permet la génération d'un acide activé qui présente la même réactivité que l'anhydride d'acide correspondant. Cet intermédiaire peut alors réagir très rapidement avec des nucléophiles forts tels que des amines afin de former une liaison amide, mais aussi avec des nucléophiles plus faibles tels que les alcools via une liaison ester.

Cependant, dans le cadre de la réaction d'estérification, il est possible que l'alcool impliqué dans la réaction de couplage ne soit pas suffisamment nucléophile. La réaction est alors très lente et conduit à la formation d'un produit indésirable issu du réarrangement du O-acyluréé en N-acyluréé non réactif. Cette migration du groupement acyl peut être inhibée en utilisant le DMAP. Il s'agit d'un nucléophile fort qui attaque très rapidement le dérivé O-acylé en formant un dérivé amide qui réagit très rapidement avec les alcools et empêche donc tout réarrangement intramoléculaire.

Cette réaction d'estérification ne pouvant pas être réalisée dans l'eau, la première stratégie de couplage envisagée consistait à traiter la suspension de AuNPs **NP9-3** par une solution aqueuse d'acide chlorhydrique afin de reformer l'acide puis d'effectuer un transfert de phase dans du dichlorométhane. Cependant, cette procédure conduit à une agglomération des AuNPs qui deviennent alors inutilisables (schéma 56).

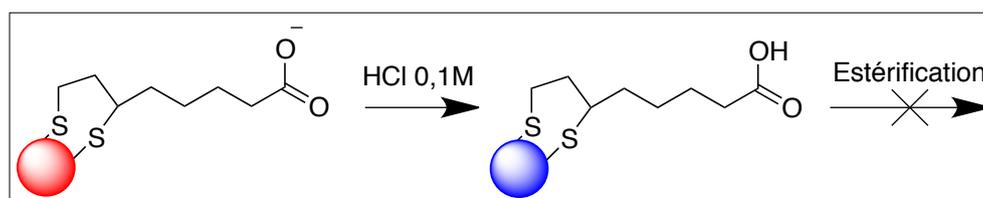
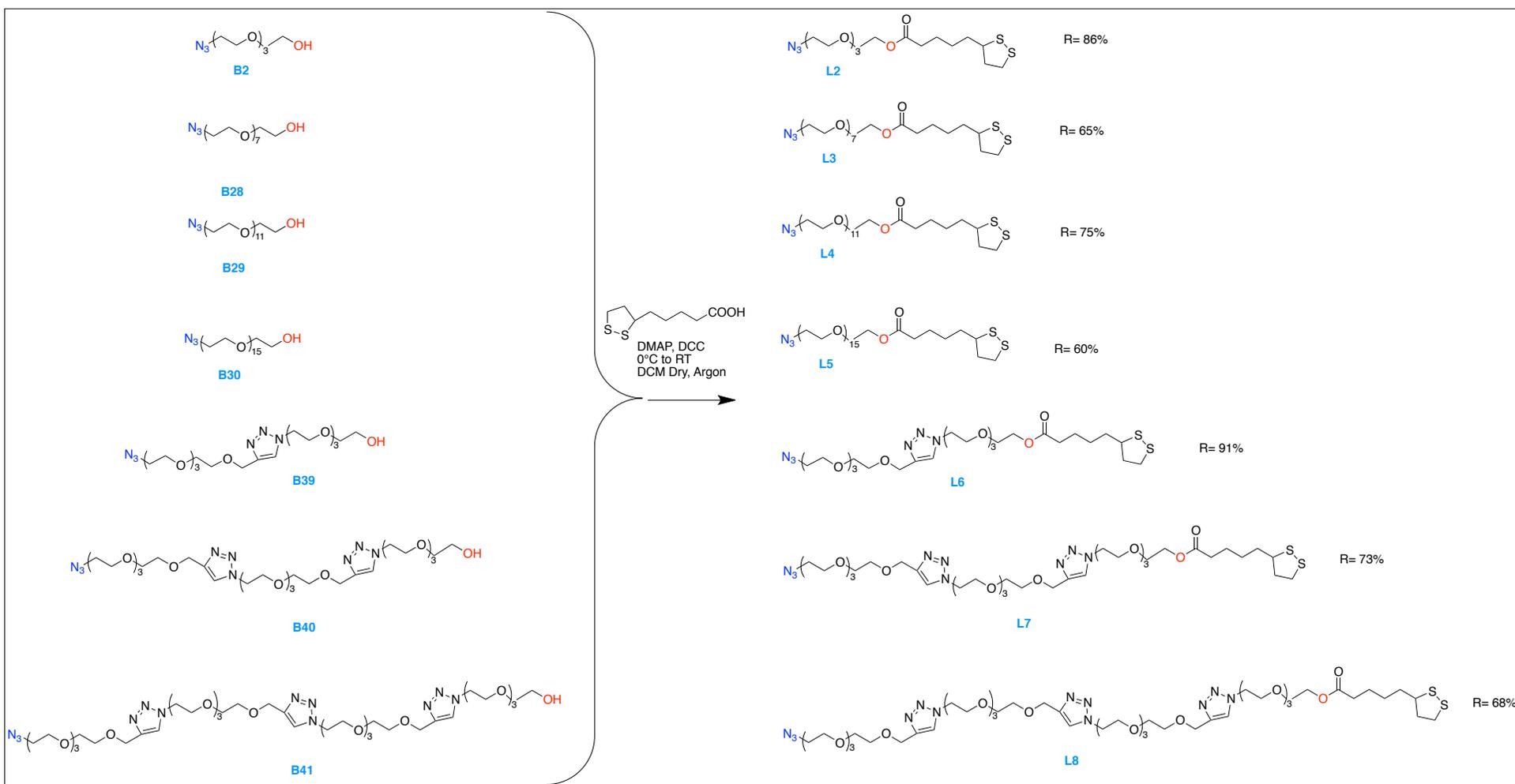


Schéma 56 : Stratégie de transfert de phase des AuNPs NP9-3 modifiées par le lipoate sodique par acidification du milieu en présence d'eau et de dichlorométhane.

Le processus d'estérification in-situ entre le linker et l'acide lipoïque fixé aux AuNPs ne donnant pas de résultats satisfaisants, nous avons décidé de synthétiser ces ligands puis de réaliser leur insertion à la surface des AuNPs (schéma 57).

Avec cette stratégie de couplage, les rendements varient de 60 à 91% en fonction des bras espaceurs pegylés considérés.

Schéma 57 : Synthèse des ligands pegylés L2 à L8 par réaction d'estérification.



IV-2-1 ÉTUDE PRÉLIMINAIRE : FONCTIONNALISATION AVEC LE LIGAND L2

Les premiers essais de fonctionnalisation des nanoparticules ont été mis en œuvre avec le ligand **L2** à partir des conditions opératoires développées lors de la fonctionnalisation des AuNPs avec le composé **L1** (schéma 58).

Pour rappel les nanoparticules **NP9-3** sont obtenues à partir de 20 mL de suspension de nanoparticules **NP3B-1** chauffée à 80°C et dans laquelle est ajoutée 1 mL de solution aqueuse de lipote de sodium **L1** à 40 mg/mL.

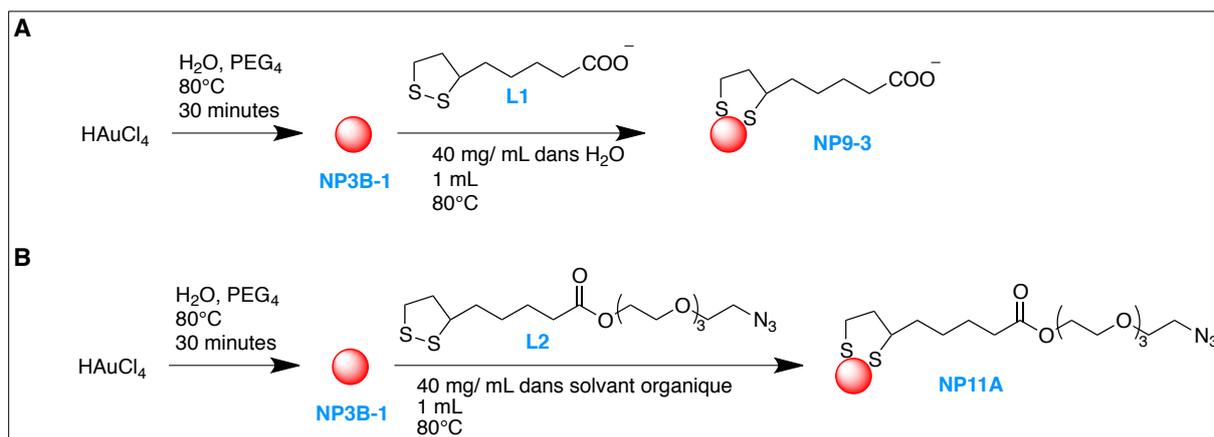


Schéma 58 : Conditions expérimentales de la fonctionnalisation des nanoparticules d'or avec : A) le ligand L1 ; B) le ligand L2.

Ce ligand **L2** n'est pas soluble dans l'eau mais présente une excellente solubilité dans des solvants miscibles à l'eau tels que l'acétonitrile (CH₃CN), l'acétone, le tétrahydrofurane (THF), le N,N-diméthylformamide (DMF) ou le mélange binaire tBuOH/H₂O en proportion 1/1. En revanche, sa solubilité est moyenne dans des solvants tels que le méthanol, l'éthanol ou encore le mélange binaire PEG₄/H₂O en proportion 1/1.

Au préalable, nous nous sommes donc assurés que ces solvants étaient compatibles avec la suspension colloïdale de nanoparticules d'or. Les solvants testés sont le THF, l'acétone, l'acétonitrile, le DMF et le mélange binaire tBuOH/H₂O en proportion 1/1.

L'ajout de 1 mL de solvant organique aux 20 mL de solution de nanoparticules **NP3B-1** n'a pas engendré de changement de la coloration de la solution et les spectres UV-Visible sont en tout point superposables à celui de **NP3B-1** sauf pour l'acétone. En présence de ce solvant, une altération des AuNPs est observée et se traduit par l'apparition d'une coloration bleu-violacée reflétant une agrégation des nanoparticules d'or.

La compatibilité des AuNPs avec les solvants organiques a été vérifiée à 80°C ainsi qu'à température ambiante. Les résultats obtenus sont similaires quelle que soit la température considérée.

Compte-tenu des conditions opératoires et plus particulièrement de la température à laquelle est réalisée la fonctionnalisation des AuNPs, les solvants doivent avoir un point d'ébullition supérieur à 80°C. C'est pourquoi les solvants utilisés pour ces tests sont le DMF ($t_{eb}= 153^{\circ}\text{C}$), l'acétonitrile ($t_{eb}= 82^{\circ}\text{C}$) et le mélange tBuOH/H₂O ($t_{eb}=82^{\circ}\text{C}$).

Cependant, contrairement à ce qui était attendu, l'addition du ligand **L2** provoque une agrégation des nanoparticules d'or caractérisée par une coloration violacée de la solution suivie d'une sédimentation de particules noires visibles à l'œil nu (procédures **NP11A-1, NP11A-2 et NP11A-3**).

D'autres essais ont alors été effectués en modifiant différents paramètres expérimentaux comme la concentration de la solution en ligand L2, la température ou encore le volume réactionnel total. Le tableau 19 ci-après présente les différentes conditions opératoires mises en œuvre pour la fonctionnalisation des AuNPs **NP3B-1** avec le ligand **L2**.

	[Au] mg/L	NP3B-1 Volume (mL)	[L2] mg/mL	L2 Solvant	L2 Volume (mL)	T (°C)	Résultats
NP11A-1	40	20	40	DMF	1	80	
NP11A-2	40	20	40	CH ₃ CN	1	80	
NP11A-3	40	20	40	tBuOH/H ₂ O	1	80	
NP11A-4	40	20	80	DMF	1	80	
NP11A-5	40	20	80	CH ₃ CN	1	80	
NP11A-6	40	20	80	tBuOH/H ₂ O	1	80	
NP11A-7	40	20	100	DMF	1	80	
NP11A-8	40	20	100	CH ₃ CN	1	80	
NP11A-9	40	20	100	tBuOH/H ₂ O	1	80	
NP11A-10	40	20	120	DMF	1	80	
NP11A-11	40	20	120	CH ₃ CN	1	80	
NP11A-12	40	20	120	tBuOH/H ₂ O	1	80	
NP11A-13	40	20	200	DMF	1	80	
NP11A-14	40	20	200	CH ₃ CN	1	80	
NP11A-15	40	20	200	tBuOH/H ₂ O	1	80	
NP11B-1	40	10	40	DMF	0,5	80	
NP11B-2	40	10	40	CH ₃ CN	0,5	80	
NP11B-3	40	10	40	tBuOH/H ₂ O	0,5	80	
NP11B-4	40	10	80	DMF	0,5	80	
NP11B-5	40	10	80	CH ₃ CN	0,5	80	
NP11B-6	40	10	80	tBuOH/H ₂ O	0,5	80	

Tableau 19: Tableau récapitulatif des différentes conditions opératoires mises en œuvre pour la fonctionnalisation des nanoparticules d'or NP3B-1 avec le ligand L2.

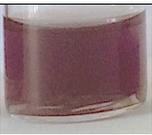
	[Au] mg/L	NP3B-1 Volume (mL)	[L2] mg/mL	L2 Solvant	L2 Volume (mL)	T (°C)	Résultats
NP11B-7	40	10	100	DMF	0,5	80	
NP11B-8	40	10	100	CH ₃ CN	0,5	80	
NP11B-9	40	10	100	tBuOH/H ₂ O	0,5	80	
NP11B-10	40	10	120	DMF	0,5	80	
NP11B-11	40	10	120	CH ₃ CN	0,5	80	
NP11B-12	40	10	120	tBuOH/H ₂ O	0,5	80	
NP11B-13	40	10	200	DMF	0,5	80	
NP11B-14	40	10	200	CH ₃ CN	0,5	80	
NP11B-15	40	10	200	tBuOH/H ₂ O	0,5	80	
NP11C-1	40	5	40	DMF	0,25	80	
NP11C-2	40	5	40	CH ₃ CN	0,25	80	
NP11C-3	40	5	40	tBuOH/H ₂ O	0,25	80	
NP11C-4	40	5	80	DMF	0,25	80	
NP11C-5	40	5	80	CH ₃ CN	0,25	80	
NP11C-6	40	5	80	tBuOH/H ₂ O	0,25	80	
NP11C-7	40	5	100	DMF	0,25	80	
NP11C-8	40	5	100	CH ₃ CN	0,25	80	
NP11C-9	40	5	100	tBuOH/H ₂ O	0,25	80	
NP11C-10	40	5	120	DMF	0,25	80	
NP11C-11	40	5	120	CH ₃ CN	0,25	80	
NP11C-12	40	5	120	tBuOH/H ₂ O	0,25	80	
NP11C-13	40	5	200	DMF	0,25	80	
NP11C-14	40	5	200	CH ₃ CN	0,25	80	
NP11C-15	40	5	200	tBuOH/H ₂ O	0,25	80	
NP11D-1	40	5	80	DMF	0,25	TA	
NP11D-2	40	5	80	CH ₃ CN	0,25	TA	
NP11D-3	40	5	80	tBuOH/H ₂ O	0,25	TA	
NP11D-4	40	5	80	THF	0,25	TA	
NP11D-5	40	5	100	DMF	0,25	TA	
NP11D-6	40	5	100	CH ₃ CN	0,25	TA	
NP11D-7	40	5	100	tBuOH/H ₂ O	0,25	TA	
NP11D-8	40	5	120	DMF	0,25	TA	
NP11D-9	40	5	120	CH ₃ CN	0,25	TA	
NP11D-10	40	5	120	tBuOH/H ₂ O	0,25	TA	

Tableau 19 suite : Tableau récapitulatif des différentes conditions opératoires mises en œuvre pour la fonctionnalisation des nanoparticules d'or NP3B-1 avec le ligand L2.

Les procédures [NP11A](#), [NP11B](#) et [NP11C](#) permettent d'investiguer à la fois l'influence de la concentration en ligand sur le processus de fonctionnalisation des AuNPs ainsi que celle du solvant, et cela pour des volumes réactionnels totaux différents (21 mL, 10,5 mL et 5,25 mL respectivement).

Quel que soit le solvant employé pour solubiliser le ligand [L2](#), cela ne semble pas avoir d'influence sur le processus d'insertion du ligand. En revanche, la réussite de la fonctionnalisation des nanoparticules d'or par le ligand [L2](#) semble être majoritairement dépendante du volume réactionnel total.

En effet, les nanoparticules fonctionnalisées obtenues avec les conditions [NP11A](#) présentent une coloration bleu-violacée qui traduit une forte agglomération des AuNPs. De plus, quelques heures après la réaction de fonctionnalisation, il est observé un dépôt très marqué de particules noires visibles à l'œil nu. Ce processus de sédimentation est accompagné d'une décoloration de la solution. Ces résultats sont similaires quel que soit le solvant utilisé ou la concentration de ligand employée.

Pour des volumes réactionnels de 10,5 mL (procédures [NP11B](#)), les résultats semblent plus prometteurs. Quelques instants après l'addition du ligand en solution, un changement de la coloration du milieu réactionnel qui devient plus violacé est obtenu. Cependant, la suspension de nanoparticules d'or modifiées est instable et un processus de sédimentation est amorcé en quelques jours.

La poursuite de cette stratégie de réduction du volume réactionnel total a permis d'obtenir des résultats concluants avec les protocoles [NP11C](#) où le volume réactionnel total est de 5,25 mL. Immédiatement après l'addition du ligand, une modification de la coloration de la solution colloïdale de AuNPs survient et le milieu devient violacé. Ce changement de coloration traduit une modification de la surface des AuNPs. Il est le reflet de la réussite de l'échange entre le surfactant PEG₄ et le ligand [L2](#) qui vient s'adsorber à la surface de la nanoparticule d'or afin de former une monocouche auto-assemblée. Néanmoins, la faible solubilité du ligand en milieu aqueux ne suffit pas à elle seule à expliquer l'impact du volume réactionnel total sur la réussite du processus de fonctionnalisation des nanoparticules d'or. En effet, bien que le volume réactionnel total soit modifié, la proportion H₂O/Solvant organique reste identique quelle que soit la procédure envisagée.

La réussite de cette procédure [NP11C](#) permet d'étudier l'influence de la concentration en ligand. La fonctionnalisation semble optimale pour une gamme de concentration qui s'étend de 80 mg/mL à 100 mg/mL (protocoles [NP11C-4](#) à [NP11C-9](#)). En dehors de ce domaine de concentration, les AuNPs fonctionnalisées ne sont pas stables et un précipité noir apparaît en quelques jours. C'est pourquoi une concentration en ligand [L2](#) de 90 mg/mL (soit 0,21 mM) sera désormais utilisée pour les réactions d'insertion de ligand.

Lorsque l'influence de la température est étudiée (procédures [NP11C](#) et [NP11D](#)), des différences de coloration sont observées. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer cette variation est l'existence d'une évaporation partielle du solvant lorsque la réaction est effectuée à 80°C ce qui entraîne une diminution de la solubilité du ligand. Cet abaissement de la solubilité du ligand peut être responsable de l'aspect trouble et

opalescent des solutions [NP11C-4](#) à [NP11C-9](#) comparé à celui de leurs homologues [NP11D-1](#) à [NP11D-7](#) réalisés à température ambiante. La réalisation de la fonctionnalisation à température ambiante s'avère plus performante et aboutit à des nanoparticules modifiées de meilleure qualité.

Pour des paramètres de température et de concentration en ligand identiques, la fonctionnalisation des AuNPs ne semble pas être sous la dépendance du solvant utilisé pour solubiliser le ligand [L2](#). En effet, les produits [NP11D-1](#) à [NP11D-4](#) (concentration en ligand de 80 mg/mL, 80°C) et [NP11D-5](#) à [NP11D-7](#) (concentration en ligand de 100 mg/mL, température ambiante) sont comparables bien que les solvants employés soient distincts.

Le THF va être utilisé comme solvant pour solubiliser les ligands. Différents facteurs expliquent ce choix :

- Son point d'ébullition relativement modéré ($t_{eb} = 66^\circ\text{C}$) permet une élimination aisée par évaporation sous pression réduite
- L'absence d'atome d'azote dans sa structure réduira le risque d'interférence lors de l'analyse XPS, notamment pour la caractérisation de la fonction azoture terminale des ligands.

IV-2-2 APPLICATION AUX AUTRES LIGANDS (L3 à L8)

La très faible hydrosolubilité du ligand choisi pour former la monocouche fonctionnalisée semble être le facteur limitant de cette réaction de fonctionnalisation. Cependant, nous supposons que le caractère hydrophile de cette structure pourra être amélioré par l'utilisation d'une chaîne PEG plus longue.

L'étude préliminaire de l'insertion du ligand [L2](#) à la surface des nanoparticules d'or a permis de mettre en exergue les conditions opératoires suivantes :

- La réaction est réalisée à température ambiante
- Le ligand est solubilisé dans du THF à la concentration de 0,22 mM
- 0,25 mL de la solution de ligand est ajouté à 5 mL de la suspension de AuNPs obtenues selon la procédure [NP3B-1](#).

Ces conditions opératoires ont alors été appliquées à la fonctionnalisation des AuNPs [NP3B-1](#) avec les différents ligands [L3](#) à [L8](#) (schéma 59). Le tableau 20 ci-dessous regroupe les paramètres expérimentaux employés pour effectuer ces réactions de fonctionnalisation et présente les photographies des AuNPs ainsi obtenues.

	[Ligand]	Résultats		[Ligand]	Résultats
NP11	90 mg/mL 0,21 mM		NP15	139 mg/mL 0,21 mM	
NP12	120 mg/mL 0,21 mM		NP16	195 mg/mL 0,21 mM	
NP13	158 mg/mL 0,21 mM		NP17	245 mg/mL 0,2 mM	
NP14	190 mg/mL 0,21 mM				

Tableau 20 : Conditions expérimentales utilisées pour la formation de la monocouche fonctionnalisée à la surface des nanoparticules d'or. 0,25 mL de solution de ligand sont ajoutés à 5 mL de solution de nanoparticules NP3B-1 à température ambiante.

Ces résultats visuels préliminaires montrent que les conditions opératoires définies lors de l'étude de l'insertion du ligand **L2** à la surface de la nanoparticule d'or sont applicables aux autres ligands hétérobifonctionnalisés.

En effet, quel que soit le ligand considéré, la couleur du milieu réactionnel est modifiée et devient plus violacée. Ce changement de coloration traduit la modification de l'effet plasmonique engendré par la modification de surface des nanoparticules d'or.

De plus, ils permettent d'étayer notre hypothèse selon laquelle l'augmentation de la longueur de la chaîne pegylée améliore la solubilité du ligand en milieu aqueux.

Il a été constaté que les solutions de nanoparticules deviennent plus limpides avec l'augmentation de la longueur du linker. Pour des ligands constitués de 4 (**NP11**) ou 8 (**NP12** et **NP15**) unités PEG₄, les solutions exhibent une opalescence. En revanche, la fonctionnalisation des AuNPs avec des ligands arborant 12 (**NP13** et **NP16**) ou 16 (**NP14** et **NP17**) unités PEG₄ aboutit à des solutions limpides. Ce phénomène ne semble pas être dépendant du mode de liaison des unités PEG entre elles, qu'il s'agisse d'un pont éther (**NP11** à **NP14**) ou d'une structure triazole (**NP15** à **NP17**).

Afin de confirmer ces premières constatations, ces solutions de nanoparticules fonctionnalisées ont été caractérisées par des techniques spectrales UV-Visible ainsi que par des analyses de microscopie électronique.

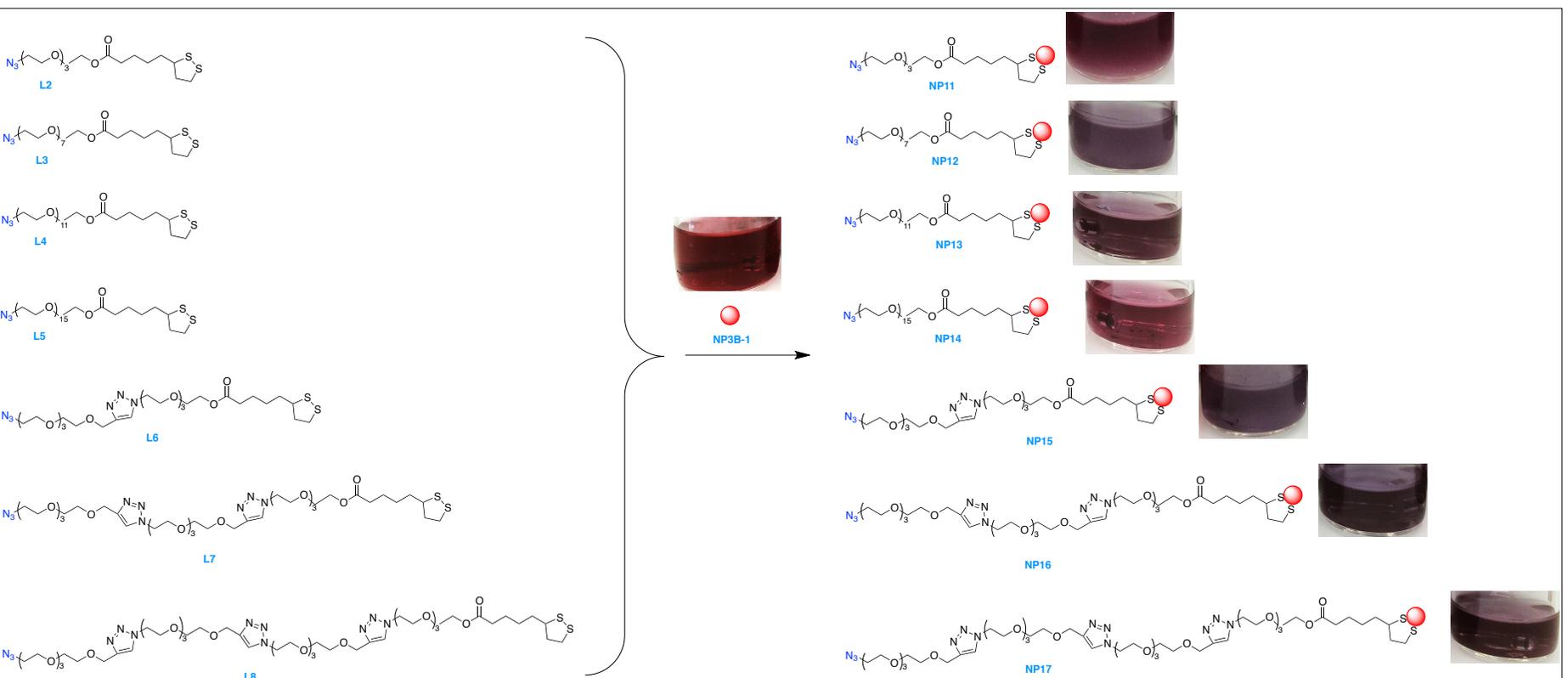


Schéma 59 : Fonctionnalisation des nanoparticules d'or synthétisées selon la procédure NP3B-1 par ligands pegylés de longueur variable.

IV-2-3 CARACTÉRISATION DES AuNPS FONCTIONNALISÉES

L'analyse spectrale UV-Visible a permis de confirmer la réussite de la modification en surface de la nanoparticule d'or en mettant en évidence un déplacement de la valeur de λ_{\max} (figure 70).

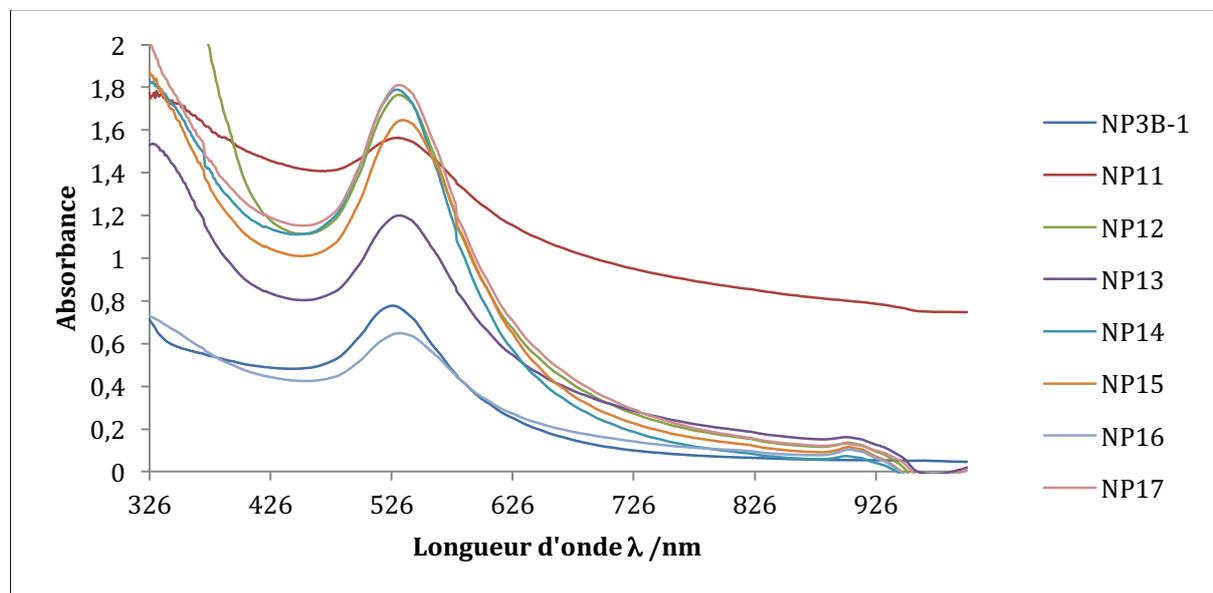


Figure 70 : Spectre UV-Visible des AuNPs NP11 à NP17 fonctionnalisées avec les ligands L2 à L8 respectivement.

Toutes les solutions colloïdales de nanoparticules fonctionnalisées exhibent une modification de la valeur de la longueur d'onde λ_{\max} par rapport à celle présentée par les nanoparticules nues [NP3B-1](#).

En effet, ces nanoparticules fonctionnalisées présentent un déplacement de 7 nm vers de plus hautes longueurs d'onde. Ce déplacement est comparable à celui observé avec les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec l'acide lipoiqye ([NP9-3](#)). Il est également important de noter que l'allure du spectre est analogue à celle de [NP3B-1](#) et [NP9-3](#) avec la présence d'un pic unique, fin et d'allure gaussienne. Ces similitudes sont en faveur de la fonctionnalisation homogène des nanoparticules via la formation d'une liaison covalente Au-S.

En revanche, les nanoparticules [NP11](#) présentent une modification de l'allure du pic qui s'étale vers de plus hautes valeurs de longueur d'onde ce qui peut traduire une dispersion de la taille des nanoparticules d'or fonctionnalisées.

Les analyses MET vont permettre de contrôler la forme des nanoparticules fonctionnalisées et de mesurer leur diamètre.

L'analyse MET montre que la fonctionnalisation des nanoparticules d'or avec les ligands pegylés n'engendre pas de modification de la forme. En effet, les AuNPs ainsi modifiées forment une population de particules sphériques. Néanmoins, quelques

éléments arborent une forme aux contours plus découpés tels que des prismes ou des triangles. Ces formes atypiques présentent une densité électronique plus faible (figure 71).

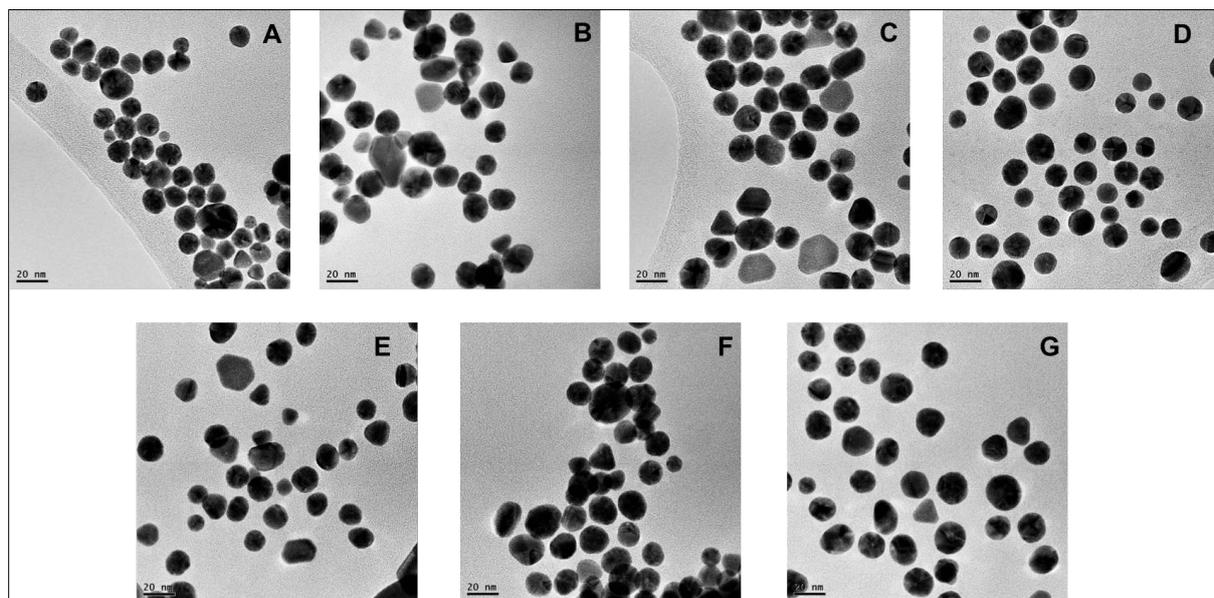


Figure 71 : Image MET des différentes AuNPs après fonctionnalisées par les ligands L2 à L8 au grossissement X120000 : A) NP11 ; B) NP12 ; C) NP13 ; D) NP14 ; E) NP15 ; F) NP16 et G) NP17.

Pour chaque échantillon analysé, le diamètre moyen des nanoparticules a été calculé et la courbe de distribution en taille a été construite (figure 72).

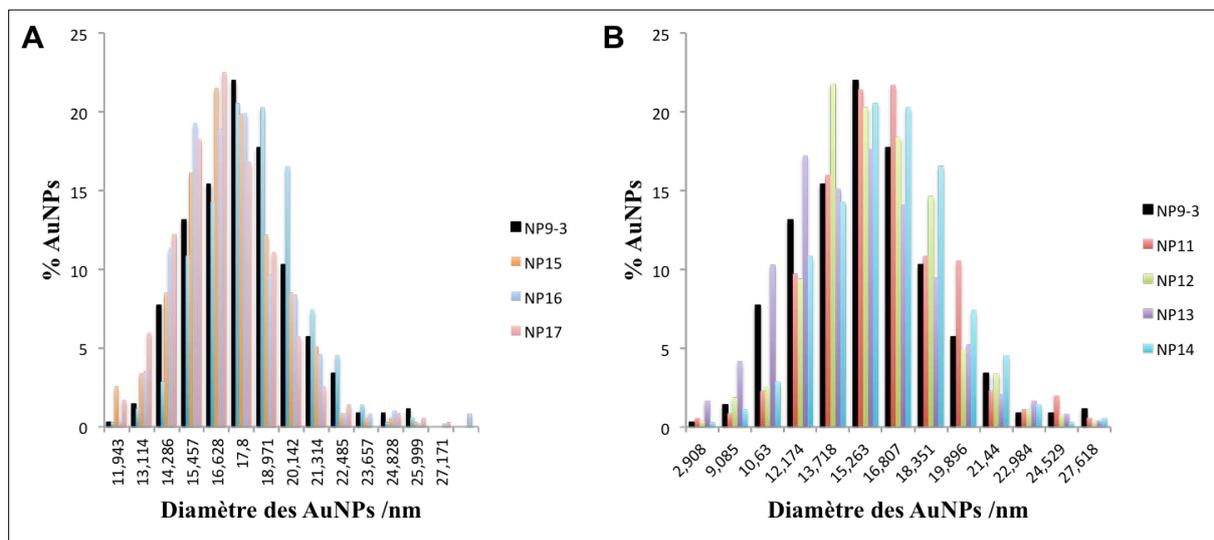


Figure 72 : Diagrammes de distribution de la taille des AuNPs fonctionnalisées par des ligands pegylés de différente longueur dont les unités tétraéthylène glycol sont reliées par A) Des ponts triazoles ; B) Des liaisons éthers.

Les AuNPs fonctionnalisées avec les ligands pegylés ont un diamètre moyen supérieur à celui observé avec les AuNPs nues [NP3B-1](#) (13,5 nm) ou modifiées avec l'acide lipoiqe [NP9-3](#) (14,6 nm). En effet, le diamètre des nanoparticules d'or [NP11](#) et [NP15](#) est de 16 nm, celui des nanoparticules [NP12](#) et [NP13](#) est de 16,5 nm et celui des nanoparticules [NP13](#), [NP16](#) et [NP17](#) est d'environ 17,5 nm.

De plus, ces AuNPs constituent des populations homogènes en taille avec un écart type de ± 2 nm, une valeur analogue à celle retrouvée chez les nanoparticules non fonctionnalisées [NP3B-1](#).

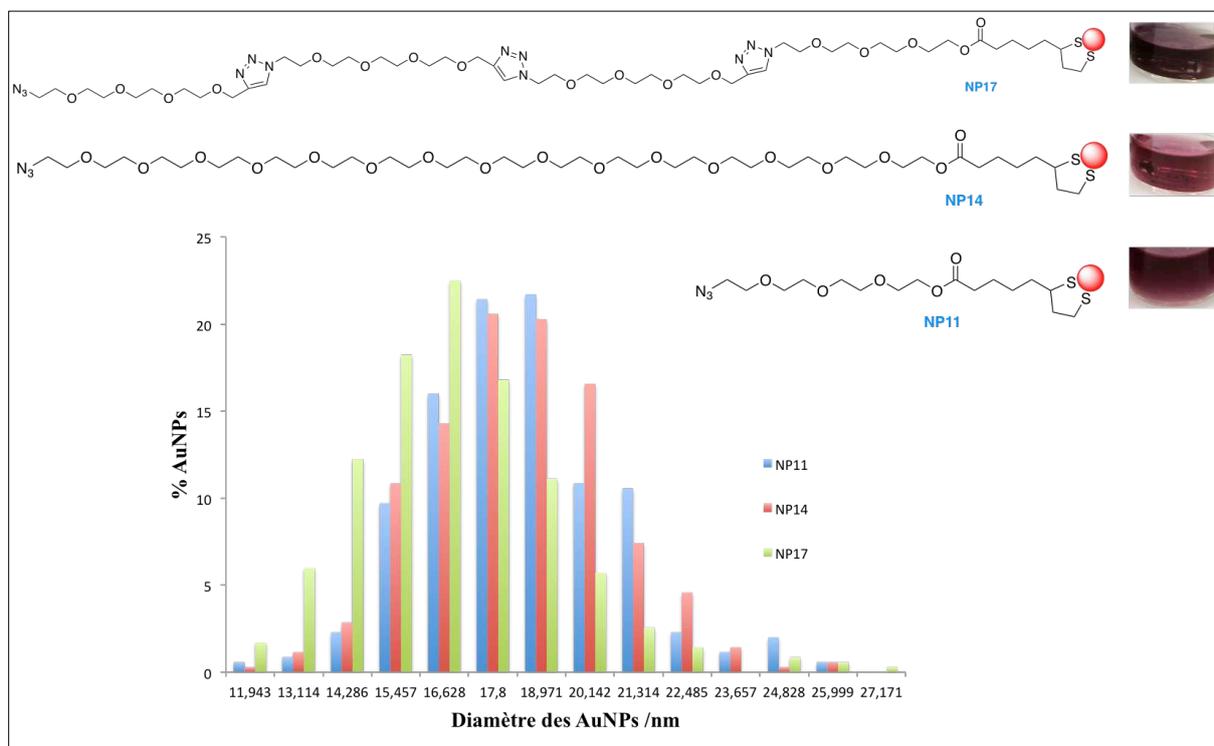


Figure 73 : Diagramme de distribution en taille des AuNPs fonctionnalisées avec les ligands L2 (NP11), L5 (NP14) et L8 (NP17). La structure des AuNPs modifiées ainsi que la couleur de la solution sont indiquées pour rappel.

La détermination des courbes de distribution en taille des AuNPs fonctionnalisées permet d'apporter quelques arguments en faveur de l'hypothèse d'un repliement du ligand à la surface de la nanoparticule (figure 73). En effet, les courbes de distribution des nanoparticules [NP11](#) (en bleu sur la figure) et [NP14](#) (en rouge) sont relativement proches alors qu'elles sont fonctionnalisées par des ligands de longueur très différente. Les nanoparticules [NP11](#) sont issues de la fonctionnalisation avec un ligand constitué de quatre unités éthylène glycol alors que le ligand utilisé pour la fonctionnalisation des particules [NP14](#) compte 16 unités. En revanche, bien que les nanoparticules [NP17](#) soient fonctionnalisées avec des ligands composés de quatre unités tétraéthylène glycol reliées entre elles par des groupements triazole, leur courbe de distribution se distingue nettement des deux premières par son déplacement vers des valeurs inférieures (en vert).

Un argument vient étayer l'hypothèse d'un repliement du ligand à la surface de la nanoparticule. Il s'agit de la valeur du diamètre moyen des nanoparticules fonctionnalisées comparée à la longueur théorique du ligand si celui-ci adoptait une configuration entièrement trans (tableau 21).

	Diamètre expérimental	Longueur du ligand	Diamètre théorique
NP11	16 ± 2 nm	2,94 nm	19,7 nm
NP14	16,3 ± 2 nm	8,3 nm	30,6 nm
NP17	17,3 ± 2,4 nm	9,86 nm	33,71 nm

Tableau 21 : Comparaison de la valeur du diamètre expérimental mesuré par MET par rapport à celle du diamètre théorique si le ligand adoptait une conformation tout trans lors de son attachement à la surface de la nanoparticule.

Nous avons réalisé l'approximation selon laquelle les longueurs de liaisons composant les ligands sont de :

- 1,54 Å pour une liaison C (sp³)-C (sp³)
- 1,10 Å pour une liaison C (sp³)-H
- 1,43 Å pour une liaison C (sp³)-O
- 1,47 Å pour une liaison C (sp³)-N
- 1,28 Å pour une liaison C (sp²)-N.

Le ligand **L2** aboutissant à la formation des nanoparticules **NP11** est constitué de 9 liaisons covalentes Csp³ - Csp³, de 8 liaisons covalentes Csp³-O, d'1 liaison Csp³-N et de 2 liaisons N-N. Si la configuration de ce ligand est « tout trans », sa longueur approximative théorique serait de 29,37 Å soit 2,94 nm. Cette valeur est multipliée par deux puisque le ligand peut se fixer de part et d'autre de la nanoparticule ce qui aboutit à une longueur totale de ligand d'environ 5,87 nm. C'est cette valeur qui est ajoutée au 14 nm des nanoparticules nues **NP3B-1**, d'où un diamètre théorique de 19,87 nm. Le même raisonnement est appliqué aux nanoparticules **NP14** et **NP17** (tableau 21).

Les diamètres théoriques sont supérieurs aux valeurs expérimentales ce qui signifie que le ligand n'adopte pas une conformation tout trans à la surface de la nanoparticule. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la présence des unités éthylène glycol qui induisent une flexibilité du bras espaceur. Cette flexibilité et donc le repliement potentiel du ligand sont accrus par la présence des structures triazole. Cependant, l'analyse par microscopie électronique à transmission ne permet de visualiser que la nanoparticule métallique et non le ligand qui s'organise en monocouche à sa surface. L'observation d'une augmentation du diamètre de quelques nanomètres par rapport aux nanoparticules nues **NP3B-1** peut s'expliquer par la forte densité de ligand présente à la surface de la nanoparticule. A cause de la libre rotation des ligands, cette densité d'occupation diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la surface de la nanoparticule⁽¹⁶¹⁾.

La mesure du potentiel de surface apporte également des éléments en faveur d'un processus de modification de la surface des nanoparticules consécutif à la réaction d'insertion du ligand. En effet, quelles que soient les nanoparticules d'or considérées, une modification du potentiel zêta est observée. Celui-ci oscille entre - 2 mV et + 2 mV selon les échantillons alors que la valeur moyenne du potentiel zêta des nanoparticules nues **NP3B-1** était de -30 mV (tableau 22).

	Potentiel ζ (mV)
NP3B-1	- 30
NP9-3	- 35
NP11	+ 42,7
NP12	- 1,7
NP13	+ 0,6
NP14	+ 1,4
NP15	- 0,7
NP16	- 1,4
NP17	+ 2,6

Tableau 22 : Tableau récapitulatif des potentiels zêta mesurés à partir des solutions de nanoparticules NP3B-1, NP9-3 et NP11 à NP17.

Cette valeur quasi nulle du potentiel zêta traduit le succès de l'échange entre le tétraéthylène glycol PEG₄ qui a servi à la synthèse des nanoparticules **NP3B-1** avec les ligands **L3** à **L8** terminés par un groupement azoture porteur d'une charge globale neutre (figure 74). En revanche, nous ne parvenons pas à expliquer la valeur de + 42,7 mV obtenue lors de la mesure du potentiel zêta des nanoparticules **NP11**.

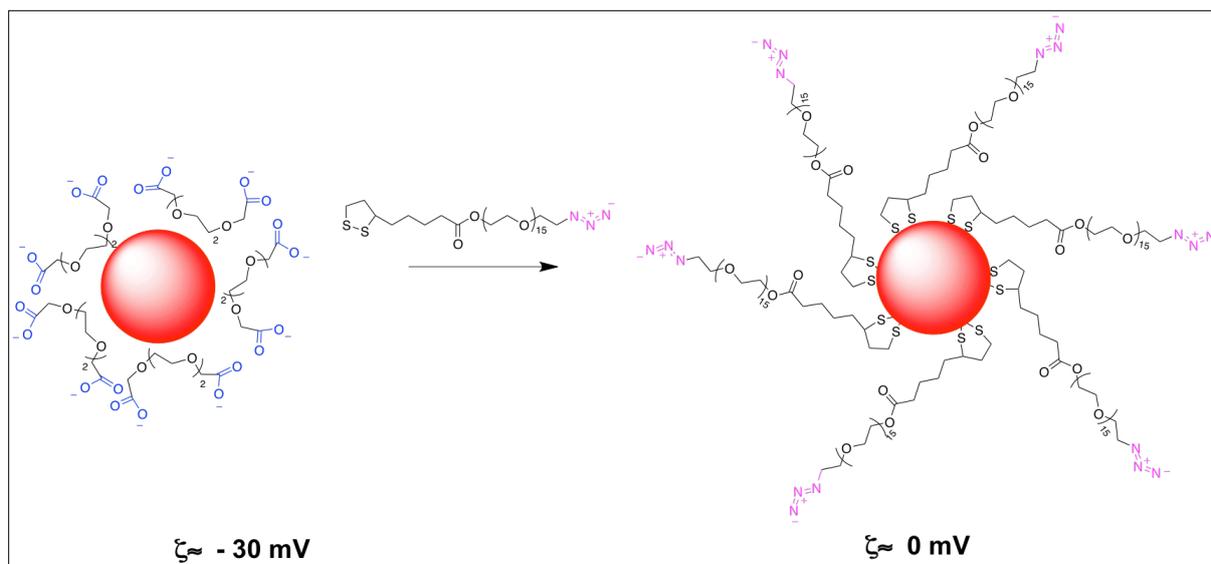


Figure 74 : Représentation schématique du processus d'échange entre le surfactant et le ligand aboutissant à un potentiel nul à la surface de la nanoparticule d'or.

Afin de compléter la caractérisation des nanoparticules fonctionnalisées, des expériences de spectrométrie de masse MALDI TOF ainsi que des analyses infrarouge et XPS sont en cours de réalisation.

IV-3 DIVERSIFICATION DE LA FONCTIONNALISATION DU LIGAND

L'objectif de ce projet de thèse est de réaliser l'attachement d'une biomolécule de reconnaissance à la surface d'une nanoparticule d'or. L'insertion d'un bras espaceur pegylé entre la biomolécule et la nanoparticule d'or permet d'améliorer la biodisponibilité du système, de réduire sa clairance et donc d'augmenter son temps de demi-vie au sein d'organismes vivants.

La fonctionnalisation des ligands pegylés par une fonction terminale azoture va permettre le couplage avec la biomolécule d'intérêt via une réaction de chimie click. Cette réaction correspond à la conversion de la fonction azoture en groupement triazole.

Cette stratégie est particulièrement intéressante car la réussite de cette ligation peut être objectivée par analyse XPS. En effet, la fonction azoture est composée de trois atomes d'azote présentant des densités électroniques distinctes. Cette différence va se traduire par des énergies de liaison différentes et donc des signaux multiples⁽¹⁶⁵⁾.

Ainsi, l'atome d'azote central qui porte la charge positive présente un environnement électronique faible ce qui engendre l'apparition d'un signal à 404 eV associé à une énergie de liaison plus élevée. En revanche, les deux atomes d'azote latéraux sont riches en électrons. Il en résulte l'apparition de deux signaux à 400,9 et 400,3 eV (figure 75).

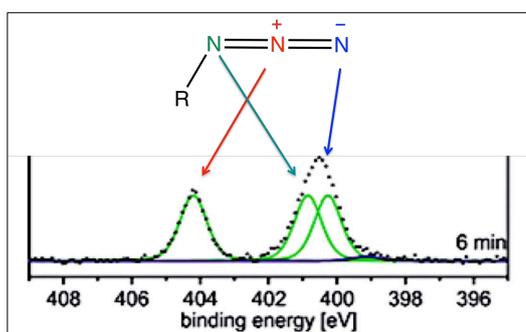


Figure 75 : Représentation du spectre XPS d'une fonction azoture : le signal à 404 eV correspond à l'atome d'azote protoné et déficitaire en électron de la fonction azoture⁽¹⁶⁵⁾.

Lors de la formation du triazole, l'appauvrissement électronique de l'azote central disparaît de même que le pic qui lui était associé.

Cependant, l'une des principales limitations à la réaction de fonctionnalisation des nanoparticules d'or développée au laboratoire est la faible hydrosolubilité des ligands synthétisés. Bien que l'élongation de la chaîne PEG augmente le caractère hydrophile du ligand, seuls les linkers comportant 16 unités éthylène glycol sont réellement solubles dans l'eau. Afin de résoudre ce problème, nous avons essayé de diversifier la fonctionnalisation terminale du bras espaceur.

La première stratégie alternative envisagée a été de fonctionnaliser le ligand avec une fonction amine ou acide et donc facilement ionisable. L'attrait supplémentaire de ces fonctions terminales est qu'elles pouvaient être associées à un composé biologique via une simple réaction de couplage peptidique.

Tout d'abord, nous nous sommes assuré que les conditions expérimentales du couplage peptidique ne perturbaient pas la stabilité des nanoparticules d'or. Nous avons donc réalisé le couplage peptidique entre la lysine et les nanoparticules d'or **NP9-3** fonctionnalisées avec le ligand **L1**. Cette réaction est effectuée en milieu aqueux et en présence de N-hydroxysuccinimide (NHS) et de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC).

La première étape de cette réaction de couplage correspond à la protonation du carbodiimide et à la formation du carbocation (en rouge sur le schéma). Ce carbocation subit alors l'attaque nucléophile du carboxylate ce qui entraîne la formation d'un dérivé O-acyluréé (en bleu). Le NHS est utilisé comme agent de trans-acylation. Il y a attaque nucléophile du succinimide et formation d'un ester beaucoup plus stable vis à vis de l'hydrolyse. C'est cet ester de succinimide (en vert) qui va subir l'attaque nucléophile de la fonction amine de la lysine (schéma 60).

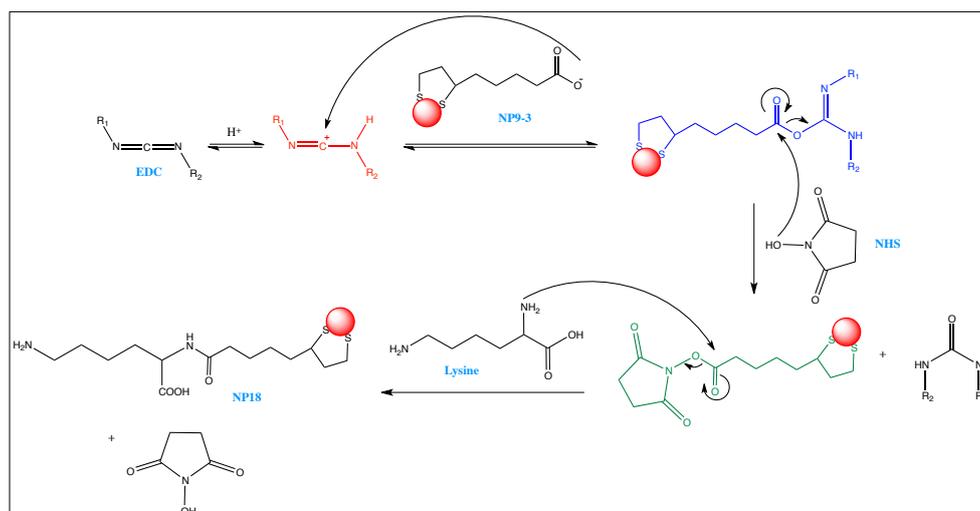


Schéma 60 : Mécanisme réactionnel de la réaction de couplage peptidique en présence de NHS et d'EDC.

L'analyse spectrale UV-Visible des ces nanoparticules a été réalisée, de même que la mesure du potentiel zêta et l'étude XPS. Ces caractérisations ont permis de mettre en évidence que le couplage peptidique assisté par NHS/EDC est efficace et n'est pas délétère pour les nanoparticules d'or.

Des essais de fonctionnalisation du ligand pegylé avec un groupement terminal acide carboxylique ont été mis en œuvre au laboratoire mais n'ont pas donné de résultat. Deux stratégies d'oxydation ont été employées (schéma 61) :

- Une oxydation par le réactif de Jones⁽¹⁶⁶⁾ (voie A sur le schéma 61)
- Une oxydation de Dess-Martin⁽¹⁶⁷⁾ suivie d'une oxydation de Pinnick⁽¹⁶⁸⁾ (voie B).

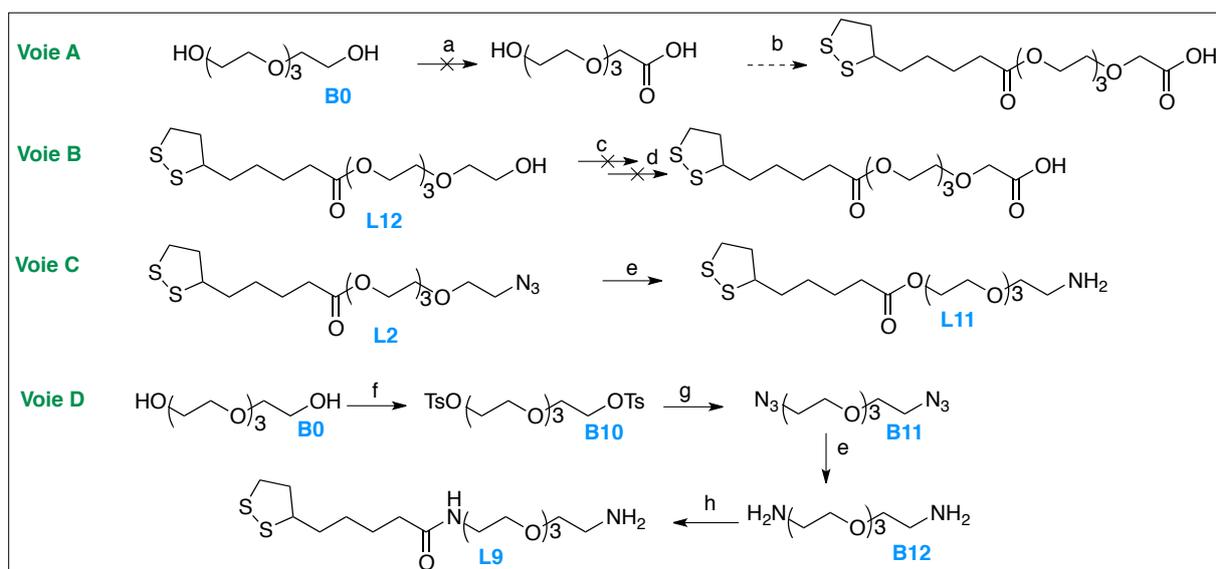


Schéma 61 : Stratégie de synthèse mise en œuvre pour l'élaboration d'un ligand pegylé porteur d'une fonctionnalité acide ou amine terminale : a) CrO_3 , H_2SO_4 , acétone ; b) DCC, DMAP, 0°C to RT, DCM ; c) Dess Martin ; d) Pinnick ; e) PPh_3 , THF ; f) TsCl , Et_3N , 0°C to RT, DCM ; g) NaN_3 , acétone, reflux ; h) DCC, DMAP, 0°C to RT, DCM.

En ce qui concerne la fonctionnalisation amine terminale, la première voie de synthèse envisagée mettait en œuvre une réduction de la fonctionnalité azoture du ligand **L2** en groupement amine par la triphénylphosphine (voie C)⁽¹⁴¹⁾. Malheureusement, bien que la réaction semble effective, nous ne parvenons pas à séparer le produit d'intérêt **L11** de l'oxyde de triphénylphosphine généré au cours de la réaction. C'est pourquoi nous avons testé une voie de synthèse alternative avec, dans un premier temps, la réduction du composé **B11** par la triphénylphosphine⁽¹⁶⁹⁾ suivie d'une réaction de couplage de type peptidique (voie D).

IV-4 CONCLUSION

L'insertion d'un bras espaceur pegylé entre la nanoparticule d'or et l'aptamère permet non seulement d'augmenter la stabilité in-vitro du colloïde vis à vis de la coalescence mais également d'améliorer sa biodisponibilité et sa biocompatibilité in-vivo, notamment en diminuant sa clairance.

Afin de réaliser cette construction, il est nécessaire de fonctionnaliser les deux extrémités du bras espaceur afin que celui-ci puisse s'attacher à la surface de la nanoparticule d'or d'une part se coupler à un aptamère d'autre part.

Le couplage avec l'aptamère de reconnaissance va être réalisé par une réaction de chimie click, c'est pourquoi l'extrémité ω du bras espaceur va être fonctionnalisée avec un groupement azoture.

L'insertion du linker à la surface de la nanoparticule devrait nécessiter la présence d'une fonction thiol en position α . Cependant, afin d'éviter tout risque d'oxydation, une molécule d'acide lipique va être utilisée comme système d'ancrage. Le

linker va être couplé à l'acide lipoiqye par formation d'une liaison ester en présence de DCC/DMAP. La stratégie initiale était de réaliser cette réaction d'estérification in-situ, c'est à dire sur des nanoparticules préalablement fonctionnalisées avec de l'acide lipoiqye disposé en monocouche auto-assemblée mais les résultats furent décevants.

Des bras espaceurs constitués d'unités tétraéthylène glycol reliées les unes aux autres par des ponts éthers ou par des ponts triazoles ont été synthétisés puis couplés à l'acide lipoiqye.

Des solutions de nanoparticules fonctionnalisées et stables ont été obtenues pour chaque ligand envisagé. La réussite de la modification de la surface de la nanoparticule d'or a été évaluée par la modification de la coloration du milieu réactionnel et confirmée par spectrométrie UV-Visible. Ces analyses spectrales ont montré l'existence d'un déplacement de λ_{\max} vers de plus hautes valeurs de longueur d'onde. Ce déplacement traduisait une modification de la résonance plasmonique de surface induite par une modification de la surface des nanoparticules consécutive à l'attachement du ligand.

Les analyses MET ont montré que ces expériences de fonctionnalisation des nanoparticules ne modifiaient pas leur forme et respectaient leur intégrité. Pour chaque ligand, les produits modifiés se sont présentés sous la forme d'une population isotropique en taille et en forme de nanoparticules sphériques.

Le facteur limitant de ce processus de fonctionnalisation des nanoparticules d'or par des ligands organiques réside dans la faible hydrosolubilité de ces composés. La chaîne PEG n'est pas suffisante pour contrebalancer le caractère hydrophobe du résidu lipoiqye et de la fonctionnalisation azoture terminale. C'est pourquoi de nouvelles synthèses de ligands sont en cours pour modifier l'extrémité ω du bras espaceur par une fonction acide carboxylique ou amine.

V-1 DÉTECTION DE LA THROMBINE : PRÉSENTATION DU SYSTÈME

Les expériences SELEX effectuées en présence de thrombine ont permis d'isoler différents aptamères capables de fixer la thrombine avec une très haute affinité et une excellente spécificité. Les séquences nucléotidiques de ces aptamères fixant la thrombine (ou TBA pour Thrombin Binding Aptamer en anglais) sont parfaitement connues. De même, la modification conformationnelle et la formation de la structure G-Quadruplex de ces TBA induite par la présence de thrombine ont été très largement étudiées. De ce fait, ce sont probablement les aptamères les plus couramment utilisés dans la recherche et le développement de systèmes de détection innovants.

De plus, ces aptamères anti-thrombine sont des produits commerciaux que l'on peut se procurer soit sous forme native, soit porteurs de modification telles que l'insertion d'un fluorophore ou la fonctionnalisation par un groupement acide, amine, alcyne, ou encore azoture.

Cet aptamère TBA servira de preuve de concept pour évaluer et valider la pertinence de notre stratégie de détection d'un bio-composé. Celle-ci repose sur la forte affinité de l'aptamère pour sa cible ainsi que sur sa flexibilité conformationnelle. Cette stratégie a également pour ambition de mettre à profit les propriétés optiques et électroniques des nanoparticules d'or et notamment leur capacité à induire un quenching de fluorescence.

L'aptamère fixant la thrombine (TBA) va être immobilisé à la surface des nanoparticules d'or. Notre choix s'est porté sur l'oligomère le plus court constitué de 15 nucléotides et dont la séquence est la suivante : 5'-GGT-TGG-TGT-GGT-TGG-3'.

Deux stratégies ont été envisagées et deux aptamères, notés respectivement **TBA-1** et **TBA-2**, ont donc été utilisés (figure 76) :

- Un attachement direct de l'aptamère à la surface de la nanoparticule d'or via la formation d'une liaison Au-S. L'extrémité 3' de l'aptamère **TBA-1** doit être modifiée pour introduire une fonction thiol.
- Une réaction de chimie click entre l'aptamère et la fonction azoture terminale des ligands pegylés présents à la surface de la nanoparticule (AuNPs fonctionnalisées **NP11** à **NP17**). L'extrémité 3' de l'aptamère **TBA-2** doit être fonctionnalisée par un groupement alcyne terminal.

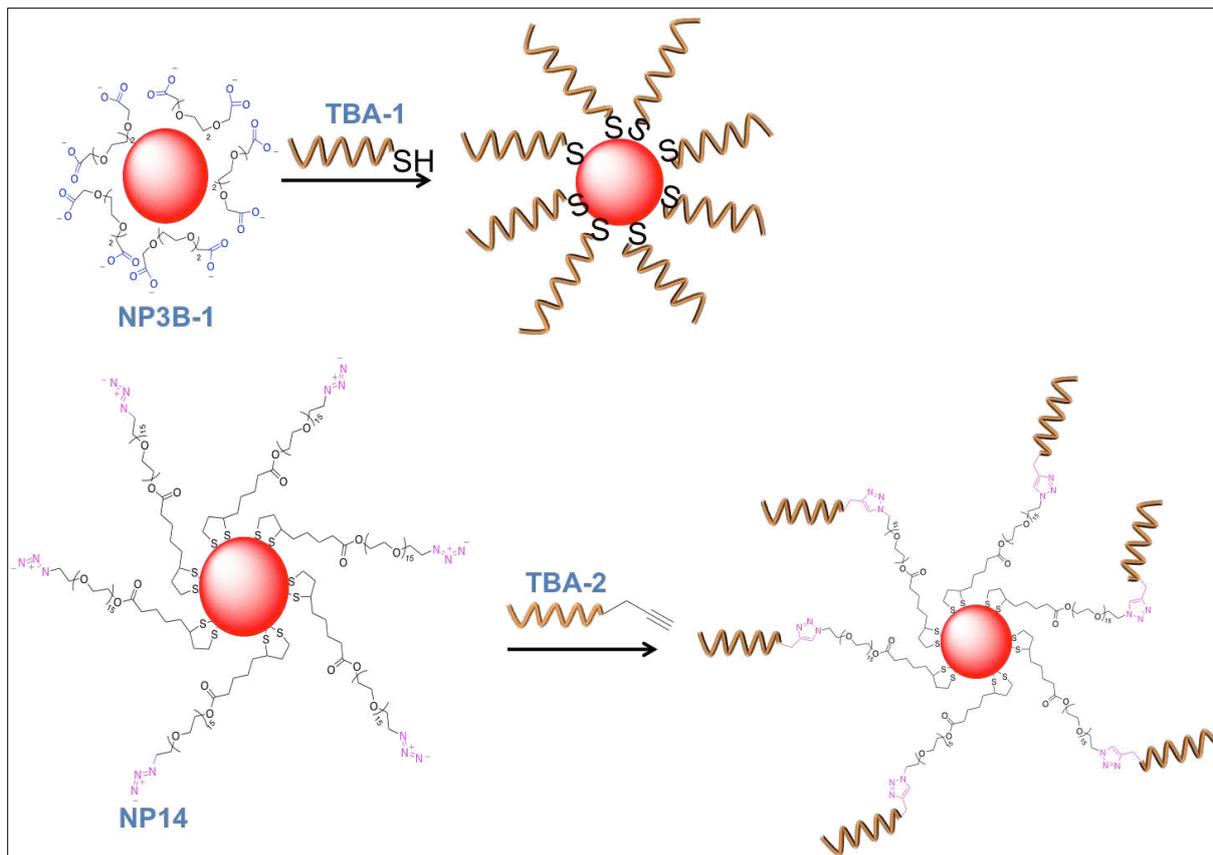


Figure 76 : Construction du système de détection de la thrombine par immobilisation d'aptamères anti-thrombine à la surface d'une nanoparticules d'or.

Cet aptamère ainsi modifié a été associé à son brin complémentaire, noté **TBAc**, dont la séquence est la suivante : 5'- CCA-ACC-ACA-CCA-ACC-3'. Ce brin complémentaire est modifié au niveau de son extrémité 5' par couplage covalent avec une molécule de fluorescéine, une sonde fluorescente très fréquemment utilisée pour le marquage des biocomposés⁽¹⁷⁰⁾⁽¹⁷¹⁾.

Une étape supplémentaire d'hybridation a permis d'associer ces deux séquences nucléotidiques en un duplex par appariement complémentaire des bases selon les règles de Watson et Crick⁽²¹⁾. Ce duplex est une structure stable qui s'organise en une double hélice, la structure classique de l'ADN.

Dans le cadre de cette stratégie de détection, les nanoparticules d'or servent à la fois de support aux aptamères de reconnaissance TBA, de système reporteur de l'interaction entre l'aptamère et la thrombine et d'amplificateur du signal ainsi généré⁽¹⁰⁹⁾ (schéma 62).

En effet, l'immobilisation du duplex via l'attachement de **TBA-1** à la surface de la nanoparticule entraîne une proximité entre la fluorescéine et les électrons de conduction, générant ainsi un phénomène de quenching de fluorescence⁽¹⁷²⁾⁽¹⁷³⁾⁽¹⁷⁴⁾⁽¹⁷⁵⁾.

L'aptamère de reconnaissance exhibe vis à vis de la thrombine une affinité supérieure à celle présentée pour son brin complémentaire⁽¹⁷⁶⁾⁽⁴⁰⁾. L'addition de thrombine entraîne la dissociation du duplex **TBA/TBAc**. L'interaction entre le TBA et

sa cible se traduit par une profonde modification conformationnelle de l'aptamère qui adopte une structure tridimensionnelle en G-Quadruplex⁽³⁸⁾. Le complexe TBA/Thrombine reste immobilisé à la surface de la nanoparticule. En revanche, le brin complémentaire est libéré, la distance entre la fluorescéine et les électrons de surface de la nanoparticule s'accroît. Cet éloignement permet de restaurer les capacités de fluorescence de la sonde et un rayonnement d'émission peut être mesuré après excitation⁽¹⁷⁷⁾.

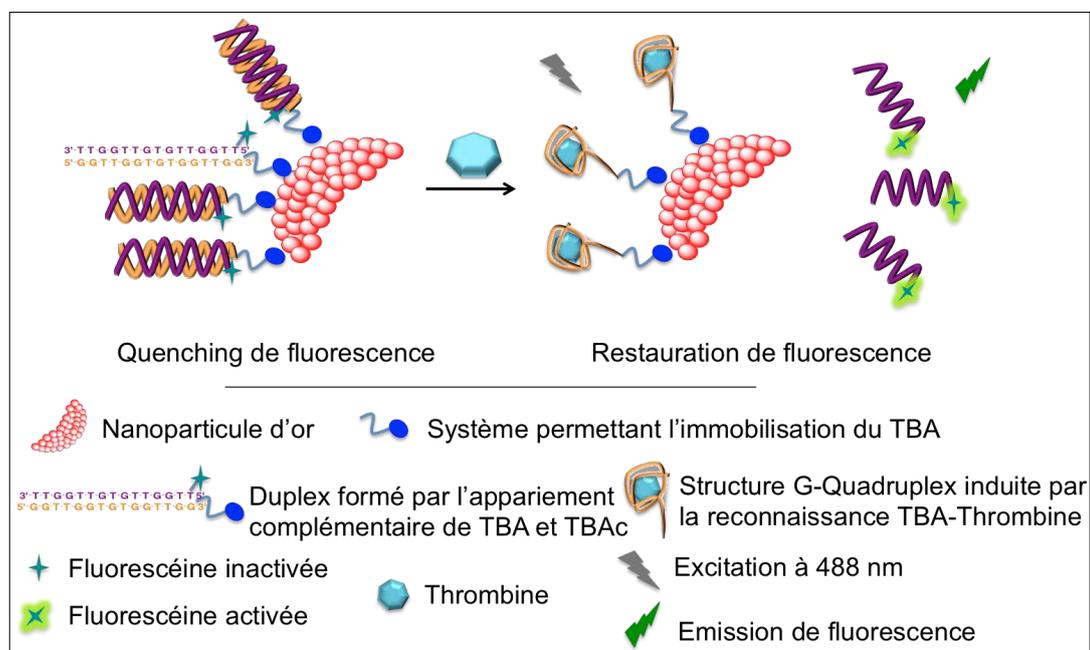


Schéma 62 : Représentation du fonctionnement du système de détection de la thrombine mettant à profit les capacités de reconnaissance moléculaire des aptamères ainsi que les propriétés optiques et électroniques des nanoparticules d'or.

La structure sphérique des nanoparticules d'or permet d'augmenter le ratio surface/volume et donc la surface de contact accessible au motif de reconnaissance. Plusieurs aptamères peuvent donc être ancrés à la surface d'une même nanoparticule. Cette densité localisée de ligands favorise les interactions avec la cible et permet une amplification du signal consécutif à la formation du complexe TBA/Thrombine⁽¹⁷⁸⁾.

Dans le cas de l'utilisation du duplex [TBA-1/TBAC](#), l'attachement direct de l'aptamère [TBA-1](#) à la surface de la nanoparticule d'or via son extrémité 3' fonctionnalisée par un thiol réduit au minimum la distance entre le fluorophore couplé à l'extrémité 5' du brin complémentaire et les électrons de conduction ce qui assure le phénomène d'extinction de fluorescence.

En revanche, le couplage du duplex [TBA-2/TBAC](#) avec des ligands pegylés de longueur croissante aboutit à un espacement entre les électrons de surface de la nanoparticule d'or et la fluorescéine. Il a donc été nécessaire de s'assurer que la longueur de la chaîne pegylée n'empêchait pas le processus de neutralisation de fluorescence.

V-2 ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA LONGUEUR DU BRAS ESPACEUR SUR LE QUENCHING DE FLUORESCENCE

V-2-1 MISE AU POINT DES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Avant de réaliser le couplage par chimie click entre l'aptamère **TBA-2** et les nanoparticules d'or fonctionnalisées par une monocouche de ligands porteurs d'un groupement azoture (**NP11 à NP17**), deux prérequis ont dû être pris en considération :

- les conditions expérimentales optimales permettant la mise en application de la chimie click sans dénaturation des nanoparticules d'or
- l'influence de la longueur du bras espaceur sur le quenching de fluorescence

Afin de répondre à la première interrogation, des réactions de chimie click entre les nanoparticules fonctionnalisées **NP11** et la propargylglycine ont été mises en œuvre à partir de sulfate de cuivre (CuSO_4) et d'acide ascorbique⁽¹⁷⁹⁾⁽¹⁸⁰⁾⁽¹⁸¹⁾⁽¹⁸²⁾ (schéma 63). L'introduction de ces réactifs au sein de la suspension colloïdale de nanoparticules **NP11** a abouti à une dénaturation des nanoparticules caractérisée par une décoloration de la solution associée à un processus de sédimentation de particules noires visibles à l'œil nu.

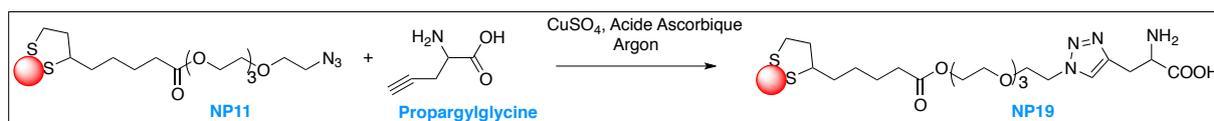


Schéma 63 : Réaction de couplage par chimie click en présence de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des ligands porteurs d'un groupement terminal azoture.

Nous avons supposé que cette dégradation des AuNPs résultait de l'utilisation d'acide ascorbique qui pouvait entraîner une déstabilisation des nanoparticules par modification de la force ionique du milieu réactionnel. Des sources directes de cuivre à l'état d'oxydation I, comme CuI ⁽¹⁸³⁾ ou CuBr ⁽¹⁸⁴⁾⁽¹⁸⁵⁾, et ne nécessitant pas d'étape de réduction préalable ont alors été utilisées. Malheureusement, les résultats furent similaires à ceux observés avec le sulfate de cuivre.

Il a alors été envisagé que ces échecs puissent provenir d'une réoxydation du cuivre Cu(I)^+ en Cu(II)^{2+} par les sels d'or aurique Au^{3+} qui n'auraient pas été consommés lors de la synthèse des nanoparticules. Bien que l'hypothèse d'une présence résiduelle d'ions Au^{3+} soit peu probable compte tenu des lavages effectués par centrifugation, elle ne peut pas être éliminée. Une pré-incubation du cuivre en présence d'un agent complexant comme le N,N,N',N'',N''-Pentamethyldiethylenetriamine (PMDTA) permettait d'éviter ce phénomène d'oxydation⁽¹⁸⁶⁾. Néanmoins, les tentatives effectuées avec ces nouvelles conditions ont également été infructueuses. L'ensemble des conditions expérimentales mises en œuvre lors de ces essais de couplage par chimie click est présenté dans le tableau 23 ci-après.

	CuSO ₄ /acide ascorbique	CuI	CuBr	CuSO ₄ /acide ascorbique/PMDTA	CuI/PMDTA	CuBr/PMDTA
Eq	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4
Solvant	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF
T°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C
NP11	1 Eq	1 Eq	1 Eq	1 Eq	1 Eq	1 Eq

Tableau 23 : Conditions opératoires de la réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire entre la propargylglycine et les nanoparticules NP11.

Compte tenu de l'insuccès de ces réactions de cycloaddition Cu-catalysées, une nouvelle stratégie de chimie click a été mise en œuvre à l'aide de cyclooctynes⁽¹⁸⁷⁾. La tension de cycle induite par la triple liaison confère une très grande réactivité à ces composés ce qui permet de s'affranchir du catalyseur cuivreux.

La cyclooctyne **F1** (en vert sur le schéma 64) que nous avons choisi pour réaliser cette réaction de couplage est fonctionnalisée avec un groupement terminal amino introduit via un bras espaceur diéthylène. Cette fonction terminale aminée pourra être couplée avec un acide carboxylique par formation d'une liaison ester. Cette possibilité de ligation va être mise à profit pour permettre le couplage des nanoparticules avec l'aptamère **TBA-2** ainsi qu'avec la rhodamine (schéma 64). L'extrémité 3' de l'aptamère **TBA-2** devra donc être fonctionnalisée par un acide carboxylique.

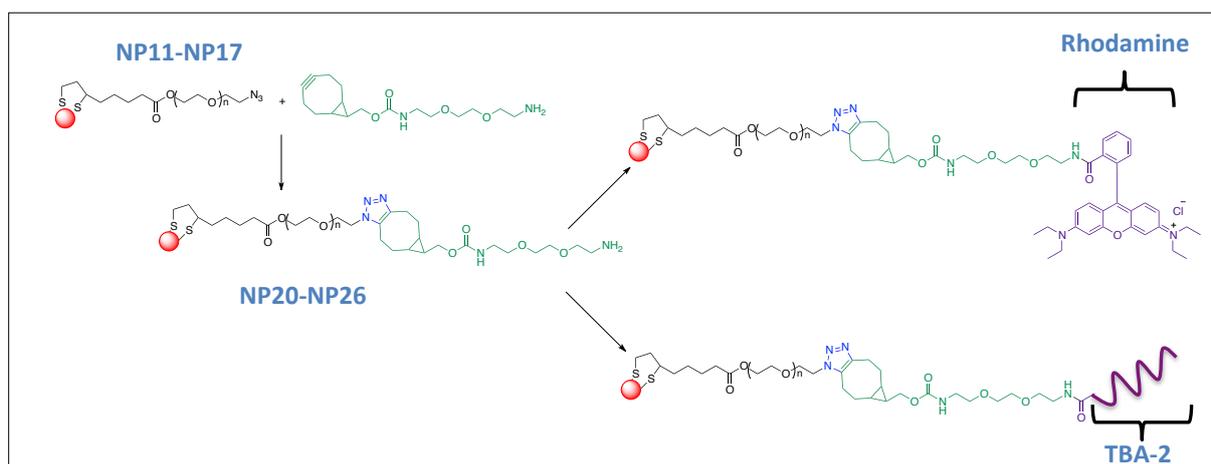


Schéma 64 : Stratégie alternative de couplage par chimie click utilisant la forte réactivité des cyclooctynes.

Les nanoparticules **NP11 à NP17** respectivement fonctionnalisées avec les ligands **L2 à L8** ont été mises en présence de cyclooctyne pendant 24 heures à température ambiante afin de réaliser la réaction de chimie click.

Sur l'ensemble des AuNPs testées, seuls les nanoparticules **NP20** et **NP23** ont conservé leur stabilité en milieu aqueux. Une décoloration du milieu réactionnel accompagnée d'un dépôt de grosses particules noires a été observée au bout de quelques jours de stockage avec les autres suspensions colloïdales.

L'analyse spectrale UV-Visible montre un déplacement de la valeur de λ_{\max} de 6 nm (**NP20**) et de 11 nm (**NP23**) par rapport aux nanoparticules **NP3B-1** et de 1 nm (**NP20**) et de 6 nm (**NP23**) par rapport aux nanoparticules **NP11** et **NP14** respectivement (figure 77).

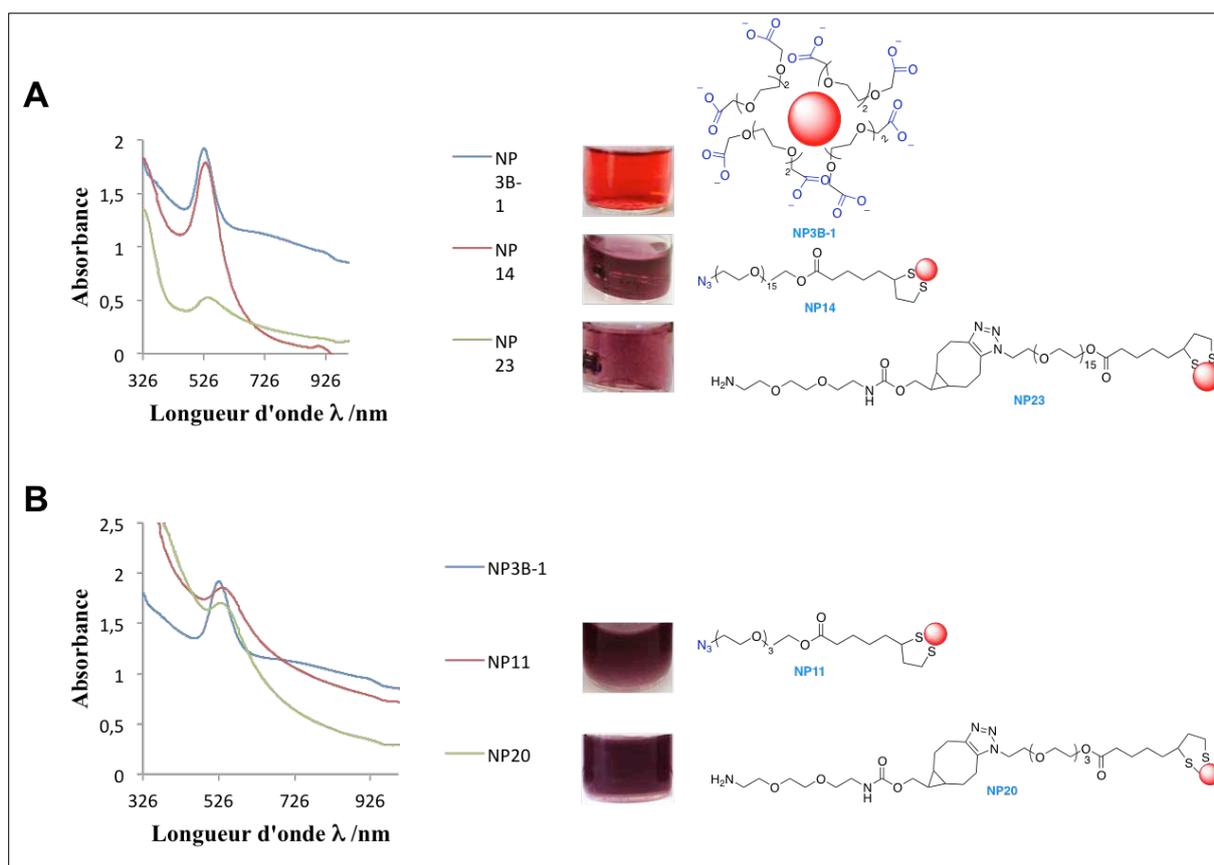


Figure 77 : Caractérisation UV-Visible des nanoparticules d'or obtenues après chimie click en présence de cyclooctynes : A) NP23 ; B) NP20.

Concernant les nanoparticules **NP20** et **NP23**, l'analyse spectrale semble en faveur d'une fonctionnalisation effective des nanoparticules avec une molécule de cyclooctyne via une réaction de chimie click.

Des analyses XPS sont en cours afin d'étayer cette hypothèse. La formation d'une structure triazole pourra être objectivée par la disparition du pic d'énergie à 405 eV correspondant à l'atome d'azote central déficitaire en électron du groupement azoture.

Cependant, la modification chimique des ligands préalablement fixés à la surface des nanoparticules d'or a entraîné une instabilité de la plupart des échantillons testés qui a abouti à une agrégation et à une sédimentation des AuNPs.

V-2-2 ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE LA LONGUEUR DU LIGAND

Afin d'étudier l'influence de la longueur de la chaîne PEG sur les capacités de quenching de fluorescence des nanoparticules, celles-ci ont été fonctionnalisées avec de la rhodamine B⁽¹⁸⁸⁾⁽¹⁸⁹⁾. Le couplage de la rhodamine sur les nanoparticules **NP20** et **NP23** est effectué par une réaction d'amidation en présence de NHS et de DCC (schéma 65).

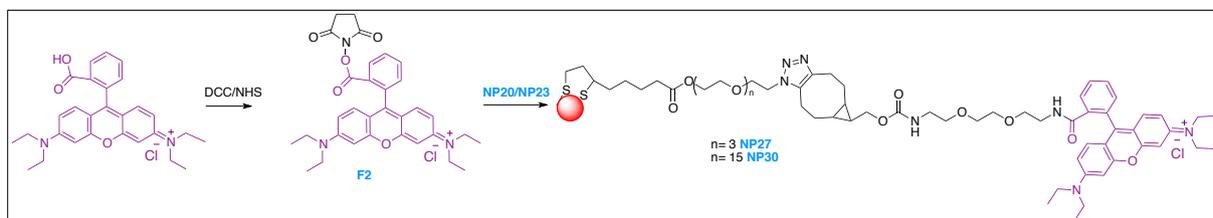


Schéma 65 : Stratégie de couplage de la rhodamine sur les nanoparticules d'or fonctionnalisées avec la cyclooctyne par réaction d'amidation entre le groupement carboxylique de la rhodamine et la fonction amine de la cyclooctyne.

La première étape consistait à former le dérivé succinimidyl ester de la rhodamine **F2** puis à le faire réagir sur les solutions de nanoparticules d'or **NP20** et **NP23**. Seul 0,5 équivalent du dérivé rhodamine **F2** a été additionné sur les nanoparticules d'or afin de s'assurer que l'intégralité de la rhodamine était couplée aux nanoparticules et qu'il ne restait pas de rhodamine non liée pouvant induire une émission de fluorescence.

L'analyse de l'émission de fluorescence des nanoparticules issues de cette réaction de couplage a alors été réalisée et comparée à une solution de succinimidyl ester de la rhodamine à la même concentration que celle utilisée pour la réaction de couplage (figure 78). Le spectre de fluorescence a été enregistré après excitation de l'échantillon à 553 nm par balayage des longueurs d'onde de 500 à 800 nm.

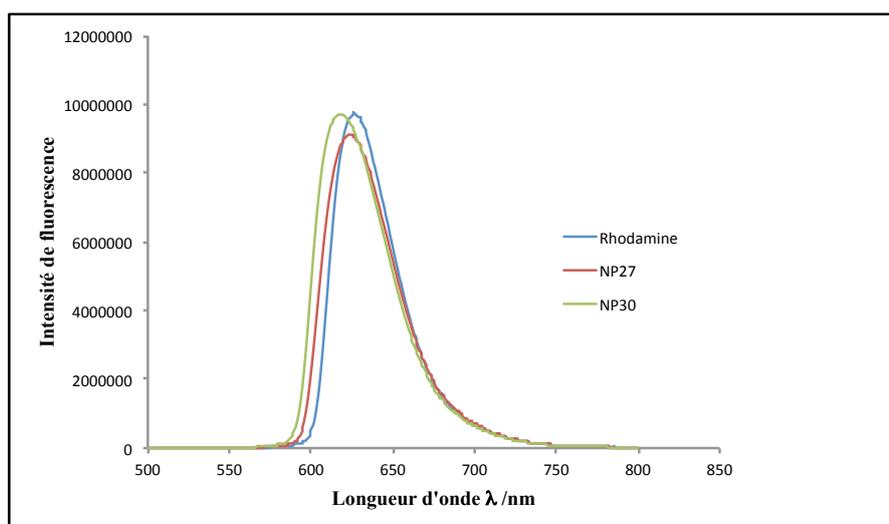


Figure 78 : Spectres d'émission de fluorescence des nanoparticules NP27 et NP30 après réaction d'amidation avec un dérivé de la rhodamine.

L'analyse de ces spectres suggère qu'il n'y a pas de quenching de fluorescence quelle que soit la longueur du bras espaceur considéré. Néanmoins, on remarque que les intensités de fluorescence enregistrées avec les nanoparticules fonctionnalisées sont presque identiques bien qu'une différence de 12 unités éthylène glycol existe entre ces deux linkers. Cette constatation nous amène à douter de la réussite de la réaction de chimie click et/ou de la réaction de couplage.

Afin de déterminer avec certitude si la longueur du bras espaceur n'excède pas la capacité de quenching de fluorescence des nanoparticules, des ligands couplés à la rhodamine ont été synthétisés puis attachés à la surface des nanoparticules d'or **NP3B-1**.

Tout d'abord la rhodamine a été fonctionnalisée par une fonction alcyne terminale via une réaction d'estérification avec l'alcool propargylique en présence de NHS/EDC⁽¹⁹⁰⁾ (composé **F3**) puis couplée au ligand pegylé porteur d'un groupement azoture par une réaction de chimie click. Les ligands ainsi obtenus ont ensuite été fixés à la surface des nanoparticules en employant les conditions opératoires définies dans les sections IV-2-1 et IV-2-2 (schéma 66).

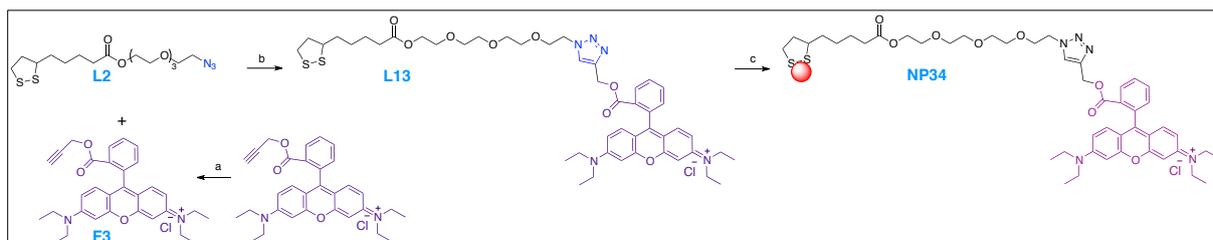


Schéma 66 : Stratégie de fonctionnalisation des nanoparticules d'or avec des ligands pegylés couplés à la rhodamine via une réaction de chimie click : a) EDC, NHS, DCM, de 0°C à température ambiante, 48 heures ; b) CuSO₄, acide ascorbique, tBuOH/H₂O, température ambiante, 48 heures ; c) NP3B-1, température ambiante, 3 heures.

Les nanoparticules **NP34 à NP40** (figure 79) ainsi obtenues ont alors été analysées par spectrofluorimétrie. Pour chaque échantillon, l'intensité de fluorescence a été comparée à la solution de ligands non liés correspondant (**L13 à L19**). Ces solutions de ligands non liés servent de référence pour évaluer la propriété de quenching de fluorescence et sont utilisées à la même concentration que celle employée pour réaliser la fonctionnalisation des AuNPs (figure 80).

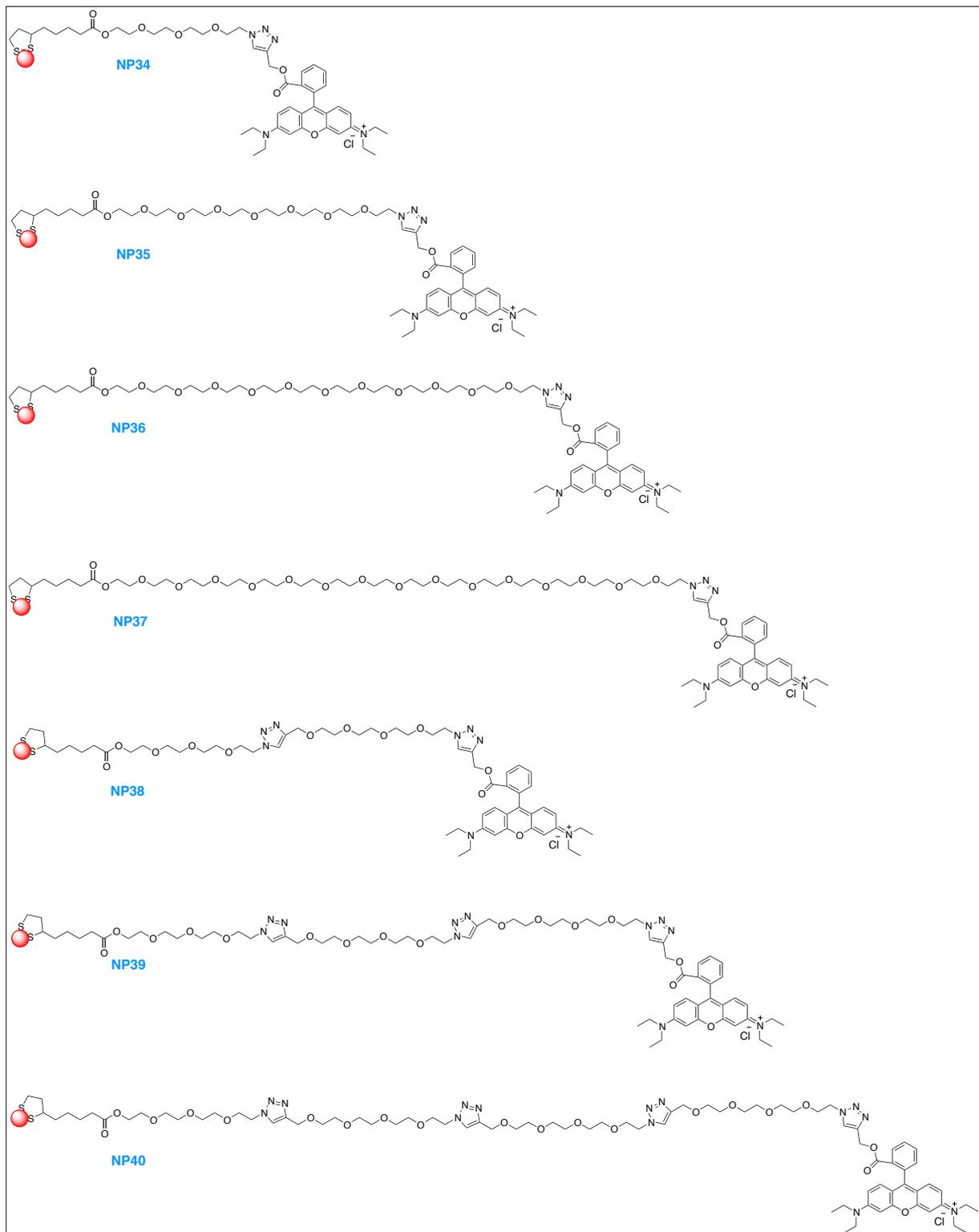


Figure 79 : Structure des nanoparticules d'or fonctionnalisées par des ligands pegylés couplés à la rhodamine via une réaction de cycloaddition 1,3 dipolaire.

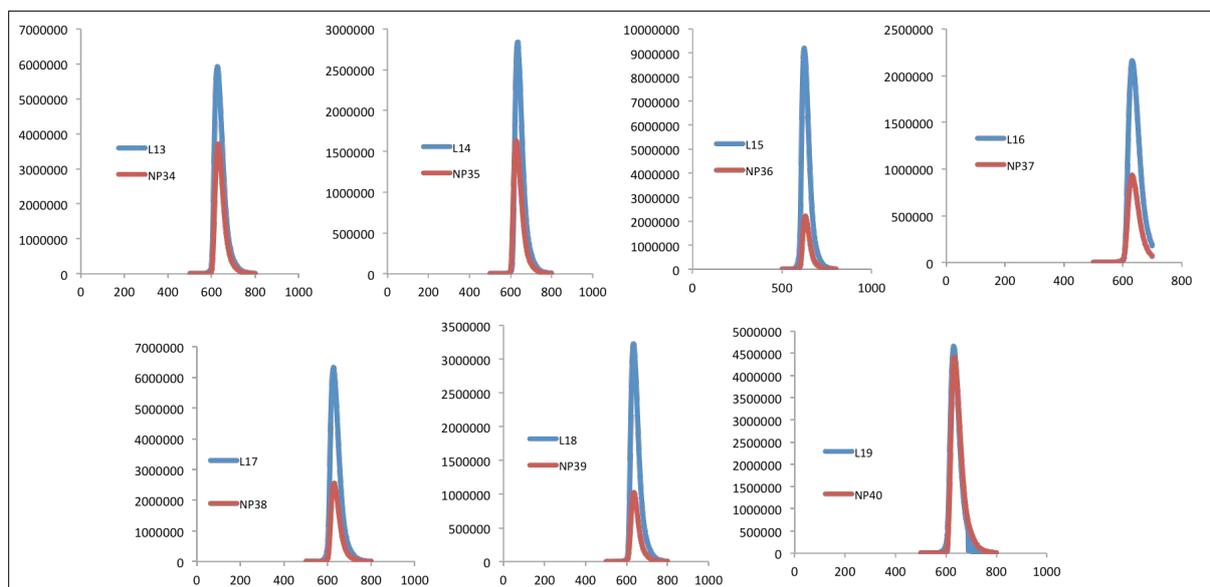


Figure 80 : Spectre d'émission de fluorescence des nanoparticules d'or NP34 à NP40 fonctionnalisées avec des ligands PEG de longueur variable et couplés à une molécule de rhodamine.

L'analyse de ces spectres de fluorescence montre qu'il existe un quenching de fluorescence partiel et que celui-ci est maintenu quelque soit la longueur du ligand composant la monocouche présente à la surface de la nanoparticule d'or.

En effet, l'intensité de fluorescence est diminuée de 30, 44, 58 et 75% pour les nanoparticules [NP34](#), [NP35](#), [NP36](#) et [NP37](#) et de 60 et 68% pour les nanoparticules [NP38](#) et [NP39](#) respectivement. On remarque également qu'avec les nanoparticules [NP40](#), le quenching de fluorescence n'est plus effectif.

En revanche, cette propriété de quenching ne semble pas corrélée à la longueur du bras espaceur. Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, l'importance du quenching de fluorescence augmente avec la longueur du bras espaceur. De même, il a été constaté que pour un même nombre d'unité tétraéthylène glycol, la capacité de neutralisation de la fluorescence est supérieure lorsque ces unités sont reliées entre elles par des ponts triazoles ([NP38](#) et [NP39](#) versus [NP35](#) et [NP36](#)).

Cette élévation de l'extinction de fluorescence avec la longueur du bras espaceur semble plutôt traduire une meilleure solubilisation des ligands en phase aqueuse et donc une insertion en surface plus homogène et des nanoparticules plus stables. Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse selon laquelle la fonctionnalisation des nanoparticules avec des ligands pegylés permet d'améliorer la stabilité et le caractère hydrosoluble de ces dernières.

V-2-3 APPLICATION À L'APTAMÈRE FIXANT LA THROMBINE

Afin d'appliquer notre système fluorimétrique à la détection de la thrombine, nous nous sommes procurés deux duplex oligonucléotidiques auprès de la société Eurogentec. Chaque duplex est composé d'un aptamère fixant la thrombine (TBA) et de son brin complémentaire lié par une liaison covalente à la fluorescéine.

Les séquences des deux aptamères sont les suivantes :

TBA-1: 5'-GGT-TGG-TGT-GGT-TGG-C6-SH-3'

TBAc: 5'-6FAM- CCA-ACC-ACA-CCA-ACC-3'

L'extrémité 3' de l'aptamère fixant la thrombine **TBA-1** est fonctionnalisée avec un groupement thiol afin de permettre l'insertion de l'aptamère à la surface des nanoparticules d'or **NP3B-1** via la formation d'une liaison covalente Au-S (figure 81A).

L'addition de l'aptamère **TBA-1** à la solution colloïdale de nanoparticules d'or **NP3B-1** entraîne une modification immédiate de la coloration du milieu réactionnel (figure 81B). Les AuNPs **NP41** fonctionnalisées sont ainsi obtenues.

L'analyse spectrale UV-Visible confirme cette observation et montre l'existence d'un déplacement de la longueur d'onde λ_{\max} de 526 nm à 490 nm. Ce déplacement de λ_{\max} vers de plus faible valeur de longueur d'onde s'explique par la présence de la fluorescéine qui exhibe un maximum d'absorption à 494 nm⁽¹⁷²⁾. De plus, le pic d'absorption présente un épaulement vers 526 nm qui correspond à l'absorbance imputable aux nanoparticules d'or (figure 81C). Ces arguments sont en faveur de la réussite de l'attachement de l'aptamère à la surface des nanoparticules.

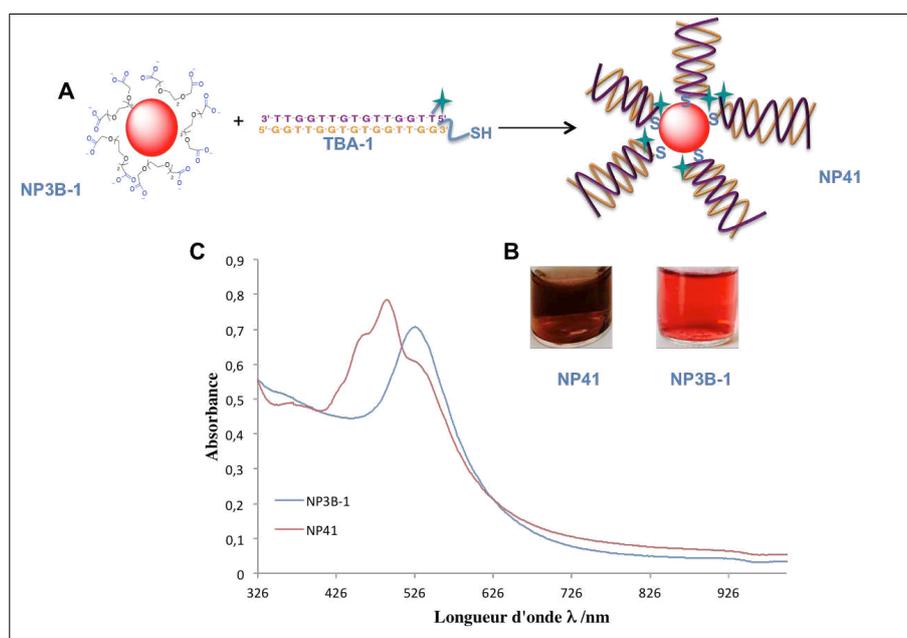


Figure 81 : A) Fonctionnalisation des nanoparticules d'or NP3B-1 par l'aptamère TBA-1 (associé en duplex à TBAC) via la formation d'une liaison covalente Au-S; B) Photographies des nanoparticules NP41 fonctionnalisées avec le duplex TBA-1/TBAc et des AuNP3B-1 ; C) Spectre UV-Visible des nanoparticules NP41 et NP3B-1.

Une étude de l'émission de fluorescence de ces nanoparticules NP41 en l'absence de thrombine a été effectuée afin de confirmer le quenching de fluorescence induit par la proximité entre la fluorescéine et les électrons de conduction présents à la surface de la nanoparticule (figure 82).

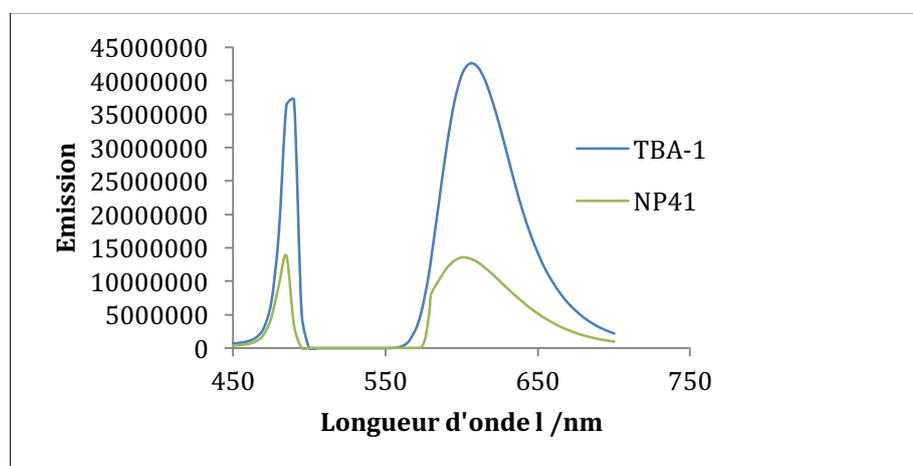


Figure 82 : Spectres d'émission de fluorescence de l'aptamère fixant la thrombine sous forme libre (TBA-1) ou attaché à la surface des nanoparticules d'or (NP41).

La fluorescéine est une sonde fluorescente dont les longueurs d'onde maximales d'excitation et d'émission sont respectivement de 494 nm et 518 nm⁽¹⁷²⁾. L'étude préliminaire du comportement fluorescent de l'aptamère TBA-1 montre qu'il existe un quenching de fluorescence même lorsque celui-ci n'est pas lié à la nanoparticule d'or.

Aucune émission de fluorescence n'est observée entre 500 et 550 nm. Cette inhibition de la fluorescence peut être imputée à la présence des bases guanines. En effet, la formation du duplex par appariement complémentaire des bases entre l'aptamère de reconnaissance et le brin couplé à un fluorophore par une liaison covalente au niveau de l'extrémité 5' entraîne une proximité entre les bases guanines G14 et G15 de l'aptamère fixant la thrombine et la fluorescéine⁽¹⁹¹⁾.

Bien qu'aucune émission ne soit observée entre 500 et 550 nm, le spectre fait apparaître la présence de deux pics, l'un à 494 nm et le second à 605 nm.

Ces pics d'absorption inattendus sont également retrouvés lors de l'analyse des nanoparticules **NP41** fonctionnalisées avec le duplex TBA-1/TBAC. Cependant, l'intensité de ces deux pics est diminuée, de plus de 95% pour le premier pic et de 68% pour le second dans le cas de l'échantillon **NP41**. L'insertion du duplex TBA-1/TBAC à la surface de la nanoparticule a bien induit un quenching de fluorescence de la sonde fluorescente fixée sur le brin complémentaire.

La solution de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec le duplex d'aptamère a été incubée en présence de quantité croissante de thrombine humaine plasmatique avec une gamme de concentration s'étendant de 24 mg/mL à 2,4 ng/mL. Les analyses de fluorescences ont été réalisées sur chaque échantillon (figure 83).

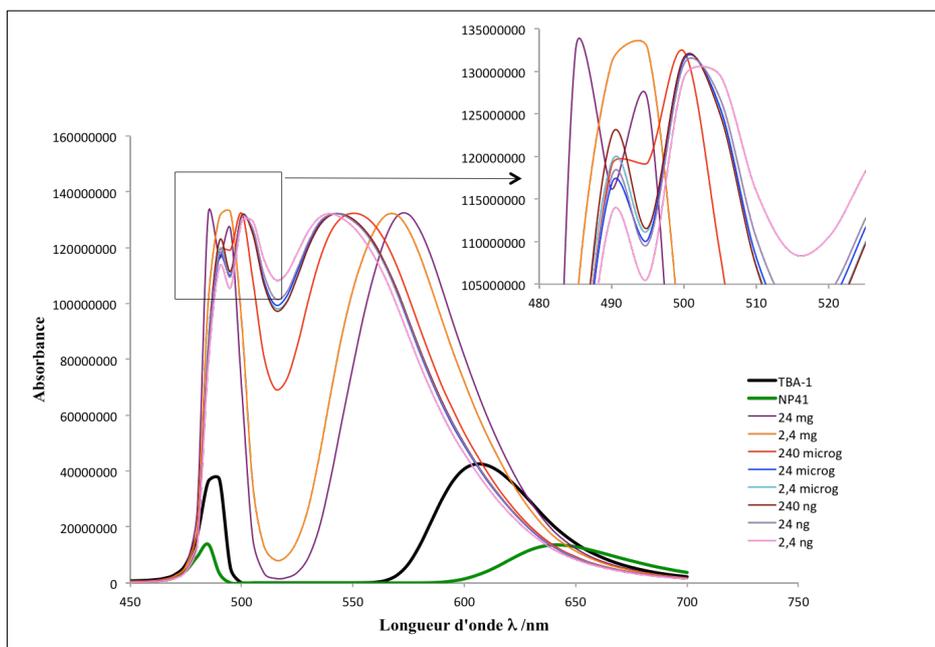


Figure 83 : Spectres d'émission de fluorescence des nanoparticules NP41 en présence de quantité décroissante de thrombine. Le spectre d'émission de fluorescence de NP41 est également représenté afin de servir de référence.

L'étude de la fluorescence des solutions de nanoparticules en présence de thrombine montre une importante augmentation de l'intensité de fluorescence. De plus, elle fait apparaître un troisième pic d'émission à environ 508 nm. Ce pic peut correspondre à une émission de fluorescence de la fluorescéine consécutive à la dissociation du duplex et à la libération du brin complémentaire marqué. La distance entre la sonde fluorescente et la surface de la nanoparticule d'or s'accroît et devient suffisante pour restaurer les capacités d'émission de la fluorescéine⁽¹⁹²⁾.

Le pic d'émission initialement situé à 605 nm est toujours présent, néanmoins son maximum d'absorption est décalé vers de plus hautes valeurs d'énergie au fur et à mesure que la concentration en thrombine diminue. Son positionnement évolue de 572 nm pour une concentration en thrombine de 24 mg/mL à 540 nm pour une concentration en thrombine de 2,4 ng/mL.

Ces résultats peuvent s'expliquer par la modification de surface subie par les nanoparticules d'or lors de l'ajout de thrombine.

En effet, l'addition de thrombine doit provoquer une dissociation du duplex et la libération du brin porteur de la fluorescéine. Cette hypothèse est cohérente avec les résultats obtenus et l'apparition du pic d'émission à 508 nm. Cependant, l'aptamère fixant la thrombine reste immobilisé à la surface de la nanoparticule d'or via la liaison covalente Au-S. De plus, l'interaction entre la thrombine et son aptamère doit aboutir à la formation d'une structure G-Quadruplex. L'organisation structurale de la monocouche d'aptamère à la surface de la nanoparticule d'or est donc profondément modifiée et peut induire le décalage d'absorption ainsi observé.

V-2-4 CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'élaborer un système de référence de détection de la thrombine par émission de fluorescence. La structure de reconnaissance et de capture était un aptamère sélectionné pour se fixer spécifiquement et avec une grande affinité à la thrombine cible. Cet aptamère était associé à son brin complémentaire sous forme de duplex en double hélice et l'ensemble était immobilisé à la surface d'une nanoparticule d'or. L'extrémité 5' du brin complémentaire était couplée à une sonde fluorescente et servait de système transducteur de l'interaction entre l'aptamère de reconnaissance et la thrombine. En effet, en l'absence de thrombine, la proximité entre le fluorophore et les électrons de surface de la nanoparticule devait engendrer une neutralisation de l'émission de fluorescence. En revanche, l'addition de thrombine devait provoquer la dissociation du duplex, la libération de la séquence complémentaire et la restauration de la fluorescence.

L'immobilisation du duplex à la surface de la nanoparticule devait être réalisée soit par attachement direct de l'aptamère de reconnaissance à la surface de la nanoparticule via une liaison covalente Au-S, soit par une réaction de couplage entre l'aptamère de reconnaissance et les ligands PEG préalablement fixés sous forme d'une monocouche auto-assemblée à la surface de la nanoparticule d'or.

Pour mettre en œuvre cette stratégie de détection, il était nécessaire d'étudier au préalable l'influence de la longueur du bras espaceur pegylé sur le phénomène de quenching de fluorescence. C'est pourquoi des ligands constitués d'une, deux, trois et quatre unités tétraéthylène glycol ont été couplés à une molécule de rhodamine via une réaction de chimie click puis fixés sur les AuNPs. L'analyse des spectres d'émission de fluorescence a montré que quelle que soit la longueur de ligand considérée, le quenching de fluorescence restait effectif.

Initialement nous voulions réaliser le couplage entre l'aptamère et les ligands pegylés via une réaction de chimie click, c'est pourquoi ces derniers portaient un groupement azoture en position ω . Cependant, nous ne sommes pas parvenus à effectuer cette réaction, probablement à cause d'une interaction entre l'ion Cu^+ et les nanoparticules d'or ou à cause d'une trop faible solubilité des ligands en phase aqueuse.

Une stratégie alternative a alors été envisagée en utilisant des cyclooctynes. Ces composés sont très réactifs ce qui permet de réaliser la réaction de cycloaddition en l'absence de cuivre. La présence d'un groupement aminé terminal sur la cyclooctyne aurait permis d'effectuer des réactions de couplage de type peptidique avec un aptamère de reconnaissance porteur d'une fonction acide carboxylique. Néanmoins, les résultats ont été peu concluants car la majorité des nanoparticules d'or ainsi fonctionnalisées ont présenté une forte instabilité et ont sédimenté en quelques jours.

Nous avons donc dû limiter notre étude à l'attachement direct de l'aptamère fixant la thrombine via une liaison covalente Au-S. L'analyse spectrale UV-Visible a montré un déplacement de la valeur de λ_{\max} ce qui est évocateur d'une modification de la surface des nanoparticules d'or et vient corroborer les observations visuelles.

Néanmoins, l'analyse de l'émission de fluorescence des nanoparticules d'or ainsi modifiées a été surprenante car elle a montré l'existence de deux pics d'émission à 488 et 606 nm respectivement. Les profils des spectres d'émission enregistrés après incubation des AuNPs avec des concentrations décroissantes de thrombine montrent l'apparition d'un nouveau pic d'émission situé à environ 508 nm. Cette observation vient valider notre hypothèse de restauration de la fluorescence induite par la dissociation du duplex et la libération du brin complémentaire lors de l'ajout de la cible.

Grâce à ces différentes expériences, nous avons pu vérifier la validité de notre système de détection. La fonctionnalisation de **TBA-1** par un groupement thiol en 3' permet la réussite de l'ancrage du duplex **TBA-1/TBAC** à la surface de la nanoparticule. La proximité physique entre la fluoréscéine et la surface électronique des nanoparticules d'or entraîne un quenching de fluorescence. Cette inhibition de fluorescence est levée lors de l'introduction de la thrombine cible car elle provoque une dissociation du duplex **TBA-1/TBAC** et la libération de **TBAC**.

Ce système de reconnaissance et de transduction du signal semble donc applicable à la détection des marques épigénétiques des histones et plus particulièrement à l'acétylation post-traductionnelle de l'histone H4 sur le résidu lysine en position 16, notre cible. Cependant, compte-tenu des émissions parasites observées à 488 nm et 606 nm, une autre stratégie de détection va être privilégiée et reposera sur la stabilité colloïdale des AuNPs.

V-3 DÉTECTION DE H4K16 : PRÉSENTATION DU SYSTÈME

Les méthodes les plus fréquemment employées pour la détection des modifications post-traductionnelles des histones sont des procédures immunologiques comme les techniques Western-Blot⁽¹⁹³⁾, ELISA⁽¹⁹⁴⁾ ou encore les techniques d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ou d'immunocytochimie⁽¹⁹⁵⁾⁽¹⁹⁶⁾⁽¹⁹⁷⁾.

Des techniques d'analyse par spectrométrie de masse couplées à des techniques de séparation par chromatographie liquide haute performance ont également été mises au point afin de détecter et de caractériser ces modifications post-traductionnelles⁽¹⁹⁸⁾⁽¹⁹⁹⁾.

Quelques aptamères ont été sélectionnés par processus SELEX afin de reconnaître spécifiquement des modifications post-traductionnelles présentes sur les histones⁽²⁰⁰⁾. Comparé aux anticorps, ces aptamères présentent l'avantage d'être des structures de reconnaissance moléculaire de petite taille, faciles à obtenir et aisément fonctionnalisables. De plus, ils présentent une grande spécificité vis à vis de leur cible. Ils sont notamment capables de discriminer deux ligands ne différant l'un de l'autre que par des modifications chimiques minimales comme par exemple la présence ou l'absence d'un groupement méthyle⁽²⁰¹⁾.

Un des aptamères décrit est celui fixant la lysine acétylée en position 16 de l'histone H4 (H4-K16). Cet aptamère a été sélectionné par SELEX à partir d'une librairie de 10^{14} séquences d'ADN simple brin constituées de 48 nucléotides chacune. Une première étape de contre SELEX a été réalisée en présence d'une séquence peptidique comportant le résidu lysine 16 non acétylé afin d'éliminer les aptamères capables de reconnaître cette cible. Les aptamères restants ont ensuite été incubés en présence du fragment peptidique comportant la lysine 16 acétylée. L'aptamère ainsi obtenu est capable de se fixer avec une grande affinité sur le résidu H4-K16 acétylé. De plus, son affinité pour ses homologues non acétylés ou acétylés en position 8 est respectivement réduite d'un facteur 12 et 15 par rapport à l'anticorps anti H4-K16⁽²⁰²⁾(figure 84).

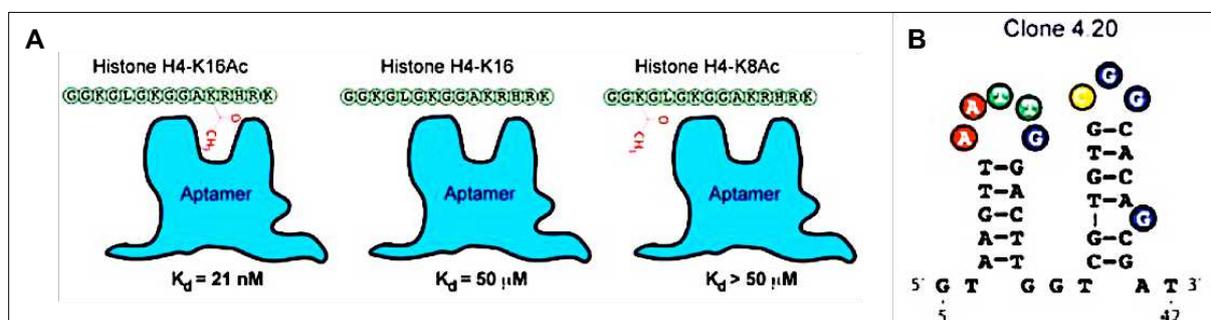


Figure 84 : A) Représentation schématique simplifiée de la relation entre la structure de l'aptamère et sa spécificité pour le résidu H4-K16 acétylé ; B) Structure tridimensionnelle de l'aptamère, les nucléotides directement impliqués dans l'interaction avec H4-K16 sont indiqués en couleur. Illustrations issues de la référence (202).

Jiang *et al.*⁽²⁰³⁾ ont développé une technique colorimétrique pour quantifier l'activité enzymatique de l'histone méthyltransférase (HMT) responsable de la méthylation de la lysine en position 4 de l'histone H3 (H3-K4) ainsi que celle de l'histone acétyltransférase (HAT) impliquée dans le processus d'acétylation de la lysine 14 de cette même protéine histone (H3-K14). Cette détection colorimétrique était basée sur l'agrégation des nanoparticules d'or préalablement fonctionnalisées avec des fragments peptidiques de l'histone H3 contenant les résidus lysine K4 et K14. Ces nanoparticules ainsi fonctionnalisées ont été mises en présence des enzymes HMT et HAT puis en présence d'anticorps reconnaissant spécifiquement le résidu H3K4 méthylé ainsi que le résidu H3K14 acétylé. Ces anticorps étant capables de fixer deux molécules cibles simultanément, une agrégation des nanoparticules d'or a été observée (figure 85).

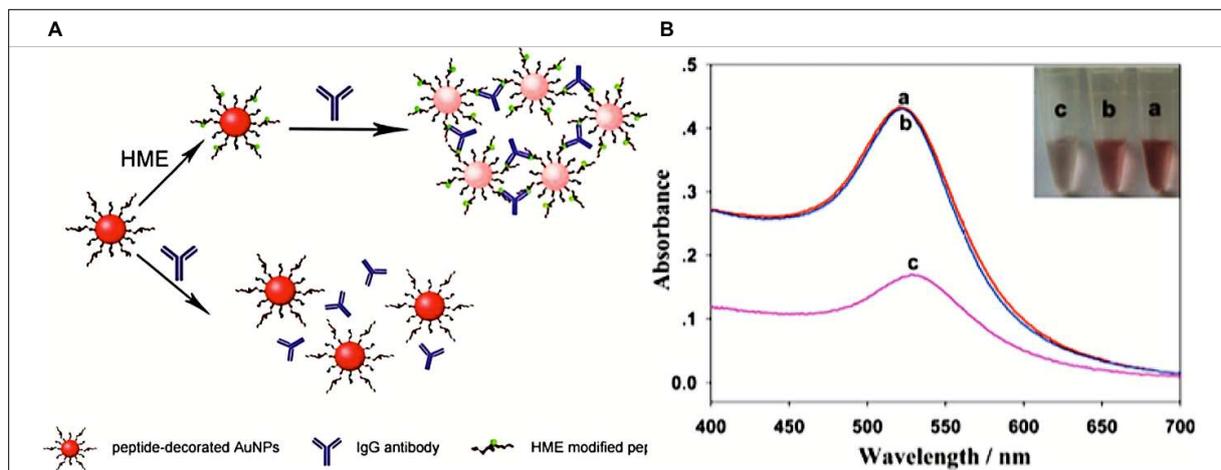


Figure 85 : A) Présentation de la stratégie de quantification de deux enzymes responsables de la modification post-traductionnelle de l'histone H3 par détection colorimétrique ; B) Spectres UV-Visible traduisant la décoloration de la solution de nanoparticules d'or en présence des anticorps anti H3K4 méthylé. Illustrations issues de la référence (203).

A ce jour, aucun système de détection de marques épigénétiques d'histones associant à la fois des nanoparticules et des aptamères n'a encore été décrit. Nous nous proposons d'élaborer un tel système en fonctionnalisant des nanoparticules d'or avec un aptamère ([Apt1](#)) sélectionné par SELEX et capable de reconnaître spécifiquement l'acétylation de la lysine en position 16 de l'histone H4 (H4K16). Un second aliquot de nanoparticules d'or a été fonctionnalisé avec le brin complémentaire ([Apt2](#)) de l'aptamère de reconnaissance. Ces deux solutions de nanoparticules ont été mises en contact l'une de l'autre.

Comme pour le système de détection de thrombine présenté précédemment, notre hypothèse de travail est que les séquences nucléotidiques s'associent en une structure duplex double hélice par complémentarité des bases. La formation de la structure duplex doit induire un rapprochement des nanoparticules entre elles conduisant à leur agrégation. Ce processus de coalescence doit alors engendrer une modification de la résonance plasmonique de surface se traduisant par une modification de la coloration du milieu réactionnel en une solution bleu-violacée⁽²⁰⁴⁾. L'addition de la séquence peptidique comportant la cible H4-K16 acétylée doit supprimer cette agglomération des nanoparticules par rupture de la structure duplex (schéma 67).

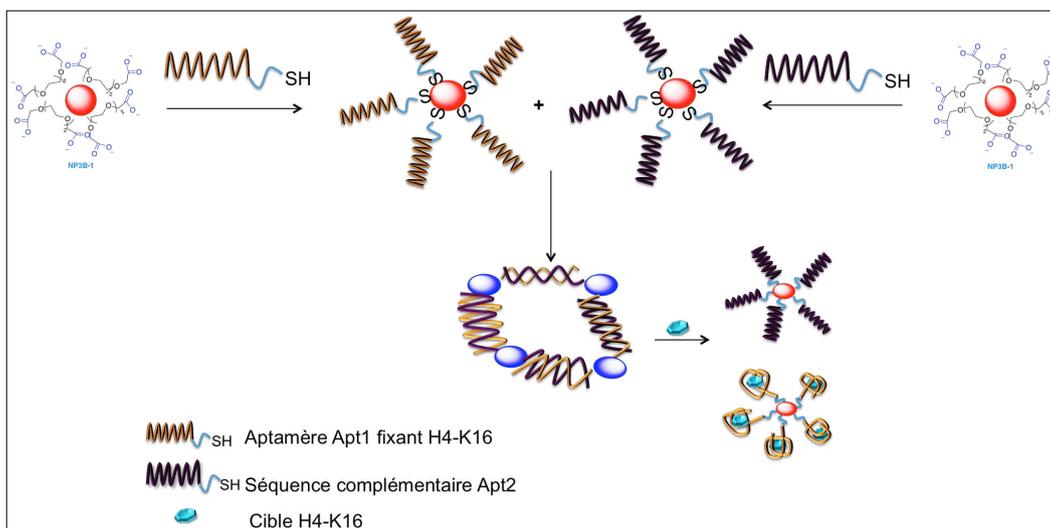


Schéma 67 : Stratégie de détection de l'acétylation du résidu lysine en position 16 de l'histone H4 par agglomération réversible de deux populations de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des aptamères complémentaires.

Nous nous sommes procuré l'aptamère fixant le résidu H4-K16 (**Apt1**) auprès du département de chimie moléculaire de l'Université de Grenoble. Cet aptamère est modifié chimiquement sur l'extrémité 3' avec l'introduction d'un groupement thiol qui servira à la fonctionnalisation des nanoparticules **NP3B-1** par formation d'une liaison covalente Au-S. Nous nous sommes également procuré la séquence complémentaire (**Apt2**) de cet aptamère dont l'extrémité 5' a également été fonctionnalisée par un groupement thiol.

La séquence de ces deux aptamères est la suivante :

Apt 1 :

5'AGACGGTAAGTTTAATTGGACTTGGTCGTGTGCGGCACAGCGATTGAAAT-p-O(CH₂)₃SH

Apt 2 :

5'HS(CH₂)₃O(CH₂)₂OpATTTCAATCGCTGTGCCGCCACACGACCAAGTCCAATTA ACTTACGT
CT

Chacun de ces deux aptamères a été attaché à la surface des nanoparticules d'or **NP3B-1** selon le protocole expérimental détaillé plus haut. Ainsi les nanoparticules **NP42** ont été obtenues après fonctionnalisation par **Apt1** et les nanoparticules **NP43** ont été fonctionnalisées avec son brin complémentaire **Apt2**. L'ajout de l'aptamère à la solution de nanoparticules a entraîné une modification de la coloration du milieu réactionnel qui est devenu plus violacé. L'analyse spectrale UV-Visible a confirmé ce résultat en affichant un déplacement de la valeur de λ_{\max} de 5 nm vers de plus hautes longueurs d'onde (figure 86).

Contrairement à ce qui était attendu, la suspension de nanoparticules d'or **NP44** résultant du mélange de ces deux solutions de nanoparticules d'or (**NP42** et **NP43**) n'a pas entraîné d'agrégation visible à l'œil nu ou par spectrométrie UV-Visible. L'hypothèse la plus probable pour expliquer ce résultat est la très faible concentration d'aptamère disponible pour réaliser la fonctionnalisation des nanoparticules. Seule une faible

proportion de la population de nanoparticules d'or a été fonctionnalisée. Le pourcentage de nanoparticules d'or agglomérées lors du mélange est négligeable et la modification de la coloration du milieu réactionnel ne peut donc pas être détectée.

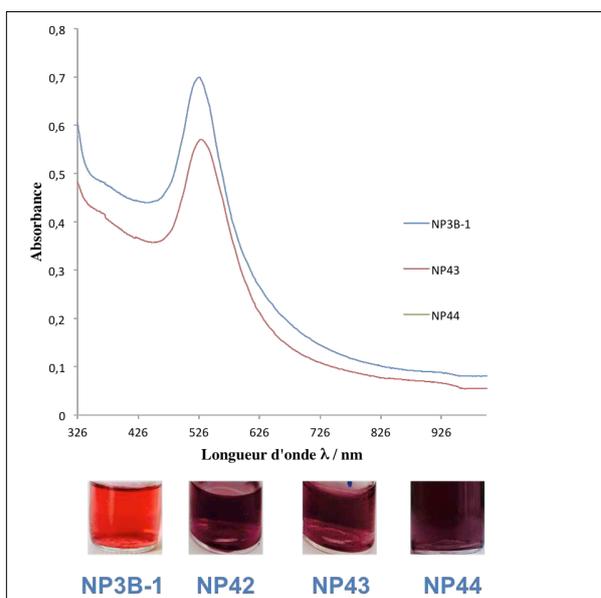


Figure 86 : Photographies et spectres UV-Visible des nanoparticules d'or avant (NP3B-1) et après fonctionnalisation avec les aptamères Apt1 et Apt2 (NP42 et NP43). Spectres UV-Visibles de ces nanoparticules avant et après mise en commun (NP44).

Afin de vérifier cette hypothèse, des électrophorèses sur gel pourraient être réalisées à partir de chaque population de nanoparticules fonctionnalisées et en présence du résidu H4-K16 acétylé et de son homologue non acétylé afin de discriminer les différents constituants selon leur masse moléculaire par exemple (figure 87).

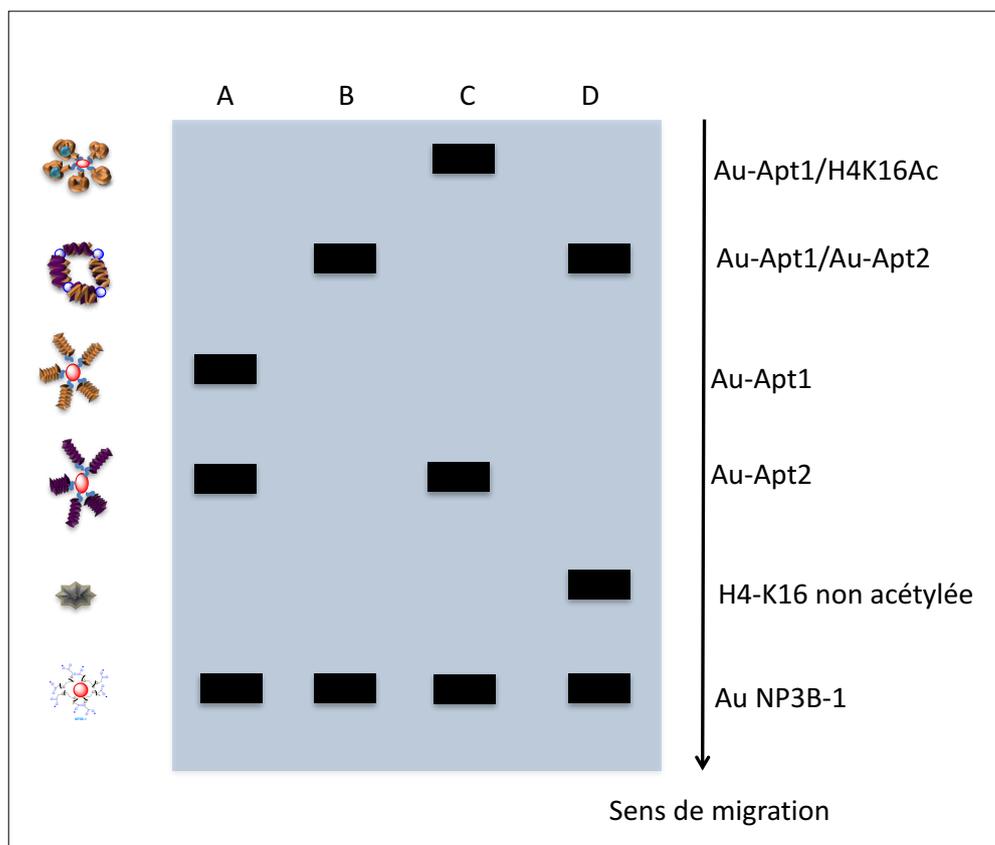


Figure 87 : Profil électrophorétique théorique : A) Des nanoparticules NP42 et NP43 fonctionnalisées par Apt1 ou Apt2 ; B) Des nanoparticules NP44 ; C) De NP44 en présence de H4-K16 acétylé ; D) En présence de H4-K16 non acétylé.

En l'absence de cible, l'électrophorèse du mélange des nanoparticules fonctionnalisées devrait montrer deux bandes de migration : la première correspondant aux nanoparticules fonctionnalisées agrégées suite à la formation du duplex et la seconde représentant la population de nanoparticules non modifiées.

En revanche, en présence de la cible H4-K16 acétylée (H4K16Ac), la bande correspondant au duplex devrait disparaître et une nouvelle bande de migration représentant la formation du complexe supramoléculaire [AuNP/Apt1/H4K16Ac](#) devrait apparaître ainsi que la bande correspondant aux AuNPs [NP43](#) fonctionnalisées avec Apt2.

La spécificité de ce système de détection pourrait également être investiguée en incubant le mélange de nanoparticules d'or avec le dérivé H4-K16 non acétylé ou encore avec une autre histone modifiée.

V-4 CONCLUSION

L'épigénétique regroupe l'ensemble des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de l'expression de l'information génétique. Ces effecteurs épigénétiques sont interdépendants les uns des autres et exercent différemment leur action le long des chromosomes afin de le diviser en régions codantes et non codantes. Il s'agit de processus dynamiques, réversibles et transmissibles qui assurent l'expression contrôlée des gènes au sein d'une cellule via des actions activatrices et répressives. Cette expression génique différentielle permet la différenciation cellulaire et l'élaboration d'organismes complexes. Le caractère dynamique de ce contrôle assure également la plasticité des organismes vis à vis de leur environnement et leur confère une capacité d'adaptation en cas de modification de ce dernier.

Cependant, un dysfonctionnement de ces mécanismes de contrôle génétique induit une expression erronée en excès (surexpression) ou en défaut (répression) qui est inadaptée aux besoins de l'organisme. Il en résulte l'émergence d'un phénotype défavorable et en inadéquation avec son environnement.

L'influence des modifications épigénétiques dans la physiopathologie des cancers est de plus en plus investiguée. Ainsi de nombreuses pathologies tumorales se sont vues associées à des anomalies d'expression épigénétique. Néanmoins, il est encore impossible de savoir si ces aberrations épigénétiques sont la cause ou une résultante du processus de cancérogénèse.

La plupart des biomarqueurs utilisés pour la détection, le pronostic ou l'étude des processus physiopathologiques sont des marqueurs s'exprimant au niveau phénotypique. C'est pourquoi le développement de stratégies de biosensing pour identifier les différents effecteurs épigénétiques semble constituer un domaine d'étude prometteur. En effet, une cartographie précise du réseau de contrôle épigénétique permettrait de définir quelles altérations provoquent un degré d'expression conduisant à un phénotype pathologique et d'identifier de nouvelles cibles au niveau génotypique.

La reconnaissance de ces marques épigénétiques portées par les histones fait intervenir des anticorps exhibant une excellente affinité pour leurs cibles. Cependant, ces anticorps souffrent d'un manque de spécificité et sont souvent incapables de différencier des marques épigénétiques proches telles que la di- ou la tri-méthylation d'un résidu lysine d'une histone. Les aptamères constituent une excellente alternative. En effet, ils présentent une affinité comparable à celle des anticorps mais sont également capables de discriminer des modifications post-traductionnelles voisines.

Nous avons tenté d'élaborer un système de détection de l'acétylation de la lysine en position 16 de l'histone H4 via une coalescence réversible de nanoparticules fonctionnalisées avec des aptamères obtenus par SELEX et dirigés spécifiquement contre cette marque épigénétique. Malheureusement, les résultats sont peu probants et des analyses complémentaires doivent être mises en œuvre pour valider notre stratégie.

Chapitre VI : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'établissement d'un diagnostic repose non seulement sur des arguments cliniques mais également sur des arguments biologiques et plus précisément la recherche de biomarqueurs dont la présence est corrélée à des mécanismes pathologiques responsables de l'apparition de la maladie.

Les techniques les plus largement employées pour la détection de ces biomarqueurs sont des techniques de reconnaissance moléculaire. Elles nécessitent l'utilisation d'un biosenseur capable de se fixer avec une haute affinité et une excellente spécificité sur sa cible. De plus, il est indispensable d'inclure dans ce système de détection un élément reporteur capable de convertir l'interaction entre le ligand et sa cible en un signal physique mesurable.

Le principe de reconnaissance moléculaire entre un anticorps et son antigène constitue la base de nombreux tests diagnostiques. Néanmoins, ces anticorps présentent certaines limitations relatives à leur technique de production, leur sensibilité à de nombreux paramètres tels que la température, le pH, la force ionique ou encore leur manque de spécificité.

L'émergence des aptamères dans les années 90 a ouvert de nouvelles perspectives dans le domaine du biosensing. Ces aptamères sont des séquences oligonucléotidiques artificielles obtenues par processus SELEX. Ce mode de sélection leur confère une affinité et une spécificité pour leur cible comparables voire supérieures à celles des anticorps. Ces composés possèdent une excellente stabilité et peuvent être modifiés très aisément afin d'introduire une grande diversité de groupements fonctionnels. Cette grande flexibilité chimique facilite leur couplage à des composés biologiques ou leur immobilisation à la surface de matériaux, notamment les nanoparticules d'or.

L'incorporation de nanoparticules d'or au sein d'un dispositif de détection apporte de nombreux avantages. Ces nanoparticules sont des édifices polyatomiques stables et organisés obtenus par réduction de sels précurseurs d'or en or métallique ou par subdivision d'or massif. Leurs dimensions nanométriques leur confèrent des propriétés optiques et électroniques uniques qui résultent de l'effet de résonance plasmonique de surface. Deux de ces propriétés sont largement mises à profit pour l'élaboration d'un système de détection : l'absorbance d'un rayonnement électromagnétique incident dont la localisation sur le spectre visible dépend de la taille et de la forme des nanoparticules ainsi que de leur degré de coalescence et le quenching de fluorescence.

L'objectif de ce travail de doctorat était de construire un système de détection combinant les propriétés de reconnaissance des aptamères aux propriétés optiques des nanoparticules d'or puis de valider ce concept pour la détection de thrombine et enfin de l'appliquer à la détection d'une marque épigénétique présente sur une histone.

Afin de mener à bien ce projet, une nouvelle voie de synthèse des nanoparticules d'or a été élaborée. Elle consistait à réduire des sels d'or à l'état d'oxydation Au (III) ³⁺ en or métallique Au⁰ par une technique « bottom-up » directe en utilisant le tétraéthylène glycol comme agent réducteur et stabilisant. Avec cette voie de synthèse, une population homogène de nanoparticules d'or sphériques a été obtenue. Ces nanoparticules, d'un diamètre moyen de 14 ± 2 nm, montraient une meilleure anisotropie de taille et de forme ainsi qu'une stabilité accrue et une meilleure pénétration cellulaire que celles synthétisées par la méthode au citrate dérivée de la procédure de Turkevich.

La finalité de ces nanoparticules étant de servir de support à des éléments de reconnaissance et d'être utilisées in-vivo pour la détection de biomarqueurs, la stabilité de ces structures polyatomiques a dû être améliorée. La stratégie envisagée a été de fonctionnaliser ces particules avec une monocouche auto-assemblée de ligands.

Ces ligands devaient assurer la fixation à la surface de la nanoparticule d'or d'une part et le couplage aux aptamères d'autre part. Il était donc nécessaire de synthétiser des ligands hétérobifonctionnalisés. L'extrémité α de ces ligands devait porter un groupement thiol pour permettre la formation d'une liaison covalente Au-S thermodynamiquement favorisée et stable. En revanche, l'extrémité ω devait permettre le couplage avec un aptamère ou un bio-composé d'intérêt. De plus, afin d'augmenter la stabilité et la biodisponibilité des nanoparticules nous voulions introduire une chaîne éthylène glycol entre la nanoparticule d'or et le senseur nucléotidique.

Nous avons utilisé une molécule d'acide lipoiq ue comme structure d'ancrage du ligand à la surface de la nanoparticule. La présence de la fonction disulfure a abouti à la formation de la liaison covalente Au-S et avait l'avantage de nous affranchir du problème d'oxydation de la fonction thiol. De plus, la fonction carboxylique de l'acide lipoiq ue nous a permis de mettre en œuvre des réactions de couplage de type peptidique avec un substrat test, la lysine.

Cette molécule d'acide lipoiq ue a ensuite été couplée à des chaînes polyéthylène glycol de différentes longueurs et porteuses d'une fonction terminale azoture. L'élongation de la chaîne PEG a entraîné une augmentation de la solubilité et de la stabilité en milieux aqueux des nanoparticules modifiées.

La fonction azoture devait servir à effectuer le couplage avec des biocomposés via une réaction de chimie click catalysée au cuivre mais les résultats furent décevants, probablement à cause d'une interaction entre l'or et le cuivre. Nous sommes actuellement en train de synthétiser des ligands avec une fonctionnalité amino en position ω. Ces ligands seront ensuite fixés à la surface de la nanoparticule d'or. Nous supposons que l'existence de cet amino-groupe terminal permettra d'augmenter l'hydrosolubilité des ligands et d'améliorer la stabilité des nanoparticules fonctionnalisées et constituera un point de départ simple et efficace pour le couplage avec des biocomposés arborant une fonction acide carboxylique.

Concernant l'application des nanoparticules d'or fonctionnalisées avec des aptamères, deux systèmes de détection ont été élaborés. Le premier a mis à profit les capacités de neutralisation de fluorescence des électrons de conduction présents à la surface des nanoparticules d'or ainsi que la grande affinité de l'aptamère fixant la thrombine pour sa cible. L'interaction de la thrombine avec son aptamère de reconnaissance a entraîné la libération d'un fluorophore dont l'activité était inhibée à cause de sa grande proximité avec la surface de la nanoparticule d'or et la restauration de ses capacités de fluorescence. Une émission de fluorescence a ainsi pu être détectée pour des quantités de thrombine de l'ordre du nanomolaire.

Le second système de détection devait utiliser les propriétés colorimétriques des solutions de nanoparticules d'or dont la couleur varie en fonction de leur taille et de leur degré d'agrégation. Les résultats de ce test n'ont pas été concluants et des analyses complémentaires sont en cours pour valider cette stratégie de détection.

Lors de ce travail, nous nous sommes limités à la fonctionnalisation des nanoparticules par un seul type de ligand ainsi qu'à l'application de cet édifice aux seules techniques de détection. Néanmoins, il est tout à fait possible d'imaginer fonctionnaliser simultanément ces nanoparticules d'or avec des ligands distincts, capables de reconnaître des cibles différentes et couplés à des éléments reporteurs différents. De même, il est envisageable de réaliser la fonctionnalisation des nanoparticules à la fois avec des éléments de reconnaissance et avec des agents thérapeutiques selon une stratégie de vectorisation pour une délivrance ciblée du principe actif.

SECTION EXPERIMENTALE

Chapitre I : MATÉRIELS ET CARACTÉRISATION

I-1 LIGANDS ORGANIQUES

I-1-1 MATÉRIELS ET RÉACTIFS

Les produits commerciaux utilisés pour la synthèse des bras espaceurs et des ligands sont issus de différents fournisseurs : Sigma Aldrich, Fisher Scientific, Alfa Aesar et Acros Organics. Ces produits sont employés sans purification particulière.

Les solvants utilisés sont des solvants anhydres de qualité analytique, conditionnés sous septum et conservés à température ambiante à l'abri de la lumière sur tamis moléculaire. Les volumes sont prélevés sous atmosphère inerte d'Argon.

Les aptamères fixant la thrombine ainsi que le brin complémentaire ont été synthétisés, purifiés par chromatographie liquide haute performance (CLHP), analysés par spectrométrie de masse MALDI TOF puis associés en duplex par la société Eurogentec. Leurs séquences sont les suivantes :

TBA-1 : 5'-GGT-TGG-TGT-GGT-TGG-Thiol modifié C6-3'

TBA-2 : 5'-GGT-TGG-TGT-GGT-TGG-CarboxydT-3'

TBAc : 5'-6-FAM-CCA-ACC-ACA-CCA-ACC-3'

L'aptamère fixant l'histone H4 portant une acétylation sur le résidu lysine en position 16 (H4-K16) ainsi que le brin complémentaire ont été sélectionnés par SELEX puis synthétisés, purifiés par CLHP et analysés par spectrométrie de masse MALDI TOF au département de chimie moléculaire de l'Université de Grenoble. Leurs séquences sont les suivantes :

Apt1 :

5'-AGACGTAAGTTAATTGGACTTGGTCGTGTGCGGCACAGCGATTGAAAT-p-O(CH₂)₃SH-3'

Apt2 :

5'-HS(CH₂)₃OpATTTCAATCGCTGTGCCGCACACGACCAAGTCCAATTAAGTTAGTCT- 3'

Le suivi de l'avancement des réactions a été réalisé par chromatographie sur couche mince (CCM) à l'aide de plaques de silice de type Macherey-Nagel (ALUGRAM® SIL G/UV254). Ces dernières ont été révélées par fluorescence sous une lampe UV à 254 nm ou par pulvérisation d'une solution éthanolique d'acide phosphomolybdique à 3g/100 mL.

Les produits de réactions ont été purifiés par flash-chromatographie sur colonne de gel de silice (MACHEREY-NAGEL 60, 15-40 µm) ou par chromatographie automatisée sur des appareils Combi-Flash équipés d'un détecteur DEDL et/ou d'un détecteur par fluorescence.

I-1-2 CARACTÉRISATION

Les produits synthétisés ont été analysés par résonance magnétique nucléaire (RMN) avec un appareil BRUCKER 400 AVANCE III Plus à 400 MHz pour le spectre du proton ^1H et à 100 MHz pour le spectre du carbone ^{13}C . Les déplacements chimiques ont été exprimés en ppm et ont été calibrés par rapport au pic résiduel à 7,26 ppm du solvant deutéré CDCl_3 qui sert de référence. L'attribution des déplacements chimiques des protons et des carbones a été réalisée par les expériences 1D (DEPT 135) et 2D (COSY H-H et HSQC). Les signaux observés ont été décrits avec les abréviations suivantes : s : singulet ; d : doublet ; t : triplet ; q : quadriplet ; dd : doublet dédoublé ; m : multiplet.

Les analyses de spectrométrie de masse haute résolution ont été réalisées au pôle « Analyse et Caractérisation » de l'Université de Poitiers par ionisation positive en électrospray.

I-2 NANOPARTICULES D'OR

I-2-1 MATÉRIELS ET RÉACTIFS

Les sels d'or aurique HAuCl_4 précurseurs ainsi que les différents réactifs ont été achetés chez Alfa Aesar, Sigma Aldrich, Acros Organics et Fisher Scientific.

L'eau utilisée pour les réactions de synthèse et de fonctionnalisation des nanoparticules d'or ainsi que pour la préparation des solutions de réactifs et de ligands a été de qualité Milli-Q. Cette eau ultrapure de qualité Milli-Q a été obtenue avec un appareil à cartouche QPAK® 1 associé à un filtre Millipore RiOs™ 3.

Les solutions aqueuses d'hydroxyde de sodium (NaOH) et de citrate de sodium ont dû être préparées extemporanément afin d'éviter toute dégradation.

L'intégralité de la verrerie a dû être lavée avec une solution d'eau Régale (HCl/HNO_3 : 3/1) puis rincée avec de l'eau bouillante ultrapure de qualité Milli-Q et séchée à l'étuve.

Les réactions de synthèse et de fonctionnalisation des nanoparticules d'or ont été effectuées dans des réacteurs en verre à fond plat. L'agitation a été assurée par une tige magnétique incluse dans une gaine de verre.

Les nanoparticules nouvellement synthétisées ont été purifiées par centrifugation différentielle en exerçant une accélération croissante. Deux cycles de centrifugation de 20 minutes à 2500 tours par minutes (rpm) ont été effectués afin d'éliminer les plus grosses nanoparticules. Ces cycles ont été suivis de deux cycles de centrifugation à 5000 rpm puis d'un cycle de 10 minutes à 10000 rpm et enfin d'un cycle de centrifugation de 10 minutes à 15000 rpm. Les culots obtenus après centrifugation à

5000, 10000 et 15000 rpm ont été combinés. La centrifugation a été réalisée à 20°C avec une centrifugeuse Sigma® 2-16 PK (Fisher Bioblock Scientific) munie d'un rotor 12139-H.

I-2-2 CARACTÉRISATION

Les nanoparticules synthétisées et/ou modifiées ont été photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique afin de pouvoir objectiver le changement de coloration induit par la modification de la surface des nanoparticules.

L'étude spectrale UV-Visible a été réalisée avec un spectrophotomètre Helios® Omega avec un balayage des longueurs d'onde de 326 nm à 1100 nm. L'échantillon à mesurer a été placé dans une cuve en quartz de 3 mL et dont le trajet optique est de 1 cm. Le blanc de mesure a été réalisé avec de l'eau ultrapure de qualité Milli-Q.

Le dosage de la solution de nanoparticules d'or obtenues par la synthèse au citrate a été effectué par spectrométrie d'absorbance atomique à 242,80 nm. Une courbe d'étalonnage a été construite par dilutions successives au 1/10^{ème} de cette solution mère. Cette courbe d'étalonnage permet de déterminer la concentration en nanoparticules d'or par application de la loi de Beer-Lambert. Le même procédé a été appliqué aux solutions de nanoparticules d'or obtenues par la synthèse au PEG₄.

La valeur du potentiel de surface zêta a été déterminée avec un zétamètre Zetasizer Nano-ZS modèle ZEN 3600 (Malvern).

La taille, la forme et la dispersion des nanoparticules ont été analysées avec un microscope électronique à transmission JEOL 2100 UHR équipé d'un filament au LaB₆ comme canon à électron et opérant à 200 kV. Une goutte de la solution colloïdale de nanoparticules d'or obtenue après centrifugation à 5000 rpm a été déposée sur une grille en cuivre recouverte d'un film de carbone puis séchée à l'air libre pendant quelques minutes. Les données micrographiques ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Le diamètre moyen des nanoparticules ainsi que leur profil de distribution ont été calculés à partir de la mesure du diamètre de 600 nanoparticules.

Les analyses XPS ont été réalisées au sein du Laboratoire de Réactivité de Surface de l'Université Pierre et Marie Curie avec un spectrophotomètre de photon X PHOIBOS 100 (SPECS GmbH, Berlin, Allemagne) équipé d'une source de rayons X monochromatiques Al K α . Une goutte de solution de nanoparticules centrifugées a été déposée sur une plaque en indium fixée au support à l'aide de scotch carbone double face.

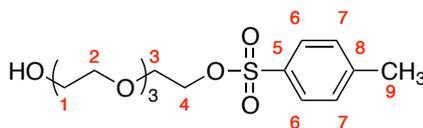
L'étude de l'émission de fluorescence des nanoparticules fonctionnalisées avec un fluorophore a été réalisée avec le spectrofluorimètre Fluoromax®-4 (HORIBA Jobin Yvon). Les analyses ont été réalisées dans des cellules de quartz de 3 mL et présentant un trajet optique de 1 cm. Les ligands et les nanoparticules fonctionnalisés avec de la

rhodamine ont été soumis à un rayonnement d'excitation de 553 nm et le spectre d'émission à été enregistré de 500 à 800 nm. En revanche, pour les nanoparticules ou les ligands couplés à la fluorescéine, la longueur d'onde d'excitation a été fixée à 488 nm et le balayage des longueurs d'onde d'émission a été effectué de 400 à 750 nm.

Chapitre II : SYNTHÈSE DU LIGAND

II-1 SYNTHÈSE ET FONCTIONNALISATION DU BRAS ESPACEUR PÉGYLÉ EN SERIE PEG₄

Synthèse du 2-(2-(2-(2-hydroxyethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl-4-methylbenzenesulfonate B1

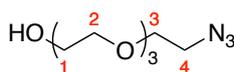


Dans un ballon de 250 mL, dissoudre 77,22 mmol de tétraéthylène glycol (PEG₄) (15 g ; 13,4 mL ; 10 Eq) dans 36 mL de DCM anhydre puis ajouter 11,58 mmol de triéthylamine (Et₃N) (1,62 mL ; 0,15 Eq). Placer le milieu réactionnel à 0°C dans un bain d'eau et de glace et ajouter progressivement 7,72 mmol de chlorure de tosylo (TsCl) (1,467 g ; 0,1 Eq). Après 15 minutes à 0°C, ramener le milieu à température ambiante et laisser sous agitation constante pendant 24 heures. Laver trois fois à l'eau le milieu brut et extraire trois fois la phase aqueuse obtenue avec du DCM. Les phases organiques sont combinées et lavées avec de l'eau jusqu'à disparition du PEG₄ dans la phase organique. La phase organique est alors séchée sur du sulfate de magnésium anhydre (MgSO₄) et filtrée. Les solvants sont évaporés et 6,72 mmol (2,338 g ; Rdt = 87%) d'une solution jaune pâle sont obtenues.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,79 (dd, 2H, *J* = 8,3 Hz, H₆) ; 7,33 (dd, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₇) ; 4,15 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₄) ; 3,55-3,71 (m, 14H, H₁, H₂, H₃) ; 2,43 (s, 3H, H₉).

Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²⁰⁵⁾⁽²⁰⁶⁾.

Synthèse du 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol B2



Voie 1 : Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 6,72 mmol (2,338 g ; 1 Eq) de composé **B1** dans 36 mL de DMF puis ajouter 33,60 mmol (2,184 g ; 5 Eq) d'azoture de sodium (NaN₃). Le milieu réactionnel est laissé sous agitation constante à température ambiante pendant 48 heures. Les solvants sont évaporés et le solide blanc ainsi obtenu est repris dans 20 mL de DCM. La solution organique est alors lavée trois fois à l'eau. Les phases aqueuses sont combinées et extraites par du DCM jusqu'à disparition du produit d'intérêt dans la phase aqueuse. Les phases organiques sont combinées et lavées avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique 6N afin d'éliminer le DMF. Les phases aqueuses résultantes sont alors combinées et neutralisées par ajout de carbonate de sodium solide puis extraites avec du DCM. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ anhydre et filtrées. Les solvants sont alors évaporés et 6,384 mmol (1,399 g ; Rdt = 95%) d'une solution jaune sont obtenues.

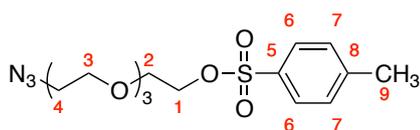
Voie 2 : Dans un ballon de 500 mL, dissoudre 61 mmol (21,20 g ; 1 Eq) de composé **B1** dans 266 mL d'acétone anhydre puis ajouter 122 mmol (7,93 g ; 2 Eq) de NaN₃. A ce mélange est ensuite ajouté 85 mL de DMF. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux sous agitation constante pendant 24 heures. Les solvants sont évaporés et le solide blanc ainsi obtenu est repris dans 30 mL de DCM. La solution organique est alors lavée à l'eau. Les phases aqueuses sont combinées et extraites avec du DCM jusqu'à disparition du produit d'intérêt dans la phase aqueuse. Les phases organiques sont combinées et lavées avec une solution aqueuse de HCl 6N afin d'éliminer le DMF. Les phases aqueuses résultantes sont alors combinées et neutralisées par ajout de carbonate de sodium solide (NaHCO₃) puis extraites avec du DCM. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ anhydre et filtrées. Les solvants sont alors évaporés et 43,93 mmol (9,627 g ; Rdt = 72%) d'une solution jaune pâle sont alors obtenues.

Voie 3 : Dans un ballon de 250 mL, dissoudre 74,68 mmol (25,989 g ; 1 Eq) de composé **B1** dans 150 mL d'acétone anhydre puis ajouter 149,36 mmol (9,71 g ; 2 Eq) de NaN₃. Le milieu réactionnel est chauffé à reflux sous agitation continue pendant 24 heures. Les solvants sont évaporés et le solide blanc ainsi obtenu est repris dans 70 mL de DCM et 50 mL d'eau. La phase aqueuse est alors extraite avec du DCM jusqu'à disparition du produit d'intérêt dans la phase aqueuse. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées. Les solvants sont évaporés et 76,40 mmol (16,74 g, Rdt = 98%) d'une solution jaune pâle sont alors obtenues.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,72 (m, 2H, H₁) ; 3,66 (m, 10H, H₂, H₃) ; 3,60 (m, 2H, H₃) ; 3,39 (t, 2H, J = 8,0 Hz, H₄).

Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽¹⁴¹⁾.

Synthèse du 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl- 4-methylbenzenesulfonate B3



Voie 1 : Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 28,18 mmol (6,172 g ; 1 Eq) de composé **B2** dans 113 mL de DCM anhydre puis ajouter 54,53 mmol (7,6 mL ; 1,9 Eq) de Et₃N. Placer le milieu réactionnel à 0°C dans un bain d'eau et de glace et ajouter progressivement 33,82 mmol (6,447 g ; 1,2 Eq) de TsCl. Après 15 minutes à 0°C, le milieu est ramené à température ambiante et laissé sous agitation constante pendant 24 heures. Les solvants sont évaporés et le résidu est repris dans 20 mL de DCM. La phase organique est alors lavée trois fois avec de l'eau. Les phases aqueuses sont combinées et extraites avec du DCM jusqu'à disparition du produit d'intérêt dans la phase aqueuse. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgO₄ anhydre et filtrées. Les solvants sont évaporés et 11,03 g d'une solution jaune ocre est obtenue. Le produit brut est purifié par flash-chromatographie en utilisant le mélange binaire EP/AcOEt comme

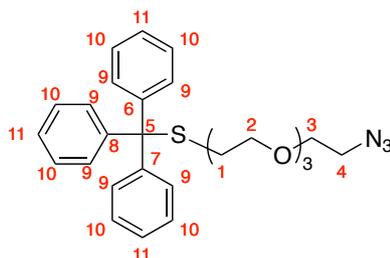
phase mobile éluante avec un gradient croissant en AcOEt de 20% à 50%. Après purification 23,57 mmol (8,794 g ; Rdt = 84%) d'une solution jaune sont obtenues.

Voie 2 : Dans un ballon de 250 mL, dissoudre 53,52 mmol (11,72 g ; 1 Eq) de composé **B2** dans 24 mL de THF anhydre et placer le mélange à 0°C dans un bain d'eau et de glace puis ajouter 250,69 mmol (5,07 g ; 4,7 Eq) de NaOH préalablement dissous dans 29 mL d'eau et enfin ajouter progressivement à l'aide d'une ampoule de coulée 74,93 mmol (14,30 g ; 1,4 Eq) de TsCl préalablement dissous dans 30 mL de THF anhydre. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation à 0°C pendant 2 heures puis les solvants organiques sont évaporés. La solution aqueuse est extraite quatre fois avec du DCM et les phases organiques sont alors combinées, séchées sur MgSO₄ anhydre et filtrées. Après évaporation des solvants 48,53 mmol (18,108 g ; Rdt = 91%) d'une solution jaune sont obtenues. Le produit ne nécessite pas de purification⁽²⁰⁷⁾⁽²⁰⁸⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,79 (dd, 2H, *J* = 8,3 Hz, H₆) ; 7,34 (dd, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₇) ; 4,42 (t, 2H, *J* = 5,0 Hz, H₁) ; 4,15 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₂) ; 3,54-3,74 (m, 12H, H₃, H₄) ; 3,38 (t, 2H, *J* = 8 Hz, H₄) ; 2,44 (s, 3H, H₉).

Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²⁰⁹⁾.

Synthèse du 13-azido-1,1,1-triphenyl-5,8,11-trioxa-2-thiatridecane B4

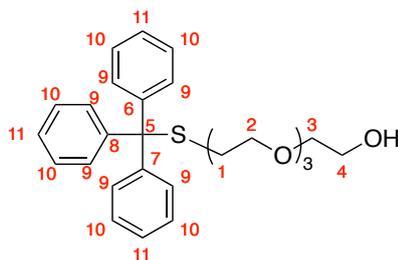


Dans un ballon de 250 mL, dissoudre 22,37 mmol (8,344 g ; 1 Eq) de composé **B3** dans 112 mL d'acétone anhydre puis ajouter 22,37 mmol (6,188 g ; 1 Eq) de triphénylméthanethiol ainsi que 22,37 mmol (3,353 g ; 1 Eq) d'iodure de sodium et 167,78 mmol (23,188 g ; 1 Eq) de carbonate de potassium. Laisser le milieu réactionnel sous agitation continue à température ambiante pendant 72 heures. Evaporer les solvants et reprendre le résidu dans un mélange eau/DCM puis extraire la phase aqueuse avec du DCM. Combiner les phases organiques et les laver avec une solution aqueuse Na₂S₂O₃ saturée puis avec une solution aqueuse de NaCl saturée. Sécher la phase organique sur MgSO₄ anhydre puis filtrer. Les solvants sont évaporés et 11,476 g de brut sous forme d'une solution huileuse jaune ocre sont ainsi obtenus. Le brut est alors purifié par flash-chromatographie en utilisant un mélange binaire EP/AcOEt : 80/20 comme phase mobile éluante. Après évaporation des solvants 16,83 mmol (8,035 g ; Rdt = 75%) d'un solide jaune sont obtenues⁽²¹⁰⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,39-7,44 (m, 6H, H₁₀) ; 7,25-7,31 (m, 6H, H₉) ; 7,18-7,23 (m, 3H, H₁₁) ; 3,61-3,68 (m, 6H, H₂, H₃) ; 3,57 (m, 2H, H₁) ; 3,45 (m, 2H, H₂) ; 3,37 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₄) ; 3,30 (t, 2H, *J* = 80 Hz, H₁) ; 2,42 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₁).

Les analyses RMN ^{13}C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²¹¹⁾.

Synthèse du 1,1,1-triphenyl-5,8,11-trioxa-2-thiatridecan-13-ol B4bis

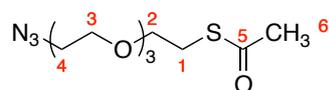


Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 5,75 mmol (2,000 g ; 1 Eq) de composé **B1** dans 29 mL d'acétone anhydre puis ajouter 17,25 mmol (4,768 g, 3 Eq) de triphénylméthanethiol. Après dissolution totale, ajouter 8,63 mmol (1,294 g ; 1,5 Eq) de NaI et 43,13 mmol (5,961 g ; 7,5 Eq) de K_2CO_3 . Le milieu est laissé sous agitation constante à température ambiante pendant 96 heures puis les solvants sont évaporés. Le résidu est repris 100 mL d'eau puis extrait avec du DCM. La phase organique est alors lavée avec une solution aqueuse $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ saturée puis avec une solution aqueuse NaCl saturée. La phase organique est alors séchée sur MgSO_4 anhydre et filtrée. Après évaporation des solvants, on obtient 5,8705 g de produit brut sous forme d'une huile épaisse jaune. Le brut est alors purifié par flash-chromatographie en utilisant un mélange binaire DCM/MeOH : 98/2 comme phase mobile éluante. Après évaporation des solvants 5,43 mmol (2,456 g ; Rdt = 95%) d'une solution huileuse jaune sont obtenues⁽²¹⁰⁾.

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 7,39-7,42 (m, 6H, H_{10}) ; 7,24-7,29 (m, 6H, H_9) ; 7,17-7,22 (m, 3H, H_{11}) ; 3,69 (m, 2H, H_4) ; 3,55-3,66 (m, 8H, H_2 , H_3) ; 3,43 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_2 , H_3) ; 3,28 (t, 2H, $J = 12,0$ Hz, H_2) ; 2,42 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_1).

Les analyses RMN ^{13}C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²¹²⁾.

Synthèse du S-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)ethanethioacetate B5

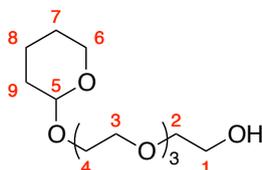


Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 2,68 mmol (1 g ; 1 Eq) de composé **B3** dans 15 mL d'éthanol absolu et placer le milieu réactionnel sous atmosphère inerte d'Argon puis ajouter 4,02 mmol (0,459 g, 1,5 Eq) de potassium thioacétate et chauffer à reflux sous agitation vigoureuse pendant 1 heure. Evaporer les solvants et reprendre le résidu dans 20 mL de solution aqueuse NaCl saturée et 20 mL de solution aqueuse NH_4Cl saturée puis extraire avec du DCM. La phase organique est alors séchée sur MgSO_4 anhydre et filtrée. Après évaporation des solvants, on obtient 2,60 mmol (0,783 g ; Rdt = 97%) de solution jaune ocre qui ne nécessite aucune étape de purification⁽²¹³⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,58-3,69 (m, 12H, H₃, H₄, H₂) ; 3,39 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₄) ; 3,08 (t, 2H, *J* = 12Hz, H₁) ; 2,33 (s, 3H, H₆).

Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²¹⁴⁾.

Synthèse du 2-(2-(2-(2-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethanol B7

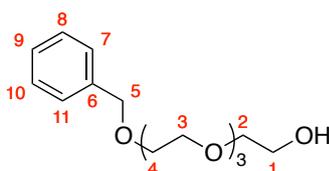


Dans un ballon de 250 mL, dissoudre 51,49 mmol (10 g ; 10 Eq) de tétraéthylène glycol dans 100 mL de DCM anhydre et placer le milieu à 0°C dans un bain d'eau et de glace puis ajouter goutte à goutte 5,66 mmol (0,52 mL ; 1,1 Eq) de dihydropyrane. Ajouter progressivement 1,03 mmol (0,178 g ; 0,2 Eq) d'acide paratoluène sulfonique. Laisser sous agitation à 0°C pendant 15 minutes puis le milieu est autorisé à revenir progressivement à température ambiante et l'agitation est maintenue pendant 24 heures. Laver par une solution aqueuse NaCl saturée jusqu'à disparition du PEG₄ de départ. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée. Les solvants sont évaporés et 4,11 mmol (1,1436 g ; Rdt = 73%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse incolore sont obtenues⁽²¹⁰⁾⁽²¹⁵⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4,64 (m, 1H, H₅) ; 3,87 (m, 2H, H₆) ; 3,60-3,74 (m, 16H, H₁, H₂, H₃, H₄) ; 3,49 (m, 1H, OH) ; 1,82 (m, 1H, H₉) ; 1,71 (m, 1H, H₉) ; 1,51 (m, 4H, H₇, H₈).

Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²¹⁶⁾.

Synthèse du 1-phenyl-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol B8



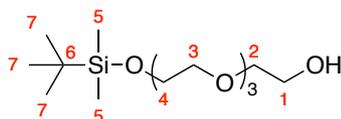
Dans un ballon tricol de 1 L, dissoudre 2,16 mol (420 g ; 1 Eq) de tétraéthylène glycol dans 48 mL d'eau et ajouter 0,93 mol (60 g ; 0,43 Eq) de KOH en poudre. Faire buller le milieu réactionnel sous flux d'Argon pendant 30 minutes puis maintenir le milieu réactionnel sous atmosphère inerte d'Argon. Chauffer à 110°C pendant 2 heures puis ajouter goutte à goutte 0,75 mol (88 mL ; 0,35 Eq) de bromure de benzyle et poursuivre l'agitation à 110°C et sous atmosphère inerte pendant 24 heures. Laisser le milieu revenir à température ambiante et ajouter 700 mL d'un mélange eau/glace. Extraire la phase aqueuse avec du cyclohexane pour éliminer le PEG₄ di-O-benzylé puis extraire la phase aqueuse avec du DCM pour isoler le produit d'intérêt. Cette phase organique est ensuite lavée par une solution aqueuse NaCl saturée afin d'éliminer le PEG₄ de départ. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée. Les solvants

sont évaporés et 0,247 mol (70,1445 g ; Rdt = 33%) d'une solution huileuse brune sont obtenues.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,27-7,33 (m, 5H, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁) ; 4,56 (s, 2H, H₅) ; 3,61-3,72 (m, 16H, H₁, H₂, H₃, H₄).

Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la référence⁽¹⁴⁶⁾.

Synthèse du 2,2,3,3-tetraméthyl-4,7,10,13-tetraoxa-3-silapentadecan-15-ol B9

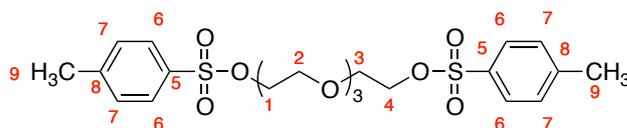


Dans un ballon de 500 mL, dissoudre 0,515 mol (100g ; 10 Eq) de tétraéthylène glycol dans 150 mL de THF anhydre et ajouter 0,077 mol (5,26 g ; 1,5 Eq) d'imidazole puis 0,077 mol (11,61 g ; 1,5 Eq) de chlorure de tertbutyldiméthylsilyle. Laisser sous agitation à température ambiante et sous atmosphère saturée en Argon pendant 12 heures. Evaporer les solvants et reprendre le résidu dans 300 mL de DCM et laver avec 200 mL de solution aqueuse NaCl saturée. Extraire trois fois la phase aqueuse avec 600 mL de DCM et évaporer les solvants. Reprendre le résidu dans 150 mL de DCM et laver trois fois la phase organique avec 300 mL de solution aqueuse NaCl saturée. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée. Les solvants sont évaporés et 68,11 mmol (21,014 g ; Rdt = 88%) d'une solution huileuse incolore sont obtenues⁽²¹⁷⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,80 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₄) ; 3,54-3,76 (m, 12H, H₂, H₃, H₄) ; 3,51 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₁) ; 0,84 (s, 9H, H₇) ; 0,05 (s, 6H, H₅).

Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²¹²⁾.

Synthèse du ((oxybis(ethane-2,1-diyl))bis(oxy))bis(ethane-2,1-diyl) bis(4-méthylbenzenesulfonate) B10



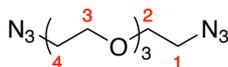
Dans un ballon de 2 L, dissoudre 579 mmol (112,5 g ; 1 Eq) de tétraéthylène glycol dans 1 L de DCM anhydre et ajouter 1505 mmol (211 mL ; 2,6 Eq) de triéthylamine. Placer le milieu à 0°C dans un bain d'eau et de glace et ajouter progressivement 1448 mmol (276 g ; 2,5 Eq) de chlorure de tosylate. Laisser sous agitation vigoureuse à 0°C pendant 30 minutes puis laisser le milieu revenir progressivement à température ambiante et maintenir l'agitation pendant 24 heures. Les solvants sont évaporés au ¾ et le résidu est filtré sur fritté recouvert de Célite puis évaporé à sec. Le résidu est repris dans 200 mL de DCM et lavé par une solution aqueuse NaHCO₃ saturée puis par une solution aqueuse NaCl saturée. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée. Les solvants sont alors évaporés et 576 mmol

(289,42 g ; Rdt= 99%) de produit sous forme d'une solution huileuse jaune orangée sont obtenues.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,79 (d, 4H, J = 8,0 Hz, H₆) ; 7,34 (d, 4H, J = 8,0 Hz, H₇) ; 5,30 (t, 4H, J = 8,0 Hz, H₁, H₄) ; 3,51-4,16 (m, 12H, H₂, H₃) ; 2,44 (s, 6H, H₉).

Le spectre ¹³C et l'analyse SMHR sont décrits dans la référence⁽¹⁴⁶⁾.

Synthèse du 1-azido-2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethane B11

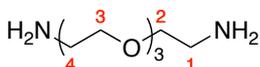


Dans un ballon de 250 mL, dissoudre 29,87 mmol (15 g ; 1 Eq) de composé **B10** dans 100 mL d'acétone anhydre et ajouter 150 mmol (9,71 g ; 5 Eq) de NaN₃ puis chauffer à reflux sous agitation continue pendant 48 heures. Le milieu est filtré sur Célite, les solvants sont évaporés et le produit brut est purifié par Combi-Flash avec un mélange binaire EP/AcOEt comme phase mobile éluante avec un gradient croissant en AcOEt de 0% à 100%. Après évaporation des solvants, on obtient 22,71 mmol (5,547 g ; Rdt = 76%) de produit sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,60-3,76 (m, 12H, H₂, H₃) ; 3,33 (t, 4H, J = 8,0 Hz, H₁, H₄).

Le spectre ¹³C et l'analyse SMHR sont décrits dans la référence⁽²¹⁸⁾.

Synthèse du 3,6,9,16,19,22-hexaoxa-12,13-dithiatetracosane-1,24-diamine B12

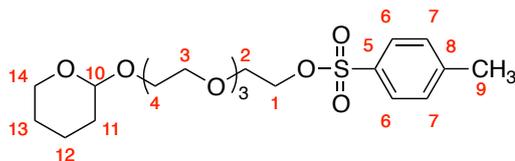


Dans un ballon de 500 mL, dissoudre 14,36 mmol (3,5079 g ; 1 Eq) de composé **B11** dans 70 mL de THF anhydre puis ajouter 30,16 mmol (7,911 g ; 2,1 Eq) de triphénylphosphine et laisser sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Ajouter 25 mL d'eau de qualité Milli-Q et laisser sous agitation à température ambiante pendant 24 heures supplémentaires. Evaporer les solvants et reprendre le résidu dans 200 mL d'eau Milli-Q. Filtrer le précipité sur Célite et laver avec 5X100 mL de toluène. Après décantation, séparer la phase organique et extraire la phase aqueuse avec 6X200 mL de DCM. Evaporer la phase aqueuse qui contient 10,28 mmol (1,975 g ; Rdt = 72%) de produit d'intérêt sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,60-3,76 (m, 12H, H₂, H₃) ; 2,86 (t, 4H, J = 8,0 Hz, H₁, H₄), 1,86 (s, 4H, NH₂).

Le spectre ¹³C et l'analyse SMHR sont décrits dans la référence⁽²¹⁸⁾.

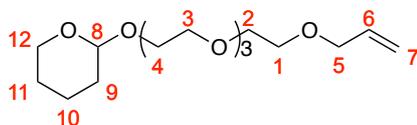
Synthèse du 2-(2-(2-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-méthylbenzenesulfonate B13



Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 14,35 mmol (5 g ; 1 Eq) de composé **B1** dans 50 mL de DCM anhydre et placer le milieu réactionnel sous atmosphère inerte d'Argon. Ajouter 21,53 mmol (1,98 mL ; 1,5 Eq) de dihydropyrane et 2,87 mmol (721 mg ; 0,2 Eq) de pyridinium toluène sulfonate. Chauffer à reflux pendant 12 heures, évaporer les solvants et reprendre le résidu dans 50 mL de DCM et laver la phase organique avec 20 mL d'eau puis 20 mL de solution aqueuse NaCl saturée. La phase organique est ensuite séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et les solvants sont évaporés. Obtention de 14,28 mmol (6,3894 g ; Rdt =99%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse ocre. Le brut sera utilisé sans étape de purification⁽¹⁴⁵⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,79 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₆) ; 7,34 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₇) ; 5,30 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₁) ; 4,64 (m, 1H, H₁₀) ; 3,87 (m, 2H, H₁₄) ; 3,51-4,16 (m, 12H, H₂, H₃, H₄) ; 2,44 (s, 3H, H₉) ; 1,82 (m, 1H, H₁₁) ; 1,71 (m, 1H, H₁₁) ; 1,51 (m, 4H, H₁₂, H₁₃). Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²¹⁹⁾.

Synthèse du 2-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-en-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran B14



Dans un ballon de 50 mL, dissoudre 12,94 mmol (518 mg ; 1,2 Eq) de NaH dans 5 mL de THF anhydre et faire buller sous Argon pendant 20 minutes puis, sous atmosphère inerte, ajouter goutte à goutte 10,78 mmol (3 g ; 1 Eq) de composé **B7** et laisser sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes puis ajouter goutte à goutte 10,78 mmol (0,93 mL ; 1 Eq) de bromure d'allyl et poursuivre l'agitation pendant 12 heures supplémentaires. Neutraliser le milieu par ajout précautionneux d'eau et extraire avec du DCM. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse NaCl saturée puis séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée. Enfin les solvants sont évaporés. Le produit brut sera purifié par Combi-Flash en utilisant le mélange binaire EP/AcOEt comme phase mobile éluante et en appliquant un gradient croissant en AcOEt⁽²²⁰⁾.

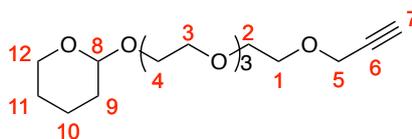
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 5,90 (m, 1H, H₆) ; 5,26 (dd, 1H, *J* = 16 Hz, 8 Hz, H₇) ; 5,17 (dd, 1H, *J* = 16 Hz, 8 Hz, H₇) ; 4,62 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, H₈) ; 4,02 (dt, 2H, *J* = 12 Hz, 6 Hz, 3 Hz, H₅) ; 3,83-3,88 (m, 2H, H₁₂) ; 3,58-3,71 (m, 16H, H₁, H₂, H₃, H₄) ; 1,71 (m, 1H, H₉) ; 1,59 (m, 1H, H₉) ; 1,51 (m, 4H, H₁₀, H₁₁).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : Analyse en cours.

SMHR (ESI) : 341,1939 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 2-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yloxy)tetrahydro-2H-pyran

B15



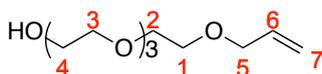
Dans un ballon de 50 mL, dissoudre 12,94 mmol (518 mg ; 1,2 Eq) de NaH dans 5 mL de THF anhydre et faire buller sous Argon pendant 20 minutes puis, sous atmosphère inerte, ajouter goutte à goutte 10,78 mmol (3 g ; 1 Eq) de composé **B7** et laisser sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes puis ajouter goutte à goutte 10,78 mmol (1,2 mL ; 1 Eq) de bromure de propargyl et poursuivre l'agitation pendant 12 heures supplémentaires. Neutraliser le milieu par ajout précautionneux d'eau et extraire avec du DCM. La phase organique est lavée avec une solution aqueuse NaCl saturée puis séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée. Enfin les solvants sont évaporés. Obtention de 10,23 mmol (3,237 g ; Rdt = 95%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune qui ne nécessite pas d'étape de purification⁽²²¹⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4,63 (t, 1H, *J* = 8,0 Hz, H₈) ; 4,20 (d, 2H, *J* = 4,0 Hz, H₅) ; 3,83-3,88 (m, 2H, H₁₂) ; 3,58-3,71 (m, 16H, H₁, H₂, H₃, H₄) ; 2,42 (t, 1H, *J* = 4 Hz, H₇) ; 1,71 (m, 1H, H₉) ; 1,59 (m, 1H, H₉) ; 1,51 (m, 4H, H₁₀, H₁₁).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 106,3 (s, 1C, C₈) ; 78,7 (s, 1C, C₆) ; 76,4 (s, 1C, C₇) ; 70,0 (m, 8C, C₁, C₂, C₃, C₄) ; 63,3 (s, 1C, C₁₂) ; 60,3 (s, 1C, C₅) ; 30,5 (s, 1C, C₉) ; 25,1 (s, 1C, C₁₁) ; 20,4 (s, 1C, C₁₀).

SMHR (ESI) : 339,1776 pour [M+Na]⁺

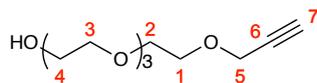
Synthèse du 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-en-1-ol B16



Dans un ballon bicol de 50 mL, dissoudre 15,79 mmol (632 mg ; 1,1 Eq) de NaH dans 3 mL de THF anhydre et faire buller sous Argon pendant 30 minutes puis, toujours sous atmosphère inerte, ajouter goutte à goutte 14,35 mmol (0,98 mL ; 1 Eq) d'alcool allylique et laisser sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. Ajouter goutte à goutte 14,35 mmol (5 g ; 1 Eq) du composé **B1** préalablement dissous dans 15 mL de THF anhydre. Laisser sous agitation à température ambiante et sous atmosphère inerte pendant 12 heures. La réaction est alors neutralisée par ajout précautionneux d'eau et le milieu réactionnel est extrait avec du DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et les solvants sont évaporés. Le produit brut est purifié par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire EP/AcOEt comme phase mobile éluante en utilisant un gradient croissant en AcOEt de 80% à 100%. Après évaporation des solvants, on obtient 11,47 mmol (2,685 g ; Rdt = 80%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse incolore⁽²²²⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 5,92 (m, 1H, H₆) ; 5,26 (dd, 1H, J = 16 Hz, 8 Hz, H₇) ; 5,16 (dd, 1H, J = 16 Hz, 8 Hz, H₇) ; 4,02 (m, 2H, H₅) ; 3,58-3,73 (m, 16H, H₁, H₂, H₃, H₄).
Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²²³⁾.

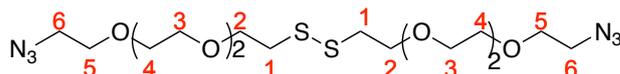
Synthèse du 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-ol B17



Dans un ballon bicol de 50 mL, dissoudre 15,79 mmol (632 mg ; 1,1 Eq) de NaH dans 5 mL de THF anhydre et faire buller sous Argon pendant 30 minutes puis, toujours sous atmosphère inerte, ajouter goutte à goutte 14,35 mmol (0,84 mL ; 1 Eq) d'alcool propargylique et laisser sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes. Ajouter goutte à goutte 14,35 mmol (5 g ; 1 Eq) du composé **B1** préalablement dissous dans 15 mL de THF anhydre. Laisser sous agitation à température ambiante et sous atmosphère inerte pendant 12 heures. Neutraliser le milieu réactionnel par ajout précautionneux d'eau et extraire avec du DCM. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ anhydre puis filtrée et les solvants sont évaporés. Le produit brut est purifié par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire DCM/MeOH comme phase mobile éluante avec un gradient croissant en MeOH de 0% à 10%. Obtention de 4,67 mmol (1,084 g ; Rdt = 33%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4,20 (d, 2H, J = 4,0 Hz, H₅) ; 3,58-3,71 (m, 16H, H₁, H₂, H₃, H₄) ; 2,42 (t, 1H, J = 4 Hz, H₇).
Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²²⁴⁾⁽²²⁵⁾.

Synthèse du 1,24-diazido-3,6,9,16,19,22-hexaoxa-12,13-dithiatetracosane L1bis

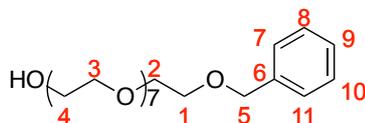


Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 3,41 mmol (0,945 g ; 1 Eq) de composé **B5** dans 21 mL de MeOH anhydre et ajouter 6,82 mmol (0,368 g ; 2 Eq) de méthanoate de sodium et laisser sous agitation à température ambiante pendant 2 heures puis ajouter 0,51 mL de DMSO. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 20 heures supplémentaires. Neutraliser le milieu réactionnel par ajout de résine Amberlyst®15 jusqu'à l'obtention d'un pH neutre. Le milieu est alors filtré sur Célite et les solvants sont évaporés. Obtention de 1,649 g de produit brut sous forme d'un solide orangé. Le brut est alors purifié par flash-chromatographie en utilisant un mélange binaire DCM/MeOH comme phase mobile éluante, avec un gradient croissant en MeOH de 0% à 5%. Obtention de 3,11 mmol (1,456 g ; Rdt = 91%) d'une solution huileuse jaune⁽²²⁶⁾.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,58-3,69 (m, 24H, H₂, H₃, H₄, H₅) ; 3,39 (t, 4H, J = 8,0 Hz, H₆) ; 3,08 (t, 4H, J = 12Hz, H₁). Les analyses RMN ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²²⁶⁾.

II-2 ÉLONGATION DU BRAS ESPACEUR VIA DES PONTS ÉTHERS

Synthèse du 1-phenyl-2,5,8,11,14,17,20,23-octaoxapentacosan-25-ol B19



Dans un ballon de 50 mL dont l'atmosphère est saturée en Argon inerte, dissoudre 1,169 mmol (432,9 mg ; 1 Eq) de composé 35 dans 12 mL de DCM anhydre et placer le milieu réactionnel à 0°C dans un bain d'eau et de glace. Ajouter 0,234 mmol (39 mg ; 0,2 Eq) de KI et 1,753 mmol (403 mg ; 1,5 Eq) de Ag₂O. Laisser sous agitation à 0°C pendant 10 minutes puis ajouter goutte à goutte 1,286 mmol (0,153 mL ; 1,1 Eq) de bromure de benzyle. Le milieu est alors autorisé à revenir progressivement à température ambiante et l'agitation est poursuivie pendant 3 heures supplémentaires. Le milieu réactionnel est alors filtré sur fritté recouvert de Célite et lavé à deux reprise avec 50 mL de DCM. Les solvants sont évaporés et le produit brut est purifié par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire DCM/MeOH comme phase mobile éluante avec un gradient croissant en MeOH de 0% à 10%. Cette purification permet l'obtention de deux fractions : F1 (98 mg) qui se présente sous la forme d'une solution huileuse incolore et qui correspond au dérivé dibenzylé et F2 (0,59 mmol ; 272 mg ; Rdt = 66%) qui est également une solution huileuse incolore et qui correspond au produit monobenzylé d'intérêt.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,27-7,33 (m, 5H, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁) ; 4,56 (s, 2H, H₅) ; 3,61-3,72 (m, 32H, H₁, H₂, H₃, H₄).

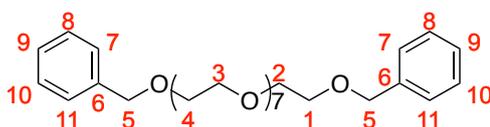
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 137,5 (s, 1C, C₆) ; 128,6 (s, 2C, C₈, C₁₀) ; 127,8 (s, 1C, C₉) ; 127,4 (s, 2C, C₇, C₁₁) ; 73,0 (s, 1C, C₅) ; 70,2 (s, 15C, C₁, C₂, C₃, C₄) ; 61,3 (s, 1C, C₄).

SMHR (ESI) : 483,2555 pour [M+Na]⁺

II-2-1 CONDENSATION DES UNITES PEG DEUX A DEUX : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Dans un ballon tricol préalablement flushé à l'Argon à trois reprises, dissoudre 1 Eq de composé éthylène glycol mono O-benzylé (HO-PEG_n-OBn) dans du dioxane anhydre puis faire buller le milieu sous Argon pendant 30 minutes en chauffant à 130°C. Ajouter 5 Eq de KOH et maintenir une agitation vigoureuse à 130°C et sous atmosphère saturée en Argon pendant 3 heures. Arrêter le chauffage, laisser le milieu tiédir et ajouter goutte à goutte à l'aide d'une ampoule de coulée 0,55 Eq de chlorure de tosylé préalablement dissous dans du dioxane anhydre. Reprendre le chauffage à 130°C et poursuivre l'agitation sous atmosphère inerte pendant 72 heures. Le milieu réactionnel est alors filtré sur fritté recouvert de Céelite et les solvants sont évaporés. Le résidu est alors repris dans 75 mL de DCM et la phase organique est lavée à deux reprises avec 60 mL de solution aqueuse NaCl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et les solvants sont évaporés⁽¹⁴⁶⁾.

Synthèse du 1,27-diphenyl-2,5,8,11,14,17,20,23,26-nonaoxaheptacosane B20



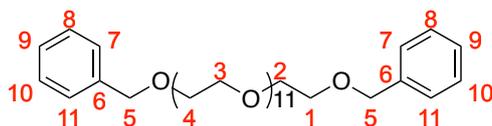
Obtention d'une solution huileuse jaune (Rdt = 95%)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,27-7,33 (m, 10H, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁) ; 4,56 (s, 4H, H₅) ; 3,61-3,72 (m, 32H, H₁, H₂, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 137,5 (s, 2C, C₆) ; 128,6 (s, 4C, C₈, C₁₀) ; 127,8 (s, 2C, C₉) ; 127,4 (s, 4C, C₇, C₁₁) ; 73,0 (s, 2C, C₅) ; 70,2 (m, 16C, C₁, C₂, C₃, C₄).

SMHR (ESI) :

Synthèse du 1,39-diphenyl-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38-tridecaoxanonatriacontane B18



Dans un ballon tricol de 250 mL préalablement flushé à l'argon à trois reprises, dissoudre 17,59 mmol (5 g ; 1 Eq) de composé **B8** dans 13 mL de dioxane anhydre et faire buller sous Argon pendant 30 minutes. Ajouter 87,98 mmol (5,68 g ; 5 Eq) de KOH et chauffer à 130°C pendant 3 heures sous atmosphère rigoureusement inerte. Ajouter goutte à goutte 8,80 mmol (4,419 g ; 0,5 Eq) de composé **B10** préalablement dissous dans 18 mL de dioxane. Puis diluer le milieu par ajout de 40 mL de dioxane

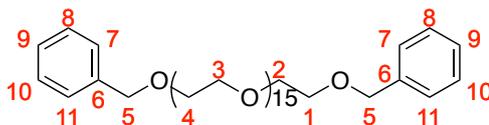
supplémentaires. Laisser sous agitation à 130°C pendant 48 heures puis filtrer sur fritté recouvert de Célite et laver deux fois le fritté avec 150 mL de DCM. Evaporer les solvants et reprendre le résidu dans 100 mL de DCM et laver deux fois la phase organique avec 80 mL de solution aqueuse NaCl saturée. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ anhydre puis filtrée et les solvants sont évaporés. Obtention de 5,359 g de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune. Le produit brut va être purifié par flash-chromatographie en utilisant un mélange ternaire AcOEt/MeOH/NH₄OH. L'étape de purification permet l'obtention de deux fractions F1 et F2. La fraction F1 correspond au composé BnO-PEG₄-OBn (1,983 g) sous forme d'une solution huileuse jaune pâle et la fraction F2 correspond au composé BnO-PEG₁₂-OBn d'intérêt, également sous forme d'une solution huileuse jaune pâle (2,76 mmol ; 2,005 g ; Rdt = 31%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,27-7,33 (m, 10H, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁) ; 4,56 (s, 4H, H₅) ; 3,61-3,72 (m, 48H, H₁, H₂, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 137,5 (s, 2C, C₆) ; 128,6 (s, 4C, C₈, C₁₀) ; 127,8 (s, 2C, C₉) ; 127,4 (s, 4C, C₇, C₁₁) ; 73,0 (s, 2C, C₅) ; 70,2 (m, 24C, C₁, C₂, C₃, C₄).

SMHR (ESI) :

Synthèse du 1,51-diphenyl-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35,38,41,44,47,50-heptadecaohexapentacontane B21



Obtention d'une solution huileuse jaune (Rdt = 95%)

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,27-7,33 (m, 10H, H₇, H₈, H₉, H₁₀, H₁₁) ; 4,56 (s, 4H, H₅) ; 3,61-3,72 (m, 64H, H₁, H₂, H₃, H₄).

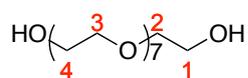
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 137,5 (s, 2C, C₆) ; 128,6 (s, 4C, C₈, C₁₀) ; 127,8 (s, 2C, C₉) ; 127,4 (s, 4C, C₇, C₁₁) ; 73,0 (s, 2C, C₅) ; 70,2 (m, 32C, C₁, C₂, C₃, C₄).

SMHR (ESI) : 925,5151 pour [M+Na]⁺

II-2-2 DÉPROTECTION DU GROUPEMENT O-BENZYL : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Dans un ballon bicol préalablement saturé en atmosphère inerte d'Argon, dissoudre 1 Eq de composé éthylène glycol di O-benzylé (BnO-PEG_n-OBn) dans du DCM anhydre et ajouter 0,1 Eq de Palladium sur charbon à 10% (m/m) et agiter. Remplacer le flux d'Argon par un flux de H₂ et saturer l'atmosphère du milieu réactionnel. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 12 heures. Remettre le milieu sous Argon par échange H₂/Argon et filtrer le mélange sur fritté recouvert de Céélite. Laver à deux reprises le fritté avec 30 mL de DCM et évaporer les solvants. Le produit brut se présente sous la forme d'une solution huileuse incolore et ne nécessite aucune purification additionnelle⁽²²⁷⁾⁽²²⁸⁾.

Synthèse du 3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosane-1,23-diol B23



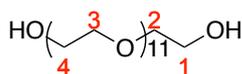
Obtention d'une solution huileuse incolore (Rdt = 99%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,51-3,67 (m, 32H, H₁, H₂, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 70,2 (m, 16C, C₁, C₂, C₃, C₄).

SMHR (ESI) : 393,2094 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaopentatriacontane-1,35-diol B22



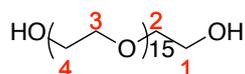
Obtention d'une solution huileuse incolore (Rdt = 97%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,51-3,67 (m, 48H, H₁, H₂, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 70,2 (m, 24C, C₁, C₂, C₃, C₄).

SMHR (ESI) : 547,3316 pour [M+H]⁺

Synthèse du 3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-pentadecaohaheptatetracontane-1,47-diol B24



Obtention d'une solution huileuse incolore (Rdt = 97%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,56-3,72 (m, 64H, H₁, H₂, H₃, H₄).

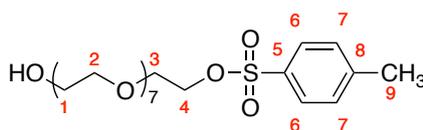
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 70,2 (m, 32C, C₁, C₂, C₃, C₄).

SMHR (ESI) : 745,4199 pour [M+Na]⁺

II-2-3 MONOTOSYLATION RÉGIOSÉLECTIVE : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Dans un ballon dont l'atmosphère a été préalablement saturée en Argon inerte, dissoudre 1 Eq de composé éthylène glycol diol (HO-PEG_n-OH) dans du DCM anhydre et placer le milieu réactionnel à 0°C dans un bain d'eau et de glace puis ajouter 0,2 Eq de KI et 1,5 Eq de Ag₂O. Après 10 minutes d'agitation à 0°C sous atmosphère inerte, ajouter goutte à goutte 1,1 Eq de chlorure de tosylate. Le milieu est alors autorisé à revenir progressivement à température ambiante et l'agitation est poursuivie pendant 8 heures. Le milieu réactionnel est filtré sur fritté recouvert de Célite et le fritté est lavé à deux reprises avec 30 mL de DCM. Les solvants sont évaporés. Obtention d'un produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune qui ne nécessite aucune étape supplémentaire de purification⁽¹⁴⁷⁾.

Synthèse du 23-hydroxy-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosyl 4-méthylbenzenesulfonate B25



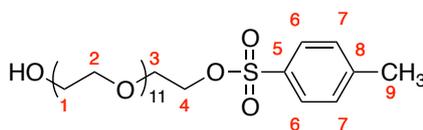
Obtention d'une solution huileuse jaune pâle (Rdt = 95%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,78 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H₆) ; 7,34 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H₇) ; 4,14 (t, 2H, J = 8,0 Hz, H₄) ; 3,57-3,76 (m, 30H, H₁, H₂, H₃) ; 2,44 (s, 3H, H₉).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 144,4 (s, 1C, C₅); 140,3 (s, 1C, C₈); 130,5 (s, 2C, C₇); 128,3 (s, 2C, C₆); 70,4 (m, 14C, C₁, C₂, C₃); 67,6 (s, 1C, C₄); 61,3 (s, 1C, C₁); 21,3 (s, 1C, C₉).

SMHR (ESI) : 547,2181 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 35-hydroxy-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaopentatriacontyl 4-méthylbenzenesulfonate B26



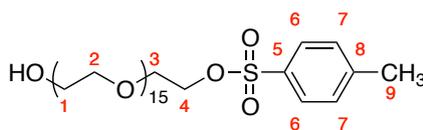
Obtention d'une solution huileuse jaune pâle (Rdt = 97%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,78 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H₆) ; 7,34 (d, 2H, J = 8,0 Hz, H₇) ; 4,14 (t, 2H, J = 8,0 Hz, H₄) ; 3,59-3,75 (m, 46H, H₁, H₂, H₃) ; 2,44 (s, 3H, H₉).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 144,4 (s, 1C, C₅); 140,3 (s, 1C, C₈); 130,5 (s, 2C, C₇); 128,3 (s, 2C, C₆); 70,4 (m, 22C, C₁, C₂, C₃); 67,6 (s, 1C, C₄); 61,3 (s, 1C, C₁); 21,3 (s, 1C, C₉).

SMHR (ESI):

Synthèse du 47-hydroxy-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-pentadecaoxaheptatetracontyl 4-methylbenzenesulfonate B27



Obtention d'une solution huileuse jaune pâle (Rdt = 66%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,78 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₆) ; 7,34 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₇) ; 4,14 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₄) ; 3,59-3,75 (m, 62H, H₁, H₂, H₃) ; 2,44 (s, 3H, H₉).

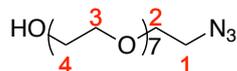
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 144,4 (s, 1C, C₅); 140,3 (s, 1C, C₈); 130,5 (s, 2C, C₇); 128,3 (s, 2C, C₆); 70,4 (m, 30C, C₁, C₂, C₃); 67,6 (s, 1C, C₄); 61,3 (s, 1C, C₁); 21,3 (s, 1C, C₉).

SMHR (ESI) : 899,4334 pour [M+Na]⁺

II-2-4 AZIDATION DU BRAS PEGYLÉ : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Dissoudre 1 Eq de composé éthylène glycol monotosylé (TsO-PEG_n-OH) dans de l'acétone anhydre et ajouter 5 Eq de NaN₃ puis chauffer à reflux sous agitation vigoureuse pendant 48 heures. Filtrer le milieu réactionnel sur un fritté recouvert de Célite et laver à trois reprise le fritté avec 50 mL d'acétone. Evaporer les solvants. Obtention d'un produit brut qui se présente sous la forme d'une solution huileuse jaune pâle et qui ne nécessite pas de purification ultérieure.

Synthèse du 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosan-1-ol B28



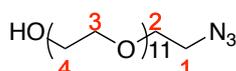
Obtention d'une solution huileuse jaune pâle (Rdt = 82%).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 3,59-3,72 (m, 30H, H₂, H₃, H₄) ; 3,38 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₁).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm): 70,2 (m, 14C, C₂, C₃, C₄); 61,3 (s, 1C, C₄); 50,0 (s, 1C, C₁).

SMHR (ESI) : 418,2170 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 35-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undecaoxapentatriacontan-1-ol B29



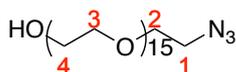
Obtention d'une solution huileuse jaune pâle (Rdt = 88%).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 3,59-3,72 (m, 46H, H_2 , H_3 , H_4) ; 3,38 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_1).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 70,2 (m, 22C, C_2 , C_3 , C_4); 61,3 (s, 1C, C_4); 50,0 (s, 1C, C_1).

SMHR (ESI) : 594,3215 pour $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Synthèse de 47-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-pentadecaoxaheptatetracontan-1-ol B30



Obtention d'une solution huileuse jaune pâle (Rdt = 94%).

RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 , δ ppm) : 3,59-3,72 (m, 62H, H_2 , H_3 , H_4) ; 3,38 (t, 2H, $J = 8,0$ Hz, H_1).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3 , δ ppm): 70,2 (m, 30C, C_2 , C_3 , C_4); 61,3 (s, 1C, C_4); 50,0 (s, 1C, C_1).

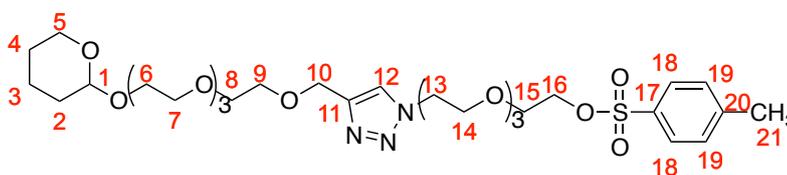
SMHR (ESI) : 770,4269 pour $[\text{M}+\text{Na}]^+$

II-3 ÉLONGATION DU BRAS ESPACEUR VIA DES PONTS TRIAZOLES

II-3-1 CLICK-CHEMISTRY DES BRAS ESPACEURS : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Dans un ballon dont l'atmosphère a été préalablement saturée en Argon inerte, dissoudre 1 Eq de composé éthylène glycol azidé **B3** ainsi que 1 Eq de composé éthylène glycol propargylé **B15** dans un mélange binaire $\text{tBuOH}/\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q en proportion 1/1 et faire buller sous flux d'Argon pendant 40 minutes. Toujours sous atmosphère inerte, ajouter 0,25 Eq de sulfate de cuivre II (CuSO_4) et 0,3 Eq d'ascorbate de sodium. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 8 heures. Ajouter une solution aqueuse EDTA saturée et poursuivre l'agitation pendant 60 minutes supplémentaires. Extraire à trois reprises le milieu réactionnel avec du DCM. La phase organique résultante est alors séchée sur MgSO_4 anhydre et filtrée. Les solvants sont évaporés ce qui permet l'obtention d'un produit brut ne nécessitant pas de purification additionnelle⁽²²⁹⁾⁽²²⁶⁾.

Synthèse du 2-(2-(2-(2-(4-(13-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate B31



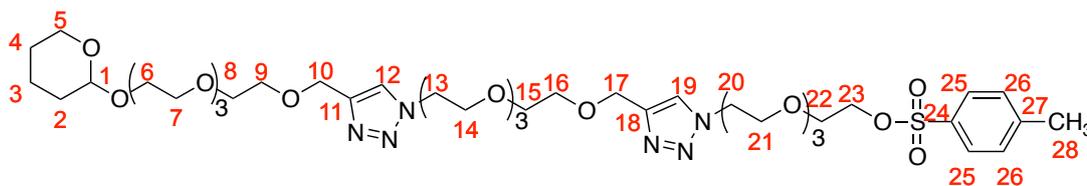
A partir de 17,38 mmol (3,810 g ; 1 Eq) de composé éthylène glycol azidé **B3** et de 17,38 mmol (5,499 g ; 1 Eq) de composé éthylène glycol propargylé **B15** dans 50 mL d'un mélange tBuOH/H₂O Milli-Q. Addition de 4,345 mmol (693 mg ; 0,25 Eq) de CuSO₄ et de 5,214 mmol (1,033 mg ; 0,3 Eq) d'ascorbate de sodium. Obtention de 17,073 mmol (9,14 g ; Rdt = 98%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,77 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₁₈) ; 7,72 (s, 1H, H₁₂) ; 7,32 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₁₉) ; 4,65 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₁₀) ; 4,60 (m, 1H, H₁) ; 4,51 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₁₃) ; 3,83 (m, 4H, H₅, H₁₆) ; 3,54-3,68 (m, 28H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₄, H₁₅) ; 2,44 (s, 3H, H₂₁) ; 1,70 (m, 1H, H₂) ; 1,58 (m, 1H, H₂) ; 1,51 (m, 4H, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 147,4 (1C, C₁₇) ; 145,0 (1C, C₁₁) ; 133,0 (1C, C₂₀) ; 129,5 (4C, C₁₈, C₁₉) ; 99,1 (1C, C₁) ; 69,5-70,9 (17C, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₃, C₁₄, C₁₅) ; 67,6 (1C, C₁₆) ; 50,4 (1C, C₁₃) ; 30,5 (1C, C₂) ; 25,5 (1C, C₃) ; 21,3 (1C, C₂₁) ; 19,7 (1C, C₄).

SMHR (ESI) : 712,3110 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 2-(2-(2-(2-(4-((2-(2-(2-(4-(13-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethyl 4-methylbenzenesulfonate B32



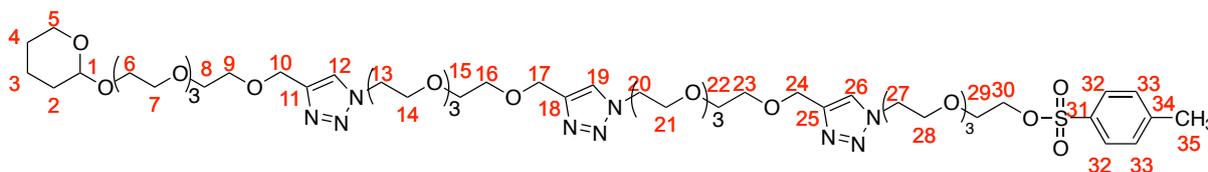
A partir de 1,451 mmol (541 mg ; 1 Eq) de composé éthylène glycol azidé **B3** et de 1,451 mmol (831,9 mg ; 1 Eq) de composé éthylène glycol propargylé **B34** dans 3 mL d'un mélange tBuOH/H₂O Milli-Q. Obtention de 8,32 mmol (5,789 g ; Rdt = 99%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,76 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₂₅) ; 7,73 (s, 1H, H₁₂) ; 7,73 (s, 1H, H₁₉) ; 7,32 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₂₆) ; 4,65 (t, 4H, *J* = 8,0 Hz, H₁₀, H₁₇) ; 4,60 (m, 1H, H₁) ; 4,51 (t, 4H, *J* = 8,0 Hz, H₁₃, H₂₀) ; 3,83 (m, 4H, H₅, H₂₃) ; 3,54-3,68 (m, 42H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₂₁, H₂₂) ; 2,44 (s, 3H, H₂₈) ; 1,70 (m, 1H, H₂) ; 1,58 (m, 1H, H₂) ; 1,51 (m, 4H, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 147,4 (1C, C₂₄) ; 145,0 (2C, C₁₁, C₁₈) ; 133,0 (1C, C₂₇) ; 129,5 (4C, C₂₅, C₂₆) ; 99,1 (1C, C₁) ; 69,5-70,9 (24C, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₂₀, C₂₁, C₂₂) ; 67,6 (1C, C₂₃) ; 50,4 (2C, C₁₃, C₂₀) ; 30,5 (1C, C₂) ; 25,5 (1C, C₃) ; 21,3 (1C, C₂₈) ; 19,7 (1C, C₄).

SMHR (ESI) : 969,4485 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 2-(2-(2-(2-(4-(13-(4-(13-(4-(13-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl benzenesulfonate B33



A partir de 5,109 mmol (4,243 g ; 1 Eq) de composé éthylène glycol propargylé **B35** et de 5,109 mmol (1,906 g ; 1 Eq) de composé **B3** dans 8 mL de tBuOH/H₂O Milli-Q. Addition de 1,277 mmol (319 mg, 0,25 Eq) de CuSO₄ et de 1,533 mmol (304 mg ; 0,3 Eq) d'ascorbate de sodium. Obtention de 5,007 mmol (5,806 g ; Rdt = 98%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,76 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₃₂) ; 7,73 (s, 1H, H₁₂) ; 7,73 (s, 1H, H₁₉) ; 7,73 (s, 1H, H₂₆) ; 7,32 (d, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₃₃) ; 4,63 (t, 4H, *J* = 8,0 Hz, H₁₀, H₁₇) ; 4,60 (m, 1H, H₁) ; 4,51 (t, 4H, *J* = 8,0 Hz, H₁₃, H₂₀) ; 4,13 (t, 2H, *J* = 8,0 Hz, H₂₄) ; 3,83 (m, 6H, H₅, H₂₇, H₃₀) ; 3,54-3,68 (m, 68H, H₆, H₇, H₈, H₉, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₈, H₂₉) ; 2,44 (s, 3H, H₃₅) ; 1,70 (m, 1H, H₂) ; 1,58 (m, 1H, H₂) ; 1,51 (m, 4H, H₃, H₄).

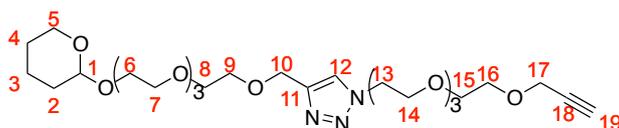
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 147,4 (1C, C₃₁) ; 145,0 (3C, C₁₁, C₁₈, C₂₅) ; 133,0 (1C, C₃₄) ; 129,5 (4C, C₃₂, C₃₃) ; 99,1 (1C, C₁) ; 69,5-70,9 (32C, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₄, C₂₇, C₂₈, C₂₉) ; 67,6 (1C, C₃₀) ; 50,4 (3C, C₁₃, C₂₀, C₂₇) ; 30,5 (1C, C₂) ; 25,5 (1C, C₃) ; 21,3 (1C, C₃₅) ; 19,7 (1C, C₄).

SMHR (ESI) : 1226,5847 pour [M+Na]⁺

II-3-2 PROPARGYLATION DES BRAS ESPACEURS TOSYLÉS : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Dans un ballon saturé en atmosphère inerte d'Argon, dissoudre 1,7 Eq de NaH dans du THF anhydre et faire buller sous flux d'Argon pendant 30 minutes. Toujours sous atmosphère inerte, ajouter goutte à goutte 1,5 Eq d'alcool propargylique et laisser sous agitation à température ambiante pendant 60 minutes. Ajouter goutte à goutte 1Eq de composé éthylène glycol tosylé préalablement dissous dans du THF anhydre. Poursuivre l'agitation à température ambiante et sous atmosphère d'Argon pendant 12 heures supplémentaires. Le milieu réactionnel est alors neutralisé par ajout précautionneux d'eau et extrait à trois reprises avec du DCM. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et les solvants sont évaporés. Obtention d'un produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune qui ne nécessite pas de purification.

Synthèse du 1-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl)-4-(13-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazole B34



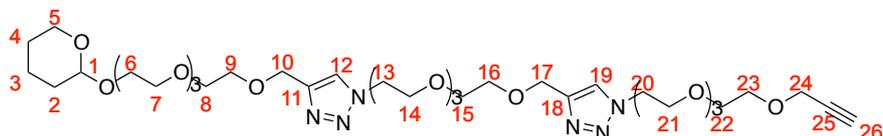
A partir de 27,59 mmol (1,104 g ; 1,7 Eq) de NaH dissous dans 10 mL de THF anhydre sur lequel est ajouté 16,23 mmol (11,187 g ; 1 Eq) de composé éthylène glycol tosylé **B31** dissous dans 10 mL de THF anhydre puis 24,34 mmol (1,42 mL ; 1,5 Eq) d'alcool propargylique. Obtention de 13,384 mmol (7,6734g ; Rdt = 82%) de produit sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,73 (s, 1H, H₁₂) ; 4,64 (m, 2H, H₁₀) ; 4,60 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H₁) ; 4,51 (dd, 2H, J = 8,0 Hz, H₉) ; 3,83 (m, 2H, H₁₃) ; 3,56-3,67 (m, 30H, H₅, H₇, H₈, H₉) ; 2,42 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H₁₉) ; 1,77-1,82 (m, 1H, H₂) ; 1,65-1,72 (m, 1H, H₂) ; 1,47-1,58 (m, 4H, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 144,9 (1C, C₁₁) ; 123,9 (1C, C₁₂) ; 99,0 (1C, C₁) ; 78,7 (1C, C₁₈), 76,8 (1C, C₁₉) ; 69,5-70,8 (14C, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₀, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇) ; 64,6 (1C, C₄) ; 50,7 (1C, C₁₄) ; 50,2 (1C, C₁₃) ; 30,6 (1C, C₂) ; 25,5 (1C, C₄) ; 19,6 (1C, C₃).

SMHR (ESI) : 596,3174 pour [M+Na]⁺

Synthèse de 1-(1-(1-(3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-4-(13-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazole B35



A partir de 12,68 mmol (507 mg ; 1,7 Eq) de NaH dissous dans 5 mL de THF anhydre sur lequel est ajouté 10,78 mmol (0,63 mL ; 1,5 Eq) d'alcool propargylique puis 6,34 mmol (6 g ; 1 Eq) de composé éthylène glycol tosylé **B32** préalablement dissous dans 15 mL de THF anhydre. Obtention de 5,11 mmol (4,2432 g ; Rdt = 81%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,73 (m, 2H, H₁₂, H₁₉) ; 4,66 (s, 4H, H₁₀, H₁₇) ; 4,62 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H₁) ; 4,51 (dd, 4H, J = 8,0 Hz, H₉, H₁₆) ; 3,83 (m, 6H, H₁₃, H₂₀) ; 3,56-3,67 (m, 42H, H₅, H₆, H₇, H₈, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₂₁, H₂₂) ; 2,42 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H₂₆) ; 1,77-1,82 (m, 1H, H₂) ; 1,65-1,72 (m, 1H, H₂) ; 1,47-1,58 (m, 4H, H₃, H₄).

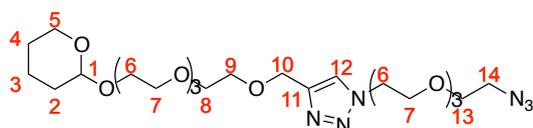
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 145,0 (2C, C₁₂, C₁₉) ; 123,9 (2C, C₁₁, C₁₈) ; 99,0 (1C, C₁) ; 78,7 (1C, C₂₅), 76,8 (1C, C₂₆) ; 69,5-70,8 (25C, C₅, C₆, C₇, C₈, C₉) ; 64,6 (1C, C₄) ; 50,7 (2C, C₁₃, C₂₀) ; 30,6 (1C, C₂) ; 25,5 (1C, C₄) ; 19,6 (1C, C₃).

SMHR (ESI) : 853,4530 pour [M+Na]⁺

II-3-3 AZIDATION DES BRAS ESPACEURS TOSYLÉS : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Dissoudre 1 Eq de composé éthylène glycol tosylé dans de l'acétone anhydre et ajouter 8 Eq de NaN₃ puis chauffer à reflux pendant 48 heures. Filtrer le milieu réactionnel sur fritté recouvert de Cérite et laver à trois reprises avec 60 mL d'acétone puis évaporer les solvants. Le résidu est alors repris dans 100 mL de DCM et lavé à deux reprises avec 60 mL de solution aqueuse NaCl saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre puis filtrée et les solvants sont évaporés. Obtention d'un produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

Synthèse du 1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(13-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazole B36



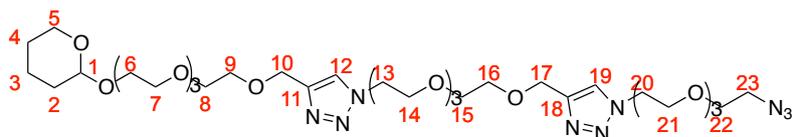
A partir de 8,40 mmol (5,789 g ; 1 Eq) de composé éthylène glycol tosylé [B31](#) et de 72 mmol (4,68 g ; 8 Eq) de NaN₃ dans 20 mL d'acétone anhydre. Purification par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire DCM/MeOH avec un gradient croissant en MeOH de 0% à 10%. Obtention de 3,99 mmol (2,234 g ; Rdt = 47%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,73 (s, 1H, H₁₂) ; 4,64 (m, 2H, H₁₀) ; 4,60 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H₁) ; 4,51 (dd, 2H, J = 8,0 Hz, H₉) ; 3,83 (m, 2H, H₆) ; 3,56-3,67 (m, 30H, H₅, H₇, H₈, H₉) ; 3,36 (t, 2H, J = 8,0 Hz, H₁₄) ; 1,77-1,82 (m, 1H, H₂) ; 1,65-1,72 (m, 1H, H₂) ; 1,47-1,58 (m, 4H, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 144,9 (1C, C₁₁) ; 123,9 (1C, C₁₂) ; 99,0 (1C, C₁) ; 69,5-70,8 (14C, C₆, C₇, C₈, C₉) ; 64,6 (1C, C₄) ; 50,7 (1C, C₁₄) ; 50,2 (1C, C₁₃) ; 30,6 (1C, C₂) ; 25,5 (1C, C₄) ; 19,6 (1C, C₃).

SMHR (ESI) : 561,3246 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(13-(4-(13-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazole B37



A partir de 4,23 mmol (4 g ; 1Eq) de composé éthylène glycol tosylé [B32](#) en présence de 33,81 mmol (2,198 g ; 8 Eq) de NaN₃ dissous dans 100 mL d'acétone

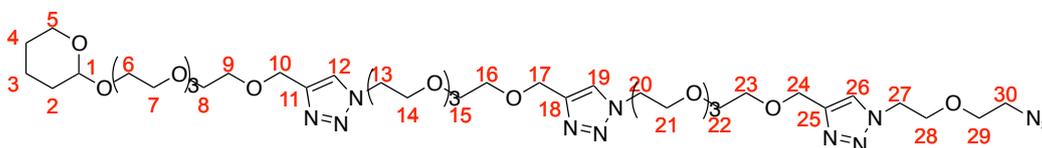
anhydre. Obtention de 4,29 mmol (3,507 g ; Rdt = 100%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune qui ne nécessite pas de purification.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,73 (m, 2H, H₁₂, H₁₉) ; 4,64 (m, 4H, H₁₀, H₁₇) ; 4,60 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H₁) ; 4,51 (dd, 4H, J = 8,0 Hz, H₉, H₁₆) ; 3,83 (m, 4H, H₁₃, H₂₀) ; 3,56-3,67 (m, 40H, H₅, H₆, H₇, H₈, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₈, H₂₉) ; 3,36 (t, 2H, J = 8,0 Hz, H₂₃) ; 1,77-1,82 (m, 1H, H₂) ; 1,65-1,72 (m, 1H, H₂) ; 1,47-1,58 (m, 4H, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 144,9 (2C, C₁₁, C₁₈) ; 123,9 (2C, C₁₂, C₁₉) ; 99,0 (1C, C₁) ; 69,5-70,8 (21C, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₂₁, C₂₂) ; 64,6 (1C, C₄) ; 50,7 (1C, C₂₃) ; 50,2 (2C, C₁₃, C₂₀) ; 30,6 (1C, C₂) ; 25,5 (1C, C₄) ; 19,6 (1C, C₃).

SMHR (ESI) : 840,4452 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-4-(13-(4-(13-(4-(13-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazole B38



A partir de 5, 466 mmol (6, 338 g ; 1 Eq) de composé éthylène glycol **B33** en présence de 43,73 mmol (2,84 g ; 8 Eq) de NaN₃ dissous dans mL d'acétone anhydre. Obtention de 4,467 mmol (4,6034 g ; Rdt = 82%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune qui ne nécessite pas de purification.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,73 (m, 3H, H₁₂, H₁₉, H₂₆) ; 4,64 (m, 6H, H₁₀, H₁₇, H₂₄) ; 4,60 (t, 1H, J = 8,0 Hz, H₁) ; 4,51 (dd, 6H, J = 8,0 Hz, H₉, H₁₆, H₂₃) ; 3,83 (m, 6H, H₁₃, H₂₀, H₂₇) ; 3,56-3,67 (m, 56H, H₅, H₆, H₇, H₈, H₁₄, H₁₅, H₁₆, H₂₁, H₂₂, H₂₃, H₂₈, H₂₉) ; 3,36 (t, 2H, J = 8,0 Hz, H₃₀) ; 1,77-1,82 (m, 1H, H₂) ; 1,65-1,72 (m, 1H, H₂) ; 1,47-1,58 (m, 4H, H₃, H₄).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 144,9 (3C, C₁₁, C₁₈, C₂₅) ; 123,9 (3C, C₁₂, C₁₉, C₂₆) ; 99,0 (1C, C₁) ; 69,5-70,8 (31C, C₆, C₇, C₈, C₉, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₂₁, C₂₂, C₂₃, C₂₈, C₂₉) ; 64,6 (1C, C₄) ; 50,7 (1C, C₃₀) ; 50,2 (3C, C₁₃, C₂₀, C₂₇) ; 30,6 (1C, C₂) ; 25,5 (1C, C₄) ; 19,6 (1C, C₃).

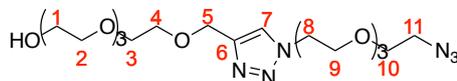
SMHR (ESI) :

II-3-4 HYDROLYSE DU GROUPEMENT PROTECTEUR : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Dissoudre 1 Eq de composé éthylène glycol OTHP dans du MeOH et ajouter 0,4 Eq d'acide paratoluène sulfonique. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 12 heures puis évaporer les solvants. Reprendre le résidu dans 100 mL de DCM et laver deux fois la phase organique avec 40 mL de solution aqueuse NaHCO₃ saturée. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ anhydre puis filtrée. Les solvants sont évaporés ce qui conduit à l'obtention d'un produit brut qui se présente sous forme d'une solution

huileuse jaune pâle. Purification par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire DCM/MeOH comme phase mobile éluante avec un gradient croissant en MeOH de 0% à 10%⁽²¹⁰⁾.

Synthèse du 1-(1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol B39



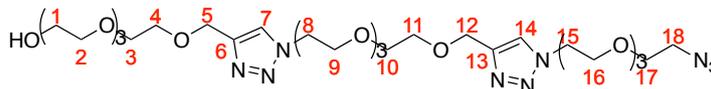
A partir de 3,569 mmol (2 g ; 1 Eq) de composé **B36** avec 1,428 mmol (246 mg ; 0,4 Eq) d'acide paratoluène sulfonique dans 95 mL de MeOH. Obtention de 2,808 mmol (1,3375 g ; Rdt = 79%) de produit brut sous forme d'une solution huileuse jaune pâle. Ce brut ne nécessite pas de purification par Combi-Flash.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,74 (m, 1H, H₇) ; 4,67 (s, 2H, H₅) ; 4,53 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₄) ; 3,86 (t, 2H, H₈) ; 3,57-3,66 (m, 27H, H₂, H₃, H₉, H₁₀) ; 3,37 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁₁) ; 2,69 (t, J = 8,0 Hz, 1H, OH).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 144,9 (1C, C₆) ; 123,9 (1C, C₇) ; 69,5-72,7 (13C, C₂, C₃, C₄, C₉, C₁₀) ; 64,6 (1C, C₈) ; 61,7 (1C, C₁) ; 50,7 (1C, C₁₁).

SMHR (ESI) : 499,2499 pour [M+Na]⁺

Synthèse 1-(1-(1-(1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol B40



A partir de 4,29 mmol (3,507 g ; 1 Eq) de composé **B37** en présence de 2,15 mmol (370 mg ; 0,5 Eq) d'acide paratoluène sulfonique dans 100 mL de MeOH. Purification par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire DCM/MeOH comme phase mobile éluante avec un gradient croissant en MeOH de 0% à 10%. Obtention de 1,856 mmol (1,2798 g ; Rdt = 43%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

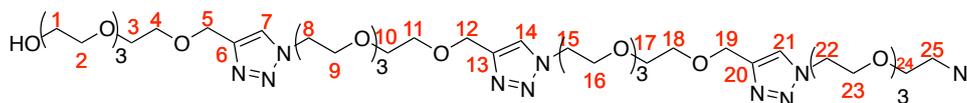
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,70-7,74 (m, 2H, H₇, H₁₄) ; 4,65 (m, 4H, H₅, H₁₂) ; 4,51 (td, J = 8,0 Hz, 4H, H₄, H₁₁) ; 3,85 (m, 4H, H₈, H₁₅) ; 3,57-3,66 (m, 40H, H₉, H₁₀, H₁₆, H₁₇) ; 3,36 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁₈).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 144,9 (2C, C₆, C₁₃) ; 123,9 (2C, C₇, C₁₄) ; 69,5-72,7 (18C, C₂, C₃, C₄, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₆, C₁₇) ; 64,6 (2C, C₈, C₁₅) ; 61,7 (1C, C₁) ; 50,7 (1C, C₁₈).

SMHR (ESI) : 756,3879 pour [M+Na]⁺

Synthèse du 1-(1-(1-(1-(1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-ol

B41



A partir de 4,467 mmol (4,467 g ; 1 Eq) de composé **B38** en présence de 2,233 mmol (3785 mg ; 0,5 Eq) d'acide paratoluène sulfonique dans 100 mL de MeOH. Purification par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire DCM/MeOH comme phase mobile éluante avec un gradient croissant en MeOH de 0% à 10%. Obtention de 1,982 mmol (1,8756 g ; Rdt = 44%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune pâle.

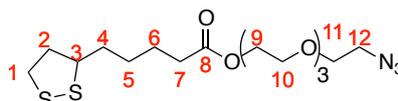
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,70-7,74 (m, 3H, H₇, H₁₄, H₂₁) ; 4,65 (m, 6H, H₅, H₁₂, H₁₉) ; 4,51 (td, *J* = 8,0 Hz, 6H, H₄, H₁₁, H₁₈) ; 3,85 (m, 6H, H₈, H₁₅, H₂₂) ; 3,57-3,66 (m, 54H, H₉, H₁₀, H₁₆, H₁₇, H₂₃, H₂₄) ; 3,36 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, H₂₅).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 144,9 (3C, C₆, C₁₃, C₂₀) ; 123,9 (3C, C₇, C₁₄, C₂₁) ; 69,5-72,7 (25C, C₂, C₃, C₄, C₉, C₁₀, C₁₁, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₂₃, C₂₄) ; 64,6 (3C, C₈, C₁₅, C₂₂) ; 61,7 (1C, C₁) ; 50,7 (1C, C₂₅).

SMHR (ESI) :

II-4 COUPLAGE DU BRAS ESPACEUR AVEC L'ACIDE LIPOIQUE

Synthèse du 2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L2



Dans un ballon de 250 mL, sous flux d'Argon, dissoudre 13,40 mmol (5 g ; 3 Eq) de composé **B2** ainsi que 4,47 mmol (922 mg ; 1 Eq) d'acide lipoiqye **B0** et 0,89 mmol (109 mg ; 0,2 Eq) de DMAP dans 40 mL de DCM anhydre. Faire buller sous Argon pendant 20 minutes puis placer le milieu à 0°C dans un bain d'eau et de glace et ajouter goutte à goutte 13,40 mmol (2.765 g ; 3 Eq) de DCC préalablement dissous dans 20 mL de DCM anhydre. Laisser sous agitation à 0°C pendant 20 minutes puis laisser le milieu revenir à température ambiante et maintenir l'agitation pendant 24 heures. Filtrer le précipité sur fritté recouvert de Célite et laver la phase organique par une solution aqueuse NaHCO₃ saturée puis par une solution aqueuse NaCl saturée. Sécher la phase organique sur MgSO₄ anhydre, filtrer puis évaporer les solvants. Purification par flash-chromatographie en utilisant une phase mobile éluante binaire EP/AcOEt en proportion 70/30. Obtention de 3,86 mmol (1.571 g ; Rdt = 86%) d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4,21 (m, 2H, H₉) ; 3.52-3,74 (m, 12H, H₁₀, H₁₁) ; 3.39 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁₂) ; 3.07-3,19 (m, 2H, H₅) ; 2.45 (m, 1H, H₁) ; 2.32 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁) ; 1.84-1.91 (m, 1H, H₃) ; 1.62-1.69 (m, 4H, H₄, H₆) ; 1.44 (m, 2H, H₂).

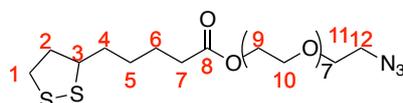
RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 173,5 (1C, C₈) ; 69,2-70,8 (6C, H₁₀, H₁₁) ; 63,5 (1C, C₉) ; 56,4 (1C, C₁₂) ; 50,7 (1C, C₃) ; 40,3 (1C, C₂) ; 39,8 (1C, C₁) ; 34,6 (1C, C₄) ; 34,0 (1C, C₇) ; 28,8 (1C, C₆) ; 28,3 (1C, C₅).

SMHR (ESI) : 430,1439 pour [M+Na]⁺

II-4-1 COUPLAGE DES BRAS PEGYLÉS AVEC L'ACIDE LIPOIQUE : PROCÉDURE GÉNÉRALE

Sous flux d'Argon, dissoudre 1 Eq de bras espaceur pegylé ainsi que 1,5 Eq d'acide lipoiq ue et 0,3 Eq de DMAP dans 10 mL de DCM anhydre. Faire buller sous Argon pendant 20 minutes puis placer le milieu à 0°C dans un bain d'eau et de glace et ajouter goutte à goutte 2 Eq de DCC préalablement dissous dans 5 mL de DCM anhydre. Laisser sous agitation à 0°C pendant 20 minutes puis laisser le milieu revenir à température ambiante et maintenir l'agitation pendant 24 heures. Filtrer le précipité sur fritté recouvert de Cé lite et laver la phase organique par une solution aqueuse NaHCO₃ saturée puis par une solution aqueuse NaCl saturée. Sécher la phase organique sur MgSO₄ anhydre, filtrer puis évaporer les solvants. Purification par flash-chromatographie en utilisant une phase mobile éluante binaire DCM/MeOH.

Synthèse du 23-azido-3,6,9,12,15,18,21-heptaoxatricosyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L3



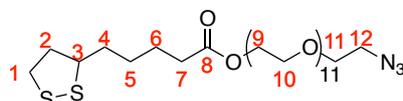
Obtention de 0,940 mmol (548,4 mg ; Rdt = 65%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4,21 (m, 2H, H₉) ; 3.52-3,74 (m, 28H, H₁₀, H₁₁) ; 3.37 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁₂) ; 3.07-3,19 (m, 2H, H₅) ; 2.45 (m, 1H, H₁) ; 2.32 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁) ; 1.84-1.91 (m, 1H, H₃) ; 1.62-1.69 (m, 4H, H₄, H₆) ; 1.44 (m, 2H, H₂).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 173,5 (1C, C₈) ; 69,2-70,8 (14C, H₁₀, H₁₁) ; 63,5 (1C, C₉) ; 56,4 (1C, C₁₂) ; 50,7 (1C, C₃) ; 40,3 (1C, C₂) ; 39,8 (1C, C₁) ; 34,6 (1C, C₄) ; 34,0 (1C, C₇) ; 28,8 (1C, C₆) ; 28,3 (1C, C₅).

SMHR (ESI) :

Synthèse du 35-azido-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33-undeca oxapentatriacontyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L4



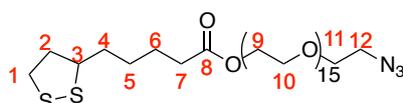
Obtention de 1,235 mmol (937,9 mg ; Rdt = 75%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4,21 (m, 2H, H₉) ; 3,52-3,67 (m, 61H, H₉, H₁₀, H₁₁) ; 3,37 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁₂) ; 3,07-3,19 (m, 2H, H₅) ; 2,45 (m, 1H, H₁) ; 2,32 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁) ; 1,84-1,91 (m, 1H, H₃) ; 1,62-1,69 (m, 4H, H₄, H₆) ; 1,44 (m, 2H, H₂).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 173,5 (1C, C₈) ; 69,2-70,8 (22C, H₁₀, H₁₁) ; 63,5 (1C, C₉) ; 56,4 (1C, C₁₂) ; 50,7 (1C, C₃) ; 40,3 (1C, C₂) ; 39,8 (1C, C₁) ; 34,6 (1C, C₄) ; 34,0 (1C, C₇) ; 28,8 (1C, C₆) ; 28,3 (1C, C₅).

SMHR (ESI) :

Synthèse du 47-azido3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45-pentadecaoxaheptatetracontyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L5



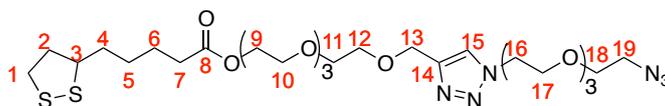
Obtention de 0,651 mmol (608,9 mg ; Rdt = 60%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4,21 (m, 2H, H₉) ; 3,55-3,69 (m, 60H, H₉, H₁₀, H₁₁) ; 3,37 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁₂) ; 3,07-3,16 (m, 2H, H₅) ; 2,45 (m, 1H, H₁) ; 2,32 (t, J = 8,0 Hz, 1H, H₁) ; 1,87-1,91 (m, 1H, H₃) ; 1,60-1,69 (m, 4H, H₄, H₆) ; 1,21 (m, 2H, H₂).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 173,5 (1C, C₈) ; 69,2-70,8 (30C, C₁₀, C₁₁) ; 66,9 (1C, C₉) ; 56,4 (1C, C₁₂) ; 50,7 (1C, C₃) ; 40,3 (1C, C₂) ; 39,8 (1C, C₁) ; 34,6 (1C, C₄) ; 34,0 (1C, C₇) ; 28,8 (1C, C₆) ; 28,3 (1C, C₅).

SMHR (ESI) :

Synthèse du 1-(1-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L6



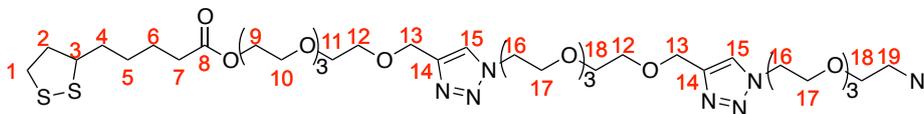
Obtention de 1,717 mmol (1,141 g ; Rdt = 91%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,72 (s, 1H, H₁₅) ; 4,63 (s, 2H, H₁₃) ; 4,50 (td, J = 8,0 Hz, 2H, H₁₂) ; 4,19 (m, 2H, H₉) ; 3,84 (m, 2H, H₁₆) ; 3,58-3,65 (m, 25H) ; 3,35 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁₉) ; 3,07-3,15 (m, 2H, H₅) ; 2,43 (m, 1H, H₁) ; 2,31 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H₁) ; 1,83-1,92 (m, 1H, H₃) ; 1,61-1,66 (m, 4H, H₄, H₆) ; 1,38-1,48 (m, 2H, H₂).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 173,5 (1C, C₈) ; 144,9 (1C, C₁₄) ; 123,9 (1C, C₁₅) ; 106,6 (1C, C₁₉) ; 69,2-70,8 (13C, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₇, C₁₈) ; 64,6 (1C, C₁₃) ; 63,5 (1C, C₉) ; 56,4 (1C, C₁₆) ; 50,7 (1C, C₃) ; 40,3 (1C, C₂) ; 39,8 (1C, C₁) ; 34,6 (1C, C₄) ; 34,0 (1C, C₇) ; 28,8 (1C, C₆) ; 28,3 (1C, C₅).

SMHR (ESI) :

Synthèse du 1-(1-(1-(1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L7



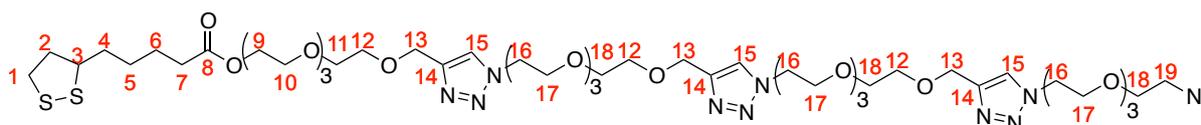
Obtention de 0,948 mmol (873,2 mg ; Rdt = 73%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,72 (s, 1H, H₁₅) ; 7,71 (s, 1H, H₁₅) ; 4,63 (s, 4H, H₁₃) ; 4,50 (td, *J* = 8,0 Hz, 4H, H₁₂) ; 4,19 (m, 2H, H₉) ; 3,84 (m, 4H, H₁₆) ; 3,58-3,65 (m, 37H, H₇, H₁₀, H₁₁, H₁₇, H₁₈) ; 3,35 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, H₁₉) ; 3,07-3,15 (m, 2H, H₅) ; 2,43 (m, 1H, H₁) ; 2,31 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, H₁) ; 1,83-1,92 (m, 1H, H₃) ; 1,61-1,66 (m, 4H, H₄, H₆) ; 1,38-1,48 (m, 2H, H₂).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 173,5 (1C, C₈) ; 144,9 (2C, C₁₄) ; 123,9 (2C, C₁₅) ; 106,6 (1C, C₁₉) ; 69,2-70,8 (20C, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₇, C₁₈) ; 64,6 (2C, C₁₃) ; 63,5 (1C, C₉) ; 56,4 (2C, C₁₆) ; 50,7 (1C, C₃) ; 40,3 (1C, C₂) ; 39,8 (1C, C₁) ; 34,6 (1C, C₄) ; 34,0 (1C, C₇) ; 28,8 (1C, C₆) ; 28,3 (1C, C₅).

SMHR (ESI) :

Synthèse du 1-(1-(1-(1-(1-(1-(2-(2-(2-(2-azidoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecan-13-yl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L8



Obtention de 1,342 mmol (1,582 g ; Rdt = 68%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune.

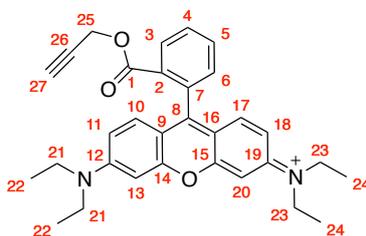
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 7,70-7,74 (m, 3H, H₁₅) ; 4,63 (s, 6H, H₁₃) ; 4,49 (td, *J* = 8,0 Hz, 6H, H₁₂) ; 4,18 (m, 2H, H₇) ; 3,84 (m, 6H, H₁₆) ; 3,57-3,56 (m, 50H, H₅, H₁₀, H₁₁, H₁₈) ; 3,35 (t, *J* = 8,0 Hz, 2H, H₁₉) ; 3,11 (m, 1H, H₅) ; 2,43 (m, 1H, H₁) ; 2,31 (t, *J* = 8,0 Hz, 1H, H₁) ; 1,83-1,92 (m, 1H, H₃) ; 1,61-1,66 (m, 4H, H₄, H₆) ; 1,38-1,48 (m, 2H, H₂).

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 173,5 (1C, C₈) ; 154,40 (1C, C₁₄) ; 149,38 (1C, C₁₄) ; 146,9 (1C, C₁₄) ; 123,9 (3C, C₁₅) ; 106,6 (1C, C₁₉) ; 69,2-72,69 (30C, C₁₀, C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₇, C₁₈) ; 64,6 (1C, C₉) ; 56,4 (3C, C₁₆) ; 50,7 (1C, C₃) ; 40,3 (1C, C₂) ; 39,8 ; 38,9 (1C, C₁) ; 34,6 ; 34,0 (1C, C₄) ; 28,8 (1C, C₇) ; 28,3 (1C, C₆) ; 24,7 (1C, C₅).

SMHR (ESI) :

II-4-2 COUPLAGE DES LIGANDS AVEC UN FLUOROPHORE

Synthèse du N-(6-(diéthylamino)-9-(2-((prop-2-yn-1-yloxy)carbonyl)phenyl)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride F3



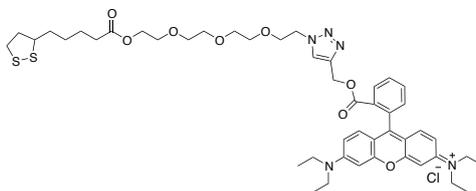
Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 12,52 mmol (1 Eq ; 6,0 g) de rhodamine B dans 20 mL de DCM anhydre et ajouter 20,04 mmol (1,6 Eq ; 3,84 g) de EDC puis 13,78 mmol (1,1 Eq ; 1,586 g) de NHS et faire buller sous argon pendant 60 minutes à température ambiante. Ajouter goutte à goutte 50,10 mmol (4 Eq ; 3 mL) d'alcool propargylique et 1,25 mmol (0,1 Eq ; 153 mg) de DMAP préalablement dissous dans 3 mL de DCM anhydre. Laisser sous agitation à température ambiante et sous atmosphère d'argon pendant 48 heures. Laver la phase organique avec une solution aqueuse saline saturée, sécher sur MgSO₄ anhydre, filtrer sur Célite et évaporer les solvants. Le produit brut est purifié par Flash-Chromatographie en utilisant une phase mobile éluante binaire DCM/MeOH avec un gradient croissant en MeOH, de 0% à 10%. Obtention de 7,34 mmol (3,7891 g, R = 59%) de produit purifié sous forme d'un solide violet. Les analyses sont conformes à la littérature⁽¹⁹⁰⁾.

II-4-2-1 PROCÉDURE GÉNÉRALE DU COUPLAGE

Dans un ballon de 25 mL, dissoudre 0,103 mmol (1 Eq) de ligand porteur d'une fonction azoture terminale avec 0,103 mmol (53,10 mg ; 1 Eq) de composé **F3** dans 5 mL d'un mélange binaire tBuOH/H₂O Milli-Q en proportion 1/1. Faire buller le milieu réactionnel sous argon pendant 60 minutes à température ambiante puis le maintenir sous atmosphère inerte d'argon. Ajouter 0,052 mmol (26 mg ; 0,5 Eq) de CuSO₄, 0,103 mmol (17,85 mg ; 1 Eq) de N,N,N',N'',N''-Pentaméthyl-diéthylène-triamine (PMDTA) et 0,062 mmol (40,8 mg ; 0,6 Eq) d'acide ascorbique. Laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 24 heures. Ajouter une solution aqueuse EDTA saturée et poursuivre l'agitation pendant 60 minutes supplémentaires. Extraire à trois reprises le milieu réactionnel avec du DCM. La phase organique résultante est alors séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée et les solvants sont évaporés. Les analyses RMN et HRMS de ces composés sont en cours.

II-4-2-2 SYNTHÈSE DES LIGANDS

Synthèse du N-(9-(2-(((1-(17-(1,2-dithiolan-3-yl)-13-oxo-3,6,9,12-tetraoxaheptadecyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride L13



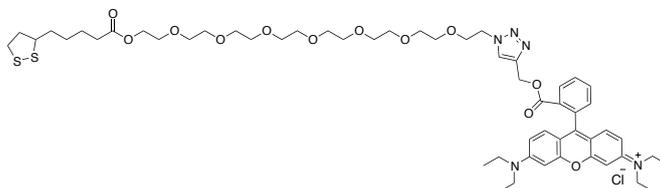
A partir de 0,103 mmol (45 mg ; 1 Eq) de ligand [L2](#). Obtention de 0,044 mmol (41 mg, R= 43 %) d'une cire violacée.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

SMHR (ESI) :

Synthèse du N-(9-(2-(((1-(29-(1,2-dithiolan-3-yl)-25-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24-octaoxonacosyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride L14



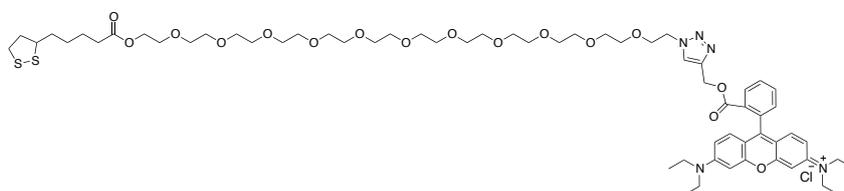
A partir de 0,103 mmol (60 mg ; 1 Eq) de ligand [L3](#). Obtention de 0,079 mmol (87 mg, R =77 %) d'une cire violacée.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

SMHR (ESI) :

Synthèse du N-(9-(2-(((1-(41-(1,2-dithiolan-3-yl)-37-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36-dodecaoxahentetracontyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride L15



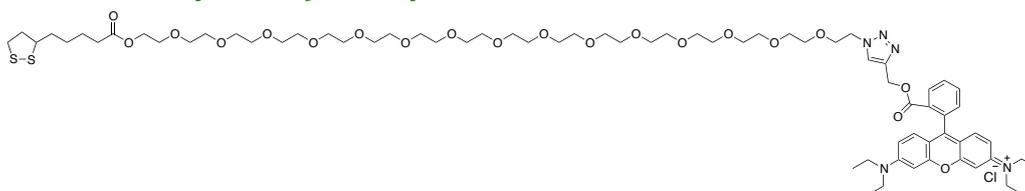
A partir de 0,103 mmol (79 mg ; 1 Eq) de ligand [L4](#). Obtention de 0,025 mmol (32 mg, R =24 %) d'une cire violacée.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

SMHR (ESI) :

Synthèse du N-(9-(2-(((1-(53-(1,2-dithiolan-3-yl)-49-oxo-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48-hexadecaoxatripentacontyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride L16



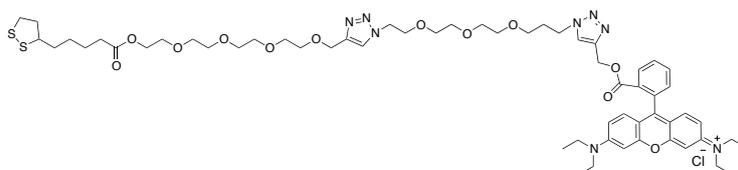
A partir de 0,103 mmol (95 mg ; 1 Eq) de ligand [L5](#). Obtention de 0,060 mmol (86,9 mg, R =58 %) d'une cire violacée.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

SMHR (ESI) :

Synthèse du N-(9-(2-(((1-(3-(2-(2-(2-(4-(19-(1,2-dithiolan-3-yl)-15-oxo-2,5,8,11,14-pentaoxonadecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)propyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride L17



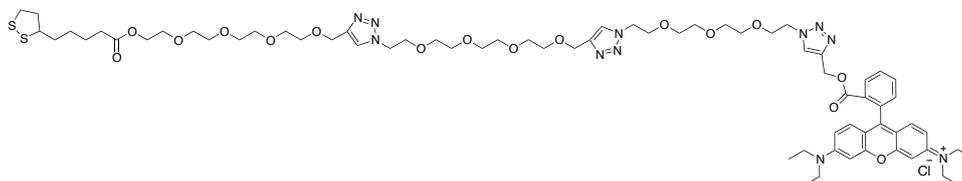
A partir de 0,103 mmol (69,5 mg ; 1 Eq) de ligand [L6](#). Obtention de 0,039 mmol (45,8 mg, R =38 %) d'une cire violacée.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

SMHR (ESI) :

Synthèse du N-(9-(2-(((1-(2-(2-(2-(2-(4-(13-(4-(19-(1,2-dithiolan-3-yl)-15-oxo-2,5,8,11,14-pentaoxonadecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride L18



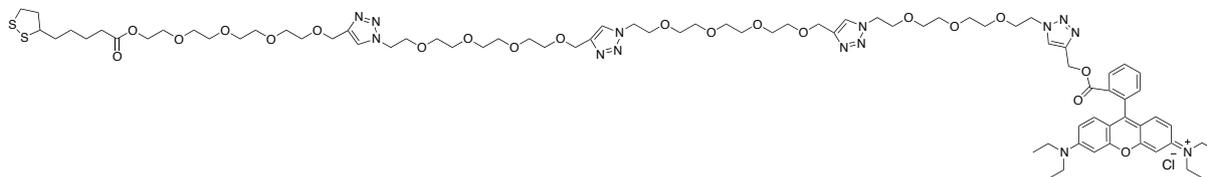
A partir de 0,103 mmol (97,5 mg ; 1 Eq) de ligand **L7**. Obtention de 0,053 mmol (76,1 mg, R = 52 %) d'une cire violacée.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

SMHR (ESI) :

Synthèse du N-(9-(2-(((1-(2-(2-(2-(2-(4-(13-(4-(13-(4-(19-(1,2-dithiolan-3-yl)-15-oxo-2,5,8,11,14-pentaoxonadecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)-2,5,8,11-tetraoxatridecyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methoxy)carbonyl)phenyl)-6-(diethylamino)-3H-xanthen-3-ylidene)-N-ethylethanaminium chloride L19



A partir de 0,103 mmol (122,5 mg ; 1 Eq) de ligand **L8**. Obtention de 0,039 mmol (66,6 mg, R = 38 %) d'une cire violacée.

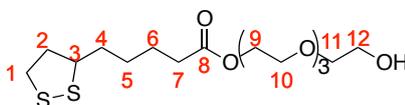
RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃, δ ppm) :

SMHR (ESI) :

II-4-3 DIVERSIFICATION DE LA FONCTIONNALISATION TERMINALE DU LIGAND

Synthèse du 2-(2-(2-(2-hydroxyéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L12

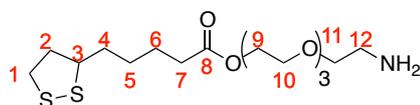


Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 25,74 mmol (5 g ; 10 Eq) de tétraéthylène glycol **B0** ainsi que 2,574 mmol (531 mg ; 1 Eq) d'acide lipoiq **L1** et 0,772 mmol (95 mg ; 0,3 Eq) de DMAP dans 26 mL de DCM anhydre. Faire buller sous Argon pendant 20 minutes et saturer l'atmosphère en Argon puis placer le milieu à 0°C dans un bain d'eau et de glace et ajouter goutte à goutte 2,831 mmol (584 mg ; 1,1 Eq) de DCC préalablement dissous dans 2 mL de DCM anhydre. Laisser sous agitation à 0°C pendant 60 minutes puis laisser le milieu revenir à température ambiante et maintenir l'agitation pendant 24 heures. Filtrer le précipité sur fritté recouvert de Célite et laver la phase organique par une solution aqueuse NaHCO₃ saturée puis par une solution aqueuse NaCl saturée. Sécher la phase organique sur MgSO₄ anhydre, filtrer puis évaporer les solvants. Purification du produit brut par flash-chromatographie en utilisant un mélange binaire EP/AcOEt comme phase mobile éluante et en appliquant un gradient croissant de AcOEt de 70% à 100%. Obtention de 1,57 mmol (600.7 mg ; Rdt = 60%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune.

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, δ ppm) : 4.24 (t, *J* = 4.3 Hz, 2H) ; 3.66–3.72 (m, 12H) ; 3.61 (t, *J* = 4.2 Hz, 2H) ; 3.58–3.72 (m, 1H) ; 3.10–3.20 (m, 2H) ; 2.44–2.50 (m, 1H) ; 2.35 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H) ; 1.88–1.95 (m, 1H) ; 1.62–1.72 (m, 4H) ; 1.43–1.51 (m, 2H).

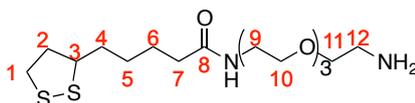
Les analyses ¹³C et SMHR sont décrites dans la littérature⁽²³⁰⁾.

Synthèse du 2-(2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate L11



Dans un ballon de 50 mL, dissoudre 1,23 mmol (500 mg ; 1 Eq) de composé **L2** dans 10 mL de THF anhydre et ajouter 1,72 mmol (452 mg ; 1,4 Eq) de triphénylphosphine (PPh₃). Lorsque le mélange est homogène, ajouter 310 µL d'eau de qualité Milli-Q et laisser sous agitation constante à température ambiante. Synthèse en cours.

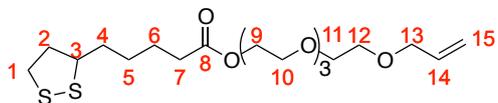
Synthèse du N-(2-(2-(2-(2-aminoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl)-5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanamide L9



Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 2,10 mmol (433 mg ; 1 Eq) d'acide lipoiq **L1** ainsi que 0,63 mmol (77 mg ; 0,3 Eq) de DMAP et 20,99 mmol (4.0349 g ; 10 Eq) de composé **B12** dans 20 mL de DCM anhydre. Placer le milieu à 0°C dans un bain d'eau et de glace et faire buller sous Argon pendant 1 heure. Ajouter goutte à goutte 2,73 mmol (523 mg ; 1,3 Eq) de DCC préalablement dissous dans 5 mL de THF anhydre. Après 30

minutes le milieu est autorisé à revenir à température ambiante et l'agitation est poursuivie pendant 24 heures supplémentaires. Synthèse en cours.

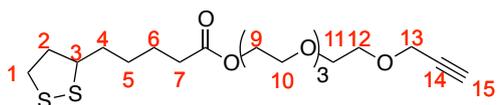
Synthèse du 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-en-1-yl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate



Voie 1 : Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 5,76 mmol (230 mg ; 1,1 Eq) de NaH dans 2 mL de THF anhydre et faire buller sous Argon pendant 30 minutes puis, toujours sous atmosphère inerte d'Argon, ajouter goutte à goutte 5,23 mmol (2 g ; 1 Eq) de composé **L1bis** préalablement dissous dans 15 mL de THF anhydre. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes puis ajouter goutte à goutte 5,23 mmol (0,45 mL, 1 Eq) de bromure d'allyl. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 12 heures puis neutraliser le milieu réactionnel par ajout précautionneux d'eau et extraire avec DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée puis les solvants sont évaporés. Le produit brut sera purifié par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire EP/AcOEt comme phase mobile éluante avec un gradient croissant en AcOEt de 20% à 80%. Obtention de 3,53 mmol (1,5337g ; Rdt = 70%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune. Synthèse en cours.

Voie 2 : Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 2,13 mmol (440 mg ; 1 Eq) d'acide lipoïque **L1** ainsi que 2,13 mmol (500 mg ; 1 Eq) de composé **B16** et 0,64 mmol (79 mg ; 0,3 Eq) de DMAP dans 10 ml de DCM anhydre. Laisser buller sous flux d'Argon pendant 30 minutes puis placer le milieu à 0°C dans un bain d'eau et de glace. Ajouter goutte à goutte 2,77 mmol (573 mg ; 1,3 Eq) de DCC préalablement dissous dans 5 mL de DCM anhydre. Le milieu est alors autorisé à revenir progressivement à température ambiante. Laisser sous agitation et sous atmosphère inerte pendant 12 heures. Le milieu est filtré sur Célite puis lavé avec une solution aqueuse NaHCO₃ saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et les solvants sont évaporés. Synthèse en cours.

Synthèse du 3,6,9,12-tetraoxapentadec-14-yn-1-yl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate

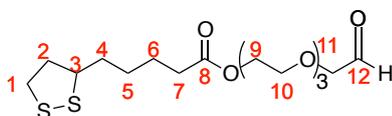


Voie 1 : Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 5,76 mmol (230 mg ; 1,1 Eq) de NaH dans 2 mL de THF anhydre et faire buller sous Argon pendant 30 minutes puis, toujours sous atmosphère inerte d'Argon, ajouter goutte à goutte 5,23 mmol (2 g ; 1 Eq) de composé **L1bis** préalablement dissous dans 15 mL de THF anhydre. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 30 minutes puis ajouter goutte à goutte 5,23

mmol (0,458 mL, 1 Eq) de bromure de propargyl. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 12 heures puis neutraliser le milieu réactionnel par ajout précautionneux d'eau et extraire avec DCM. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre et filtrée puis les solvants sont évaporés. Le produit brut sera purifié par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire EP/AcOEt comme phase mobile éluante avec un gradient croissant en AcOEt de 20% à 80%. Obtention de 3,73 mmol (1,5702 g ; Rdt = 71%) de produit purifié sous forme d'une solution huileuse jaune. Synthèse en cours

Voie 2 : Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 2,42 mmol (500 mg ; 1 Eq) d'acide lipoiq **L1** ainsi que 3,63 mmol (572 mg ; 1,5 Eq) de composé **B17** et 0,73 mmol (89 mg ; 0,3 Eq) de DMAP dans 5 ml de DCM anhydre. Laisser buller sous flux d'Argon pendant 30 minutes puis placer le milieu à 0°C dans un bain d'eau et de glace. Ajouter goutte à goutte 2,66 mmol (549 mg ; 1,1 Eq) de DCC préalablement dissous dans 5 mL de DCM anhydre. Le milieu est alors autorisé à revenir progressivement à température ambiante. Laisser sous agitation et sous atmosphère inerte pendant 12 heures. Le milieu est filtré sur Célite puis lavé avec une solution aqueuse NaHCO₃ saturée. La phase organique est séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et les solvants sont évaporés. Synthèse en cours.

Synthèse du 2-(2-(2-(2-oxoéthoxy)éthoxy)éthoxy)éthyl 5-(1,2-dithiolan-3-yl)pentanoate



Dans un ballon de 100 mL, dissoudre 6,373 mmol (2,4354 g ; 1 Eq) de composé **L1bis** dans 60 mL de DCM anhydre et faire buller sous Argon pendant 15 minutes puis, sous atmosphère saturée en Argon, ajouter 9,56 mmol (4,055 g ; 1,5 Eq) de Dess-Martin periodinane. Laisser sous agitation constante à température ambiante pendant 4 heures. Laver la phase organique avec une solution aqueuse Na₂S₂O₄ saturée puis extraire la phase aqueuse avec du DCM. Les phases organiques sont combinées, séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et les solvants sont évaporés. Le produit brut sera purifié par Combi-Flash en utilisant un mélange binaire AcOEt/MeOH avec un gradient croissant en MeOH de 0% à 10%. Synthèse en cours.

Chapitre III- SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES D'OR

III-1 SYNTHÈSE CLASSIQUE AU CITRATE NP1

Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution aqueuse de sels d'or HAuCl_4 à 2,5 mM, 1 mL de solution aqueuse de NaOH à 20 mM et compléter avec 18 mL d' H_2O Milli-Q. Ajuster le pH de la solution par ajout goutte à goutte de solution aqueuse de NaOH à 20 mM si nécessaire afin d'obtenir un pH compris entre 8,5 et 9. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et chauffé à 80°C à l'aide d'un bain-marie. Après 5 à 10 minutes d'agitation à 80°C, ajouter rapidement 0,6 mL de solution aqueuse de citrate de sodium à 170 mM. Laisser le milieu sous agitation continue à 80°C pendant 3 heures. Après 90 minutes de réaction, une coloration rose pâle du milieu réactionnel est observée. Celle-ci s'intensifie de plus en plus jusqu'à l'obtention d'une coloration rouge vif qui se stabilise après 150 minutes de chauffage à 80°C et correspond à la formation des nanoparticules d'or. La suspension de nanoparticules d'or ainsi obtenue est alors centrifugée à deux reprises à 2500 rpm pendant 20 minutes à 20°C. Après chaque cycle de centrifugation, le culot est éliminé à l'aide d'une pipette. Le surnageant est alors centrifugé à deux reprises à 5000 rpm pendant 20 minutes à 20°C et le culot est également récupéré. Le surnageant est alors centrifugé une fois à 10000 rpm pendant 10 minutes à 20°C et le culot est récupéré. Enfin, le surnageant résiduel est centrifugé une dernière fois à 15000 rpm pendant 10 minutes à 20°C et le culot est récupéré.

Analyse UV-Visible

Analyse UV-Visible du brut : $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$

Analyse UV-Visible après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$

Analyse UV-Visible après centrifugation à 10000 rpm : $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$

Analyse UV-Visible après centrifugation à 15000 rpm : $\lambda_{\text{max}} = 530 \text{ nm}$

Analyse MET

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 32 \pm 6 \text{ nm}$

Analyse MET après centrifugation à 10000 rpm : $d = 24 \pm 8 \text{ nm}$

Analyse MET après centrifugation à 15000 rpm : $d = 23 \pm 4 \text{ nm}$

III-2 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES AVEC DU TRIÉTHYLSILANE

Procédure NP2A

Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution aqueuse de sels d'or HAuCl_4 à 2,5 mM, 1 mL de solution aqueuse de NaOH à 20 mM et compléter avec 18 mL d'un mélange Acétone/ H_2O Milli-Q en proportion 50/50. Ajuster le pH de la solution par ajout goutte à goutte de solution aqueuse de NaOH à 20 mM si nécessaire afin d'obtenir un pH compris entre 8,5 et 9. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et chauffé à 80°C à l'aide d'un bain-marie. Après 5 à 10 minutes d'agitation à 80°C, ajouter rapidement 0,6 mL de solution de triéthylsilane (Et_3SiH) préalablement dissous dans un mélange Acétone/ H_2O Milli-Q en proportion 50/50 à la concentration de 170 mM et 0,6 mL de solution d'acide trifluoroacétique (TFA) préalablement dissous dans un mélange Acétone/ H_2O Milli-Q en proportion 50/50 à la concentration de 170 mM. Laisser le milieu sous agitation continue à 80°C pendant 3 heures. Après 40 minutes de réaction, l'apparition de particules noires visibles à l'œil nu est constatée et aucune coloration rose-rouge du milieu réactionnel n'a été constatée.

Procédure NP2B

Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution aqueuse de sels d'or HAuCl_4 à 2,5 mM, 1 mL de solution aqueuse de NaOH à 20 mM et compléter avec 18 mL d'un mélange $\text{PEG}_4/\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q en proportion 50/50. Ajuster le pH de la solution par ajout goutte à goutte de solution aqueuse de NaOH à 20 mM si nécessaire afin d'obtenir un pH compris entre 8,5 et 9. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et chauffé à 80°C à l'aide d'un bain-marie (ou laissé à température ambiante, voir tableau). Après 5 à 10 minutes d'agitation, ajouter rapidement 0,6 mL de solution de triéthylsilane (Et_3SiH) préalablement dissous dans un mélange $\text{PEG}_4/\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q en proportion 50/50 et la solution de TFA préalablement dissous dans ce même mélange binaire $\text{PEG}_4/\text{H}_2\text{O}$. Laisser le milieu sous agitation continue pendant 3 heures.

HAuCl_4	NaOH	Et_3SiH	TFA	Solvant	Température	
2,5 mM	20 mM	170 mM	170 mM	$\text{PEG}_4/\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q	80°C	NP2B (Données non montrées)
		85 mM	85 mM			
		340 mM	340 mM			
		170 mM	0 mM			
		85 mM				
		340 mM				
		170 mM				
		85 mM	TA		NP2B-1	
		340 mM			NP2B-2	
		340 mM			NP2B-3	

Procédure NP2C

Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution aqueuse de sels d'or HAuCl_4 à 2,5 mM, 1 mL de solution aqueuse de NaOH à 20 mM et compléter avec 18 mL d'un mélange PEG₄/H₂O Milli-Q en proportion 50/50. Ajuster le pH de la solution par ajout goutte à goutte de solution aqueuse de NaOH à 20 mM si nécessaire afin d'obtenir un pH compris entre 8,5 et 9. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et laissé à température ambiante. Laisser le milieu sous agitation continue pendant 3 heures.

III-3 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES AVEC DU TÉTRAÉTHYLÈNE GLYCOL

Procédure NP3A :

Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution aqueuse de sels d'or HAuCl_4 à 2,5 mM, 1 mL de solution aqueuse de NaOH à 20 mM et compléter avec un volume X d'eau ultrapure de qualité Milli-Q. Ajuster le pH de la solution par ajout goutte à goutte de solution aqueuse de NaOH à 20 mM si nécessaire afin d'obtenir un pH compris entre 8,5 et 9. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et chauffé à 80°C à l'aide d'un bain-marie. Après 5 à 10 minutes d'agitation à 80°C, ajouter rapidement un volume Y de tétraéthylène glycol. Laisser le milieu sous agitation continue à 80°C pendant 3 heures.

Volume X (mL)	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Volume Y (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Procédure NP3B :

Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution aqueuse de sels d'or HAuCl_4 à 2,5 mM et compléter avec un volume X d'eau ultrapure de qualité Milli-Q. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et chauffé à 80°C à l'aide d'un bain-marie. Après 5 à 10 minutes d'agitation à 80°C, ajouter rapidement un volume Y de tétraéthylène glycol. Laisser le milieu sous agitation continue à 80°C pendant 3 heures.

Volume X (mL)	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	0
Volume Y (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Analyse UV-Visible NP3B-1

Analyse UV-Visible du brut : $\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$

Analyse UV-Visible après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$

Analyse UV-Visible après centrifugation à 10000 rpm : $\lambda_{\text{max}} = 526 \text{ nm}$

Analyse UV-Visible après centrifugation à 15000 rpm : $\lambda_{\max} = 526 \text{ nm}$

Analyse MET NP3B-1

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 14 \pm 2 \text{ nm}$

Analyse MET après centrifugation à 10000 rpm : $d = 13 \pm 2 \text{ nm}$

Analyse MET après centrifugation à 15000 rpm : $d = 12 \pm 2 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta : $z = -30 \text{ mV}$

Procédure NP4 :

Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution aqueuse de sels d'or HAuCl_4 à la concentration de 2,5 mM et compléter avec 20 mL d'un mélange binaire $\text{PEG}_4/\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q dont les proportions varient de 19/1 à 10/10. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et chauffé à 80°C à l'aide d'un bain-marie. Laisser le milieu sous agitation continue à 80°C pendant 3 heures.

Procédure NP5 :

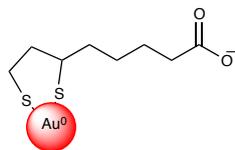
Les sels précurseurs sont dissous dans un mélange binaire $\text{PEG}_4/\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q dont les proportions varient de 19/1 à 10/10. Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution de sels d'or HAuCl_4 à la concentration de 2,5 mM et compléter avec 20 mL d' H_2O Milli-Q. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et chauffé à 80°C à l'aide d'un bain-marie. Laisser le milieu sous agitation continue à 80°C pendant 3 heures.

Procédure NP6 :

Les sels précurseurs sont dissous dans un mélange binaire $\text{PEG}_4/\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q dont les proportions varient de 19/1 à 10/10. Dans un réacteur en verre de 80 mL, introduire 2 mL de solution de sels d'or HAuCl_4 à la concentration de 2,5 mM et compléter avec 20 mL d'un mélange binaire $\text{PEG}_4/\text{H}_2\text{O}$ Milli-Q dont les proportions varient de 19/1 à 10/10. Le milieu réactionnel est alors fermé de façon non hermétique et chauffé à 80°C à l'aide d'un bain-marie. Laisser le milieu sous agitation continue à 80°C pendant 3 heures.

Chapitre IV- FONCTIONNALISATION DES NANOPARTICULES D'OR

IV-1 FONCTIONNALISATION AVEC L'ACIDE LIPOIQUE L1



Procédure NP7 :

Préparer des solutions d'acide lipoiqye à différentes concentrations (50, 60, 70, 80, 90, 95, 100, 105, 110 et 120 mg/mL) par dissolution dans du tétraéthylène glycol.

Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes.

Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante puis centrifuger deux fois à 2500 rpm pendant 20 minutes et éliminer le culot. Centrifuger trois fois à 5000 rpm pendant 20 minutes et récupérer le culot. Déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Prélever 2 mL de la solution de nanoparticules [NP3B-1](#) ainsi préparée et chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie. Après 5 à 10 minutes, ajouter 1 mL d'acide lipoiqye en solution dans le tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes.

[NP3B-1] (mg/mL)	[L0] (mg/L)	
37,05	30 ; 40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90	NP7-A
47,91	50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 ; 100	NP7-B
54,07	40 ; 50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 ; 100	NP7-C
56,72	50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 ; 100 ; 110 ; 120	NP7-D
67,00	50 ; 60 ; 70 ; 80	NP7-E
71,60	50 ; 60 ; 70 ; 80 ; 90 ; 95 ; 100 ; 105 ; 110	NP7-F
90,28	70 ; 90 ; 110 ; 120	NP7-G

Procédure NP8 :

Préparer des solutions d'acide lipoïque à différentes concentrations (42, 82, 122, 174, 258 et 325mg/mL) par dissolution dans du tétraéthylène glycol.

Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Chauffer à nouveau la solution de nanoparticules à 80°C et après 5 à 10 minutes, ajouter 1 mL d'acide lipoïque en solution dans le tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes.

Procédure NP9 :

Préparer des solutions d'acide lipoïque à différentes concentrations (20, 30, 40 et 50 mg/mL) par dissolution dans une solution aqueuse équimolaire de soude NaOH.

Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Chauffer à nouveau la solution de nanoparticules à 80°C et après 5 à 10 minutes, ajouter 1 mL de la solution aqueuse d'acide lipoïque préalablement préparée. Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP9-3

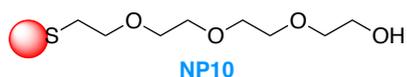
Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 533 \text{ nm}$

Analyse MET NP9-3

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 14,6 \pm 2 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP9-3 : $\zeta = -35 \text{ mV}$

IV-2 FONCTIONNALISATION AVEC LE 2-{2-[2-(2-MERCAPTOETHOXY)ETHOXY]ETHOXY}ETHANOL L1ter



Procédure NP10 : Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

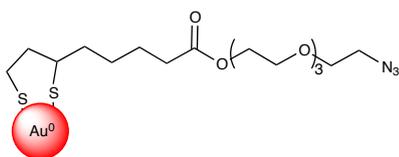
Chauffer à nouveau la solution de nanoparticules à 80°C et après 5 à 10 minutes, ajouter le ligand [L1ter](#). Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP10-3

Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 533 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP10-3 : $\zeta = -17 \text{ mV}$

IV-3 FONCTIONNALISATION AVEC LE 2-{2-[2-(2-AZIDOETHOXY)ETHOXY]ETHOXY}ETHYL 5-(1,2-DITHIOLAN-3-YL)PENTANOATE L2



Procédure NP11A1 à NP11A-15 :

Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Dissoudre le ligand [L2](#) dans un solvant organique miscible à l'eau tel que le N,N-diméthylformamide (DMF), l'acétonitrile (CH₃CN) ou un mélange binaire tertbutanol (tBuOH)/H₂O Milli-Q en proportion 50/50 et préparer des solutions de ligand [L2](#) à 40,

80, 100, 120 et 200 mg/mL. Chauffer à nouveau la solution de nanoparticules à 80°C et après 5 à 10 minutes, ajouter 1 mL de la solution de ligand [L2](#) préalablement préparée. Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes.

Procédure NP11B1 à NP11B-15 :

Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#): Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Dissoudre le ligand [L2](#) dans un solvant organique miscible à l'eau tel que le N,N-diméthylformamide (DMF), l'acétonitrile (CH₃CN) ou un mélange binaire tertbutanol (tBuOH)/H₂O Milli-Q en proportion 50/50 et préparer des solutions de ligand [L2](#) à 40, 80, 100, 120 et 200 mg/mL.

Chauffer 10 mL de la solution de nanoparticules à 80°C et après 5 à 10 minutes, ajouter 0,5 mL de la solution de ligand [L2](#) préalablement préparée. Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes.

Procédure NP11C1 à NP11C-15 :

Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Dissoudre le ligand [L2](#) dans un solvant organique miscible à l'eau tel que le N,N-diméthylformamide (DMF), l'acétonitrile (CH₃CN) ou un mélange binaire tertbutanol (tBuOH)/H₂O Milli-Q en proportion 50/50 et préparer des solutions de ligand [L2](#) à 40, 80, 100, 120 et 200 mg/mL.

Chauffer 5 mL de la solution de nanoparticules à 80°C et après 5 à 10 minutes, ajouter 0,25 mL de la solution de ligand [L2](#) préalablement préparée. Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes.

Procédure finale NP11 : Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage. Ajouter 0,25 mL de ligand [L2](#) préalablement dissous dans du THF à la concentration de 90 mg/mL (0,22 mM) à 5 mL de la solution de nanoparticules [NP3B-1](#). Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP11

Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$

Analyse MET NP11

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 16 \pm 2 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP11 : $\zeta = +42,7 \text{ mV}$

IV-4 FONCTIONNALISATION AVEC LES LIGANDS L3 A L8

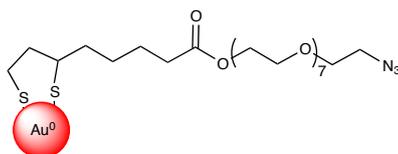
IV-4-1 Procédure générale :

Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Dissoudre le ligand d'intérêt dans un volume de THF adapté afin d'obtenir une solution à 0,21 mM.

A 5 mL de la solution aqueuse de NP3B-1 à 40 mg/L, ajouter 0,25 mL de la solution de ligand à la concentration de 0,21 mM et laisser sous agitation à température ambiante pendant 45 minutes.

IV-4-2 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP12 :



Préparer une solution de ligand [L3](#) à 120 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules [NP3B-1](#) à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP12

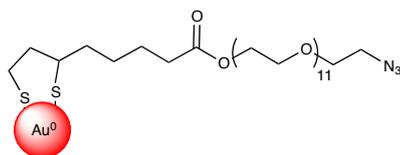
Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 536 \text{ nm}$

Analyse MET NP12

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 16,5 \pm 2 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP12 : $\zeta = +1,7 \text{ mV}$

IV-4-3 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP13 :



Préparer une solution de ligand **L4** à 158 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP13

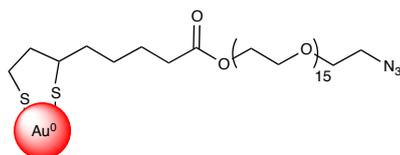
Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$

Analyse MET NP13

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 17,14 \pm 1,9 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP13 : $\zeta = +0,6 \text{ mV}$

IV-4-4 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP14 :



Préparer une solution de ligand **L4** à 190 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP14

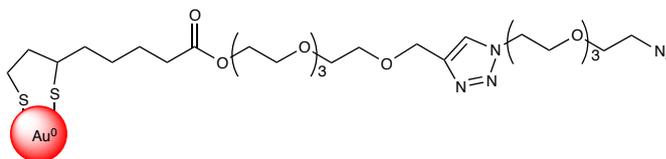
Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$

Analyse MET NP14

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 16,3 \pm 1,8 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP14 : $\zeta = +1,4 \text{ mV}$

IV-4-5 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP15 :



Préparer une solution de ligand **L5** à 139 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP15

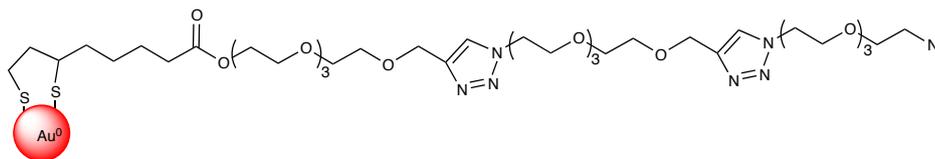
Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 533 \text{ nm}$

Analyse MET NP15

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 16,05 \pm 2,3 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP15 : $\zeta = -0,7 \text{ mV}$

IV-4-6 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP16 :



Préparer une solution de ligand **L6** à 195 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP16

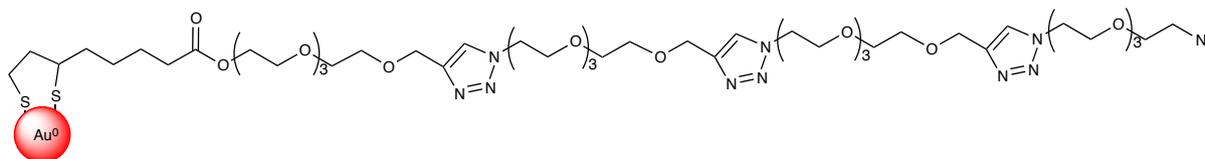
Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 534 \text{ nm}$

Analyse MET NP16

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 17,6 \pm 2,1 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP16 : $\zeta = -1,4 \text{ mV}$

IV-4-7 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP17 :



Préparer une solution de ligand **L6** à 245 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

Analyse UV-Visible NP17

Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 535 \text{ nm}$

Analyse MET NP17

Analyse MET après centrifugation à 5000 rpm : $d = 17,4 \pm 2,4 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP17 : $\zeta = +2,6 \text{ mV}$

IV-5 FONCTIONNALISATION AVEC LA LYSINE : NP18

Préparer une solution d'acide lipoiqye à la concentration de 40 mg/mL par dissolution dans une solution aqueuse équimolaire de soude NaOH. Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure **NP3B-1** : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage. Chauffer à nouveau la solution de nanoparticules à 80°C et après 5 à 10 minutes, ajouter 1 mL de la solution aqueuse d'acide lipoiqye préalablement préparée. Laisser sous agitation à 80°C pendant 45 minutes. Laisser la solution revenir à température ambiante.

A la solution de nanoparticules fonctionnalisées par le sel sodique d'acide lipoiqye, ajouter 40,0 mg (0,19 mmol ; 3 Eq) de DCC et 22,3 mg (0,19 mmol ; 3 Eq) de NHS préalablement dissous dans 1 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. laisser sous agitation pendant 3 heures à température ambiante.

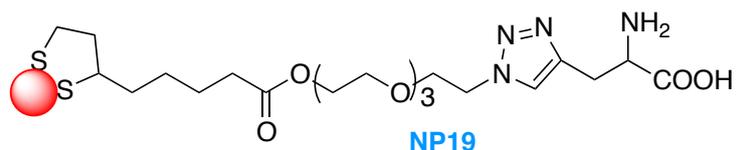
Prélever 5 mL de cette solution et l'ajouter goutte à goutte à 7 mg (0,048 mmol ; 1,3 Eq) de lysine préalablement dissous dans 1 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 24 heures.

Analyse UV-Visible NP18

Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 542 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP18 : $\zeta = -31,6 \text{ mV}$

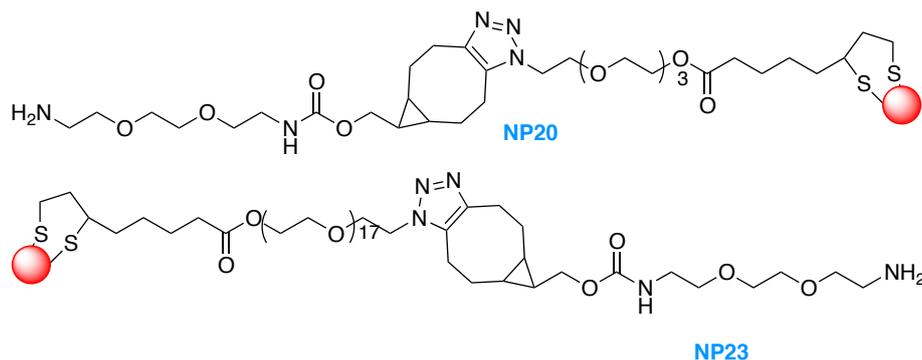
IV-6 CHIMIE CLICK AVEC LA PROPARGYLGLYCINE NP19



Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage. Prélever 5 mL de la solution de nanoparticules [NP3B-1](#) et ajouter 0,25 mL de ligand [L2](#) préalablement dissous dans du THF à la concentration de 90 mg/mL. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 45 minutes. Ajouter la source de cuivre ainsi que l'acide ascorbique et le PMDTA selon les indications présentées dans le tableau ci-dessous. Après 30 minutes, une décoloration de la solution est observée ainsi que la sédimentation de particules noires visibles à l'œil nu.

	CuSO ₄ /acide ascorbique	CuI	CuBr	CuSO ₄ /acide ascorbique/PMDTA	CuI/PMDTA	CuBr/PMDTA
Eq	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4	0,25/0,3 1/2 2/4
Solvant	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF	tBuOH/H ₂ O THF DMF
T°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C	TA ; 50°C
NP11	1 Eq ; 0,22 mmol	1 Eq ; 0,22 mmol	1 Eq ; 0,22 mmol			

IV-7 CHIMIE CLICK AVEC LA CYCLOOCTYNE : NP20 à NP26



Procédure générale : Les nanoparticules d'or sont synthétisées selon la procédure [NP3B-1](#) puis fonctionnalisées avec les ligands [L2 à L8](#) respectivement selon les procédures décrites ci-dessus.

Ajouter 0,039 mmol de cyclooctyne (12,5 mg ; 0,7 Eq) aux 5 mL de solution de nanoparticules fonctionnalisées. Laisser sous agitation à température ambiante pendant 24 heures. Seules les nanoparticules [NP20](#) et [NP23](#) sont demeurées stables au cours du temps.

Analyse UV-Visible NP20

Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 532 \text{ nm}$

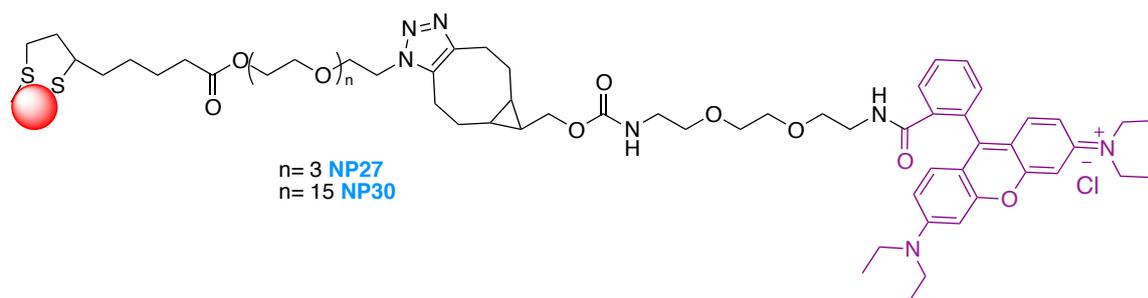
Analyse UV-Visible NP23

Analyse UV-Visible du brut et après centrifugation à 5000 rpm : $\lambda_{\max} = 537 \text{ nm}$

Potentiométrie zêta NP20 : $\zeta = +30,4 \text{ mV}$

Potentiométrie zêta NP23 : $\zeta = +8,98 \text{ mV}$

IV-8 COUPLAGE AVEC LA RHODAMINE : NP27 et NP30



Dissoudre 0,25 mmol (123, 2 mg ; 1 Eq) de rhodamine dans 10 mL d'un mélange binaire THF/H₂O Milli-Q en proportion 50/50 et ajouter 0,75 mmol (86,3 mg ; 3 Eq) de NHS. Faire buller le milieu réactionnel sous flux d'Argon et le maintenir sous atmosphère inerte. Ajouter goutte à goutte 0,75 mmol (154,7 mg ; 3 Eq) de DCC préalablement dissous dans 2 mL d'un mélange THF/H₂O Milli-Q : 50/50. Laisser sous agitation pendant 3 heures. Prélever 1,2 mL de cette solution et l'ajouter aux 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules [NP20](#) et [NP23](#). Laisser sous agitation pendant 24 heures.

Analyse de fluorescence :

Préparation des échantillons : Dans une cuve d'analyse en quartz, introduire 1 mL de la solution de nanoparticules [NP27](#) et compléter avec 2 mL d'H₂O Milli-Q. Procéder de même avec la solution de nanoparticules [NP30](#). La quantité théorique de ligands fonctionnalisés avec de la rhodamine est donc de 5,52 μmol .

Préparation de la référence : Prélever 1 mL de la solution d'ester de rhodamine et compléter avec 4 mL d'H₂O Milli-Q. Disposer 3 mL de cette solution dans la cuve d'analyse.

Le blanc est réalisé avec de l'eau ultrapure de qualité Milli-Q. Les échantillons sont excités à 533 nm et le spectre d'émission est enregistré de 500 à 800 nm.

L'intensité maximale de la référence est de 9775378,8 pour une $\lambda_{\text{max}} = 626$ nm

L'intensité maximale de [NP27](#) est de $9,12 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\text{max}} = 625$ nm

L'intensité maximale de [NP30](#) est de $9,73 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\text{max}} = 617$ nm

L'intensité à la longueur d'onde λ_{max} théorique (627 nm) est de $9,73 \cdot 10^6$ pour la référence, de $9,02 \cdot 10^6$ pour [NP27](#) et de $9,15 \cdot 10^6$ pour [NP30](#).

IV-9 FONCTIONNALISATION AVEC LES LIGANDS L13 A L19

IV-9-1 Procédure générale :

Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure [NP3B-1](#) : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante et déterminer la concentration en or métallique Au⁰ à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Dissoudre le ligand d'intérêt dans un volume de THF adapté afin d'obtenir une solution à 0,21 mM.

A 5 mL de la solution aqueuse de [NP3B-1](#) à 40 mg/L, ajouter 0,25 mL de la solution de ligand à la concentration de 0,21 mM et laisser sous agitation à température ambiante pendant 45 minutes.

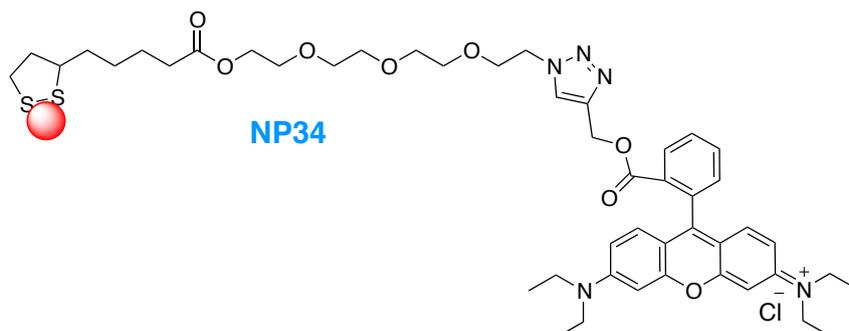
Analyse de fluorescence :

Préparation des échantillons : Dans une cuve d'analyse en quartz, introduire 1 mL de la solution de nanoparticules et compléter avec 2 mL d'H₂O Milli-Q. La quantité théorique de ligands fonctionnalisés avec de la rhodamine est donc de 11,1 μmol .

Préparation de la référence : Prélever 1 mL de la solution de ligand et compléter avec 4 mL d'H₂O Milli-Q. Disposer 3 mL de cette solution dans la cuve d'analyse.

Le blanc est réalisé avec de l'eau ultrapure de qualité Milli-Q. Les échantillons sont excités à 533 nm et le spectre d'émission est enregistré de 500 à 800 nm.

IV-9-2 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP34 :



Préparer une solution de ligand **L13** à 194 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

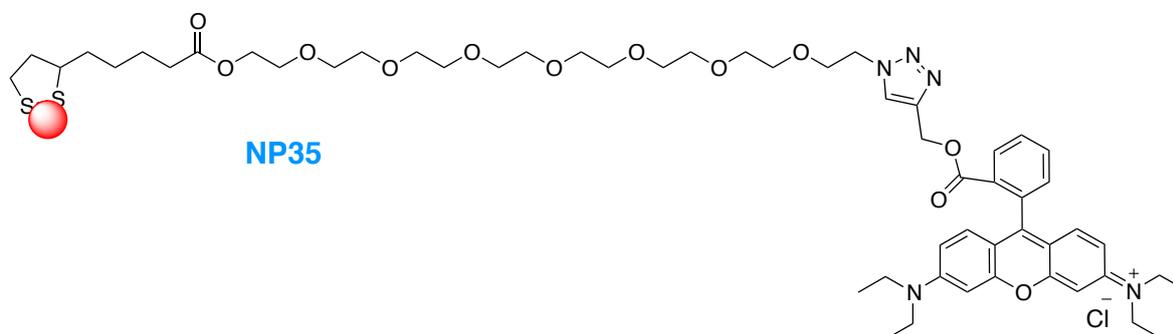
Analyse de fluorescence :

L'intensité maximale de la référence est de $5,92 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 626$ nm

L'intensité maximale de **NP34** est de $3,71 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 630$ nm

L'intensité à la longueur d'onde λ_{\max} théorique (627 nm) est de $5,90 \cdot 10^6$ pour la référence et de $3,63 \cdot 10^6$ pour **NP34**.

IV-9-3 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP35 :



Préparer une solution de ligand **L14** à 231 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

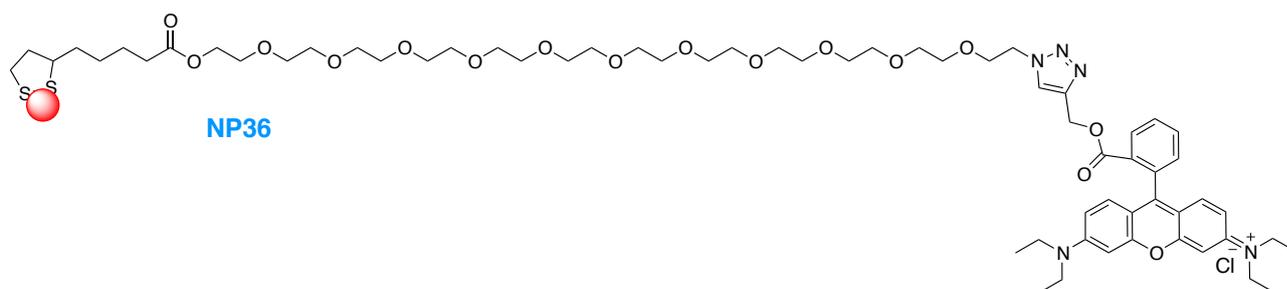
Analyse de fluorescence :

L'intensité maximale de la référence est de $2,84 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 633$ nm

L'intensité maximale de **NP35** est de $2,55 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 627$ nm

L'intensité à la longueur d'onde λ_{\max} théorique (627 nm) est de $2,55 \cdot 10^6$ pour la référence et de $1,63 \cdot 10^6$ pour **NP35**.

IV-9-4 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP36 :



Préparer une solution de ligand **L15** à 268 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

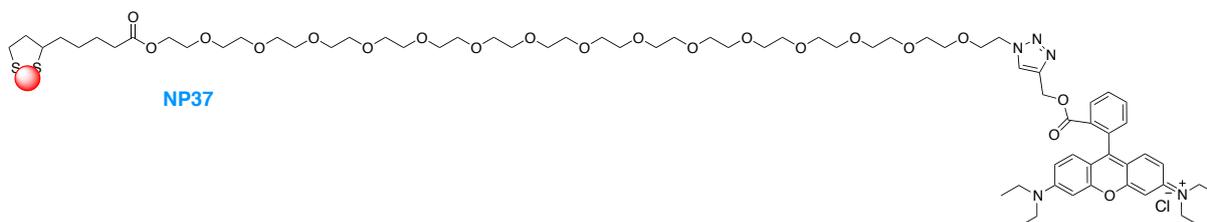
Analyse de fluorescence :

L'intensité maximale de la référence est de $2,84 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 633$ nm

L'intensité maximale de **NP36** est de $9,19 \cdot 10^5$ pour une $\lambda_{\max} = 623$ nm

L'intensité à la longueur d'onde λ_{\max} théorique (627 nm) est de $2,19 \cdot 10^6$ pour la référence et de $9,03 \cdot 10^5$ pour **NP36**.

IV-9-5 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP37 :



Préparer une solution de ligand **L16** à 305 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

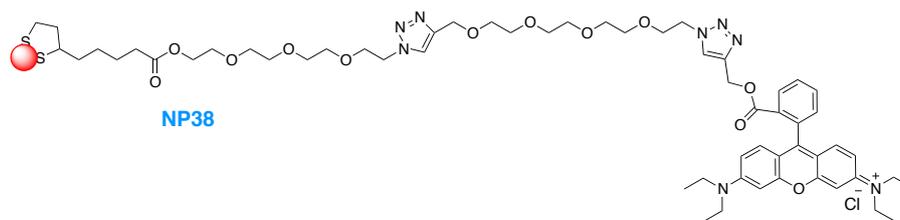
Analyse de fluorescence :

L'intensité maximale de la référence est de $2,20 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 632$ nm

L'intensité maximale de **NP37** est de $9,30 \cdot 10^5$ pour une $\lambda_{\max} = 623$ nm

L'intensité à la longueur d'onde λ_{\max} théorique (627 nm) est de $2,06 \cdot 10^6$ pour la référence et de $8,96 \cdot 10^5$ pour **NP37**.

IV-9-6 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP38 :



Préparer une solution de ligand **L17** à 248 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

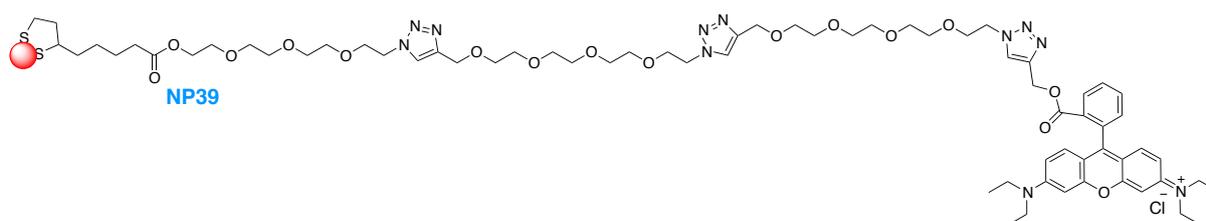
Analyse de fluorescence :

L'intensité maximale de la référence est de $6,32 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 627$ nm

L'intensité maximale de **NP38** est de $2,55 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 630$ nm

L'intensité à la longueur d'onde λ_{\max} théorique (627 nm) est de $6,32 \cdot 10^6$ pour la référence et de $2,52 \cdot 10^6$ pour **NP38**.

IV-9-7 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP39 :



Préparer une solution de ligand **L18** à 302 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

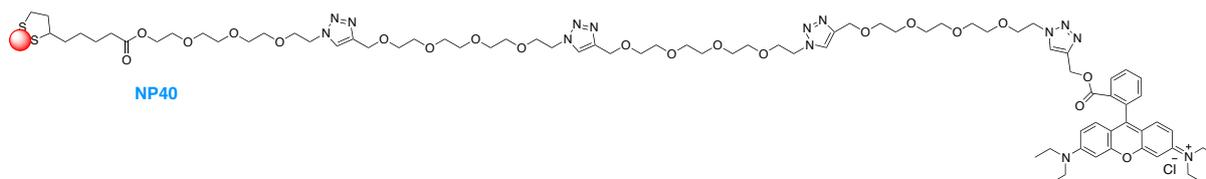
Analyse de fluorescence :

L'intensité maximale de la référence est de $3,23 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 633$ nm

L'intensité maximale de **NP39** est de $1,02 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 633$ nm

L'intensité à la longueur d'onde λ_{\max} théorique (627 nm) est de $2,96 \cdot 10^6$ pour la référence et de $8,97 \cdot 10^5$ pour **NP39**.

IV-9-8 Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP40 :



Préparer une solution de ligand **L19** à 356 mg/mL dans le THF. A température ambiante, ajouter 0,25 mL de cette solution à 5 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40 mg/L. laisser sous agitation continue à température ambiante pendant 45 minutes.

Analyse de fluorescence :

L'intensité maximale de la référence est de $4,42 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 633$ nm

L'intensité maximale de **NP40** est de $4,66 \cdot 10^6$ pour une $\lambda_{\max} = 630$ nm

L'intensité à la longueur d'onde λ_{\max} théorique (627 nm) est de $4,50 \cdot 10^6$ pour la référence et de $4,03 \cdot 10^6$ pour **NP40**.

IV-10 FONCTIONNALISATION AVEC LES APTAMÈRES

Procédure générale : Préparer une solution aqueuse de nanoparticules d'or selon la procédure **NP3B-1** : Dans un réacteur en verre, dissoudre 2 mL de solution aqueuse de sels d'or et compléter avec 19 mL d'H₂O ultrapure de qualité Milli-Q. Chauffer à 80°C à l'aide d'un bain marie puis après 5 à 10 minutes, ajouter rapidement 1 mL de tétraéthylène glycol. Laisser sous agitation à 80°C pendant 40 minutes. Laisser la solution de nanoparticules revenir à température ambiante. Centrifuger deux fois à 2500 rpm pendant 20 minutes et éliminer le culot de centrifugation. Déterminer la concentration en or métallique Au⁰ du surnageant à l'aide de la courbe d'étalonnage.

Dissoudre l'aptamère d'intérêt dans 1 mL de solution aqueuse ultrapure tamponnée à pH 7,4 et exempte de RNase. Ce volume est alors ajouté à 2 mL de la solution de nanoparticules **NP3B-1** à la concentration de 40,0 mg/mL.

Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP41 : Dans un réacteur en verre à fond plat, introduire 2 mL de solution aqueuse de nanoparticules **NP3B-1** puis ajouter 1 mL de solution aqueuse d'aptamère **TBA-1** à la concentration de 40 nmol/mL.

Incubation en présence de thrombine : Introduire 300 μ L de solution de nanoparticules fonctionnalisées **NP41** et ajouter 900 μ L de thrombine en solution dans de l'eau ultrapure de qualité Milli-Q.

Analyse de fluorescence en l'absence de thrombine :

Préparation des échantillons : Dans une cuve d'analyse en quartz, introduire 0,5 mL de la solution de nanoparticules fonctionnalisées avec **TBA-1** et compléter avec 2,5 mL d'H₂O Milli-Q.

Préparation de la référence : Dans une cuve d'analyse en quartz, introduire 0,5 mL de la solution de ligand [TBA-1](#) et compléter avec 2,5 mL d'H₂O Milli-Q.

Le blanc est réalisé avec de l'eau ultrapure de qualité Milli-Q. Les échantillons sont excités à 488 nm et le spectre d'émission est enregistré de 400 à 750 nm.

Analyse de fluorescence en présence de thrombine:

Préparation des échantillons : Dans une cuve d'analyse en quartz, introduire 0,5 mL de la solution de nanoparticules fonctionnalisée avec [TBA-1](#) et la thrombine et compléter avec 2,5 mL d'H₂O Milli-Q.

Préparation de la référence : Dans une cuve d'analyse en quartz, introduire 0,5 mL de la solution de ligand [TBA-1](#) et compléter avec 2,5 mL d'H₂O Milli-Q.

Le blanc est réalisé avec de l'eau ultrapure de qualité Milli-Q. Les échantillons sont excités à 488 nm et le spectre d'émission est enregistré de 400 à 750 nm.

Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP42 : Dans un réacteur en verre à fond plat, introduire 2 mL de solution aqueuse de nanoparticules [NP3B-1](#) puis ajouter 1 mL de solution aqueuse d'aptamère [Apt-1](#) à la concentration de 67 nmol/mL.

Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP43 : Dans un réacteur en verre à fond plat, introduire 2 mL de solution aqueuse de nanoparticules [NP3B-1](#) puis ajouter 1 mL de solution aqueuse d'aptamère [Apt-2](#) à la concentration de 27,5 nmol/mL.

Synthèse et fonctionnalisation des nanoparticules NP44 : Dans un réacteur en verre à fond plat, mélanger les nanoparticules [NP42](#) et [NP43](#). Analyses en cours.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Etzioni R, Urban N, Ramsey S, McIntosh M, Schwartz S, Reid B, et al. Early detection: The case for early detection. *Nat Rev Cancer*. 2003 Apr;3(4):243–52.
2. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. The structure of a typical antibody molecule. 2001 [cited 2016 Aug 15]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27144/>
3. jfmadre. Des modèles moléculaires d'anticorps — Acces [Internet]. [cited 2016 Aug 16]. Available from: <http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/enseigner/ressources-logicielles/sequences/des-modeles-moleculaires-danticorps>
4. Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. *Int J Biomed Sci IJBS*. 2006 Sep;2(3):217–35.
5. Berson SA, Yalow RS. Radioimmunoassays of peptide hormones in plasma. *N Engl J Med*. 1967 Sep 21;277(12):640–7.
6. Landon J, Moffat AC. The radioimmunoassay of drugs. A review. *Analyst*. 1976 Jan 1;101(1201):225–43.
7. Bast RC, Klug TL, John ES, Jenison E, Niloff JM, Lazarus H, et al. A Radioimmunoassay Using a Monoclonal Antibody to Monitor the Course of Epithelial Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 1983 Oct 13;309(15):883–7.
8. Hicks JM. Fluorescence immunoassay. *Hum Pathol*. 1984 Feb;15(2):112–6.
9. Coons AH, Creech HJ, Jones RN. Immunological Properties of an Antibody Containing a Fluorescent Group. *Exp Biol Med*. 1941 Jun 1;47(2):200–2.
10. Dandliker WB, Halbert SP, Florin MC, Alonso R, Schapiro HC. Study of Penicillin Antibodies by Fluorescence Polarization and Immunodiffusion. *J Exp Med*. 1965 Nov 30;122(6):1029–48.
11. Dandliker WB, Feigen GA. Quantification of the antigen-antibody reaction by the polarization of fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun*. 1961 Jul 26;5(4):299–304.
12. Hemmilä I. Fluoroimmunoassays and immunofluorometric assays. *Clin Chem*. 1985 Mar;31(3):359–70.
13. Dickson EF, Pollak A, Diamandis EP. Time-resolved detection of lanthanide luminescence for ultrasensitive bioanalytical assays. *J Photochem Photobiol B*. 1995 Jan;27(1):3–19.
14. Smith DS, Al-Hakim MH, Landon J. A review of fluoroimmunoassay and immunofluorometric assay. *Ann Clin Biochem*. 1981 Sep;18(Pt 5):253–74.
15. Xie C, Wang G. Development of simultaneous detection of total prostate-specific antigen (tPSA) and free PSA with rapid bead-based immunoassay. *J Clin Lab Anal*.

2011;25(1):37–42.

16. Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF. “Homogeneous” enzyme immunoassay. A new immunochemical technique. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972 May 26;47(4):846–51.
17. Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol*. 1978 Jun;31(6):507.
18. O’sullivan MJ, Bridges JW, Marks V. Enzyme Immunoassay: A Review. *Ann Clin Biochem Int J Biochem Med*. 1979 Jan 1;16(1–6):221–39.
19. Lee Y, Jeong Y, Kang HJ, Chung SJ, Chung BH. Cascade enzyme-linked immunosorbent assay (CELISA). *Biosens Bioelectron*. 2009 Oct 15;25(2):332–7.
20. Wu J, Fu Z, Yan F, Ju H. Biomedical and clinical applications of immunoassays and immunosensors for tumor markers. *TrAC Trends Anal Chem*. 2007 Jul;26(7):679–88.
21. Watson JD, Crick FHC. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature*. 1953 Apr 25;171(4356):737–8.
22. Reece JB, Campbell NA. *Campbell biologie*. Saint-Laurent; Montréal: ERPI ; Pearson; 2012.
23. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988 Jan 29;239(4839):487–91.
24. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*. 1975 Nov 5;98(3):503–17.
25. Wetmur JG. DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1991;26(3–4):227–59.
26. Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*. 1996 Mar;14(3):303–8.
27. Huppert JL. Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chem Soc Rev*. 2008;37(7):1375.
28. Rescifina A, Zagni C, Varrica MG, Pistarà V, Corsaro A. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. *Eur J Med Chem*. 2014 Mar 3;74:95–115.
29. Harada K, Frankel AD. Identification of two novel arginine binding DNAs. *EMBO J*. 1995;14(23):5798.
30. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990 Aug 3;249(4968):505–10.
31. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific

ligands. *Nature*. 1990 Aug 30;346(6287):818–22.

32. Jayasena SD. Aptamers: An Emerging Class of Molecules That Rival Antibodies in Diagnostics. *Clin Chem*. 1999 Sep 1;45(9):1628–50.
33. Yüce M, Ullah N, Budak H. Trends in aptamer selection methods and applications. *The Analyst*. 2015 Aug 21;140(16):5379–99.
34. Blind M, Blank M. Aptamer Selection Technology and Recent Advances. *Mol Ther — Nucleic Acids*. 2015 Jan 13;4(1):e223.
35. Mendonsa SD, Bowser MT. In vitro selection of aptamers with affinity for neuropeptide Y using capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc*. 2005 Jul 6;127(26):9382–3.
36. Stoltenburg R, Nikolaus N, Strehlitz B. Capture-SELEX: Selection of DNA Aptamers for Aminoglycoside Antibiotics. *J Anal Methods Chem*. 2012 Dec 30;2012:e415697.
37. Trapaidze A, Bancaud A, Brut M. Binding modes of thrombin binding aptamers investigated by simulations and experiments. *Appl Phys Lett*. 2015 Jan 26;106(4):43702.
38. Macaya RF, Schultze P, Smith FW, Roe JA, Feigon J. Thrombin-binding DNA aptamer forms a unimolecular quadruplex structure in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3745–9.
39. Schultze P, Macaya RF, Feigon J. Three-dimensional Solution Structure of the Thrombin-binding DNA Aptamer d(GGTTGGTGTGGTTGG). *J Mol Biol*. 1994 Feb 3;235(5):1532–47.
40. Kumar N, Maiti S. Quadruplex to Watson–Crick duplex transition of the thrombin binding aptamer: a fluorescence resonance energy transfer study. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Jul 2;319(3):759–67.
41. Nagatoishi S, Nojima T, Galezowska E, Juskowiak B, Takenaka S. G Quadruplex-Based FRET Probes with the Thrombin-Binding Aptamer (TBA) Sequence Designed for the Efficient Fluorometric Detection of the Potassium Ion. *ChemBioChem*. 2006 Nov 6;7(11):1730–7.
42. Li X, Shen L, Zhang D, Qi H, Gao Q, Ma F, et al. Electrochemical impedance spectroscopy for study of aptamer-thrombin interfacial interactions. *Biosens Bioelectron*. 2008 Jun 15;23(11):1624–30.
43. Nagatoishi S, Isono N, Tsumoto K, Sugimoto N. Loop residues of thrombin-binding DNA aptamer impact G-quadruplex stability and thrombin binding. *Biochimie*. 2011 Aug;93(8):1231–8.
44. Pagano B, Martino L, Randazzo A, Giancola C. Stability and Binding Properties of a Modified Thrombin Binding Aptamer. *Biophys J*. 2008 Jan 15;94(2):562–9.
45. Padmanabhan K, Padmanabhan KP, Ferrara JD, Sadler JE, Tulinsky A. The

- structure of alpha-thrombin inhibited by a 15-mer single-stranded DNA aptamer. *J Biol Chem.* 1993 Aug 25;268(24):17651–4.
46. Han K, Liang Z, Zhou N. Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors. *Sensors.* 2010 May 4;10(5):4541–57.
47. Zhao S, Yang W, Lai RY. A folding-based electrochemical aptasensor for detection of vascular endothelial growth factor in human whole blood. *Biosens Bioelectron.* 2011 Jan;26(5):2442–7.
48. Chen Z, Chen L, Ma H, Zhou T, Li X. Aptamer biosensor for label-free impedance spectroscopy detection of potassium ion based on DNA G-quadruplex conformation. *Biosens Bioelectron.* 2013 Oct 15;48:108–12.
49. Wang W, Chen C, Qian MX, Zhao XS. Aptamer biosensor for protein detection based on guanine-quenching. *Sens Actuators B Chem.* 2008 Jan 29;129(1):211–7.
50. Xiao SJ, Hu PP, Li YF, Huang CZ, Huang T, Xiao GF. Aptamer-mediated turn-on fluorescence assay for prion protein based on guanine quenched fluorophore. *Talanta.* 2009 Oct 15;79(5):1283–6.
51. Huang D-W, Niu C-G, Qin P-Z, Ruan M, Zeng G-M. Time-resolved fluorescence aptamer-based sandwich assay for thrombin detection. *Talanta.* 2010 Nov 15;83(1):185–9.
52. Kong L, Xu J, Xu Y, Xiang Y, Yuan R, Chai Y. A universal and label-free aptasensor for fluorescent detection of ATP and thrombin based on SYBR Green I dye. *Biosens Bioelectron.* 2013 Apr 15;42:193–7.
53. Li N, Ho C-M. Aptamer-Based Optical Probes with Separated Molecular Recognition and Signal Transduction Modules. *J Am Chem Soc.* 2008 Feb 1;130(8):2380–1.
54. Han K, Chen L, Lin Z, Li G. Target induced dissociation (TID) strategy for the development of electrochemical aptamer-based biosensor. *Electrochem Commun.* 2009 Jan;11(1):157–60.
55. Toh SY, Citartan M, Gopinath SCB, Tang T-H. Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay. *Biosens Bioelectron.* 2015 Feb 15;64:392–403.
56. Barthelmebs L, Jonca J, Hayat A, Prieto-Simon B, Marty J-L. Enzyme-Linked Aptamer Assays (ELAAs), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of Ochratoxin A in wine. *Food Control.* 2011 May;22(5):737–43.
57. a) Durand G, Dausse E, Goux E, Fiore E, Peyrin E, Ravelet C, Toulmé J-J. A combinatorial approach to the repertoire of RNA kissing motifs; towards multiplex detection by switching hairpin aptamers. *Nucleic Acids Res.* 2016 May 19;44(9):4450–9.
b) Durand G, Lisi S, Ravelet C, Dausse E, Peyrin E, Toulmé J-J. Riboswitches based on kissing complexes for the detection of small ligands. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2014

Jul 1;53(27):6942–5.

c) Goux E, Lisi S, Ravelet C, Durand G, Fiore E, Dausse E, Toulmé J-J, Peyrin E. An improved design of the kissing complex-based aptasensor for the detection of adenosine. *Anal Bioanal Chem.* 2015 Aug;407(21): 6515-24.

d) Chovelon B, Durand G, Dausse E, Toulmé J-J, Faure P, Peyrin E, Ravelet C. ELAKCA: Enzyme-Linked Aptamer Kissing Complex Assay as a Small Molecule Sensing Platform. *Anal. Chem.* 2016 Mar;88(5): 2570-5.

58. Svobodová M, Pinto A, Nadal P, O' Sullivan C-K. Comparison of different methods for generation of single-stranded DNA for SELEX processes. *Anal Bioanal Chem.* 2012 Aug;404(3):835-42.

59. Zhang Y, Chen Y, Han D, Ocoy I, Tan W. Aptamers selected by cell-SELEX for application in cancer studies. *Bioanalysis.* 2010 May;2(5):907-18.

60. Daniel M-C, Astruc D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chem Rev.* 2004 Jan;104(1):293–346.

61. Déjà dans l'Antiquité... [Internet]. *Courrier international.* 2013 [cited 2016 Aug 4]. Available from: <http://www.courrierinternational.com/article/2013/07/04/deja-dans-l-antiquite>

62. Faraday M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light [Internet]. Royal Society of London; 1857 [cited 2016 Oct 10]. Available from: <http://archive.org/details/philtrans01816596>

63. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951 Jan 1;11(0):55–75.

64. Mer VKL. Nucleation in Phase Transitions. *Ind Eng Chem.* 1952 Jun 1;44(6):1270–7.

65. Frens G. Particle size and sol stability in metal colloids. *Kolloid-Z Z Für Polym.* 1972 Jul;250(7):736–41.

66. Frens G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature.* 1973 Jan 1;241(105):20–2.

67. Takiyama K. Formation and Aging of Precipitates. VIII. Formation of Monodisperse Particles (1) Gold Sol Particles by Sodium Citrate Method. *Bull Chem Soc Jpn.* 1958 Aug 1;31(8):944–50.

68. Chow MK, Zukoski CF. Gold Sol Formation Mechanisms: Role of Colloidal Stability. *J Colloid Interface Sci.* 1994 Jun 1;165(1):97–109.

69. Polte J, Ahner TT, Delissen F, Sokolov S, Emmerling F, Thünemann AF, et al. Mechanism of gold nanoparticle formation in the classical citrate synthesis method

derived from coupled in situ XANES and SAXS evaluation. *J Am Chem Soc.* 2010 Feb 3;132(4):1296–301.

70. Tomalová I, Lee C-H, Chen W-T, Chiang C-K, Chang H-T, Preisler J. Analysis of the Formation Process of Gold Nanoparticles by Surface-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2013 Jan 11;24(2):305–8.

71. Turkevich J. Colloidal gold. Part I. *Gold Bull.* 18(3):86–91.

72. Kimling J, Maier M, Okenve B, Kotaidis V, Ballot H, Plech A. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. *J Phys Chem B.* 2006 Aug 1;110(32):15700–7.

73. Zabetakis K, Ghann WE, Kumar S, Daniel M-C. Effect of high gold salt concentrations on the size and polydispersity of gold nanoparticles prepared by an extended Turkevich–Frens method. *Gold Bull.* 2012 Oct 23;45(4):203–11.

74. Ojea-Jiménez I, Bastús NG, Puentes V. Influence of the Sequence of the Reagents Addition in the Citrate-Mediated Synthesis of Gold Nanoparticles. *J Phys Chem C.* 2011 Aug 18;115(32):15752–7.

75. Sivaraman SK, Kumar S, Santhanam V. Monodisperse sub-10 nm gold nanoparticles by reversing the order of addition in Turkevich method: the role of chloroauric acid. *J Colloid Interface Sci.* 2011 Sep 15;361(2):543–7.

76. Slot JW, Geuze HJ. A method to prepare isodisperse colloidal gold sols in the size range 3–17 NM. *Ultramicroscopy.* 1984 Jan 1;15(4):383.

77. Li C, Li D, Wan G, Xu J, Hou W. Facile synthesis of concentrated gold nanoparticles with low size-distribution in water: temperature and pH controls. *Nanoscale Res Lett.* 2011 Jul 6;6(1):440.

78. Giersig M, Mulvaney P. Preparation of ordered colloid monolayers by electrophoretic deposition. *Langmuir.* 1993 Dec 1;9(12):3408–13.

79. Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin DJ, Whyman R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid–Liquid system. *J Chem Soc Chem Commun.* 1994 Jan 1;(7):801–2.

80. Brown KR, Natan MJ. Hydroxylamine Seeding of Colloidal Au Nanoparticles in Solution and on Surfaces. *Langmuir.* 1998 Feb 1;14(4):726–8.

81. Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Seed-Mediated Growth Approach for Shape-Controlled Synthesis of Spheroidal and Rod-like Gold Nanoparticles Using a Surfactant Template. *Adv Mater.* 2001 Sep 1;13(18):1389–93.

82. Rodríguez-Fernández J, Pérez-Juste J, García de Abajo FJ, Liz-Marzán LM. Seeded growth of submicron Au colloids with quadrupole plasmon resonance modes. *Langmuir ACS J Surf Colloids.* 2006 Aug 1;22(16):7007–10.

83. Zhao P, Li N, Astruc D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. *Coord Chem Rev.* 2013 Feb;257(3-4):638-65.
84. Rodríguez-Fernández J, Pérez-Juste J, Mulvaney P, Liz-Marzán LM. Spatially-directed oxidation of gold nanoparticles by Au(III)-CTAB complexes. *J Phys Chem B.* 2005 Aug 4;109(30):14257-61.
85. Kim DY, Yu T, Cho EC, Ma Y, Park OO, Xia Y. Synthesis of Gold Nano-hexapods with Controllable Arm Lengths and Their Tunable Optical Properties. *Angew Chem Int Ed.* 2011 Jul 4;50(28):6328-31.
86. Beyond jewelry: Engineering new uses for gold [Internet]. MIT News. [cited 2016 Aug 4]. Available from: <http://news.mit.edu/2008/nanorod-0822>
87. Gold and silver nanoparticles shape up for a square future - nanotechweb.org [Internet]. [cited 2016 Aug 4]. Available from: <http://nanotechweb.org/cws/article/tech/16564>
88. Welcome to FutureNanoNeeds - FutureNanoNeeds [Internet]. [cited 2016 Aug 4]. Available from: <http://www.futurenanoneeds.eu/>
89. Jennings T, Strouse G. Past, present, and future of gold nanoparticles. *Adv Exp Med Biol.* 2007;620:34-47.
90. Jana NR, Gearheart L, Murphy CJ. Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir.* 2001 Oct 1;17(22):6782-6.
91. Nikoobakht B, El-Sayed MA. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem Mater.* 2003 May 1;15(10):1957-62.
92. Zhou J, Ralston J, Sedev R, Beattie DA. Functionalized gold nanoparticles: synthesis, structure and colloid stability. *J Colloid Interface Sci.* 2009 Mar 15;331(2):251-62.
93. Brust M, Fink J, Bethell D, Schiffrin DJ, Kiely C. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J Chem Soc Chem Commun.* 1995 Jan 1;(16):1655-6.
94. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM. Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology. *Chem Rev.* 2005 Apr 1;105(4):1103-70.
95. Shelley EJ, Ryan D, Johnson SR, Couillard M, Fitzmaurice D, Nellist PD, et al. Dialkyl Sulfides: Novel Passivating Agents for Gold Nanoparticles. *Langmuir.* 2002 Mar 1;18(5):1791-5.
96. Sardar R, Shumaker-Parry JS. 9-BBN Induced Synthesis of Nearly Monodisperse ω -Functionalized Alkylthiol Stabilized Gold Nanoparticles. *Chem Mater.* 2009 Apr 14;21(7):1167-9.

97. Ulman A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chem Rev.* 1996 Jan 1;96(4):1533–54.
98. Bain CD, Whitesides GM. Modeling organic surfaces with self-assembled monolayers. *Adv Mater.* 1989 Jan 1;1(4):110–6.
99. Sapsford KE, Algar WR, Berti L, Gemmill KB, Casey BJ, Oh E, Stewart HM, Medintz IL. Functionalizing Nanoparticles with Biological Molecules: Developing Chemistries that Facilitate Nanotechnology. *Chem Rev.* 2013 Mar 13;113(3):1904–2074.
100. Templeton AC, Hostetler MJ, Kraft CT, Murray RW. Reactivity of Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules: Steric Effects. *J Am Chem Soc.* 1998 Mar 1;120(8):1906–11.
101. Hostetler MJ, Templeton AC, Murray RW. Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules. *Langmuir.* 1999 May 1;15(11):3782–9.
102. Woehrle GH, Brown LO, Hutchison JE. Thiol-Functionalized, 1.5-nm Gold Nanoparticles through Ligand Exchange Reactions: Scope and Mechanism of Ligand Exchange. *J Am Chem Soc.* 2005 Feb;127(7):2172–83.
103. Beljonne D, Curutchet C, Scholes GD, Silbey RJ. Beyond Förster Resonance Energy Transfer in Biological and Nanoscale Systems. *J Phys Chem B.* 2009 May 14;113(19):6583–99.
104. Muhammed MAH, Shaw AK, Pal SK, Pradeep T. Quantum Clusters of Gold Exhibiting FRET. *J Phys Chem C.* 2008 Sep 18;112(37):14324–30.
105. Saha K, Agasti S-S, Kim C, Li X, Rotello V-M. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. *Chem Rev.* 2012 May; 112(5): 2739–79.
106. Zhao W, Brook MA, Li Y. Design of gold nanoparticle-based colorimetric biosensing assays. *Chembiochem Eur J Chem Biol.* 2008 Oct 13;9(15):2363–71.
107. Chen S-J, Huang Y-F, Huang C-C, Lee K-H, Lin Z-H, Chang H-T. Colorimetric determination of urinary adenosine using aptamer-modified gold nanoparticles. *Biosens Bioelectron.* 2008 Jun 15;23(11):1749–53.
108. Chiu T-C, Huang C-C. Aptamer-Functionalized Nano-Biosensors. *Sensors.* 2009 Dec 21;9(12):10356–88.
109. Wang W, Chen C, Qian M, Zhao XS. Aptamer biosensor for protein detection using gold nanoparticles. *Anal Biochem.* 2008 Feb 15;373(2):213–9.
110. Ao L, Gao F, Pan B, He R, Cui D. Fluoroimmunoassay for Antigen Based on Fluorescence Quenching Signal of Gold Nanoparticles. *Anal Chem.* 2006 Feb 1;78(4):1104–6.
111. Guo S, Wang E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. *Analytica Chimica Acta.* 2007;598:181–92.

112. Das J, Aziz M-A, Yang H. A Nanocatalyst-Based Assay for Proteins: DNA-Free Ultrasensitive Electrochemical Detection Using Catalytic Reduction of p-Nitrophenol by Gold-Nanoparticle Labels. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128 (50):16022-3.
113. Waddington CH. Embryology, Epigenetics and Biogenetics. *Nature.* 1956 Jun 30;177(4522):1241-1241.
114. Nanney DL. Epigenetic Control Systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1958 Jul 15;44(7):712-7.
115. Holliday R. Epigenetics: an overview. *Dev Genet.* 1994;15(6):453-7.
116. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1986 May 15;321(6067):209-13.
117. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-Induced Repression— Belts, Braces, and Chromatin. *Cell.* 1999 Nov 24;99(5):451-4.
118. Lim DHK, Maher ER. DNA methylation: a form of epigenetic control of gene expression. *Obstet Gynaecol.* 2010 Jan 1;12(1):37-42.
119. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Chromosomal DNA and Its Packaging in the Chromatin Fiber. 2002 [cited 2016 Sep 7]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26834/>
120. Zhao X, Ruan Y, Wei C-L. Tackling the epigenome in the pluripotent stem cells. *J Genet Genomics.* 2008 Jul;35(7):403-12.
121. Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and Methylation of Histones and their Possible Role in the Regulation of RNA Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1964 May;51(5):786-94.
122. Strahl BD, Allis CD. The language of covalent histone modifications. *Nature.* 2000 Jan 6;403(6765):41-5.
123. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011 Mar;21(3):381-95.
124. Tessarz P, Kouzarides T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014 Nov;15(11):703-8.
125. Yun M, Wu J, Workman JL, Li B. Readers of histone modifications. *Cell Res.* 2011 Apr;21(4):564-78.
126. Bártoová E, Krejčí J, Harničarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone Modifications and Nuclear Architecture: A Review. *J Histochem Cytochem.* 2008 Aug 1;56(8):711-21.
127. Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature.* 1983 Jan 6;301(5895):89-92.
128. Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA

hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*. 1998 Sep 3;395(6697):89–93.

129. Asmar F, Søgaaard A, Grønbaek K. Chapter 2 - DNA Methylation and Hydroxymethylation in Cancer A2 - Gray, Steven G. In: *Epigenetic Cancer Therapy* [Internet]. Boston: Academic Press; 2015 [cited 2016 Jun 4]. p. 9–30. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002063000021>

130. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007 Apr;8(4):286–98.

131. Chervona Y, Costa M. Histone modifications and cancer: biomarkers of prognosis? *Am J Cancer Res*. 2012 Aug 20;2(5):589–97.

132. Schneider R, Grosschedl R. Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Genes Dev*. 2007 Dec 1;21(23):3027–43.

133. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):27–36.

134. Turkevich J. Colloidal gold. Part II. *Gold Bull*. 18(4):125–31.

135. Zhang X, Servos MR, Liu J. Ultrahigh Nanoparticle Stability against Salt, pH, and Solvent with Retained Surface Accessibility via Depletion Stabilization. *J Am Chem Soc*. 2012 Jun 20;134(24):9910–3.

136. Pearson DA, Blanchette M, Baker ML, Guindon CA. Trialkylsilanes as scavengers for the trifluoroacetic acid deblocking of protecting groups in peptide synthesis. *Tetrahedron Lett*. 1989;30(21):2739–42.

137. Porter, LA, Ji D, Westcott SL, Graupe M, Czernuszewicz RS, Halas NJ, et al. Gold and Silver Nanoparticles Functionalized by the Adsorption of Dialkyl Disulfides. *Langmuir*. 1998 Dec;14(26):7378–86.

138. Susumu K, Mei BC, Mattoussi H. Multifunctional ligands based on dihydrolipoic acid and polyethylene glycol to promote biocompatibility of quantum dots. *Nat Protoc*. 2009;4(3):424–36.

139. Wallace TJ, Mahon JJ. Reactions of thiols with sulfoxides. II. Kinetics and mechanistic implications. *J Am Chem Soc*. 1964;86(19):4099–4103.

140. Dixit V, Van den Bossche J, Sherman DM, Thompson DH, Andres RP. Synthesis and grafting of thioctic acid-PEG-folate conjugates onto Au nanoparticles for selective targeting of folate receptor-positive tumor cells. *Bioconjug Chem*. 2006 Jun;17(3):603–9.

141. Svedhem S, Hollander C-Å, Shi J, Konradsson P, Liedberg B, Svensson SCT. Synthesis of a Series of Oligo(ethylene glycol)-Terminated Alkanethiol Amides Designed to Address Structure and Stability of Biosensing Interfaces. *J Org Chem*. 2001 Jun 1;66(13):4494–503.

142. Kanaras AG, Kamounah FS, Schaumburg K, Kiely CJ, Brust M. Thioalkylated tetraethylene glycol: a new ligand for water soluble monolayer protected gold clusters. *Chem Commun Camb Engl*. 2002 Oct 21;(20):2294–5.
143. Pérez-Rentero S, Grijalvo S, Peñuelas G, Fàbrega C, Eritja R. Thioctic acid derivatives as building blocks to incorporate DNA oligonucleotides onto gold nanoparticles. *Mol Basel Switz*. 2014;19(7):10495–523.
144. Dougan JA, Karlsson C, Smith WE, Graham D. Enhanced oligonucleotide–nanoparticle conjugate stability using thioctic acid modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jun;35(11):3668–75.
145. Loiseau FA, Hii KK (Mimi), Hill AM. Multigram Synthesis of Well-Defined Extended Bifunctional Polyethylene Glycol (PEG) Chains. *J Org Chem*. 2004 Feb 1;69(3):639–47.
146. Zada A, Avny Y, Zilkha A. Simplified synthesis of oligoethylene glycols. *J Surfactants Deterg*. 2001 Apr;4(2):163–6.
147. Bouzide A, Sauvé G. Silver(I) Oxide Mediated Highly Selective Monotosylation of Symmetrical Diols. Application to the Synthesis of Polysubstituted Cyclic Ethers. *Org Lett*. 2002 Jul 1;4(14):2329–32.
- 148a. Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed*. 2001 Jun 1;40(11):2004–21.
- 148b. Worrell BT, Malik JA, Fokin VV. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science*. 2013 Apr 26;340:457–60.
149. Huisgen R. Kinetics and Mechanism of 1,3-Dipolar Cycloadditions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1963 Nov 1;2(11):633–45.
150. Huisgen R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew Chem Int Ed Engl*. 1963 Oct 1;2(10):565–98.
151. Hebié S. Etudes électrochimiques des nanoparticules d'or: corrélation structure/activité [Internet]. Poitiers; 2013 [cited 2016 Oct 2]. Available from: <http://nuxeo.edel.univ-poitiers.fr/nuxeo/site/esupversions/3df7f6fb-d009-49d7-98e3-512ba9860281>
152. Ji X, Song X, Li J, Bai Y, Yang W, Peng X. Size control of gold nanocrystals in citrate reduction: the third role of citrate. *J Am Chem Soc*. 2007 Nov 14;129(45):13939–48.
153. Alkilany AM, Bani Yaseen AI, Kailani MH. Synthesis of Monodispersed Gold Nanoparticles with Exceptional Colloidal Stability with Grafted Polyethylene Glycol-g-polyvinyl Alcohol. *J Nanomater*. 2015 Feb 19;2015:e712359.
154. Mountrichas G, Pispas S, Kamitsos EI. Effect of Temperature on the Direct Synthesis of Gold Nanoparticles Mediated by Poly(dimethylaminoethyl methacrylate)

Homopolymer. *J Phys Chem C*. 2014 Oct 2;118(39):22754–9.

155. Noguez C. Surface Plasmons on Metal Nanoparticles: The Influence of Shape and Physical Environment. *J Phys Chem C*. 2007 Mar 1;111(10):3806–19.

156. Homola J, Yee SS, Gauglitz G. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens Actuators B Chem*. 1999 Jan 25;54(1–2):3–15.

157. Sugie A, Song H, Horie T, Ohmura N, Kanie K, Muramatsu A, et al. Synthesis of thiol-capped gold nanoparticle with a flow system using organosilane as a reducing agent. *Tetrahedron Lett*. 2012 Aug 15;53(33):4457–9.

158. Papp S, Kőrösi L, Gool B, Dederichs T, Mela P, Möller M, et al. Formation of gold nanoparticles in diblock copolymer micelles with various reducing agents. *J Therm Anal Calorim*. 2009 Nov 25;101(3):865–72.

159. Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. *Science*. 1992 Mar 20;255(5051):1523–31.

160. Torquato S, Truskett TM, Debenedetti PG. Is Random Close Packing of Spheres Well Defined? *Phys Rev Lett*. 2000 Mar 6;84(10):2064–7.

161. L H Dubois, Nuzzo and RG. Synthesis, Structure, and Properties of Model Organic Surfaces. *Annu Rev Phys Chem*. 1992;43(1):437–63.

162. Vivek JP, Burgess IJ. Quaternary Ammonium Bromide Surfactant Adsorption on Low-Index Surfaces of Gold. 1. Au(111). *Langmuir*. 2012 Mar 20;28(11):5031–9.

163. Bain CD, Evall J, Whitesides GM. Formation of monolayers by the coadsorption of thiols on gold: variation in the head group, tail group, and solvent. *J Am Chem Soc*. 1989;111(18):7155–7164.

164. Wang W, Wei Q-Q, Wang J, Wang B-C, Zhang S, Yuan Z. Role of thiol-containing polyethylene glycol (thiol-PEG) in the modification process of gold nanoparticles (AuNPs): Stabilizer or coagulant? *J Colloid Interface Sci*. 2013 Aug 15;404:223–9.

165. Heinrich T, Traulsen CH-H, Darlatt E, Richter S, Poppenberg J, Traulsen NL, et al. The versatility of “click” reactions: molecular recognition at interfaces. *RSC Adv*. 2014 Apr 10;4(34):17694–702.

166. LaBell RY, Jacobsen NE, Gervay-Hague J, O’Brien DF. Synthesis of Novel Glycolipids That Bind HIV-1 Gp120. *Bioconjug Chem*. 2002 Jan 1;13(1):143–9.

167. Chambers DJ, Evans GR, Fairbanks AJ. An approach to the synthesis of α -(1-6)-C-disaccharides by tandem Tebbe methylenation and Claisen rearrangement. *Tetrahedron* [Internet]. 2005 [cited 2016 Oct 14];61(30). Available from: <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=16909623>

168. Dalcanale E, Montanari F. Selective oxidation of aldehydes to carboxylic acids with sodium chlorite-hydrogen peroxide. *J Org Chem*. 1986 Feb 1;51(4):567–9.

169. Bodapati JB, Icil H. Highly soluble perylene diimide and oligomeric diimide dyes combining perylene and hexa(ethylene glycol) units: Synthesis, characterization, optical and electrochemical properties. *Dyes Pigments*. 2008 Dec;79(3):224–35.
170. Sato K, Anzai J. Fluorometric determination of sugars using fluorescein-labeled concanavalin A–glycogen conjugates. *Anal Bioanal Chem*. 2006 Feb 14;384(6):1297–301.
171. Homer KA, Beighton D. Fluorometric determination of bacterial protease activity using fluorescein isothiocyanate-labeled proteins as substrates. *Anal Biochem*. 1990 Nov 15;191(1):133–7.
172. Sjöback R, Nygren J, Kubista M. Absorption and fluorescence properties of fluorescein. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*. 1995 Jun 1;51(6):L7–21.
173. Smith DS, Hassan M, Nargessi RD. Principles and practice of fluoroimmunoassay procedures. In: *Modern fluorescence spectroscopy* [Internet]. Springer; 1981 [cited 2016 Oct 8]. p. 143–191. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-1092-1_4
174. Swierczewska M, Lee S, Chen X. The design and application of fluorophore–gold nanoparticle activatable probes. *Phys Chem Chem Phys PCCP*. 2011 Jun 7;13(21):9929–41.
175. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *Genome Res*. 1995 Jun 1;4(6):357–62.
176. Wei H, Li B, Li J, Wang E, Dong S. Simple and sensitive aptamer-based colorimetric sensing of protein using unmodified gold nanoparticle probes. *Chem Commun*. 2007 Sep 12;(36):3735–7.
177. Chen L, Wang Y, Fu X, Chen L. Fluorescent Nanoprobes. In: *Novel Optical Nanoprobes for Chemical and Biological Analysis* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2014 [cited 2016 Oct 8]. p. 49–74. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-43624-0_3
178. Cao X, Ye Y, Liu S. Gold nanoparticle-based signal amplification for biosensing. *Anal Biochem*. 2011 Oct 1;417(1):1–16.
179. He Y, Liang Y, Wang D. The highly sensitive and facile colorimetric detection of the glycidyl azide polymer based on propargylamine functionalized gold nanoparticles using click chemistry. *Chem Commun*. 2015 Jul 14;51(60):12092–4.
180. Zhu K, Zhang Y, He S, Chen W, Shen J, Wang Z, et al. Quantification of Proteins by Functionalized Gold Nanoparticles Using Click Chemistry. *Anal Chem*. 2012 May 15;84(10):4267–70.
181. Zhou Y, Wang S, Zhang K, Jiang X. Visual Detection of Copper(II) by Azide- and Alkyne-Functionalized Gold Nanoparticles Using Click Chemistry. *Angew Chem Int Ed*.

2008 Sep 15;47(39):7454–6.

182. Boisselier E, Salmon L, Ruiz J, Astruc D. How to very efficiently functionalize gold nanoparticles by “click” chemistry. *Chem Commun.* 2008 Nov 30;(44):5788–90.
183. Locatelli E, Ori G, Fournelle M, Lemor R, Montorsi M, Comes Franchini M. Click Chemistry for the Assembly of Gold Nanorods and Silver Nanoparticles. *Chem – Eur J.* 2011 Aug 8;17(33):9052–6.
184. Ogasawara Y, Murai Y, Sakihama Y, Hashidoko Y, Hashimoto M. Quantitative Determination of Click Reaction in the Presence of Glycine Derivatives and in Dilute Solution. *Int J Org Chem.* 2012;2(3):302–4.
185. Fischler M, Sologubenko A, Mayer J, Clever G, Burley G, Gierlich J, et al. Chain-like assembly of gold nanoparticles on artificial DNA templates via “click chemistry.” *Chem Commun.* 2008;(2):169–71.
186. Finetti C, Sola L, Pezzullo M, Prosperi D, Colombo M, Riva B, et al. Click Chemistry Immobilization of Antibodies on Polymer Coated Gold Nanoparticles. *Langmuir.* 2016 Jul 26;32(29):7435–41.
187. Heuer-Jungemann A, Kirkwood R, El-Sagheer AH, Brown T, Kanaras AG. Copper-free click chemistry as an emerging tool for the programmed ligation of DNA-functionalised gold nanoparticles. *Nanoscale.* 2013 Aug 21;5(16):7209–12.
188. Kubin RF, Fletcher AN. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes. *J Lumin.* 1982 Dec 1;27(4):455–62.
189. Kemnitz K, Tamai N, Yamazaki I, Nakashima N, Yoshihara K. Fluorescence decays and spectral properties of rhodamine B in submono-, mono-, and multilayer systems. *J Phys Chem.* 1986 Oct 1;90(21):5094–101.
190. Wu J, Gao C. Click Chemistry Approach to Rhodamine B-Capped Polyrotaxanes and their Unique Fluorescence Properties. *Macromol Chem Phys.* 2009 Oct 22;210(20):1697–708.
191. Hao L, Zhao Q. A fluorescein labeled aptamer switch for thrombin with fluorescence decrease response. *Anal Methods.* 2015 Apr 30;7(9):3888–92.
192. Guo Y-L, Yan H-T, Pei R-H. [Quenching effect of gold nanoparticles for fluorescein sodium]. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi Guang Pu.* 2008 Feb;28(2):380–3.
193. Rumbaugh G, Miller CA. Epigenetic Changes in the Brain: Measuring Global Histone Modifications. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2011;670:263–74.
194. Brinet A, Fournel C, Faure JR, Venet C, Monier JC. Anti-histone antibodies (ELISA and immunoblot) in canine lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1988 Oct;74(1):105–9.
195. Robyr D, Grunstein M. Genomewide histone acetylation microarrays. *Methods.*

2003 Sep;31(1):83–9.

196. Spencer VA, Sun J-M, Li L, Davie JR. Chromatin immunoprecipitation: a tool for studying histone acetylation and transcription factor binding. *Methods*. 2003 Sep;31(1):67–75.
197. Collas P. The Current State of Chromatin Immunoprecipitation. *Mol Biotechnol*. 2010 Jan 14;45(1):87–100.
198. Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF. Characterization of histones and their post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr Opin Chem Biol*. 2007 Feb;11(1):66–73.
199. Britton L-MP, Gonzales-Cope M, Zee BM, Garcia BA. Breaking the histone code with quantitative mass spectrometry. *Expert Rev Proteomics*. 2011 Oct;8(5):631–43.
200. Lin L, Hom D, Lindsay SM, Chaput JC. In Vitro Selection of Histone H4 Aptamers for Recognition Imaging Microscopy. *J Am Chem Soc*. 2007 Nov 28;129(47):14568–9.
201. Lin L, Fu Q, Williams BAR, Azzaz AM, Shogren-Knaak MA, Chaput JC, et al. Recognition Imaging of Acetylated Chromatin Using a DNA Aptamer. *Biophys J*. 2009 Sep 16;97(6):1804–7.
202. Williams BAR, Lin L, Lindsay SM, Chaput JC. Evolution of a histone H4-K16 acetyl-specific DNA aptamer. *J Am Chem Soc*. 2009 May 13;131(18):6330–1.
203. Zhen Z, Tang L-J, Long H, Jiang J-H. Enzymatic Immuno-Assembly of Gold Nanoparticles for Visualized Activity Screening of Histone-Modifying Enzymes. *Anal Chem*. 2012 Apr 17;84(8):3614–20.
204. Hutter E, Maysinger D. Gold-nanoparticle-based biosensors for detection of enzyme activity. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Sep;34(9):497–507.
205. Arnold RM, McNitt CD, Popik VV, Locklin J. Direct grafting of poly(pentafluorophenyl acrylate) onto oxides: versatile substrates for reactive microcapillary printing and self-sorting modification. *Chem Commun*. 2014 Apr 22;50(40):5307–9.
206. Steinem C, Janshoff A, von dem Bruch K, Reihls K, Goossens J, Galla H-J. Valinomycin-mediated transport of alkali cations through solid supported membranes. *Bioelectrochem Bioenerg*. 1998 Mar;45(1):17–26.
207. Pan H, Grow ME, Wilson O, Daniel M-C. A new poly(propylene imine) dendron as potential convenient building-block in the construction of multifunctional systems. *Tetrahedron*. 2013 Apr 1;69(13):2799–806.
208. Snow AW, Foos EE. Conversion of Alcohols to Thiols via Tosylate Intermediates. *Synthesis*. 2003;2003(4):0509–12.
209. Leaver DJ, Dawson RM, White JM, Polyzos A, Hughes AB. Synthesis of 1,2,3-

- triazole linked galactopyranosides and evaluation of cholera toxin inhibition. *Org Biomol Chem*. 2011 Nov 23;9(24):8465–74.
210. Greene TW, Wuts PGM. *Protective groups in organic synthesis*. Wiley-Interscience; 2002.
211. Gobbo P, Luo W, Cho SJ, Wang X, Biesinger MC, Hudson RHE, et al. Small gold nanoparticles for interfacial Staudinger–Bertozzi ligation. *Org Biomol Chem*. 2015;13(15):4605–12.
212. Zhang H, Li X, Shi Q, Li Y, Xia G, Chen L, et al. Highly Efficient Synthesis of Monodisperse Poly(ethylene glycols) and Derivatives through Macrocyclization of Oligo(ethylene glycols). *Angew Chem*. 2015 Mar 16;127(12):3834–8.
213. Woghiren C, Sharma B, Stein S. Protected thiol-polyethylene glycol: A new activated polymer for reversible protein modification. *Bioconjug Chem*. 1993 Sep 1;4(5):314–8.
214. Beaussart A, Abellán-Flos M, El-Kirat-Chatel S, Vincent SP, Dufrêne YF. Force Nanoscopy as a Versatile Platform for Quantifying the Activity of Antiadhesion Compounds Targeting Bacterial Pathogens. *Nano Lett*. 2016 Feb 10;16(2):1299–307.
215. Liu G, Baker GL. Structure-directed self-assembly of alkyl-aryl-ethylene oxide amphiphiles. *Soft Matter*. 2008 Apr 15;4(5):1094–101.
216. Zhang Q, Ren H, Baker GL. A practical and scalable process to selectively monofunctionalize water-soluble α,ω -diols. *Tetrahedron Lett*. 2014 May;55(22):3384–6.
217. Corey EJ, Venkateswarlu A. Protection of hydroxyl groups as tert-butyltrimethylsilyl derivatives. *J Am Chem Soc*. 1972 Aug 1;94(17):6190–1.
218. Kikkeri R, Lepenies B, Adibekian A, Laurino P, Seeberger PH. In Vitro Imaging and in Vivo Liver Targeting with Carbohydrate Capped Quantum Dots. *J Am Chem Soc*. 2009 Feb 18;131(6):2110–2.
219. Kennedy ZC, Lisowski CE, Mitaru-Berceanu DS, Hutchison JE. Influence of Ligand Shell Composition upon Interparticle Interactions in Multifunctional Nanoparticles. *Langmuir*. 2015 Nov 24;31(46):12742–52.
220. Delamarche E, Donzel C, Kamounah FS, Wolf H, Geissler M, Stutz R, et al. Microcontact Printing Using Poly(dimethylsiloxane) Stamps Hydrophilized by Poly(ethylene oxide) Silanes. *Langmuir*. 2003 Oct 1;19(21):8749–58.
221. Combemale S, Assam-Evoung J-N, Houaidji S, Bibi R, Barragan-Montero V. Gold nanoparticles decorated with mannose-6-phosphate analogues. *Mol Basel Switz*. 2014;19(1):1120–49.
222. Elkin I, Rabanel J-M, Hildgen P. Influence of Hydrophobic Dendrimer Core Structure on the Itraconazole Encapsulation Efficiency. *Macromol Chem Phys*. 2015 Dec;216(24):2356–67.

223. Lin YA, Chalker JM, Floyd N, Bernardes GJL, Davis BG. Allyl Sulfides Are Privileged Substrates in Aqueous Cross-Metathesis: Application to Site-Selective Protein Modification. *J Am Chem Soc.* 2008 Jul 1;130(30):9642–3.
224. Park KD, Morieux P, Salomé C, Cotten SW, Reamtong O, Eysers C, et al. Lacosamide Isothiocyanate-Based Agents: Novel Agents To Target and Identify Lacosamide Receptors. *J Med Chem.* 2009 Nov 12;52(21):6897–911.
225. Pintér G, Bereczki I, Roth E, Sipos A, Varghese R, Udo EE, et al. The effect of systematic structural modifications on the antibacterial activity of novel oxazolidinones. *Med Chem Shāriqah United Arab Emir.* 2011 Jan;7(1):45–55.
226. Zhao N, Roesler S, Kissel T. Synthesis of a new potential biodegradable disulfide containing poly(ethylene imine)–poly(ethylene glycol) copolymer cross-linked with click cluster for gene delivery. *Int J Pharm.* 2011 Jun 15;411(1–2):197–205.
227. Gerencsér J, Báthori N, Czugler M, Huszthy P, Nógrádi M. Synthesis of new optically active pyridino- and pyridono-18-crown-6 type ligands containing four lipophilic chains. *Tetrahedron Asymmetry.* 2003 Sep 19;14(18):2803–11.
228. Szabó T, Hirsch E, Tóth T, Huszthy P. Synthesis and transport studies of new enantiopure lipophilic crown ethers containing a diarylphosphinic acid unit. *Tetrahedron Asymmetry.* 2014 Nov 30;25(22):1443–9.
229. Dreaden EC, Gryder BE, Austin LA, Tene Defo BA, Hayden SC, Pi M, et al. Antiandrogen Gold Nanoparticles Dual-Target and Overcome Treatment Resistance in Hormone-Insensitive Prostate Cancer Cells. *Bioconjug Chem.* 2012 Aug 15;23(8):1507–12.
230. Liu W, Zhang Y, Hou S, Zhao ZK. Synthesis of isoprenoid chain-contained chemical probes for an investigation of molecular interactions by using quartz crystal microbalance. *Tetrahedron Lett.* 2013 Nov 13;54(46):6208–10.

